

Identifikation von Interaktionspartnern des Cathepsin X und deren funktionelle Charakterisierung im Magenkarzinom

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Anne Teller

geboren am 21.04.1984 in Magdeburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Albert Roessner

2. Prof. Dr. Thomas Reinheckel

eingereicht am: 28.05.2013

verteidigt am: 16.12.2013

Meiner Familie gewidmet

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind, wie sie sind.

-Aristoteles

Publikationen

Teile dieser Promotionsarbeit wurden bereits wie folgt publiziert:

Poster:

Teller, A., Roessner, A., Krueger, S. Identification of novel interaction partners of human cathepsin X in gastric cancer. ESF Embo Symposium in Sant Feliu de Guixols, Spanien, 2010

Teller, A., Kuester, D., Hartig, R., Roessner, A., Krueger, S. Interaction of Cathepsin X with Galectin-2 in *H. pylori*-dependent gastric carcinogenesis. 96. Jahrestagung der DGP in Berlin 2012.

Teller, A., Kuester, D., Hartig, R., Roessner, A., Krueger, S. Interaction of cathepsin X with RPLP0 in gastric carcinogenesis. 97. Jahrestagung der DGP in Heidelberg 2013.

Vortrag:

Teller, A., Roessner, A., Krueger, S. Identification of novel interaction partners of human cathepsin X in gastric cancer. 95. Jahrestagung der DGP in Leipzig 2011.

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis.....
II	Tabellenverzeichnis
III	Abbildungsverzeichnis.....
1	Einleitung.....	1
1.1	Cathepsine.....	1
1.1.1	Aufbau humaner Cathepsine.....	1
1.1.2	Biologische Funktionen von humanen Cathepsinen.....	2
1.2	Cathepsin X	4
1.2.1	Struktur und Aktivität von Cathepsin X.....	4
1.2.2	Biologische Funktionen von Cathepsin X	5
1.2.3	Cathepsin X in der Magenkarzinogenese (Entzündung → Karzinom)	6
1.3	Modelle zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen	7
1.3.1	<i>Yeast Two-Hybrid System</i>	8
1.4	Zielsetzung der Arbeit	10
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Materialien.....	12
2.1.1	Zelllinien.....	12
2.1.2	Bakterien- und Hefestämme	12
2.1.3	Plasmide und Vektoren.....	13
2.1.4	Enzyme	13
2.1.5	Kitsysteme	13
2.1.6	Chemikalien.....	14
2.1.7	Labormaterialien.....	15
2.1.8	Geräte.....	15
2.1.9	Antikörper.....	16
2.1.10	Puffer, Lösungen und Reagenzien	17
2.1.10.1	Mikrobielle Nährmedien.....	17
2.1.11	Oligonukleotide	17
2.1.12	Molekulare Standardmarker	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Zellkultur	19
2.2.1.1	Zellzucht und Zellpassagierung.....	19

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.2	Zellernte.....	19
2.2.1.3	Fixieren der Zellen auf Kulturplatten und <i>cover-slips</i>	20
2.2.1.4	Zellextraktion als Vorbereitung auf die magnetische Co-Immunopräzipitation ...	20
2.2.1.5	Co-Transfektion in Hek293 Zellen für die chemilumineszente Co-IP.....	21
2.2.1.6	siRNA-Behandlung an N87- und HepG2-Zellen	21
2.2.2	Durchflusszytometrische-Messungen (FACS-Messungen)	22
2.2.2.1	Zellernte und Fixierung der Zellen für FACS-Messungen.....	22
2.2.2.2	Propidiumiodid-Färbung adhärenter Zellen zur Analyse des Zellzyklus	22
2.2.3	Immunhistochemische Färbungen	23
2.2.3.1	<i>Triple</i> Immuno-Färbung	23
2.2.3.2	Immunhistochemische Färbung von Parafin-Gewebeschnitten (ABC-peroxidase Färbung)	24
2.2.4	Isolation von Nukleinsäuren	25
2.2.4.1	RNA-Isolation aus Gewebe	25
2.2.4.2	Plasmid-DNA-Isolation aus Bakterien	25
2.2.4.3	Plasmid-Isolation aus Hefen	25
2.2.5	Quantifikation von Nukleinsäuren.....	25
2.2.5.1	Agarose Gelelektrophorese.....	26
2.2.5.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.2.6	Klonierung	27
2.2.6.1	Herstellung von DNA-Fragmenten durch PCR.....	27
2.2.6.2	Restriktion der Plasmide.....	28
2.2.6.3	Ligation der Plasmide mit dem DNA-Insert.....	28
2.2.7	Mikrobiologische Methoden.....	29
2.2.7.1	Bakterientransformation	29
2.2.7.2	Hefetransformation	29
2.2.7.3	Anlegung von mikrobiellen Stocks	30
2.2.7.4	Überprüfung der DNA-BD-Fusionsproteine auf Toxizität in der Hefe.....	30
2.2.8	Aufbau der cDNA-Bibliothek.....	30
2.2.8.1	Überprüfung der RNA	31
2.2.8.2	<i>First-Strand</i> cDNA-Synthese	31
2.2.8.3	Amplifikation der ds cDNA mittels der <i>Long Distance-PCR</i> (LD-PCR)	31
2.2.8.4	Reinigung der ds cDNA.....	32
2.2.8.5	Sequentielle Transformation.....	32
2.2.8.6	Kontrollen für die Bibliotheks-Transformation.....	33
2.2.9	<i>Yeast Two-Hybrid Screening</i> mittels <i>Yeast Mating</i>	34

Inhaltsverzeichnis

2.2.10	Proteinbiochemische Methoden.....	35
2.2.10.1	Zellaufschluss	35
2.2.10.2	Proteinbestimmung	36
2.2.10.3	SDS-PAGE	36
2.2.10.4	Westernblot.....	37
2.2.10.5	Strippen der Membranen	37
2.2.10.6	Magnetische Co-Immunopräzipitation	38
2.2.10.7	Chemilumineszente Co-Immunopräzipitation.....	38
2.2.11	Statistik	38
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Anlegen einer cDNA-Bibliothek für das <i>Yeast Two-Hybrid Screening</i>	40
3.2	<i>Yeast Two-Hybrid</i> System	43
3.2.1	Konstruktion eines DNA-BD/ <i>bait</i> -Fusionsproteins	44
3.2.2	Detektion der <i>bait</i> -Expression	44
3.2.3	Test des <i>bait</i> -Fusionsproteins auf Autoaktivierung und Toxizität	45
3.2.4	Bibliothek <i>Screening</i> mittels Hefe-Verpaarung (<i>Yeast-Mating</i>)	46
3.2.5	Analyse der positiven Klone.....	47
3.2.5.1	Kolonie-PCR	48
3.2.5.2	<i>Rescue</i> und Isolierung der Bibliotheks-Plasmide	49
3.2.5.3	Unterscheidung von falsch positiven Klonen	50
3.2.5.4	Sequentielle Transformation.....	53
3.3	Chemilumineszente Co-Immunopräzipitation.....	56
3.3.1	Klonierung des pAcGFP1-C <i>bait</i> und des pProLabel-C <i>prey</i>	56
3.3.2	Verifizierung der pAcGFP1-C <i>bait</i> und der pProLabel-C <i>prey</i> -Expression	56
3.4	Ko-Lokalisation von CTSX und MUC6, RPLP0 und LGALS2 im humanen Magenkarzinomgewebe.....	60
3.5	Co-Immunopräzipitation.....	62
3.5.1	Gewebe Co-Immunopräzipitation	62
3.5.2	Co-Immunopräzipitation an N87-Magenkarzinomzellen.....	63
3.6	Charakterisierung der Interaktion von CTSX mit Galectin-2 (LGALS2)	63
3.6.1	LGALS2-Expression in humanem Gewebe	64
3.6.2	LGALS2-Expression in <i>H. pylori</i> -negativer und -positiver Gastritis und im Magenkarzinom	65
3.6.3	Ko-Lokalisation von LGALS2/CTSX im Zellkulturmodell	66
3.6.4	<i>Knockdown</i> von CTSX in HepG2-Zellen	66
3.7	Charakterisierung der Interaktion von CTSX mit RPLP0	68

Inhaltsverzeichnis

3.7.1	RPLP0-Expression in humanem Gewebe.....	68
3.7.2	RPLP0-Expression in <i>H. pylori</i> -negativer und -positiver Gastritis und im Magenkarzinom.....	69
3.7.3	Ko-Lokalisation von RPLP0/CTSX im Zellkulturmodell.....	70
3.7.4	<i>Knockdown</i> von CTSX in N87-Zellen.....	71
3.7.5	Analyse des Zellzyklus mittels <i>Knockdown</i> von RPLP0 in N87-Zellen.....	73
3.7.6	Analyse des Zellzyklus mittels <i>Knockdown</i> von CTSX in N87-Zellen.....	75
3.7.7	Doppelter <i>Knockdown</i> von CTSX und RPLP0 in N87-Zellen.....	77
3.7.8	Analysen von Zellzyklusproteinen nach Herunterregulierung von CTSX und RPLP0.....	80
4	Diskussion.....	84
4.1	Potentielle Interaktion mit MUC6.....	84
4.2	Charakterisierung der Interaktion von Cathepsin X und Galectin-2.....	86
4.2.1	Galectine.....	86
4.2.2	Galectine und ihr Expressionsprofil im Magen.....	87
4.2.2.1	Expression von Galectin-2 im Magengewebe.....	87
4.2.2.2	Untersuchung der <i>H. pylori</i> -abhängigen Galectin-2-Expression.....	88
4.2.3	Ko-Lokalisation von Galectin-2/Cathepsin X im Zellkulturmodell.....	89
4.2.4	Inverse Regulation von Cathepsin X und Galectin-2 in HepG2-Zellen.....	90
4.3	Charakterisierung der Interaktion von Cathepsin X und RPLP0.....	91
4.3.1	Ribosomale Phosphoproteine.....	91
4.3.2	Ribosomale Proteine im Magen.....	92
4.3.3	Expression von RPLP0 im humanen Magengewebe.....	93
4.3.4	Untersuchung der RPLP0-Expression im Verlauf der Karzinogenese.....	94
4.3.5	Einfluss der Cathepsin X-Defizienz auf die RPLP0-Expression.....	94
4.3.6	Einfluss von RPLP0 und Cathepsin X auf den Zellzyklus.....	95
4.3.6.1	Einfluss von RPLP0 und Cathepsin X auf Zellzyklusregulatoren.....	98
5	Zusammenfassung.....	102
	Abstract.....	104
6	Literaturverzeichnis.....	105
7	Anhang.....	122
7.1	Plasmidkarten.....	122
7.1.1	pGADT7-Rec Plasmid für den Aufbau der cDNA-Bibliothek.....	122
7.1.2	Kontrollplasmide für den <i>Yeast Two-Hybrid Assay</i>	123

Inhaltsverzeichnis

7.1.3	pGBKT7 Plasmid für die Klonierung mit CTSX im <i>Two-Hybrid Assay</i>	124
7.1.4	Plasmidkarten für die chemilumineszente Co-IP	124
7.2	Konstruktion des DNA-BD/ <i>bait</i> -Fusionsproteins	125
7.2.1	Sequenzen und Referenzen der Klone 4 und 5	125
7.3	Sequenzen des AD <i>Library Screening</i>	130
Danksagung		132
Curriculum Vitae		134
Erklärung		135

I Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AD	Aktivierungsdomäne
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure/n
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	<i>Complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
cfu	Kolonie-bildende-Einheit (<i>colony forming unit</i>)
Chk1/2	<i>Checkpoint kinase</i> ½
Cip/Kip	<i>CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein</i>
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CTSX	Cathepsin X
CXCL-12	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand 12
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dd. H ₂ O	deionisiertes Wasser (Milli-Q-Anlage)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle`s media</i>
DO-Medium	<i>Dropout</i> Medium, Mixture aus spezifischen Aminosäuren und Nucleosiden, wird zur Unterstützung mit SD-Base benutzt, um SD-Medium herzustellen
DDO-Medium	zweifach <i>dropout</i> Medium: SD/-Leu/-Trp
DDO/X/A-Medium	zweifach <i>dropout</i> Medium: SD/-Leu/-Trp mit X- α -Gal und Aureobasidin A
DTT	Dithiothreitol
ds	<i>double strand</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERGIC-53	<i>ER-Golgi intermediate compartment 53 kD protein/lectin</i>
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FITC	Fluoresceinthiocyanat
h	Stunde/n
HCl	Salzsäure
<i>H. p./H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HIER	<i>Heat Induced Epitope Retrieval</i>
INK4	Inhibitoren der CDK4 Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kb	Kilobase(n)
kDa	Kilo-Dalton

Abkürzungsverzeichnis

LFA-1	<i>Leukocyte function-associated antigen 1</i>
LGALS2	Galectin-2
Min	Minute/n
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEROPS	<i>Database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors</i>
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MMP-1	Matrixmetalloproteine 1
mRNA	<i>Messenger/Boten-RNA</i>
MUC6	Mucin-6
MW	Mittelwert
N-Terminus	aminoterminales Ende
ORF	<i>Open-reading-frame</i>
p	Wahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pm	picomol
QDO	vierfach <i>dropout</i> Medium: SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp
Rb	Retinoblastom
RLU	<i>Relative light units</i>
RPLP0	Ribosomales Phosphoprotein P0
RPLP1	Ribosomales Phosphoprotein 1
RPLP2	Ribosomales Phosphoprotein 2
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>round per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
SD-Medium	minimales synthetisches Medium für Hefen
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	<i>single strand</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween20
TDO	dreifach <i>dropout</i> Medium: SD/-His/-Leu/-Trp o. SD/-Ade/-Leu/-Trp
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
uPA	Urokinase Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinase Plasminogenaktivator Rezeptor
ÜN	über Nacht
Vol	Volumen
YPD	Wachstumsmedium für Hefen (Gemisch aus Hefeextrakt, Pepton und Dextrose)
YPDA	YPD-Medium versetzt mit Adenin Hemisulphat
z. B.	zum Beispiel

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien	12
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme	12
Tabelle 3: Verwendete Plasmide und Vektoren	13
Tabelle 4: Verwendete Kitsysteme	13
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien	14
Tabelle 6: Verwendete Labormaterialien	15
Tabelle 7: Verwendete Geräte	15
Tabelle 8: Verwendete Primär-Antikörper	16
Tabelle 9: Verwendete Sekundär-Antikörper	16
Tabelle 10: Verwendete Nährmedien und Lösungen	17
Tabelle 11: Verwendete PCR-Primer	17
Tabelle 12: Verwendete Klonierungsprimer	17
Tabelle 13: Verwendete Sequenzierungsprimer	18
Tabelle 14: Zellzahlbedingungen für die siRNA	21
Tabelle 15: PCR-Ansatz und Programm	26
Tabelle 16: PCR-Ansatz und Programm der <i>In-Fusion Cloning</i> PCR	27
Tabelle 17: PCR-Ansatz der <i>Long Distance-PCR</i> und Programm	31
Tabelle 18: Positiv- und Negativkontrolle für die Bibliotheksherstellung	33
Tabelle 19: Zusammensetzung der verschiedenen Trenngele und des Sammelgels	36
Tabelle 20: Transformation von pGADT7-Rec mit <i>SV40 large T</i> PCR-Fragment	43
Tabelle 21: Test auf Autoaktivierung des <i>bait</i> -Proteins	45
Tabelle 22: Auswertung des <i>Yeast-Mating</i>	47
Tabelle 23: Auflistung der einzelnen Klone mit dem <i>AD Library Insert</i>	49
Tabelle 24: Co-Transformation von pGBKT7/CTSX und <i>prey/AD Library</i> in Y2H Gold	51
Tabelle 25: Nukleotid- und Protein-Homologie der positiven <i>AD-Library</i> Klone	52
Tabelle 26: Auswertung der sequentiellen Transformation	54

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturelle Übersicht der Cathepsine mit Exopeptidaseaktivität (Cathepsine H, C, B, und X).....	2
Abbildung 2: Strukturübersicht von humanem CTSX.....	5
Abbildung 3: Das <i>Yeast Two-Hybrid</i> System.....	8
Abbildung 4: Homologe Rekombination der cDNA mit dem <i>prey</i> -Vektor.....	40
Abbildung 5: <i>First Strand</i> cDNA-Synthese.....	41
Abbildung 6: Hoch-qualitative cDNA mit Hilfe der SMART Technologie amplifiziert.....	42
Abbildung 7: Detektion der <i>bait</i> -Expression.....	44
Abbildung 8: <i>Yeast-Mating</i> mit typischer Zygotenbildung.....	46
Abbildung 9: Kolonie PCR der Klone 1 - 15.....	48
Abbildung 10: Kolonie PCR der Klone 16 - 30.....	48
Abbildung 11: Kolonie PCR der Klone 31 - 50.....	49
Abbildung 12: Minipräparation des <i>Library Rescues</i>	50
Abbildung 13: Minipräparation des <i>Library Rescues</i>	50
Abbildung 14/15: <i>Amplimer</i> PCR I/II zu Re-Klonierung in pGADT7.....	54
Abbildung 16: Verifizierung der AcGFP1-C <i>bait</i> -Expression in HEK293-T Zellen.....	57
Abbildung 17: Verifizierung der pProLabel-C Expression.....	58
Abbildung 18: Interaktion von CTSX mit verschiedenen humanen Proteinen.....	60
Abbildung 19: Ko-Lokalisation von MUC6, RPLP0 und LGALS2 mit CTSX in humanem Magenkarzinomgewebe.....	61
Abbildung 20: Gewebe Co-Immunopräzipitation.....	62
Abbildung 21: N87 Co-Immunopräzipitation mit einem.....	63
Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis mit anti-LGALS2.....	64
Abbildung 23: Untersuchung der LGALS2-Expression an <i>H. pylori</i> +/- Gastritis.....	65
Abbildung 24: CTSX und LGALS2 Doppelfluoreszenz an HepG2-Zellen.....	66
Abbildung 25 A) und B): <i>Knockdown</i> von CTSX in HepG2-Zellen.....	67
Abbildung 26: CTSX siRNA behandelte HepG2-Zellen (24 h, 48 h).....	68
Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis der RPLP0-Expression mit anti-RPLP0....	69
Abbildung 28: Untersuchung der RPLP0-Expression an <i>H. pylori</i> +/- Gastritis und am Magenkarzinom.....	70
Abbildung 29: CTSX und RPLP0 Doppelfluoreszenz an N87-Zellen.....	71
Abbildung 30 A) und B): <i>Knockdown</i> von CTSX in N87-Zellen.....	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31: CTSX siRNA behandelte N87-Zellen (24 h, 48 h).	73
Abbildung 32: A) Zellzyklusanalysen nach RPLP0 siRNA-Behandlung.	75
Abbildung 33: A) Zellzyklusanalysen nach CTSX siRNA-Behandlung.	77
Abbildung 34: A) Zellzyklusanalysen nach RPLP0/CTSX siRNA-Behandlung.....	79
Abbildung 35: RPLP0 siRNA Westernblotanalysen.....	81
Abbildung 36: CTSX siRNA Westernblotanalysen.	82
Abbildung 37: CTSX/RPLP0 siRNA Westernblotanalysen.	83
Abbildung 38: Schematische Übersicht der Galectin-Familie.	86
Abbildung 39: Übersicht der humanen Phosphoproteine P0, P1 und P2.....	92
Abbildung 40: Die Phasen des Zellzyklus.....	96
Abbildung 41: Regulation des G1/S Kontrollpunktes.....	99
Abbildung 42: Restriktionskarte und Klonierungsstellen von pGADT7-Rec.....	122
Abbildung 43: Plasmidkarte vom pGBKT7-p53 DNA-BD Kontrollplasmid.	123
Abbildung 44: Plasmidkarte vom pGADT7-T AD Kontrollplasmid.	123
Abbildung 45: Plasmidkarte vom pGBKT7 DNA-BD Fusionsplasmid.	124
Abbildung 46: Plasmidkarte für den Klonierungsvektor pAcGFP1-C.....	124
Abbildung 47: Plasmidkarte für den Klonierungsvektor pProLabel-C.....	125

1 Einleitung

1.1 Cathepsine

Den Begriff Cathepsine prägten 1929 erstmals Willstätter und Bamann und entlehnten ihn dem griechischen Wort „καθῆσθαι“ für „verdauen“ [1].

Cathepsine sind Proteasen, die primär in den Lysosomen lokalisiert sind und dort für eine intrazelluläre Proteindegradation sorgen [2]. Derzeitig sind 11 Vertreter der humanen, lysosomalen Cathepsine bekannt. Cathepsine gehören zur Klasse der Cysteinpeptidasen, denen ein Cysteinrest im aktiven Zentrum gemeinsam ist und die anhand ihrer evolutionären Verwandtschaft in fünf verschiedene so genannte Clans unterteilt werden: CA, CB, CC, CD und CE. Der CA Clan beinhaltet die Untergruppe der Papainfamilie C1, welche sich in die C1B Familie, bestehend aus Enzymen, die mit den Bleomycinhydrolasen verwandt sind, und die C1A Familie, Peptidasen, die dem Enzym Papain ähneln, spaltet [3; 4]. Zur C1A Familie gehören auch die Cathepsine B, C, F, H, L, K, O, S, V, W und X [5].

1.1.1 Aufbau humaner Cathepsine

Cathepsine besitzen ihre optimale Aktivität im schwach sauren und reduzierenden Milieu der Lysosomen und teilen aufgrund ihrer Verwandtschaft zu den Papain-verwandten Enzymen ähnliche Aminosäuresequenzen und Tertiärstrukturen [6]. Alle Cysteinproteasen tragen für die Spaltung einer Peptidbindung im aktiven Zentrum sowohl einen Cystein- als auch einen Histidinrest. Der Cysteinrest dient als Nucleophil und die Spaltung der Peptidbindung wird initiiert, indem das Proton der Thiolgruppe des Cysteins auf den Stickstoff des Histidins übertragen wird [7].

Cathepsine treten als Monomere mit einer Molekülgröße von ca. 30 kDa auf - mit Ausnahme des tetramerschen Cathepsin C. Sie besitzen eine Zwei-Domänen-Struktur, wobei die linke (L-) Domäne von 3 α -Helices dominiert wird und die rechte (R-) Domäne auf einem β -barrel-Motiv, das aus β -Faltblättern besteht, basiert [8]. Die Interaktion zwischen diesen Domänen ist spezifisch für jedes Cathepsin und weist sowohl einen hydrophilen als auch einen hydrophoben Charakter auf [7]. Ähnlich wie auch andere Proteasen bestehen Cathepsine aus einem Signalpeptid, einem Propeptid und der katalytischen Domäne [9]. Dabei werden die Cathepsine als inaktive Vorstufen (Präproenzyme) synthetisiert, mit Hilfe des Signalpeptides über den Mannose-6-Phosphat-Weg zu den Lysosomen transportiert und über die

proteolytische Spaltung des N-terminalen Propeptides aktiviert [10]. Die Abspaltung des Propeptides erfolgt entweder durch weitere Proteasen, wie z. B. Pepsin oder Cathepsin D, oder wird durch die autokatalytische Aktivierung im sauren pH-Bereich erreicht [6].

Der größte Teil der Cathepsine besteht aus Endopeptidasen (Cathepsine F, L, K, O, S). Ausnahmen sind - Cathepsin C und H (Aminopeptidasen), Cathepsin X (Carboxy-mono oder -dipeptidase) und Cathepsin B (Carboxydipeptidase) [11; 12]. Des Weiteren weisen die Cathepsine B und H zusätzlich eine Endopeptidaseaktivität auf [11]. Exopeptidasen (Cathepsine B, C, H und X) besitzen die Möglichkeit, die Bindung längerer Peptidsubstrate zu verhindern (Abbildung 1). Dies ermöglicht es den Substraten durch elektrostatische Interaktionen, sich über den N- oder C-Terminus des Cathepsins, zu binden.

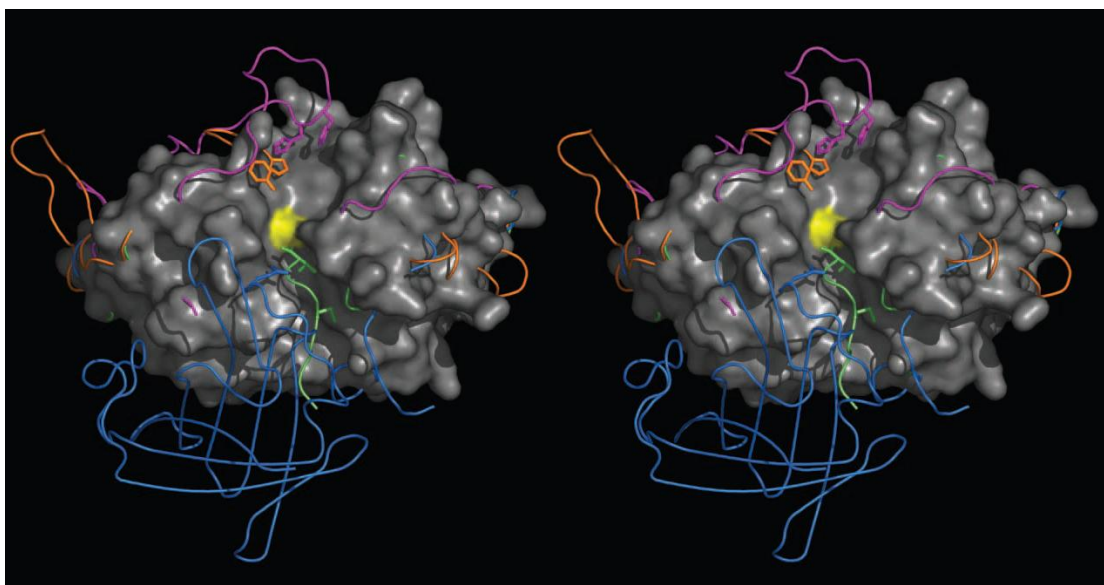


Abbildung 1: Strukturelle Übersicht der Cathepsine mit Exopeptidaseaktivität (Cathepsine H, C, B, und X).

Die Strukturen der Cathepsine H, C, B und X sind in grün, blau, magenta und orange dargestellt. Ihre Übereinanderlagerung findet auf der Oberfläche von Cathepsin L (grau) am katalytischen Cysteinrest (gelb) statt [7].

1.1.2 Biologische Funktionen von humanen Cathepsinen

Obwohl Cathepsine hauptsächlich für die intrazelluläre Proteindegradation in Lysosomen zuständig sind, wird vermutet, dass sich ihre enzymatischen Substrate und Funktionen mit einem Wechsel der Lokalität verändern. Extrazelluläre Rollen für Cysteincathepsine liegen in der Spaltung von extrazellulären Matrixproteinen, wie z. B. Laminin [13; 14], Kollagen Typ IV [13], Tenascin C [15] und Zelladhäsionsproteinen wie E-Cadherin [16]. Des Weiteren sind sie in der Lage, Pro-Enzyme wie den Pro-Urokinaseplasminogenaktivator (pro-uPA) [17] zu

aktivieren und damit die Proteolyse zu verstärken. Zusammen mit dem Rezeptor uPAR (uPA-Rezeptor) ist uPA ein potenter Effektor beim Abbau der extrazellulären Matrix (EZM). Durch dieses Zusammenspiel können weitere Proteasen, wie z. B. Plasminogen und Matrixmetalloproteasen (MMPs) aktiviert werden und sich an der Degradation der EZM beteiligen [18].

Aufgrund ihrer Spezifität beinhalten bestimmte Cathepsine vielfältige Funktionen außerhalb des lysosomalen Umfeldes. Dazu gehören unter anderem die Cathepsine B, H und L, die ubiquitär in Säugetierzellen vorkommen [19]. Die Cathepsine S, V und K dagegen weisen mit einer limitierten Gewebeexpression auf teilweise spezifische Aufgaben hin. Cathepsin S spielt zusammen mit Cathepsin L eine Rolle bei der Prozessierung des MHC-Klasse-II-Komplexes [20] und Cathepsin F scheint diesen Prozess in Makrophagen zu beeinflussen [21]. Die Expression von Cathepsin K findet vorrangig in Osteoklasten statt [19]. Cathepsin W wird ausschließlich in CD8⁺ T-Lymphozyten exprimiert [22], während Cathepsin V als ein gewebespezifisches Enzym im Thymus, den Testis und der Cornea auftritt [23].

Mit einer Vielzahl von pathologischen Prozessen, wie Arthritis, neurogenerativen und kardiovaskulären Krankheiten können Cathepsine in Verbindung gebracht werden [24-28]. Zusätzlich sind lysosomale Cathepsine in die Pro-Hormon-Prozessierung in thyroidalen Zellen und in der Endostatingenerierung während der Angiogenese involviert [29; 30].

Cathepsine werden als proteolytische Enzyme oft mit Tumorprogressionen verknüpft. Sie sind an prä-malignen Läsionen, der Angiogenese und am Wachstum von primären und metastatischen Tumoren beteiligt [24]. In der lokalen Umgebung des Tumors sind Cathepsine in der Lage, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine über Rezeptoren zu beeinflussen [31-33]. Cathepsin B wurde als eines der ersten Cathepsine in der malignen Progression von Mammakarzinomen entdeckt [34]. Erhöhte Genexpressionen der Cathepsine B, H und L wurden im Melanom, Gliom, kolorektalen Karzinom, Prostatakarzinom und im Lungenkarzinom nachgewiesen [24]. Ebenso sind Cathepsin L und B in der Migration und Invasion von humanen Osteosarcom- sowie Glioblastomzellen [35-37] beteiligt. Nicht nur im Tumor selbst, sondern auch in einer Reihe von Tumor-assoziierten Zellen, wie z. B. in Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten und endothelialen Zellen, findet eine erhöhte Expression von Cathepsinen statt [38].

Aufgrund der vielfältigen und spezifischen Funktionen von Cathepsinen kristallisiert sich heraus, dass diese nicht nur allein am proteolytischen Abbau und bei der Entstehung neoplastischer Progressionen (im Tumor) wirken. Hoch komplexe Beziehungen spielen sich im proteolytischen Netzwerk ab, die unter anderem von Proteinen, Substraten und aktivierten

Enzymen abhängig sind, die durch Cathepsine gespalten werden. Eines dieser Cathepsine, Cathepsin X, zeichnet sich durch eine erhöhte Expression im Prostata- und Magenkarzinom aus, wobei die funktionelle Bedeutung von Cathepsin X im Magenkarzinom noch weitestgehend unklar ist [39; 40]. Im Rahmen dieser Arbeit soll mit der Suche nach neuen Interaktionspartnern die Funktion von Cathepsin X im Magenkarzinom näher charakterisiert werden.

1.2 Cathepsin X

1.2.1 Struktur und Aktivität von Cathepsin X

Im Gegensatz zu anderen Cathepsinen wurde Cathepsin X (CTS_X, auch Cathepsin Z und Cathepsin P genannt) als eine der letzten Cysteinproteasen entdeckt [41; 42]. Trotz der im Allgemeinen ähnlichen Tertiärstrukturen der Cathepsine unterscheidet sich CTS_X hinsichtlich seiner Struktur offenkundig von den übrigen Cathepsinen der Papainfamilie [43; 44] (Abbildung 2). Diese strukturellen Unterschiede zeigen sich in einer stark verkürzten Pro-Region von 38 AS und einer Insertion von 3 AS-Resten in der Nähe des aktiven Zentrums [45]. Jene Sequenz ist im charakteristischen *Mini-Loop* des Moleküls lokalisiert und wirkt sich direkt auf die Substratspezifität aus [43]. Wie bereits erwähnt, gehört CTS_X daher zur Gruppe der Carboxypeptidasen und besitzt keine Endopeptidaseaktivität [43].

Ein weiteres Charakteristikum von CTS_X ist das Integrin-Erkennungsmotiv, das sich in der Pro-Form (Arg-Gly-Asp (RGD)) und der gereiften Form (Glu-Cys-Asp (ECD)) des Enzyms befindet [41; 42]. Dieses ermöglicht CTS_X die Interaktion mit β 2- und β 3-Integrinen [46; 47].

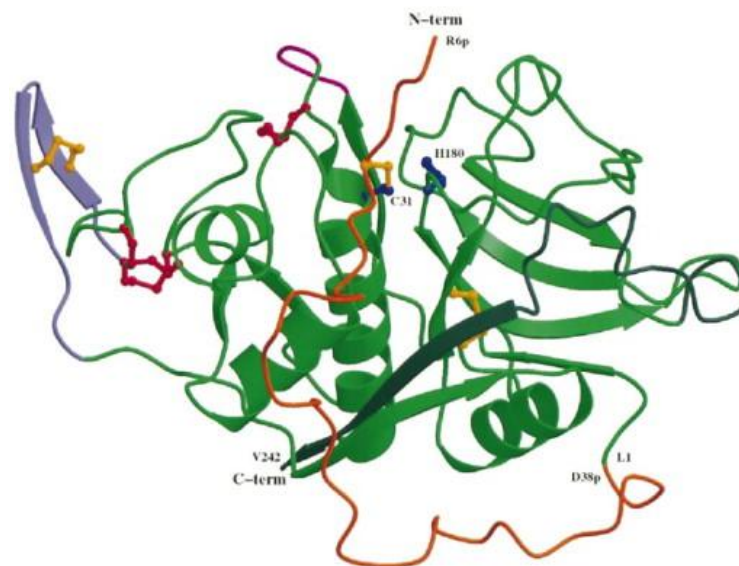


Abbildung 2: Strukturübersicht von humanem CTSX.

Pro-Region - braun, gereiftes Enzym - grün, *Mini-Loop* - magenta, Insertion - blau, Disulfidbrücken - gelb. Das aktive Zentrum mit den AS-Resten Cys31 und His180 wurde blau gefärbt [44].

1.2.2 Biologische Funktionen von Cathepsin X

Humanes CTSX ist nicht nur am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt, sondern wahrscheinlich ebenso an der Regulation der Immunantwort [48]. CTSX wird als einzige Cysteinprotease in der Magenschleimhaut nach *Helicobacter pylori* Infektion stark überexprimiert [39]. Im Gegensatz zu den übrigen Cathepsinen wird CTSX vorrangig in Immunzellen - wie Monozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen - exprimiert [48]. Jedoch findet auch im Magenkarzinom sowie im neoplastischen Epithel eine erhöhte Transkription von CTSX statt [39]. Das Integrin-Erkennungsmotiv RGD, das sowohl in der Pro-Form als auch in der gereiften Form vorhanden ist, lässt auf eine Funktion in der Zellsignalübertragung und der -adhäsion schließen [46]. Obermayer *et al.* konnten zeigen, dass die Pro-Form von CTSX mit den $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Untereinheiten der Integrine ko-lokalisiert [49]. Ausschließlich die gereifte Form von CTSX tritt mit der $\beta 2$ -Integrin-Untereinheit in differenzierten U-937 Zellen und in Kokulturen mit endothelialen Zellen auf [50].

Des Weiteren bindet CTSX an Glycosaminoglycane (Heparansulfat-Proteoglykane) und ist an der Aktivierung und Regulation von $\beta 2$ -Integrinen beteiligt. Hierbei finden post-translationale Modifikationen von LFA-1 (Integrin $\alpha_L\beta_2$) statt, indem es zu einer sequentiellen Spaltung des Integrinrezeptors am C-terminalen Ende des $\beta 2$ -cytoplasmatischen Restes kommt [51]. Dies wiederum resultiert in der Migration und Invasion von T-Lymphozyten [52-54] und lässt auf

Funktionen von CTSX in der zellulären Adhäsion, der Phagozytose und der Lymphozytenproliferation schließen.

Bei der Modulierung des Kallikrein-Kinin-Systems (Kinin-System) übernimmt CTSX die Aufgabe der carboxy-terminalen Prozessierung der Peptidhormone Bradykinin und Kallidin. Dieses System von Blutproteinen scheint unter anderem in der Inflammation, Blut-Koagulation, der Regulation des Blutdrucks, Krebs und kardiovaskulären Krankheiten eine Rolle zu spielen [55; 56]. Seine wichtigsten Mediatoren sind Bradikinin und Kallidin. CTSX agiert in diesem System als eine Typ-I-Kininase [57].

Seiner proteolytischen Rolle wird CTSX ebenfalls beim Verdau des Chemokins CXCL-12 gerecht, das von Osteoblasten sekretiert wird und ein hoch-potentes Chemoattraktant für hematopoetische Stammzellen darstellt [58]. Weiterhin wurde CTSX als ein luminales Bindungsprotein von ERGIC-53, einem oligomeren Typ-I-Membranprotein, beschrieben [59; 60]. Jüngst konnten Kraus *et al.* [57] zeigen, dass zelluläre Seneszenz durch eine Herunterregulation von CTSX induziert wird [61].

Cathepsin X zeichnet sich durch eine Vielzahl der unterschiedlichsten Funktionen aus, wobei diese teilweise gewebe- und zellspezifisch sein können. Jedoch ist eine genaue funktionelle Bedeutung, vor allem in der *H. pylori*-vermittelten Magenkarzinogenese, immer noch weitestgehend ungeklärt.

1.2.3 Cathepsin X in der Magenkarzinogenese (Entzündung → Karzinom)

Das Magenkarzinom stellt immer noch eine der Hauptursachen bei einem Karzinom-vermittelten Tod weltweit dar, wenngleich auch die Inzidenz (Häufigkeit) während der letzten Jahrzehnte abgenommen hat [62]. Nahezu 90 % aller gastrischen Tumore verkörpern Adenokarzinome, die sich in einen intestinalen und einen diffusen Typ nach Lauren klassifizieren lassen [63]. Adenokarzinome sind bösartige (maligne) Tumore, die aus Drüsengewebe hervorgegangen sind. Die Pathogenese eines intestinalen Adenokarzinoms ist mit Vorstufenveränderungen, wie z. B. einer intestinalen Metaplasie und Dysplasie sowie einer aktiven Gastritis, einer multifokalen atrophischen Gastritis und dem Vorhandensein einer *H. pylori*-Infektion, verbunden [64; 65]. Persistierende *H. pylori*-Infektionen induzieren die Infiltration von Neutrophilen, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen [66]. Diese Immunantworten resultieren meist in einem erhöhten Level an Interleukin-1 β , Interleukin-8, Interleukin-6 und dem Tumornekrosefaktor α [67; 68], ebenso wie in einer Überexpression von Proteasen, wie z. B. MMP-1 und CTSX [67; 69-71].

CTSX wird vorrangig von den Makrophagen im Stroma und in den Drüsen der antralen Mucosa exprimiert. Im Magenkarzinom hingegen wurde CTSX stärker im intestinalen Typ als im diffusen Karzinom nachgewiesen. Dort lokalisierte CTSX im Zytoplasma und wies ein zusätzliches basales Expressionsmuster auf [70].

Interaktionsstudien zwischen Ko-Kulturen mit Epithelzellen, Monozyten und Fibroblasten deuteten auf eine erhöhte Expression von CTSX, ausgelöst durch Zell-Zell-Kontakte und Matrixinteraktionen, hin. Zusätzlich zeigten *in vitro* Zellkulturexperimente, dass eine interzelluläre Signalgebung zwischen den PAI (Pathogenitätsinseln) positiven *H. pylori*-infizierten Epithelzellen und Makrophagen für eine erhöhte Expression von CTSX in den Makrophagen verantwortlich war [70]. Die Immunantwort auf eine *H. pylori*-Infektion resultiert in einer induzierten MMP-1 Expression und scheint die Magenkarzinominzidität zu erhöhen. Diese erhöhte MMP-1 Expression wird in den Magenepithelzellen über MAP-Kinasekaskaden, wie JNK, reguliert, während in Makrophagen die *H. pylori* heraufregulierte CTSX-Expression über den ERK1/2 Signaltransduktionsweg erfolgt [69; 72].

Wenig bekannt sind bislang die tumorbiologischen Funktionen von CTSX. Um die komplexen Zusammenhänge in der Magenkarzinogenese bzw. im Magenkarzinom besser zu verstehen, wurde das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf die Suche nach neuen Interaktionspartnern von CTSX und deren Charakterisierung im Magenkarzinom gelegt.

1.3 Modelle zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Innerhalb einer Zelle spielen Protein-Protein-Interaktionen eine wesentliche Rolle [73; 74]. Die meisten Proteinkomplexe sind relativ stabil assoziiert, da ihre Integrität für die Funktion essentiell ist. Gewöhnlich sind 20 Aminosäuren pro Protein an einer Interaktion beteiligt [75]. Als wichtigste Kräfte bei Protein-Protein-Interaktionen spielen hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und Salzbindungen eine bedeutende Rolle [75]. Zu den Nachweisen von Protein-Protein-Interaktionen gelten unter anderem die Reinigung und Charakterisierung von Komplexen mittels Massenspektrometrie, *Two-Hybrid* Methoden, *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) und *in vitro*-Bindungs-Experimente (*Pull-down* Assays oder Co-Immunoprecipitationen) [76; 77].

1.3.1 *Yeast Two-Hybrid System*

Das *Two-Hybrid* System ist ein in der Hefe (*S. cerevisiae*) entwickelter Assay für die Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen [78-80]. Das System basiert auf dem eukaryotischen Transkriptionsfaktor Gal4, der an eine spezifische Sequenz in der DNA bindet, wodurch die Transkription benachbarter Gene initiiert wird [81]. Gal4 setzt sich aus zwei Domänen zusammen. Die BD-Domäne bindet an die DNA, während die AD-Domäne die Transkription aktiviert [81]. Diese Eigenschaften werden sich im *Yeast Two-Hybrid* System zunutze gemacht. Ein Protein X wird an die Gal4-DNA-Bindungsdomäne (BD) („*bait*“) und ein potentieller Interaktionspartner Y an die Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) („*prey*“) fusioniert. Wenn die Proteine X und Y miteinander interagieren, kommt es zu einer Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsaktivators. Er bindet am Gal4-Promotor und sorgt dementsprechend für die Transkription bestimmter Reportergene (Abbildung 3).

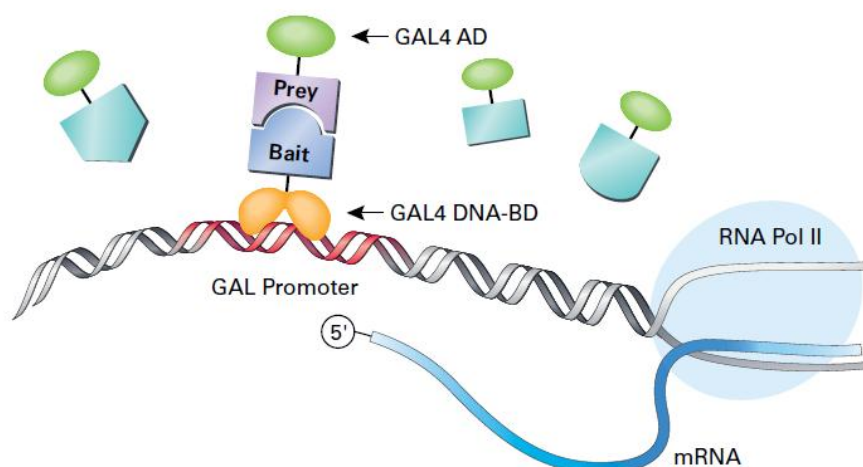


Abbildung 3: Das *Yeast Two-Hybrid* System. Zwei Proteine werden separat voneinander exprimiert, wobei das eine Protein (*bait*-Protein) an eine Gal4-DNA-Bindungsdomäne (BD) und das andere Protein (*prey*-Protein) an eine Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert wird. Kommt es zu einer Interaktion der beiden Proteine, fusionieren die Domänen und sorgen für die Aktivierung der Reportergene (*AUR1-C*, *ADE2*, *HIS3*, *MEL1*) durch die Bindung an den Gal-Promotor (*Matchmaker*TM *Gold Yeast Two-Hybrid* System Bedienungsanleitung, Clontech).

Zum einen können Interaktionen zwischen bekannten Proteinen geprüft werden, zum anderen besteht die Möglichkeit, einzelne Domänen der potentiell interagierenden Proteine näher zu untersuchen. Des Weiteren kann die Identifizierung spezifischer Aminosäurereste eines Proteins einen weiteren Aufschluss über die Interaktion mit seinem Partner geben [82].

Vorteile eines *Two-Hybrid* Assays sind die hohe Sensitivität mit der weniger affine Interaktionen detektiert werden [83]. Die Interaktionen können in der natürlichen Umgebung der Zelle erforscht werden, ohne auf künstliche *in vitro* Gegebenheiten zurückgreifen zu müssen. Hierbei werden die Zellen nicht zerstört [82].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Auf der Grundlage der bisher bekannten Funktionen von Cathepsin X, die sowohl im Magen als auch im Magenkarzinom kaum erforscht sind, war es das Ziel der Arbeit, neue Interaktionspartner mit Hilfe des *Yeast Two-Hybrid* Systems zu identifizieren. Mögliche potentielle Interaktionspartner sollten in weiteren Experimenten bestätigt und verifiziert werden, sodass im Anschluss eine eingehende Charakterisierung der Interaktionen zwischen CTSX und potentiellen Partnern erfolgen konnte.

Hierfür wurde zunächst eine Magenkarzinom-Bibliothek erstellt, die später im *Yeast Two-Hybrid* System mit CTSX auf mögliche Interaktionspartner getestet werden sollte. Daraufhin sollten positiv getestete Interaktionen in weiteren Experimenten, wie Co-Immunopräzipitationen und Ko-Lokalisationsstudien verifiziert werden. Die sich anschließende Charakterisierung basiert auf den molekularen Eigenschaften der potentiellen Proteine. Jedoch sollten die identifizierten Proteine zunächst immunhistochemisch auf ihr Vorkommen im Magen und Magenkarzinom näher untersucht werden.

H. pylori gilt als eine der Hauptursachen bei der Entstehung eines Magenkarzinoms. Anhand von *H. pylori*-positiven und -negativen Biopsien und Magenkarzinomen sollte der Einfluss von CTSX mit und auf die identifizierten Proteine betrachtet werden. Eine Methode zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen stellen *Knockdown* Experimente durch spezifische siRNA Moleküle dar. CTSX sollte mithilfe einer spezifischen siRNA herunterreguliert und die Abhängigkeit der potentiellen Interaktionspartner untersucht werden.

Folgende Ziele sollen für die Identifizierungs- und Charakterisierungsstudien erreicht werden:

- **Erstellung einer cDNA-Bibliothek aus Magenkarzinomgewebe**
- ***Yeast Two-Hybrid Screening* mit Hilfe der zuvor erstellten Bibliothek**
- **Verifizierung und Bestätigung der positiv getesteten Klone im *Yeast Two-Hybrid* System (Co-Immunopräzipitationen, Ko-Lokalisationsstudien)**
- **Immunhistochemischer Nachweis von potentiellen Interaktionspartnern im Magen und Magenkarzinom**

-
- **Untersuchung der Expression der identifizierten Partner an *H. pylori*-positiven und -negativen Biopsien und im Magenkarzinom**
 - **Charakterisierung des Einflusses einer Cathepsin X-Defizienz und deren Auswirkungen auf die möglichen Interaktionspartner**

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Medium
N87	Humane Magenkarzinomzelllinie	RPMI Medium, 10 % FCS, 100 U/ml
HepG2	Humane Leberkarzinomzelllinie	Penizillin /Streptomycin
U937	Humane Monozytenzelllinie	} Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), 2 mM Glutamin, 10 % FCS, 100 U/ml Penizillin/Streptomycin
THP1	Humane Monozytenzelllinie	
Hek293-T	Humane embryonale Nierenzelllinie	

2.1.2 Bakterien- und Hefestämme

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

	Stamm	Genstatus	Referenz
<i>E. coli</i>	XL1-Blue	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac, [F'proAB, lacI^q, ZΔM15, Tn10 (tet^r)]</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> OneShot [®] TOP10F' Competent Cells	TOP10F'	<i>F [lacI^q Tn10 (TetR)] mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> Fusion-Blue Competent Cells	K-12	<i>endA1, hsdR17 (r_{K12}⁻, m_{K12}⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, F [proA⁺B⁺, lacI^qZΔM15::Tn 10 (tet^R)]</i>	Clontech, Heidelberg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y2HGold	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : : GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3, GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2 URA3 : : MEL1_{UAS}-Mel1_{TATA} AUR1-C MEL1</i>	Nguyen, <i>unpublished</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y187	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met-, URA3 : :GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993

2.1.3 Plasmide und Vektoren

Alle verwendeten Plasmide und Vektoren stammen von der Firma Clontech.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide und Vektoren

Name	Größe [kb]	Antibiotikaresistenz	Hefe-Selektionsmarker
pGBKT7	7,3	Kanamycin	Tryptophan
pGADT7-Rec	8,0	Ampicillin	Leucin
pGBKT7-53	8,3	Kanamycin	Tryptophan
pGADT7-T	10,0	Ampicillin	Leucin
pGBKT7-Lam	7,9	Kanamycin	Tryptophan
pAcGFP1-C	4,7	Kanamycin, Neomycin	-
pProLabel-C	4,2	Kanamycin, Neomycin	-
pAcGFP1-Lam	5,5	Kanamycin, Neomycin	-
pAcGFP1-p53	5,9	Kanamycin, Neomycin	-
pProLabel-T	6,3	Kanamycin, Neomycin	-

2.1.4 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme (BamH1, DpnI, EcoRI, HindIII, SalI) wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

2.1.5 Kitsysteme

Tabelle 4: Verwendete Kitsysteme

Kit	Firma
<i>Advantage[®] 2 PCR Polymerase Mix</i>	Clontech, Heidelberg
<i>BigDye[®] Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	AB applied Biosystems, Darmstadt
DAB Farbsystem	DAKO, Hamburg
DC Protein Assay	Bio-Rad, München
<i>Easy Yeast Plasmid Isolation Kit</i>	Clontech, Heidelberg
<i>FastStart Taq DNA Polymerase, dNTP Pack</i>	Roche, Mannheim
<i>High Pure RNA Tissue Kit</i>	Roche, Mannheim
<i>In-Fusion[™] Advantage PCR Cloning Kit</i>	Clontech, Heidelberg
<i>Invisorb[®] Fragmentation CleanUp</i>	Invitex, Berlin
<i>Make Your Own "Mate&Plate[™]" Library</i>	Clontech, Heidelberg
<i>Matchmaker[™] Gold Yeast Two-Hybrid System</i>	Clontech, Heidelberg
<i>Matchmaker AD LD-Insert Screening Amplimer</i>	Clontech, Heidelberg
<i>Matchmaker[™] Insert Check PCR Mix</i>	Clontech, Heidelberg
<i>Matchmaker[™] Chemiluminescent Co-IP Assay</i>	Clontech, Heidelberg
<i>Matchmaker[™] Chemiluminescent Co-IP Vector</i>	Clontech, Heidelberg
<i>MinElute PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>NucleoSpin[®] FFPR RNA Kit</i>	MACHEREY & NAGEL, Düren
<i>NucleoSpin[®] II Kit</i>	MACHEREY & NAGEL, Düren
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
<i>Plasmid DNA Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>ProLabel[™] Detection Kit II</i>	Clontech, Heidelberg
<i>Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit</i>	Roche, Mannheim
<i>Universal Magnetic Co-IP Kit</i>	Active Motif, München
Vectastatin ABC Kit Elite (Biotin/Avidin)	Biozol, Eching
<i>Yeastmaker Yeast Transformation System 2</i>	Clontech, Heidelberg

2.1.6 Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Firma
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Aprotinin (<i>Protease Inhibitor Solution</i>)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Aureobasidin A	Clontech, Heidelberg
Benzamidine (<i>Protease Inhibitor Solution</i>)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
<i>bovine serum albumin</i> (BSA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Cathepsin X siRNA	Santa Cruz, CA, USA
Citronensäure	MERCK, Darmstadt
DAPI (Pulver)	Serva, Tübingen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAN-Biotech, Aidenbach
5 × DNA Loading buffer, blue	Bioline, Luckenwalde
Ethanol	MERCK, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
<i>fetal bovine serum</i> (FCS)	PAA, Cölbe
<i>Fluorescent Mounting Medium</i>	DAKO, Hamburg
<i>FuGene® Transfection Reagent</i>	Promega, Mannheim
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Immersol™ 518N (Immersions-Öl)	Carl Zeiss, Oberkochen
Leupeptin (<i>Protease Inhibitor Solution</i>)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
SuperSignal® Chemilumineszenz Substrates	Millipore, Schwalbach
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Nonident P-40 NP40	ApplChem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Pepstatin (<i>Protease Inhibitor Solution</i>)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Penizillin/Streptomycin (100 U/ml)	PAA, Cölbe
Phenylmethyl-sulfonyl-fluoride (PMSF)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
<i>Poncau S Solution</i>	Sigma Aldrich, Deisenhofen
RedSafe™ Nucleid Acid Staining Solution	HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg
RPLP0 siRNA	Santa Cruz, CA, USA
siRNA <i>Transfection Medium</i>	Santa Cruz, CA, USA
siRNA <i>Transfection Reagent</i>	Santa Cruz, CA, USA
SOC Medium (Transfektion von Bakterien)	Invitrogen, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
TEMED	Sigma Aldrich, Deisenhofen
TritonX-100	Serva, Tübingen
0,05 % Trypsin-EDTA (1 ×)	Invitrogen, Darmstadt
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
X-α-Gal (20 mg/ml in DMF (Dimethylformamid))	Clontech, Heidelberg

2.1.7 Labormaterialien

Tabelle 6: Verwendete Labormaterialien

Labormaterialien	Firma
<i>Cover-slips</i>	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
<i>Douncer</i> (Zellaufschluss)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Einfrierrohrchen	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Einmalskalpelle	Lagerartikel
<i>Glass beads, acid-washed</i>	Sigma Aldrich, Deisenhofen
<i>Glass beads</i> (425-600 µm)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Objektträger <i>SuperFrost</i> Plus	Thermo Scientific, München
Petrischalen	Greiner, Solingen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Reaktionsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Solingen
<i>TransBlot Transfer</i> Nitrocellulose (0,45 µm)	BioRad, München
Zellkulturflaschen	Biochrom, Berlin
Zellkulturplatten <i>6-well</i> und <i>12-well</i>	Biochrom, Berlin
Zellkulturschaber	Biochrom, Berlin
Uvette 200 - 1600 nm	Eppendorf, Hamburg

2.1.8 Geräte

Gerätetyp und Hersteller sind nachfolgend aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
ABI 310 Kapillarsequenzierer	<i>Applied Biosystems</i> , Darmstadt
Brutschränke (CO ₂)	Heraeus, Hanau
<i>Coulter Counter</i> ZII	<i>Coulter Immunotech</i> , Marseille, Frankreich
Elektrophorese-Apparaturen	<i>Advance</i> , Japan
FluorChem E (Westernblotdetektion)	<i>Cell Biosciences</i> , Heidelberg
<i>GEArray Chemilumineszenz Detection System</i>	<i>SABiosciences</i> , Biomol, Hamburg
Gel/Westernblot Dokumentationsgerät	<i>Syngene</i> , USA
Gelkammer	<i>Advance</i> , Japan
Heizplatte/Thermomixer	Heidolph, Weilheim
LEICA TCS SP2 konfokales Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer	Neolab, Heidelberg
Mikrowelle	Miele, Gütersloh
<i>Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell</i>	BioRad, München
<i>Mini-PROTEAN®3 Electrophoresis Cell</i>	BioRad, München
PCR Thermocycler	BioRad, München
Phasenkontrastmikroskop	Nikon, Düsseldorf
pH-Messgerät	WTW, Weilheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
<i>Rolling shaker</i>	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Schüttler	Heidolph, Weilheim
Sterilarbeitsbank	Heraeus, Hana
Thermocycler DNA Engine	Biozym, Oldendorf
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Bandelin, Berlin
Vortex	IKA®Werke, Staufen
Waage	Satorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

2.1.9 Antikörper

Sowohl die Antikörper für den Westernblot (Proteinbiochemie) als auch für die Immunhistochemie sind nachfolgend aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete Primär-Antikörper

Primär-Antikörper	Konzentration	Konzentration des Sekundär-Antikörpers	Firma
GAL4 DNA-BD	7,92 µg/µl	1/20.000, <i>mouse</i>	Clontech, Heidelberg
anti- <i>human</i> Cathepsin X/Z/P	1/250	1/10.00, 1/20, <i>goat</i> (Immunhistochemie)	R&D Systems, Wiesbaden
anti-Cathepsin Z	1/500	1/100, <i>rabbit</i>	Abcam, Cambridge, UK
anti-LGALS2	1/200	1/20.000, <i>rabbit</i>	ATLAS Antibodies, Stockholm, Schweden
anti-RPLP0	1/200	1/20.000, <i>rabbit</i>	ATLAS Antibodies, Stockholm, Schweden
Mucin6	1/200	1/20.000, <i>mouse</i>	Santa Cruz, CA, USA
β-Aktin	1/10.000	1/30.000, <i>mouse</i>	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Santa Cruz, CA, USA
Galectin-2	1/100	1/20.000, <i>goat</i>	Santa Cruz, CA, USA
anti- <i>human</i> CD68	1/50	1/100, <i>mouse</i>	DAKO, Hamburg
Integrin β 1	1/50	1/100, <i>mouse</i>	Abcam, Cambridge, UK
CD138	1/50	1/100, <i>mouse</i>	DAKO, Glostrup, Dänemark
anti-p53	1/50	1/30.000, <i>mouse</i>	Merck Millipore, Darmstadt,
anti-p21 ^{WAF1}	1/500	1/30.000, <i>mouse</i>	Merck Millipore, Darmstadt,
CDK2	1/1000	1/10.000, <i>rabbit</i>	<i>Cell Signaling</i> (New England Biolabs), Frankfurt a. M.
Cyclin E1	1/1000	1/20.000, <i>mouse</i>	<i>Cell Signaling</i> (New England Biolabs), Frankfurt a. M.
p27 Kip1	1/1000	1/20.000, <i>rabbit</i>	<i>Cell Signaling</i> (New England Biolabs), Frankfurt a. M.

Tabelle 9: Verwendete Sekundär-Antikörper

Sekundär-Antikörper	Firma
<i>goat</i> IgG horseradish Peroxidase-conjugated Antibody (WB)	R&D Systems, Wiesbaden
Normal <i>Goat</i> IgG (IP)	R&D Systems, Wiesbaden
<i>goat</i> anti- <i>rabbit</i> IgG (WB)	Thermo Scientific, Bonn
<i>goat</i> anti- <i>mouse</i> IgG (WB)	Thermo Scientific, Bonn
Fluorescein <i>goat</i> anti- <i>rabbit</i> IgG (IHC)	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
Texas Red anti- <i>rat</i> (IHC)	Biozol, Eching
Texas Red anti- <i>mouse</i> IgG (IHC)	Vector Labs, Burlingame CA, USA
CY3 <i>donkey</i> anti- <i>goat</i> Alexa Fluor (IHC)	Invitrogen, Darmstadt
<i>goat</i> anti- <i>rabbit</i> IgG (DAB-Färbung)	DAKO, Hamburg

2.1.10 Puffer, Lösungen und Reagenzien

2.1.10.1 Mikrobielle Nährmedien

Alle verwendeten Medien wurden von der Firma Clontech (Heidelberg) bezogen.

Tabelle 10: Verwendete Nährmedien und Lösungen

Nährmedien und Lösungen	Konzentrationen
YPDA Broth	in 0,5 l dd. H ₂ O lösen
YPDA mit Agar	in 0,5 l dd. H ₂ O lösen
2 × YPDA Broth	in 25 ml dd. H ₂ O lösen
0,5 × YPDA Broth	in 1 l dd. H ₂ O lösen
SD/-Leu mit Agar	in 0,5 l dd. H ₂ O lösen
SD/-Trp mit Agar	in 0,5 l dd. H ₂ O lösen
SDO/X Agarplatten (SD-Trp)	in 0,5 l Agarmedium lösen + 1 ml X- α -Gal Stammlösung
SDO/X/A Agarplatten (SD-Trp)	in 0,5 l Agarmedium lösen + 1 ml X- α -Gal Stammlösung + 70 μ l Aureobasidin A Stammlösung
DDO Agarplatten (SD-Leu/-Trp)	in 500 ml Agarmedium lösen
DDO/X Agarplatten (SD-Leu/-Trp)	in 500 ml Agarmedium lösen + 1ml X- α -Gal Stammlösung
DDO/X/A Agarplatten (SD-Leu/-Trp)	in 500 ml Agarmedium lösen + 1ml X- α -Gal Stammlösung + 70 μ l Aureobasidin A Stammlösung
QDO/X Agarplatten (SD-Ade/-His/-Leu/-Trp)	in 500 ml Agarmedium lösen + 1ml X- α -Gal Stammlösung
QDO/X/A Agarplatten (SD-Ade/-His/-Leu/-Trp)	in 500 ml Agarmedium lösen + 1 ml X- α -Gal Stammlösung + 70 μ l Aureobasidin A Stammlösung
<i>Freezing Medium</i>	10 ml YPDA + 50 ml 75 % Glycerol
YPD Plus <i>Liquid Medium</i>	
Aureobasidin A Stammlösung	1 mg Aureobasidin A in 2 ml absolut Ethanol, Endkonzentration: 500 μ g/ml
X- α -Gal Stammlösung	20 mg/ml

2.1.11 Oligonukleotide

Die angegebenen Primer wurden von der Firma BioTeZ (Berlin-Buch) bezogen.

Tabelle 11: Verwendete PCR-Primer

Primer	Sequenz (5' - 3')	PCR Produkt [bp]	T _m [°C]
<i>Library</i> 5' PCR Primer	TTCCACAGCAGT GGTATCAACGC AGAGTGG	-	68
<i>Library</i> 3' PCR Primer	GTATCGATGCCACCCCTC TAGAGGCCGAGGCGGCCG ACA		

Tabelle 12: Verwendete Klonierungsprimer

Primer	Sequenz (5' - 3')	PCR Produkt [bp]	T _m [°C]
<i>Forward</i> CTSX	CATGGAGGCCGAATTCACAGACCTGCTACCGCCTCTGC	822	65
<i>Reverse</i> CTSX	GCAGGTCGACGGATCCTTAAACGATGGGGTCCCCAAATGT		

Die ersten 15 Oligonukleotide weisen eine Homologie mit den linearen Enden des pGBKT7 Vektors auf. Danach folgt die Sequenz von CTSX (unterstrichen).

Tabelle 13: Verwendete Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz		T _m [°C]
T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG		56
3' DNA-BD Sequencing Primer	TTTTTCGTTTTTAAAACCTAAGAGTC		62
pGADT7-Rec Matchmaker™ AD LD Screening Amplimer 5' Primer	CTATTCGATGATGAAGATACCCCACC AAACCC	Clontech	68
pGADT7-Rec Matchmaker™ AD LD Screening Amplimer 3' Primer	GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATC TACGAT	Clontech	68

2.1.12 Molekulare Standardmarker

Nukleinsäure Marker: *HyperLadder* I und II (Bioline, Luckenwalde)

Protein Standard Marker: *Biotinylated Protein Ladder Detection Pack (Cell Signaling)* (New England Biolabs), Frankfurt a. M.)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellzucht und Zellpassagierung

Für die Arbeit wurden humane Magenkarzinom- (N87), Leberkarzinom- (HepG2), Monozyten (U938 und THP1) und HEK293-T Zellen verwendet (Tabelle 1).

Die Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 20 ml Nährmedium in einer Zellkulturflasche (75 cm², TPP/Europe, Schweiz) verteilt. Die Zellen inkubierten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Nach 24 h wurde das Medium entfernt, mit 1 × PBS (137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) gewaschen und frisches Nährmedium zugesetzt. Als die Zellen ihre Konfluenz erreicht hatten, wurden sie umgesetzt. Dafür wurden sie mit 1 × PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert (0,05 % Trypsin-EDTA, Invitrogen). Nach 1 min wurde das Trypsin abgenommen und die Zellen für 5 min in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die Zellen gründlich von der Zellkulturflasche abgespült und in 10 ml des jeweiligen Mediums aufgenommen. Die Zellen wurden entweder mit dem Zellcounter (Beckmann Coulter, GmbH, *Coulter-Partielle Count & Size Analyzer*) gezählt und für weitere Versuche ausgesät oder weiter kultiviert, indem sie in neue Zellkulturflaschen überführt wurden.

Für die einzelnen Versuche wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 1 × 10⁶ auf 100 mm Zellkultur-Platten (Corning Incorporated, CORNING[®], NY) ausgesät und entsprechend der jeweiligen Behandlung nach 24 h, 48 h und 72 h geerntet.

2.2.1.2 Zellernte

Die Überstände der Zellkultur-Platten (100 mm) wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Schabers abgelöst, mit 1 × PBS gespült und ebenfalls in das 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Zellen wurden bei 3500 × g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und zwei Mal mit 1 × PBS gewaschen. Die Pellets wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

Zellernte für Co-Transformierte Hek293-T Zellen

Nach 48 h Post-Transfektion wurden die Zellen mit 2×5 ml PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst, in 5 ml DMEM Medium mit 10 % FCS aufgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden sie bei $500 \times g$ für 5 min zentrifugiert und $2 \times$ mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 Fixieren der Zellen auf Kulturplatten und *cover-slips*

Das Fixieren der Zellen erfolgte mit einer 3,5 %igen PFA-Lösung (Paraformaldehyd), die für die einzelnen Versuche immer frisch hergestellt wurde. Das Medium wurde von den 10er-Platten, in welche 4 - 5 *cover-slips* pro Platte gelegt wurden, abgenommen und mit $1 \times$ PBS gewaschen. Danach wurden 10 ml der frisch hergestellten PFA-Lösung dazugegeben und die Platte bei Raumtemperatur (RT) für 10 min inkubiert. Anschließend wurde das PFA entfernt und die Platte mit $1 \times$ PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit $1 \times$ PBS bedeckt, um eine Austrocknung zu verhindern und um die Lagerung bei 4°C über mehrere Monate zu ermöglichen.

2.2.1.4 Zellextraktion als Vorbereitung auf die magnetische Co-Immunopräzipitation

Zellextraktion aus Tumorgewebe

Das Gewebe wurde gewogen, mit einem sterilen Skalpell in kleine Stücke zerschnitten und mithilfe eines vorgekühlten *Douncers* (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Germany) in *whole cell lysis buffer* (93 μl *whole cell lysis buffer*; 5 μl Phosphatase Inhibitor; 1 μl Deacetylase Inhibitor; 0,5 μl Protease Inhibitorcocktail; 0,5 μl PMSF) homogenisiert. Hierfür wurden 3 ml Puffer pro 1 g Gewebe eingesetzt. Anschließend inkubierte das Lysat für 30 min auf Eis, wurde bei $10.000 \times g$ für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Der Schritt wurde wiederholt. Die Gewebelysate wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zellextraktion

Nach erfolgtem Zellwachstum wurde das Kulturmedium verworfen und die Zellen mit 5 ml eiskaltem PBS/Inhibitorcocktail (0,8 ml $10 \times$ PBS; 0,4 ml Phosphatase Inhibitor; 80 μl Deacetylase-Inhibitor; 6,72 ml dd. H_2O -alles pro Platte) gespült. Mit 3 ml eiskaltem PBS/Inhibitorcocktail und einem Zellschaber wurden die Zellen abgeschabt, in ein

vorgekühltes 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und bei $400 \times g$ für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die Pellets wurden entweder sofort auf Eis aufgearbeitet oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.1.5 Co-Transfektion in Hek293 Zellen für die chemilumineszente Co-IP

In dieser Arbeit erfolgte die transiente Transfektion in Hek293 Zellen. Das *FuGene*[®]*HD* *Transfection Reagent* ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz mit einer hohen Effizienz und einer geringen Toxizität (*FuGene*[®]*HD* *Transfection Reagent, Instruction Manual*, Promega).

Für die Transfektion wurden die Zellen auf 60 mm Platten mit einer Dichte von 1×10^6 ausgesät und das Medium nach 24 h gewechselt. Für die 60 mm Platten wurden $4\text{ }\mu\text{g}$ DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt. Die DNA wurde in $200\text{ }\mu\text{l}$ Serum-freiem DMEM-Medium aufgenommen, mit $13\text{ }\mu\text{l}$ Transfektionsreagenz (1:3 im Verhältnis zur DNA) gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Reagenzansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 24 - 48 h wurden die Zellen auf Fluoreszenz der AcGFP1-Fusion kontrolliert und 48 h nach der Transfektion geerntet.

2.2.1.6 siRNA-Behandlung an N87- und HepG2-Zellen

Small Interfering RNA (siRNA) besteht aus kurzen einzel- oder doppelsträngigen RNA-Molekülen, mit deren Hilfe in der RNA-Interferenz gezielt Gene abgeschaltet werden können. Die Zellen wurden 24 h vorher in Antibiotika-freiem Medium mit der jeweiligen Zellzahl ausgesät (Tabelle 14) und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 in feuchter Atmosphäre inkubiert.

Tabelle 14: Zellzahlbedingungen für die siRNA

6-well Platten	Zellzahl
N87-Zellen	$2,9 \times 10^5$
HepG2-Zellen	$2,94 \times 10^5$
10ner Platten	Zellzahl
N87-Zellen	$1,48 \times 10^6$

Die siRNA-Behandlung erfolgte nach Protokoll der Firma Santa Cruz (CA, USA). Hierfür wurden $8\text{ }\mu\text{l}$ CTSX-/RPLP0-siRNA mit Transfektionsmedium und separat $8\text{ }\mu\text{l}$ Transfektionsreagenz mit Transfektionsmedium gemischt. Diese Ansätze wurden vereinigt und 45 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit je 1 ml oder 5 ml Transfektionsmedium gewaschen. Anschließend wurde auf 1 ml mit

Transfektionsmedium aufgefüllt und der Mix mit den Lösungsgemischen gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Die Inkubation erfolgte für 6 h im Brutschrank. Im Anschluss erhielten die Zellen ein Doppelmedium mit $2 \times$ FCS und $2 \times$ Antibiotika, ohne den Ansatz vorher zu entfernen. Nach 24 h, 48 h und 72 h konnten die Zellen geerntet und für die weitere Aufarbeitung verwendet werden (2.2.1.2).

2.2.2 Durchflusszytometrische-Messungen (FACS-Messungen)

2.2.2.1 Zellernte und Fixierung der Zellen für FACS-Messungen

Um die Zellen für die Färbung und Messung mittels Durchflusszytometrie vorzubereiten, wurden sie geerntet und mit Ethanol fixiert. Für die Versuche wurde jeweils eine Zellzahl von 1×10^6 eingesetzt. Die Zellernte wurde zunächst nach 2.2.1.2 durchgeführt. Anschließend erfolgte die Resuspendierung des Pellets in $420 \mu\text{l}$ $1 \times$ PBS und die tropfenweise Zugabe von Ethanol bis zu einem Endvolumen von 70 %. Zum Schluss wurden die Zellen ü.N. im Kühlschrank bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt und am nächsten Tag bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ zur kurzzeitigen Lagerung eingefroren.

2.2.2.2 Propidiumiodid-Färbung adhärenter Zellen zur Analyse des Zellzyklus

Propidiumiodid (PI) ist ein Farbstoff, der in die intakte DNA interkaliert und diese somit für die durchflusszytometrischen Messungen sichtbar macht.

Für die Färbung müssen die Zellen zunächst vom Ethanol befreit werden. Dazu wurden sie bei $700 \times g$ für 5 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und mit $1 \times$ PBS gewaschen. Nachdem das Zellpellet in $178 \mu\text{l}$ $1 \times$ PBS gelöst wurde, erfolgte die Zusetzung von $22 \mu\text{l}$ RNase ($100 \mu\text{g/ml}$). Der Ansatz inkubierte 10 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und kühlte auf Eis ab. Anschließend wurden $100 \mu\text{l}$ der PI-Färbelösung ($150 \mu\text{g/ml}$) (50 ml $1 \times$ PBS; $50 \mu\text{g/ml}$ PI Pulver; 50 mg NaCitrat; $0,1 \%$ Triton-X100) dazugegeben und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Proben auf Eis gestellt. Die Messung erfolgte mit einem Durchflußzytometer der Firma BD biosciences und die Auswertung mit der Software *Cell Quest Pro* von BD biosciences.

2.2.3 Immunhistochemische Färbungen

2.2.3.1 Triple Immuno-Färbung

Auf Cover-slips

Nach der Fixierung der Zellen mit 3,5 %igem PFA (für 10 min) auf *cover-slips* (2.2.1.3) erfolgte die Färbung. Dazu wurden die *cover-slips* einzeln in eine 12-well Platte gelegt und für 5 min mit 1 × PBS gewaschen. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen für 5 min mit Permeabilisierungs-Puffer (0,2 % TritonX100 in PBS; pH 7,4), anschließend wurde dreimal für 5 min mit 1 × PBS gewaschen und 10 min mit Block-Puffer (1 % BSA in PBS) inkubiert. Die darauffolgende Inkubation des primären Antikörpers (in Blockpuffer) fand über Nacht bei 4 °C statt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in 1 × PBS wurden die *cover-slips* für 10 min mit Block-Puffer geblockt und anschließend im Dunkeln bei 37 °C für 2 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper (1 % BSA in PBS) wurde vor seinem Gebrauch für 10 min bei 1.400 × g zentrifugiert. Nach der Inkubation wurde erneut dreimal für 5 min mit 1 × PBS gewaschen. Für die Färbung mit dem zweiten primären Antikörper (und sekundär) wurden alle Schritte ab dem ersten Blockierungsschritt wiederholt. Anschließend erfolgte die Einbettung der *cover-slips* mit *mounting* Medium (VECTASHIELD[®] mit DAPI, Linaris). Auf einen Objektträger wurden 10 µl *mounting*-Medium (VECTASHIELD[®] mit DAPI, Linaris) gegeben. Der *cover-slip* wurde aus der 12-well Platte herausgenommen und verkehrt herum auf den Objektträger gelegt. Zum Schluss wurde er mit Nagellack versiegelt und konnte so über mehrere Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die gefärbten *cover-slips* wurden mit einem TC8 SP2 Laserscan-Fluoreszenzmikroskop mit 63 × Vergrößerung und der dazugehörigen Software (3.2.4 SPOT *Advanced*) analysiert.

Mit Gewebeschnitten

Zunächst wurden die Gewebeschnitte dreimal für 5 min mit Xylol entparaffiniert, um das Wachs herauszulösen und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe in ein wässriges Milieu überführt (2 × 100 % EtOH, 30 - 40 s; 96 % EtOH, 30 - 40 s; 75 % EtOH, 30 - 40 s). Anschließend wurden die Schnitte in einer Küvette dreimal mit dd. H₂O gespült und für die Citratvorbehandlung vorbereitet. Hierfür wurden sie in einem Schnellkochtopf bei 120 °C für 3 min in Citratpuffer (0,1 M Na-Citrat; HIER; pH 6) gekocht, nachfolgend abgekühlt und 3 × mit 1 × PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation des 1. Primär-Antikörpers (in PBS/0,1 % Triton) ü. N. bei 4 °C. Die Objektträger wurden 3 × 5 min mit 1 × PBS gewaschen

und anschließend mit dem sekundären Antikörper für 2 h bei 37 °C inkubiert. Der vorherige Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Für die Doppel-Färbung mit einem zweiten spezifischen Antikörper (primär und sekundär) wurden alle Schritte ab dem ersten Permeabilisierungsschritt wiederholt. Nachdem die Gewebeschnitte dreimal für 5 min mit PBS gewaschen wurden, erfolgte die Kernfärbung mit DAPI (Serva, Tübingen) (*Mc Ivaines* Puffer: 0,175 g Zitronensäure; 1,54 g Na₂HPO₄; auf 125 ml dd. H₂O auffüllen; auf 50 ml *Mc Ivaines* Puffer 1,25 µl DAPI Stocklösung geben) für 25 min im Dunkeln. Danach wurde dreimal für 5 min mit 1 × PBS gewaschen und mit dd. H₂O gespült. Zum Schluss erfolgte die Einbettung mit *mounting Medium-anti fade* (DAKO, Hamburg). Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRE7) mit 40 × und 63 × Vergrößerung und der dazugehörigen Software (3.2.4 SPOT *Advanced*) ausgewertet.

2.2.3.2 Immunhistochemische Färbung von Parafin-Gewebeschnitten (ABC-peroxidase Färbung)

Die 2 - 4 µm Paraffinschnitte wurden mit Xylol entparaffiniert, durch eine absteigende Alkoholreihe in ein wässriges Milieu überführt und anschließend mit Citrat vorbehandelt (vgl. 2.2.3.1). Für die Inaktivierung der endogenen Peroxidase und damit für die Reduzierung unspezifischer Färbung erfolgte die Inkubation der Schnitte für 10 min mit 3 %iger H₂O₂-Lösung. Anschließend wurden die Schnitte 3 × mit Tris-Waschpuffer (9 g Tris; pH 7,6; 68,5 g Tris-HCl; 87,8 g NaCl; auf 1 l dd. H₂O + 3 Tropfen TritonX-100) gespült und über Nacht mit dem Primär-Antikörper bei 4 °C inkubiert (in AK-Verdünnungspuffer). Abermals wurden die Schnitte 3 × mit Tris-Waschpuffer gespült, mit dem Sekundär-Antikörper (biotynlierter AK, Verdünnungspuffer) für 30 min bei RT schüttelnd inkubiert und 3 × mit Tris-Waschpuffer gespült. Darauf erfolgte schüttelnd für 30 min bei RT die Inkubation der Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex. Die Schnitte wurden erneut 3 × mit Tris-Waschpuffer gespült, mit dem DAB (Diaminobenzidin) Farbsystem für 5 - 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit dd. H₂O gespült. Die Kernfärbung erfolgte mittels Hämatoxylin für 2 - 5 min. Zum Schluss wurden die Schnitte in einer Alkoholreihe dehydriert (75 %, 96 %, 100 % I, 100 % II, Xylol I, Xylol II) und mit Corbit-Balsam (Hecht, Kiel) unter einem Objektträger versiegelt.

2.2.4 Isolation von Nukleinsäuren

2.2.4.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Für die Erstellung der cDNA Bibliothek wurde RNA aus eingefrorenem Magenkarzinomgewebe nach Anleitung des *High Pure RNA Tissue Kits* (Roche, Mannheim) isoliert. Im ersten Schritt wurde das Gewebe in einem gekühlten Mörser auf Eis zerkleinert und in 400 µl Lysispuffer aufgenommen. Anschließend wurde das Lysat für 2 min zentrifugiert und der Überstand mit 200 µl Ethanol versetzt. Danach erfolgte die Aufreinigung der RNA nach Herstellerangaben. Zum Schluss wurde die RNA in 60 µl Elutionspuffer eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 Plasmid-DNA-Isolation aus Bakterien

Plasmid-Minipräparationen wurden aus 5 ml Übernachtskultur mit einem Plasmid Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Plasmid-Maxipräparationen erfolgten aus einer 150 ml Übernachtskultur anhand des Plasmid Maxi Kits nach Herstellerangaben von Qiagen.

2.2.4.3 Plasmid-Isolation aus Hefen

Für die Plasmid-Isolation aus Hefen wurde ein *Yeast Plasmid Isolation Kit* von Clontech verwendet. Hierfür wurde eine Hefekolonie auf einer frischen Platte mit Selektivmedium ausgestrichen (1 cm × 1 cm) und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der „Patch“ (Heferasen) mit einer sterilen Impföse abgenommen und in 500 µl 10 mM EDTA gelöst. Nachfolgend wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.5 Quantifikation von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde spektrometrisch bei 260 nm bestimmt (Photometer, Eppendorf, Hamburg). Hierbei entspricht eine optische Dichte (1 OD_{260nm}) 50 ng/µl DNA bzw. 40 ng/µl RNA.

Der Quotient OD₂₆₀ /OD₂₈₀ stellt ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren dar und beträgt für reine DNA-Lösungen 1,8 sowie für reine RNA-Lösungen 2,0.

2.2.5.1 Agarose Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung wurde die DNA in 1 bis 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit *RedSafe* (Hiss Diagnostics, Freiburg) und zur Bestimmung der Bandengröße wurde die 1 kb *HypoLadder* (Bioline, Luckenwalde) verwendet. Durchgeführt wurde die Elektrophorese für ca. 1 h bei 70 V.

2.2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Für die Umschreibung der totalen RNA aus humanen Zellen wurde der *Transkriptor High Fidelity cDNA Synthesis* Kit (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet.

Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C. Tabelle 15 zeigt die sich anschließende PCR-Reaktion.

Tabelle 15: PCR-Ansatz und Programm

PCR Ansatz		PCR-Programm			
cDNA	1 µl				
10 × PCR Puffer + MgCl ₂	5 µl				
dNTPs (je 200 µM)	1 µl	Denaturierung	95 °C	4 min	} × 30
CTSX <i>forward</i> (50 µM)	5 µl	Denaturierung	95 °C	30 s	
CTSX <i>reverse</i> (50 µM)	5 µl	Annealing	65 °C	30 s	
GC-Rich Solution	10 µl	Elongation	72 °C	3 min	
FastStart Taq DNA Polymerase (2 U)	0,4 µl	Final Extension	72 °C	7 min	
dd. H ₂ O	22,6 µl	STOP	4 °C		
Gesamtvolumen	50 µl				

3 µl des PCR Produktes wurden mit einem DNA Marker auf einem 1,5 %igen Agarosegel analysiert.

In-Fusion Cloning PCR (chemilumineszente Co-IP)

Für die Amplifizierung des pBGKT7-*bait templates* und des pGADT7-*prey templates* wurde die *Hot Start* Polymerase von Takara benutzt. In Tabelle 16 sind PCR-Programm und PCR-Ansatz dargestellt.

Tabelle 16: PCR-Ansatz und Programm der *In-Fusion Cloning PCR*

PCR Ansatz		PCR-Programm			
Vektor (0,1 µg/µl)	1 µl				
PCR Puffer (5 ×)	4 µl				
dNTP Mix (je 2,5 mM)	4 µl	Denaturierung	98 °C	5 min	} × 30
AcGFP BD/PL AD FWD (10 µM)	1 µl	Denaturierung	98 °C	15 s	
AcGFP BD/PL AD REV (10 µM)	1 µl	Annealing	55 °C	15 s	
DNA Polymerase (2,5 U/µl)	0,25 µl	Elongation	72 °C	3 min	
dd. H ₂ O		Final Extension	72 °C	10 min	
		STOP	4 °C		
Gesamtvolumen	50 µl				

5 µl des PCR Produktes wurden auf einem 1 %igen Agarosegel mit einer 1 kb DNA Leiter (*HypoLadder I*, Bioline) analysiert.

Sequenzierungs-PCR

Für die Sequenzierungsreaktion wurden 1,2 - 1,4 µg aufgereinigtes Plasmid, 4 µl Primer (1 pm/µl), und 12 µl BigDye-Mix gemischt und mit dd. H₂O auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Nach der initialen Denaturierung (96 °C, 1 min) im Thermocycler (Biozym, MJ. Research Inc., Oldendorf) wurden 25 Zyklen mit folgenden Bedingungen durchgeführt: 96 °C, 40 s – 52 °C, 25 s – 60 °C, 4 min. Vor der Sequenzierung mittels Kapillarsequencer wurde die Reaktion über ein Säulensystem (AB *applied Biosystems*, Darmstadt) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.2.6 Klonierung

2.2.6.1 Herstellung von DNA-Fragmenten durch PCR

Für das Klonieren eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid wurde zuerst die codierende Region der DNA mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurden 39 bp lange Klonierungs-Primer synthetisiert (Primer-BLAST Primer *designing tool*, NCBI), die eine 15 bp Homologie zu den entsprechenden Überhängen des Vektors (pGBKT7) aufweisen sowie BamHI und EcoRI Schnittstellen enthalten. 1 µl cDNA wurde mit je 5 µl Klonierungs-Primer in der *FastStart PCR* (Roche) eingesetzt (vgl. 2.2.5.2). 3 µl des PCR-Produktes wurden auf ein 1,5 %iges Agarosegel zur Kontrolle der Fragmentgröße geladen. Das PCR-Produkt wurde mit dem *Nucleo Extract II Kit* (MACHEREY & NAGEL, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Für die Herstellung des PCR-Produktes für das *In-FusionTM Cloning* des AcGFP1-bait und des ProLabel-prey wurde die *Hot Start* Polymerase von Takara verwendet (vgl. 2.2.5.2).

Anschließend wurden das PCR-Produkt (45 µl) mit 1 µl DpnI für 60 min bei 37 °C verdaut und mit *Nucleo Extract II* Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.6.2 Restriktion der Plasmide

Für die Restriktion des Vektors pGBKT7 wurden 0,5 µl Vektor mit je 0,5 µl BamHI und EcoRI im Multicore Puffer (Promega) bei 37 °C für 15 min inkubiert.

Die Restriktion wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft und die DNA mit dem *Nucleo Extract II* Kit nach Herstellerangaben gereinigt.

chemilumineszente Co-IP

Für das *In-Fusion PCR Cloning* wurden je 1 µg der Vektoren pAcGFP-C bzw. pProLabel-C mit je 1 µl der *Fast Digest* Enzyme SalI und HindIII bzw. SalI und BamHI für 5 min bei 37 °C inkubiert.

Eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsaktivität erfolgte für HindIII (10 min bei 80 °C), SalI (10 min bei 65 °C) und für BamHI (5 min für 80 °C). Zur Überprüfung der Restriktion wurden die Ansätze auf ein 0,7 %iges Agarosegel geladen. Für die weitere Verwendung wurden die Vektoren mit dem *Nucleo Extract II* Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.6.3 Ligation der Plasmide mit dem DNA-Insert

Die Herstellung der Plasmide erfolgte mit dem *In-FusionTM Advantage PCR Cloning* Kit. Hierfür wurden das zuvor gereinigte PCR-Fragment und der Vektor zusammen in einem molaren Verhältnis von 2:1 nach Herstellerangaben ligiert.

Der Ansatz wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert, dann für 15 min bei 50 °C erhitzt, auf Eis gestellt und anschließend mit 50 µl TE-Puffer (pH 8) aufgefüllt und gut gemixt. Die Lagerung für die Transformation erfolgte bei -20 °C.

2.2.7 Mikrobiologische Methoden

2.2.7.1 Bakterientransformation

50 μl *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C an, wonach die Transformationsansätze sofort wieder auf Eis gekühlt wurden (2 min). Nach Zugabe von 250 μl erwärmtem SOC-Medium wurden die Proben für 1 h bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Anschließend wurde auf Selektivagar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.7.2 Hefetransformation

Die Transformationen der *Saccharomyces cerevisiae* Stämme Y187 und Y2H Gold wurden mit dem *Yeastmaker*TM *Yeast Transformation System 2* nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurde eine Hefekolonie (nicht älter als 4 Wochen) in 3 ml YPDA Medium beimpft und unter Schütteln (250 rpm) bei 30 °C für 8 - 12 h inkubiert. Danach wurden 5 μl der Vorkultur in 50 ml YPDA-Medium gegeben und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,15 - 0,3 geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 700 \times g für 5 min bei RT zentrifugiert und in 100 ml frischem YPDA-Medium aufgenommen. Die Kultur schüttelte bei 30 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5. Anschließend wurde die Kultur bei 700 \times g für 5 min zentrifugiert und in sterilem dd. H₂O gewaschen. Die Pellets wurden in 3 ml 1,1 \times TE/LiAc Lösung resuspendiert und bei 1.400 \times g für 15 s zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1,2 ml 1,1 \times TE/LiAc resuspendiert und die Zellen konnten für die Transformation der Plasmid-DNA weiter verwendet werden. Kompetente Hefezellen sollten innerhalb einer Stunde für eine hohe Transformationseffizienz genutzt werden.

Für die Transformation wurden 100 ng Plasmid-DNA und 5 μl *Yeastmaker Carrier DNA* (denaturiert; 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, für 5 min bei 95 - 100 °C erhitzt und sofort in einem Eisbad abgekühlt) eingesetzt. Zu diesen Komponenten wurden 50 μl der kompetenten Zellen und anschließend 500 μl PEG/LiAc (40 % PEG 3350; 1 \times TE Puffer, 1 \times LiAc; für 10 ml Lösung: 8 ml 50 % PEG; 1 ml 10 \times TE Puffer, 1 ml LiAc (10 \times)) gegeben. Der Ansatz inkubierte bei 30 °C für 30 min. Während dieser Zeit wurde die Probe alle 10 min vorsichtig invertiert. Danach erfolgten die Zugabe von 20 μl DMSO und die Erwärmung der Zellen bei 42 °C für 15 min im Wasserbad, wobei alle 5 min die Zellen vorsichtig gemischt wurden. Anschließend wurden sie bei 1.400 \times g für 15 s bei RT zentrifugiert und in 1 ml YPD-Plus-Medium resuspendiert.

Dieser Arbeitsschritt wurde 1 × wiederholt und das Pellet anschließend in 1 ml 0,9 %iger NaCl Lösung aufgenommen. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde 100 µl einer 1/10 und 1/100 Verdünnung auf 100 mm SD Agarplatten ausgestrichen und für 3 - 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2.7.3 Anlegung von mikrobiellen Stocks

Bakterien (*E. coli*)

Für die längerfristige Lagerung von *E. coli* wurden 850 µl einer Übernachtskultur mit 150 µl sterilem 100 %igen Glycerol gemischt und sofort bei -80 °C gelagert.

Hefen (*S. cerevisiae*)

Für die Anlegung einer Lagerungskultur von *S. cerevisiae* wurde eine frische Kolonie in 500 µl YPD, YPDA-Medium, oder geeignetem SD-Medium mit 15 - 30 %igen sterilen Glycerol gründlich resuspendiert. Die Lagerung erfolgte sofort bei -80 °C.

Helicobacter pylori

H. pylori SS1 wurde von einer dicht bewachsenen Agarplatte abgenommen und in ein Einfriermedium ((1,85 g BHI/50 ml dd. H₂O) mit 20 % Glycerol, 10 % FCS) überführt und gründlich gemischt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.7.4 Überprüfung der DNA-BD-Fusionsproteine auf Toxizität in der Hefe

Zur Überprüfung der Toxizität des DNA-BD Fusionsproteins wurden 100 ng der Vektoren - pGBKT7 und pGBKT7 + *bait* Gen in kompetente Y2HGold Zellen transformiert (siehe 2.2.7.2). Es wurden jeweils 100 µl einer 1/10 und einer 1/100 Verdünnung auf SD/-Trp Platten ausgestrichen und für 3 - 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Ein toxisches Fusionsprotein würde sich in signifikant kleineren Kolonien widerspiegeln, als Kolonien, die nur mit dem leeren Vektor pGBKT7 transformiert wurden.

2.2.8 Aufbau der cDNA-Bibliothek

Der Aufbau der cDNA-Bibliothek für das *Yeast Two-Hybrid Screening* erfolgte mit dem *Make Your Own „Mate & PlateTM“ Library System Manual* (Takara, Clontech, Heidelberg) nach Herstellerangaben.

2.2.8.1 Überprüfung der RNA

Die humane Magenkarzinom RNA als auch die humane Plazenta Poly A+ RNA (Positivkontrolle) wurden mithilfe eines Agarose/MOPS-Gels auf ihre Qualität überprüft. Hierfür wurde die mRNA mit RNA *loading buffer* gemischt, für 15 min bei 65 °C inkubiert und auf dem Gel bei 80 V analysiert (10 × MOPS: 0,2 m MOPS; 10 mM Na₂-EDTA; 50 mM Na-Acetat; pH 7,0).

2.2.8.2 First-Strand cDNA-Synthese

Für die *First-Strand* cDNA-Synthese wurden 2 µl RNA, 1 µl CDSIII Primer (10 µM) und 1 µl dd. H₂O gemischt, der Mix für 2 min bei 72 °C inkubiert, 2 min auf Eis gekühlt und bei 14.000 × g für 10 s zentrifugiert. Anschließend wurden 2 µl 5 × *First-Strand buffer*, 1 µl DTT (100 mM), 1 µl dNTP (10 mM) und 1 µl SMART MMLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) zum denaturierten Mix dazugegeben. Es schloss sich eine Inkubation für 10 min bei 42 °C an, nach der die Zugabe von 1 µl SMART III *modified* Oligonukleotiden erfolgte und der Mix wiederum für 1 h bei 42 °C inkubiert wurde.

Um die *First-Strand* Synthese zu beenden, wurden die Proben für 10 min bei 75 °C inkubiert, auf RT herabgekühlt und mit 1 µl RNase H (2 Units) versetzt. Danach wurden die Proben für 20 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die *First-Strand* cDNA mittels *Long Distance PCR* (LD-PCR) amplifiziert oder bei -20 °C gelagert.

2.2.8.3 Amplifikation der ds cDNA mittels der Long Distance-PCR (LD-PCR)

Nach der Herstellung der cDNA erfolgt die Amplifikation des Produktes mithilfe einer LD-PCR. Tabelle 17 zeigt den PCR-Ansatz und das Programm.

Tabelle 17: PCR-Ansatz der Long Distance-PCR und Programm

PCR-Ansatz		PCR-Programm			
<i>First Strand</i> cDNA	2 µl				
10 × Advantage [®] 2 PCR Puffer	20 µl				
50 × dNTPs	2 µl	Denaturierung	95 °C	30 s	
5' PCR Primer (50 µM)	2 µl	Denaturierung	95 °C	10 s	} × 22
3' PCR Primer (50 µM)	2 µl	<i>Annealing</i>	68 °C	6 min	
				+ 5 s pro Zyklus	
10 × <i>Melting Solution</i>	10 µl	Elongation	68 °C	5 min	
50 × Advantage 2 Polymerase Mix	2 µl	Stop	4 °C		
dd. H ₂ O	70 µl				
Gesamtvolumen	100 µl				

Für jede experimentelle Probe wurden zwei 100 µl PCR Reaktionen angesetzt sowie eine Reaktion für die Plazentakontrolle. Die Amplifikation von 22 PCR-Zyklen richtete sich nach der totalen RNA-Menge (0,5 - 1 µg). 7 µl des PCR-Produktes wurden mit einer 1 kb DNA-Leiter auf einem 1,2 %igen Agarosegel analysiert.

2.2.8.4 Reinigung der ds cDNA

Die Reinigung der cDNA erfolgt mittels CHROMA SPIN™ TE-400 *Columns* nach Anleitung. Die aufgereinigte DNA wurde anschließend mittels Ethanolpräzipitation gefällt. 1/10 Volumen 3 M NaAcetat sowie 2,5 Volumen eiskaltes Ethanol wurden hinzugegeben, für 1 h bei -20 °C inkubiert und darauffolgend bei $17.500 \times g$ für 20 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde für 10 min an der Luft getrocknet und in 20 µl dd. H₂O gelöst. Nach der Aufreinigung war die cDNA für die *Library Construction* bereit und betrug zwischen 2 - 5 µg.

2.2.8.5 Sequentielle Transformation

Für die Herstellung der cDNA-Bibliothek wurden kompetente Y187 Hefezellen mit der humanen Magenkarzinom-ds-cDNA und dem linearen Vektor pGADT7 sequentiell transformiert. Die Hefezellen wurden - wie unter 2.2.7.2 beschrieben - für die Transformation vorbereitet.

Anschließend wurden 20 µl ds cDNA, 6 µl pGADT7-Rec Vektor (SmaI linearisiert, 0,5 µg/µl) und 20 µl denaturierte *Yeastmaker Carrier*-DNA (10 µg/µl) $2 \times$ für 5 min bei 95 - 100 °C erhitzt und sofort in einem Eisbad abgekühlt.

Zu diesen Komponenten wurden 600 µl der kompetenten Y187-Zellen gegeben und anschließend 2,5 ml PEG/LiAc (40 % PEG 3350; $1 \times$ TE Puffer, $1 \times$ LiAc; für 10 ml Lösung: 8 ml 50 % PEG, 1 ml $10 \times$ TE Puffer, 1 ml LiAc ($10 \times$)) hinzugefügt. Der Ansatz inkubierte bei 30 °C für 45 min. Während dieser Zeit wurde die Probe alle 15 min vorsichtig invertiert. Danach erfolgte die Zugabe von 160 µl DMSO und die Erwärmung der Zellen bei 42 °C für 20 min im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen bei $700 \times g$ für 5 min bei RT zentrifugiert und in 3 ml YPD-Plus-Medium resuspendiert. Darauffolgend inkubierten die Zellen schüttelnd bei 90 °C für 30 min. Anschließend wurden sie bei $700 \times g$ für 5 min bei RT zentrifugiert und in 15 ml 0,9 %iger NaCl Lösung aufgenommen.

Um die Zahl der unabhängigen Klone in der Bibliothek zu bestimmen, wurden 100 µl einer 1/10 und einer 1/100 Verdünnung auf SD/-Leu 100 mm Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C

für 3 - 4 Tage inkubiert. Die Zahl der unabhängigen Klone wurde anhand der nachfolgenden Formel bestimmt:

$$\text{Zahl der cfu/ml auf SD/-Leu} \times \text{resuspendiertes Volumen (15 ml)}$$

Dieser Wert wird zur Bestimmung der Transformationseffizienz herangezogen und sollte möglichst > 1 Mio. unabhängige Klone sein.

Die restlichen Zellen wurde auf 150 mm SD/-Leu Platten, a 150 µl pro Platte, aufgeteilt und bei 30 °C für 3 - 4 Tage inkubiert. Nach Bestimmung der Anzahl der unabhängigen Klone wurden die Transformanten gesammelt und zusammengefügt. Hierfür inkubierten alle Platten bei 4 °C für 3 - 4 h. Anschließend wurden 5 ml *Freezing Medium* (100 ml YPDA + 50 ml 75 % Glycerol) auf jede Platte gegeben, mit sterilen Glas *Beads* (Sigma Aldrich, Deisenhofen) wurden die Kolonien abgelöst und die gesammelten flüssigen Kolonien in einer sterilen Flasche vereinigt. Zum Schluss wurden die Zellen gemessen, um die Zelldichte abzuschätzen. Betrug die Zelldichte weniger als 2×10^7 /ml, wurde die Suspension aufkonzentriert. Die fertige cDNA-Bibliothek wurde a´ 1 ml (für den kurzzeitigen Gebrauch) und a´ 50 ml (für den langfristigen Gebrauch) aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.8.6 Kontrollen für die Bibliotheks-Transformation

Für die Kontrollexperimente wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle hergestellt, wobei die Positivkontrolle als positiver Kontrollstamm für das *Yeast Two-Hybrid Screening* genutzt wurde. Analog - wie beschrieben in 2.2.7.2 - wurden Y187 kompetente Zellen hergestellt und transformiert. Dafür wurden die in Tabelle 18 angegebenen Komponenten gemischt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen alle 10 min invertiert.

Tabelle 18: Positiv- und Negativkontrolle für die Bibliotheks-Herstellung

Komponente	Positivkontrolle	Negativkontrolle
pGADT7-Rec (SmaI linearisiert, 500 ng /µl)	1 µl	1 µl
SV 40 <i>Large-T PCR Fragment</i> (25 ng/µl)	3 µl	-
<i>Yeastmaker Carrier</i> DNA-denaturiert (10 µg/µl)	5 µl	5 µ
Y187 kompetente Zellen	50 µl	50 µl
PEG/LiAc Lösung	500 µl	500 µl

Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl DMSO und die Erwärmung der Zellen bei 42 °C für 15 min im Wasserbad (wobei alle 5 min die Zellen vorsichtig gemischt wurden).

Nachfolgend wurden sie bei $1.400 \times g$ für 15 s zentrifugiert, in 1 ml YPD-Plus-Medium gewaschen und das Pellet in 1 ml 0,9 %iger NaCl Lösung aufgenommen. Jeweils 100 μ l einer 1/10 und einer 1/100 Verdünnung wurden auf SD/-Leu 100 mm Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C für 3 - 4 Tage inkubiert. Es sollten mindestens $10 \times$ mehr Kolonien auf den Platten zu erkennen sein, wenn mit dem Vektor pGADT7-Rec und dem SV40 *Large-T PCR Fragment* co-transformiert wurde, als mit dem Vektor allein. Dies lässt darauf schließen, dass mindestens 90 % der Kolonien den Vektor pGADT7-Rec beinhalten, den sie durch homologe Rekombination aufgenommen haben.

2.2.9 *Yeast Two-Hybrid Screening mittels Yeast Mating*

Für das *Yeast Two-Hybrid Screening* mittels *Yeast Mating* wurde eine konzentrierte *bait* Kultur mit 1 ml der hergestellten cDNA-Bibliothek über Nacht inkubiert und zur Selektion auf DDO/X/A Agarplatten ausplattiert.

Eine frische Kolonie des *bait* Stamms (Y2HGold[pGBKT7+*bait*]) wurde in 50 ml SD/-Trp Flüssigmedium angeimpft und bei 30 °C schüttelnd (250 - 270 rpm) inkubiert bis sie eine OD_{600} von 0,8 erreicht hatte. Anschließend wurden die Zellen bei $1.000 \times g$ für 5 min zentrifugiert und das Pellet auf eine Dichte von mehr als 1×10^8 Zellen/ml in SD/-Trp Medium resuspendiert. Die Vereinigung des Bibliothekstamms (Y187 [pGADT7+ *prey*]) mit dem *bait*-Stamm gestaltete sich wie folgt: Ein 1 ml Aliquot des Bibliothekstamms wurde in einem raumtemperierten Wasserbad aufgetaut und 10 μ l für die Titration der Bibliothek (auf 100 mm SD/-Leu Agarplatten) entnommen. Als nächstes wurden 1 ml der Bibliothek mit 4 - 5 ml des *bait*-Stamms in einer sterilen 2 l Flasche gemischt, wobei das Röhrchen, das den Bibliotheksstamm enthielt, 2 mal mit 1 ml $2 \times$ YPDA-Medium ausgespült wurde. Es erfolgte die Zugabe von 45 ml $2 \times$ YPDA-Flüssigmedium mit 50 μ g/ml Kanamycin und die anschließende Inkubation der Zellen für 20 - 24 h bei 30 °C bei 30 - 50 rpm. Nach 20 h wurde ein Tropfen der Kultur unter dem Phasenkontrastmikroskop (Nikon, Düsseldorf) auf Zygoten untersucht. Wenn diese noch nicht zu erkennen waren, wurde für weitere 4 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei $1.000 \times g$ für 10 min. Währenddessen wurde die 2 l Flasche 2-mal mit 50 ml $0,5 \times$ YPDA-Medium (50 μ g/ml Kanamycin) gespült. Die Spülungen wurden vereinigt und für die Resuspendierung des Zellpellets genutzt. Erneut zentrifugierten die Zellen bei $1.000 \times g$ für 10 min und wurden in 10 ml $0,5 \times$ YPDA Flüssigmedium (50 μ g/ml Kanamycin) resuspendiert. Darauf folgend wurde das Volumen der Zellen inkl. Medium bestimmt. Von der verpaarten Kultur wurde je 100 μ l einer 1/10, 1/100, 1/1.000 und 1/10.000 Verdünnung auf jeder der folgenden Platten

ausgestrichen: SD/-Trp, SD/-Leu, SD/-Leu/-Trp (DDO). Dieser Schritt diente zur Bestimmung der Zahl der getesteten Klone. Die restliche Kultur wurde auf 200 µl pro 150 mm Agarplatte auf DDO/X/A Platten ausgestrichen und für 3 - 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Zum Schluss wurden die Kolonien auf den DDO Platten für die Bestimmung der Zahl der getesteten Klone gezählt und die *Mating*-Effizienz bestimmt:

$$\text{Zahl der getesteten Klone} = \text{cfu/ml} \times \text{resuspendiertes Volumen (ml)}$$

Bestimmung der *Mating*-Effizienz:

$$\frac{\text{Zahl der cfu/ml Diploiden}}{\text{Zahl der cfu/ml des limitierenden Partners}} \times 100 = \% \text{ Diploide}$$

Nach 3 - 5 Tagen Inkubation wurden alle auf DDO/X/A gewachsenen blauen Kolonien mithilfe einer sterilen Impföse auf die höher stringenten QDO/X/A Platten ausgestrichen und für 3 - 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Auf diesen Platten gewachsene Klone wurden weiter auf Duplikate und Protein-Protein-Interaktionen untersucht.

2.2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.2.10.1 Zellaufschluss

Die geernteten Zellpellets wurden mit Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl; pH 8.0; 150 mM NaCl; 0,02 % Natriumazid; 0,1 % SDS; 1 % P-40 NP40; 0,5 % Na-deoxycholate; 1:50 Proteaseinhibitor) aufgeschlossen. Danach wurden die Proben für 20 min auf Eis inkubiert und bei $12.000 \times g$ für 3 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden bei -80 °C gelagert.

Vorbereitung auf die magnetische Co-IP

Für die magnetische Co-IP wurden die Pellets (aus Magenkarzinomgewebe) in 100 µl *cell lysis* Puffer (93 µl *whole cell lysis* Puffer; 5 µl Phosphatase Inhibitor; 1 µl Deacetylase Inhibitor; 0,5 µl Protease Inhibitor Cocktail; 0,5 µl PMSF-100) pro Platte resuspendiert, kräftig 10 s geschüttelt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben noch einmal geschüttelt, bei $1.400 \times g$ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein gekühltes Reaktionsgefäß gegeben. Die Lysate wurden anschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Für die Proteinbestimmung wurde eine 1:2 Verdünnung genutzt.

Präparation der Zelllysate für die chemilumineszente Co-IP

Die Zellpellets wurden in 500 µl kaltem Lysispuffer (versetzt mit 1:200 200 mM PMSF) resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert, wobei die Proben alle 10 min für 5 - 10 s geschüttelt und anschließend bei $10.000 \times g$ für 20 min bei 4 °C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, sofort auf Eis gestellt und die Proteinkonzentration bestimmt. Zum Schluss wurden je 250 µg Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf 500 µl eiskalten Lysispuffer aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C oder die Co-Immunopräzipitation schloss sich direkt an.

2.2.10.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem DC Protein Assay Kit (Biorad, München) in 96-well Platten nach Anleitung durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Eichgerade (0 - 3 mg/ml) berechnet. Die Messung der Proben erfolgte bei 450 nm (Ref-Filter) und 630 nm (Test-filter) mit dem Glomax MULTI *Detection System* (Promega, Mannheim).

2.2.10.3 SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurden 30 µg Protein eingesetzt und mit 2 × Lade-Puffer (4 mM Urea; 2 % SDS; 62,5 mM Tris) versetzt. Die Proben wurden gemischt und anschließend erfolgte die Denaturierung für 5 min bei 95 °C. Je nach molekularer Masse der Proteine wurden 10 %ige oder 12 %ige Gele verwendet. An die Gel-Apparatur wurde eine Stromstärke von 30 mA und später, als die Proteine im Trenngel migrierten, von 50 mA angelegt. Die Auftrennung der Proteine im SDS-Gel erfolgte in 1 × Elektrophoresepuffer (10 × Elektrophoresepuffer, Roth, Karlsruhe).

Tabelle 19: Zusammensetzung der verschiedenen Trenngele und des Sammelgels

	10 %iges Trenngel	12 %iges Trenngel	Sammelgel
H ₂ O (dd.)	4,64 ml	3,93 ml	6,33 ml
30 %ige Acrylamid Lösung mit 0,8 % Bisacrylamid	3,33 ml	3,93 ml	1,65 ml
Trenngelpuffer (1,875 M Tris; 1 % SDS; pH 8,8)	2 ml	2 ml	-
Sammelgelpuffer 1,875 M Tris; 1 % SDS; pH 6,8)	-	-	2 ml
APS (10 %)	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl

2.2.10.4 Westernblot

Mithilfe eines *Tank-blots* wurden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (*Whatman*, Dassel) transferiert. Die Membran wurde in Transfer-Puffer (25 mM Tris Base; 192 mM Glycerol; 20 % Methanol; pH 8,3) aktiviert. Vier Lagen Blotpapier (Bio-Rad) wurden zusammen mit dem SDS-Gel in Transfer-Puffer getränkt. In der Blotapparatur wurden zwei Lagen Blotpapier, das Proteingel, die Membran und erneut zwei Lagen Blotpapier luftblasenfrei übereinandergelegt. Der Transfer lief bei konstanter Stromstärke und Spannung bei 120 V für 1,5 h oder bei 30 V über Nacht. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der transferierten Proteine mittels Färbung durch Ponceau-Rot (3 %ige Essigsäure, Roth).

Danach wurde die Membran kurz in TBST (150 mM NaCl; 7,7 mM Tris-HCl; 0,05 % Tween; pH 8) geschwenkt und für 1 h in Block-Puffer (5 % Magermilchpulver in TBST) bei RT geblockt. Bevor der primäre Antikörper dazugegeben wurde, wurde die Membran für 10 min mit Wasch-Puffer (TBST) gewaschen. Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 4 °C oder nach Angaben des Herstellers. Danach wurde die Membran wieder dreimal 5 min mit TBST gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Zum Schluss wurde der letzte Waschschrift wiederholt und die Membran konnte mittels Chemilumineszenz (SuperSignal® Chemilumineszenz Substrates; Millipore, Schwalbach) über die Substratumsetzung der HRP-konjugierten sekundären Antikörper im FluorChemE (Cell Biosciences, Heidelberg) Westernblotdetektionsgerät entwickelt werden. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm Genetools (*Syngene, BioImaging Systems*, Cambridge, UK) und mit AlphaView Sa (*Cell Biosciences Inc.*, Heidelberg).

2.2.10.5 Strippen der Membranen

Um die Westernblotmembranen mehrmals verwenden zu können, wurden sie in *Stripping* Puffer (Thermoscientific, Schwerte) für 15 min bei RT inkubiert und dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Anschließend konnten sie mit einem neuen primären Antikörper inkubiert werden.

2.2.10.6 Magnetische Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation erfolgte mit dem Universal *Magnetic Co-IP* Kit (Active Motif, München) nach Herstellerangaben.

Es wurden je 500 µg Zell- bzw. Karzinomgewebelysat mit 5 µg Cathepsin X Antikörper (R&D System, Wiesbaden) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde immer eine Probe mit einem *goat* IgG-Antikörper (R&D System, Wiesbaden) mitgeführt. Die Inkubation erfolgte für 2,5 h auf einem *Rolling shaker* (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) bei 4 °C. Am Ende erfolgte die Resuspendierung der *bead* Pellets in 20 µl 2 × *Reducing Loading buffer* (130 mM Tris; pH 6,8; 4 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau; 20 % Glycerol; 100 mM DTT) und die Lagerung bei -20 °C oder ein sofortiger Westernblot. Hierfür wurden die Proben bei 95 °C für 5 min erhitzt, bei 1.400 × g für 30 s zentrifugiert und der Überstand auf ein Polyacrylamidgel geladen. Als zusätzliche Kontrolle dienten 5 µg des gesamten Zelllysates.

2.2.10.7 Chemilumineszente Co-Immunopräzipitation

Die chemilumineszente Co-Immunopräzipitation erfolgte mit dem Matchmaker™ Chemiluminescent Co-IP Kit (Clontech, Heidelberg) nach Herstellerangaben.

Für die Pro-Label Detektion der Protein-Protein-Interaktionen wurden der *Lysis/complementation buffer* mit 1 Volumen EA, 1,2 µl Galecton, 6 µl Emerald und 22,8 µl des Substrates gemischt und auf Eis gestellt. Der Waschpuffer wurde verworfen und jede Probe mit 80 µl *Lysis/complementation buffer* vorsichtig gemischt und in eine schwarze 96-*well* Platte transferiert. In jedes *well* erfolgte die Zugabe von 30 µl Substrat-Mix und die anschließende Messung in einem 96-*well* Plattenreader (Glomax MULTI Detection System, Promega, Mannheim).

2.2.11 Statistik

Alle Daten in der vorliegenden Arbeit wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Mittels Student's *t*-Test wurde überprüft, ob sich zwei unabhängige Datengruppen signifikant voneinander unterscheiden. Voraussetzungen für den Test sind Normalverteilung und hohe Varianzhomogenität. Der resultierende Wert *p* beschreibt dabei die Wahrscheinlichkeit, mit der die Stichproben einander ähneln, wobei eine statistische Signifikanz bei einem *p*-Wert von < 0,05 gegeben war (* *p* < 0,05; ** *p* < 0,01).

Die statistischen Analysen für die Zellzyklusexperimente wurden mit der Software SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) ausgewertet. Die Einflüsse auf die Zellzahlverteilung wurden anhand eines gemischten linearen Modells untersucht. Dafür wurden die Daten zuvor logarithmiert. Beim Nachweis eines signifikanten Einflusses wurden zudem Post-hoc-Tests (Tukey- bzw. Dunnett-adjustiert für multiples Testen) durchgeführt, um Unterschiede zwischen den einzelnen Ausprägungen des Einflussparameters zu untersuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Anlegen einer cDNA-Bibliothek für das *Yeast Two-Hybrid Screening*

Für die Erstellung der cDNA-Bibliothek wurde der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm Y187 benutzt, der später im *Yeast Two-Hybrid* System seinen weiteren Einsatz fand. Die Grundlage der Bibliothek bildet die aus einem intestinalen Magenkarzinom isolierte RNA, die mithilfe der SMART Technologie (Clontech, Heidelberg) in cDNA umgeschrieben wird. Die SMART cDNA-Synthese kreiert Endsequenzen, die wiederum eine Homologie zum *prey*-Vektor pGADT7-Rec aufweisen, sodass nach einer erfolgreichen Transformation eine *in vivo* Rekombination im Stamm Y187 mit der hergestellten cDNA und dem *prey*-Vektor pGADT7-Rec stattfinden kann (Abbildung 4). Die erhaltenen Kolonien wurden gepoolt und aliquotiert. Die Aliquots konnten später für den *Yeast Two-Hybrid Screen* genutzt werden.

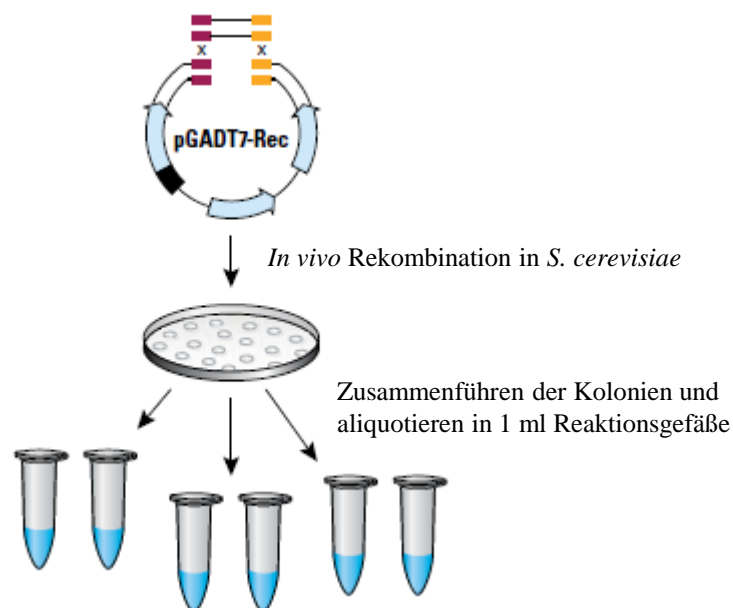


Abbildung 4: Homologe Rekombination der cDNA mit dem *prey*-Vektor pGADT7-Rec (modifiziert nach: *Library System User Manual*, Clontech).

Das verwendete System für die *First Strand* cDNA-Synthese basiert auf der SMART™ cDNA-Synthese-Technologie von Clontech (Heidelberg). Die Besonderheit liegt hierbei auf der MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) reversen Transkriptase (RT), die eine terminale Transferaseaktivität und eine *template switching*-Aktivität besitzt. Die resultierende ss cDNA besitzt ein komplettes 5'Ende der RNA sowie die komplementäre Sequenz der SMARTIII Oligonukleotide. Diese fungierte in der darauffolgenden *Long-Distance* PCR (LD-PCR) als universale Primerstelle (SMART-Anker) für die Amplifikation der ss cDNA (Abbildung 5). Ebenfalls in der PCR wurde eine Positivkontrolle (*Control Poly A + human Placenta RNA*) eingesetzt.

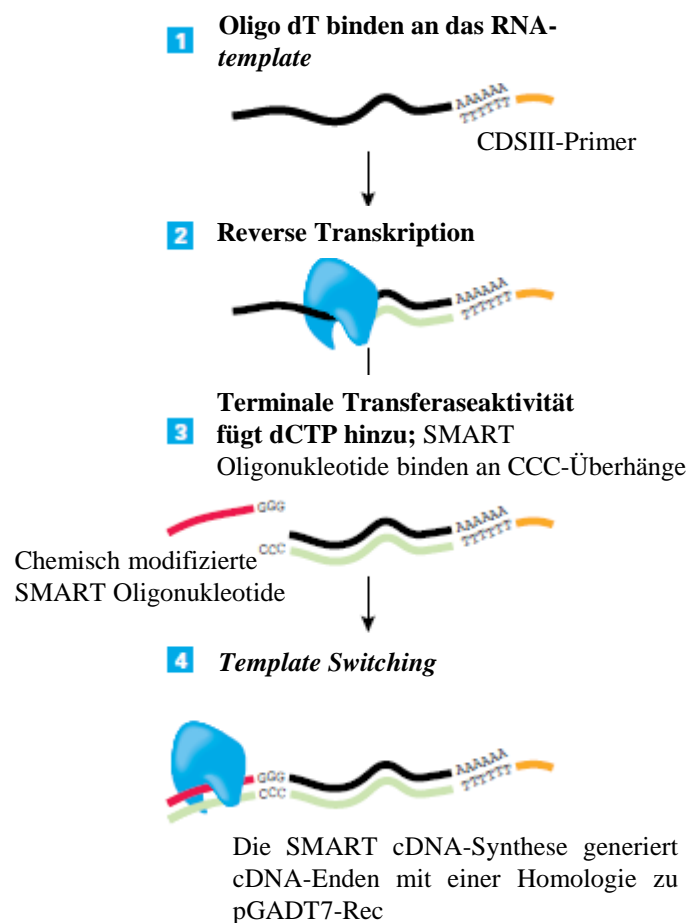


Abbildung 5: First Strand cDNA-Synthese (modifiziert nach: *Mate and Plate™ Library System User Manual*, Clontech).

Anhand der resultierenden cDNA-Bereiche lassen sich Unterschiede zwischen der Kontrolle (Spur 3) und der Karzinom-cDNA (Spur 4 und 5) erkennen (Abbildung 6). Der Bereich der Positivkontrolle liegt zwischen ca. 300 bp - 3000 bp, während die Karzinom-cDNA zwischen 150 bp - 2000 bp zu erkennen ist.

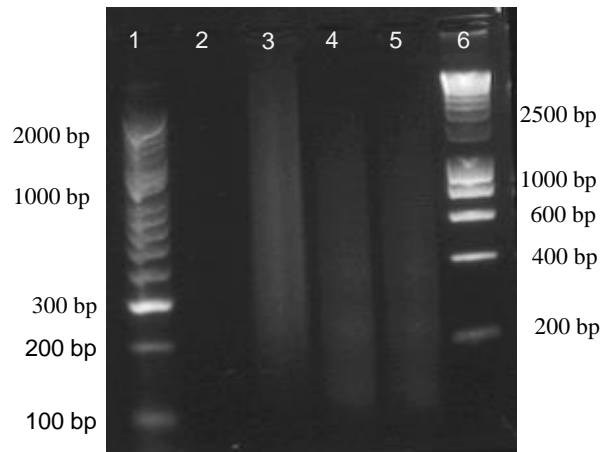


Abbildung 6: Hoch-qualitative cDNA mit Hilfe der SMART Technologie amplifiziert.

Spur 1: Marker [*HyperLadder II*]; Spur 2: Leerwert; Spur 3: Positivkontrolle [*Control PolyA + human Placenta RNA*]; Spur 4: ds cDNA (14466/08); Spur 5: ds cDNA (14406/08); Spur 6 :Marker [*HyperLadder I*]

Im Anschluss wurde die aus der LD-PCR erhaltene ds cDNA mithilfe der CHROMA SPINTM TE-400 Säulen aufgereinigt. Die Ausbeute betrug 4,26 µg aus 1 µg RNA.

Für den Aufbau der cDNA-Bibliothek wurde die hergestellte cDNA zusammen mit dem Vektor pGADT7-Rec in den Hefestamm Y187 transformiert.

Nach vier Tagen wurden die Kolonien („die Zahl der unabhängigen Klone“) auf den Agarplatten gezählt. Für den Stamm Y187 (VD 1/10) ergaben sich 205 Kolonien und für die 1/100 Verdünnung 27 Kolonien. Anschließend wurde die Zahl der unabhängigen Klone bestimmt (siehe Material und Methoden). Es konnten 405.000 unabhängige Klone gezählt werden. Die Transformationseffizienz der Y187-Zellen lag bei $1,01 \times 10^5$ cfu/ml.

Als Kontrolle wurde zusätzlich der pGADT-Rec (SmaI linearisiert) Vektor allein und der Vektor zusammen mit dem SV40 *large T* PCR-Fragment in Y187-Zellen transformiert und auf SD/-Leu Platten in einer Verdünnung von 1/10 und 1/100 ausplattiert (Tabelle 20).

Tabelle 20: Transformation von pGADT7-Rec mit SV40 *large T* PCR-Fragment

	pGADT-Rec	pGADT7-Rec + SV40 <i>large T</i> PCR
Kolonien 1/10	9	216
Kolonien 1/100	4	27

Der Vergleich der ausgezählten Kolonien zeigt eine deutliche Steigerung von pGADT7-Rec mit dem SV40 *large T* PCR-Fragment, im Vergleich zum transformierten Vektor allein (Tabelle 20). Aufgrund der erheblichen Transformationssteigerung ($> 10 \times$ Kolonien; Transformationseffizienz: $2,7 \times 10^5$ cfu/ μ g) zeigt sich, dass mehr als 90 % der Kolonien das pGADT7-T Kontroll-Plasmid durch homologe Rekombination zusammengefügt haben.

3.2 Yeast Two-Hybrid System

Der *Yeast Two-Hybrid Assay* basiert auf dem Ursprung des Gal4-Regulations-Systems in Hefen (*S. cerevisiae*). Grundlage hierfür sind ein *bait*-Protein (Cathepsin X), das an eine Gal4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert wurde (DNA-BD) und die *prey*-Proteine der cDNA-Bibliothek, die an eine Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert wurden (DNA-AD). Wenn *bait*- und *prey*-Proteine miteinander interagieren sollten, d. h. in räumlicher Nähe zueinanderfinden, interagieren auch die DNA-BD und die DNA-AD miteinander und aktivieren somit die Transkription der vier unabhängigen Reportergene (*AURI-C*, *ADE2*, *HIS3* und *MEL1*). Dies sorgt für eine Gal4 vermittelte His3 und Ade2 Expression (*HIS3* und *ADE2*), die es den Zellen erlaubt, auch auf Minimalmedium zu wachsen. Das *AURI-C* Gen ist eine dominantere Version des *AURI* Gens, welches die Inositol-phosphoryl Ceramid-Synthase codiert. In *S. cerevisiae* sorgt dessen Expression für eine starke Resistenz (*AbA'*) gegenüber der sonst hoch-toxischen Chemikalie Aureobasidin. Als farbliches Erkennungssignal positiver Y2H Gold-Zellen fungiert die α -Galactosidase, die von *MEL1* codiert wird und naturgemäß in Hefen vorkommt. Hefekolonien, die *MEL1* exprimieren, nehmen eine blaue Farbe in Anwesenheit des chromogenen Substrates X- α -Gal an.

3.2.1 Konstruktion eines DNA-BD/*bait*-Fusionsproteins

Um die hergestellte cDNA-Bibliothek im *Yeast Two-Hybrid Assay* später mit Cathepsin X (CTSX) *screenen* zu können, wurde CTSX mithilfe von EcoRI und BamHI in das *bait*-Plasmid pGBKT7 kloniert und dadurch an die Gal4-DNA-BD fusioniert.

Erhaltene Klone wurden sequenziert und mit der Sequenz NCBI-AF_136273 abgeglichen. So konnte eine vollständige und fehlerfreie *in-frame* Klonierung des Klon 4 durch Sequenzierung bestätigt werden (siehe Anhang 7.2.1).

3.2.2 Detektion der *bait*-Expression

Für die nachfolgenden Experimente wurde die korrekte Expression von CTSX (*bait*-Fusionsprotein) im Westernblot näher untersucht. Die Detektion der *bait*-Proteinexpression erfolgte mit dem monoklonalen Gal4-DNA-BD Antikörper (Abbildung 7). In Spur 2 wurde der Zellextrakt aus untransformierten Y2H Gold-Zellen als Negativkontrolle aufgetragen, während sich in Spur 3 der Proteinaufschluss von Y2H Gold-Zellen mit pGBKT7/CTSX befindet (Abbildung 7). In Spur 3 ist die Gal4-DNA-BD bei ca. 25 kDa zu erkennen, während das gesuchte Fusionsprotein bei ca. 50 kDa migriert. Dieses setzt sich aus CTSX mit ca. 29 kDa und der Gal4-DNA-BD von ca. 22 kDa zusammen.



Abbildung 7: Detektion der *bait*-Expression.

Spur 1: Marker [*Biotinylatd Protein Ladder*];

Spur 2: Negativkontrolle; Spur 3: pGBKT/CTSX

3.2.3 Test des *bait*-Fusionsproteins auf Autoaktivierung und Toxizität

Einer der ersten Schritte für einen *Yeast Two-Hybrid Screen* resultiert in der Überprüfung, ob es nicht zur alleinigen Autoaktivierung der Reportergene in den Y2H Gold-Zellen durch das *bait*-Protein - ohne die Anwesenheit des *prey*-Proteins - kommt.

Hierfür wurden kompetente Y2H Gold-Zellen mit pGBKT7 + CTSX (*bait*) (vgl. 3.2.1) transformiert und auf den entsprechenden Nährmedien ausplattiert. Als Positivkontrolle wurden die diploiden Zellen Y2H Gold (mit pGBKT7-p53) + Y187 (pGADT7-T) mitgeführt (vgl. 3.1). Die Auswertung des Versuches ist nachfolgend in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Test auf Autoaktivierung des *bait*-Proteins

Probe	Selektivagar	Kolonien	Farbe
<i>Bait</i> Autoaktivierungstest	SDO	Ja	weiß, sehr leicht rosa
<i>Bait</i> Autoaktivierungstest	SDO/X	Ja	hellblau bis hellgrün
<i>Bait</i> Autoaktivierungstest	SDO/X/A	-	-
Positivkontrolle	DDO/X/A	Ja	blau

Es wuchsen - wie erwartet - sowohl weiße Kolonien auf dem Einfach-Medium SDO (SD/-Trp) als auch blaue Kolonien der Positivkontrolle auf dem Doppel-Medium DDO/X/A (SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA) (Tabelle 21). Jedoch befanden sich kaum weiße Kolonien auf den SDO/X Platten, sondern vorwiegend leicht hellblaue bis helltürkise Kolonien (Tabelle 21). Da keine Kolonien auf den SDO/X/A Platten nachgewiesen werden konnten, aktiviert der pGBKT7/CTSX Vektor (*bait*-Fusionsprotein) auch nicht den *AbA'* Reporter und es kommt zu keiner Autoaktivierung der Reportergene durch das DNA-BD/*bait*-Fusionsprotein.

Für die nachfolgende Anlegung von Hefekulturen wurde das *bait*-Fusionsprotein auf Toxizität gegenüber den Hefezellen getestet. Bei einer vorliegenden Toxizität würden die Hefezellen sowohl in der Flüssigkultur als auch auf Agarplatten langsamer wachsen.

Hierfür wurden kompetente Y2H Gold-Zellen mit pGBKT7 + CTSX (*bait*) (vgl. 3.2.1) transformiert und auf SDO (SD-Trp) Medium ausplattiert.

Die beobachteten Kolonien waren annähernd gleich groß. Wenn das *bait*-Fusionsprotein toxisch auf die Zellen einwirken würde, würde sich dies in einer signifikanten Verkleinerung der Kolonien äußern. Somit wirkte das *bait*-Fusionsprotein nicht toxisch auf die Hefezellen Y2H Gold.

3.2.4 Bibliothek *Screening* mittels Hefe-Verpaarung (*Yeast-Mating*)

Das *Yeast-Mating* ist eine geeignete Methode für das Einbringen zweier verschiedener Plasmide in dieselbe Wirtszelle und kann als Alternative zur Co-Transformation angesehen werden [84; 85]. In diesem Fall wurden der *bait*-Stamm (Y2H Gold [pGBKT7/CTSX]) zusammen mit dem *Library*-Stamm (Y187 [pGADT7/unbekannte Bibliotheksproteine]) kombiniert.

Dafür wurde eine Übernachtskultur des *bait*-Stammes (pGBKT7/CTSX) angesetzt, am nächsten Tag mit dem *Library*-Stamm (pGADT7/*prey* Proteine) gemischt und für 20 - 24 h bei 30 °C inkubiert. Vorher wurden 10 µl von der *Library*-Kultur zur späteren Bestimmung des Titers abgenommen. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde nach ca. 20 h die Bildung von diploiden Zygoten untersucht. Eine typische Zygote weist eine 3-lappige Struktur auf („Kleeblatt ähnlich“) (Abbildung 8). Diese Lappen repräsentieren die haploiden Parentalzellen und die angehende - sich knospende - diploide Zelle (Abbildung 8, rot umrandete Strukturen). Nach der erfolgten Zygotenbildung wurden die Zellen gesammelt und aufgearbeitet. Von der verpaarten Kultur wurden 100 µl einer 1/10, einer 1/100, einer 1/1000 und einer 1/10.000 Verdünnung auf SDO und DDO Medien ausplattiert und für die spätere Bestimmung der Zahl der getesteten Klone herangezogen (Tabelle 22). Die restliche Kultur wurde auf ca. 50 150 mm DDO/X/A Platten verteilt.

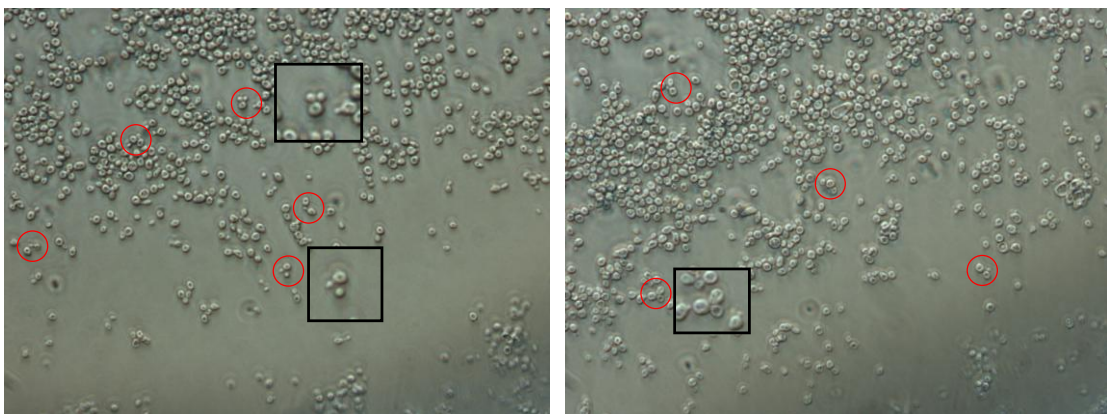


Abbildung 8: *Yeast-Mating* mit typischer Zygotenbildung

(Phasenkontrastmikroskop Nikon, 40 × Vergrößerung).

Nochmals herausvergrößerte Zellen wurden schwarz umrandet.

Tabelle 22: Auswertung des *Yeast-Mating*; Verdünnung mit zu vielen Klonen sind nicht aufgeführt

Mating-Stamm	SD Minimal-Medium	Verdünnung und Kolonien
YH2 Gold [pGBKT7/CatX] + Y187 [pGADT7] Library Strain	- Leu (SDO)	1/1000 560
		1/10.000 85
		1×10^6 1
	- Trp (SDO)	1/10.000 1244
		1×10^6 37
	- Leu/-Trp (DDO)	1/100 1040
1/1000 76		
1/10.000 17		

Für die Berechnung der Zahl an getesteten Klonen wurden die Kolonien auf den DDO Platten gezählt und ausgewertet (siehe Material und Methoden).

Mithilfe des *Yeast-Mating* konnten 9,5 Millionen diploide Klone auf eine mögliche Interaktion von CTSX mit einem unbekanntes Protein durchgetestet werden. Des Weiteren wurde die *Mating*-Effizienz der Klone bestimmt. Diese sollte mindestens 2 - 5 % betragen, um weiter fortzufahren. Hierfür wurden die Überlebensraten der Zellen berechnet. Die Viabilität der *prey Library* betrug $8,6 \times 10^6$, die des *bait* $1,2 \times 10^8$ und die der diploiden Zellen $7,6 \times 10^5$. Diese Viabilitäten wurden für die Berechnung der *Mating*-Effizienz herangezogen, wobei der limitierende Partner der Stamm mit der geringeren Viabilität ist. Die Berechnung der *Mating*-Effizienzen ergab einen Wert von 8,84 % (siehe Berechnung der *Mating*-Effizienz, Material und Methoden).

Alle auf DDO/X/A gewachsenen blauen Kolonien wurden zur höheren Stringenz auf QDO/X/A (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal/-AbA) Platten umgestrichen. Alle positiven QDO/X/A-Interaktionen wurden nachfolgend weiter analysiert, um Duplikate zu identifizieren und positive Interaktionen zu verifizieren. Insgesamt konnten 832 Klone umgestrichen werden, die auf positive Interaktionen untersucht wurden.

3.2.5 Analyse der positiven Klone

Nach dem erfolgreichen *Yeast-Mating* (vgl. 3.2.4) wurden die positiven (blauen) Klone in den nachfolgenden Abschnitten näher untersucht, um die potentiellen Interaktionen zu bestätigen und zu verifizieren. Dafür wurden in einem ersten Schritt die möglicherweise doppelten Klone durch eine Kolonie-PCR eliminiert. Als nächstes erfolgte die Isolation der *prey*-Plasmide aus der Hefe (*Rescue*) mit anschließender Transformation in *E. coli* sowie die Co-Transformation von DNA-BD *bait* (CTSX) und der positiven AD *Library* Plasmide in Y2H Gold-Zellen. Zum Schluss wurde die DNA sequenziert und anhand von Datenbanken überprüft.

3.2.5.1 Kolonie-PCR

Das *Yeast-Mating* ergab eine große Anzahl an positiven Klonen, die alle weiter überprüft wurden. Um diese Zahl etwas einzudämmen, wurde eine Kolonie-PCR, mit der die möglicherweise gleichen Klone (Duplikate) auf einfache und effektive Weise vorab aussortiert wurden, durchgeführt.

Hierfür wurden 50 Klone untersucht und anhand der unterschiedlichen Fragmentgrößen im Agarosegel für die weiteren Analysen ausgesucht (Abbildung 9 - 11). Es wurde darauf geachtet, möglichst unterschiedlich große Fragmente der PCR-Produkte auszusuchen. Zum Schluss wurden 20 Klone (**K1, K2, K6, K10, K11, K14, K17, K19, K 23, K28, K21, K32, K33, K34, K36, K37, K39, K44, K46, K50**) (Abbildung 9 - 11, rot umrandete Banden; Tabelle 23) mit unterschiedlichen Fragmentgrößen für die weiterführenden Experimente ausgewählt.



Abbildung 9: Kolonie-PCR der Klone 1 - 15.

Spur 1: Marker [*HyperLadder I*]; Spur 2 bis 16:

Klone 1 bis 15; Spur 17: Marker [*HyperLadder I*]



Abbildung 10: Kolonie-PCR der Klone 16 - 30.

Spur 1: Marker [*HyperLadder I*]; Spur 2 bis 16:

Klone 16 bis 30; Spur 17: Marker [*HyperLadder I*]

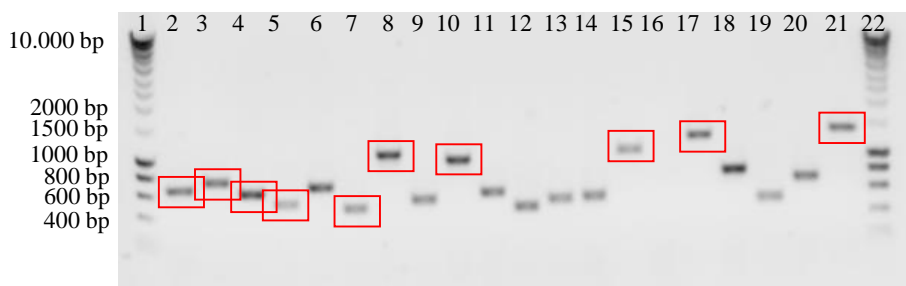


Abbildung 11: Kolonie-PCR der Klone 31 - 50.

Spur 1: Marker [*HyperLadder I*]; Spur 2 bis 21:

Klone 31 bis 50; Spur 22: Marker [*HyperLadder I*]

Tabelle 23: Auflistung der einzelnen Klone mit dem AD *Library-Insert*

Klon	AD <i>Library-Insert</i> [bp]	Klon	AD <i>Library-Insert</i> [bp]
1	1100	31	700
2	500	32	780
6	600	33	600
10	700	34	550
11	800	36	530
14	1300	37	1100
17	1200	39	1000
19	450	44	1200
23	1150	46	1400
28	1450	50	1470

3.2.5.2 *Rescue* und Isolierung der Bibliotheks-Plasmide

Transformierte Hefezellen sind in der Lage, mehr als eine Version der betreffenden Plasmide zu besitzen. Sie können zusätzlich zum eigentlichen aktiven *prey*-Plasmid auch andere *prey*-Plasmide besitzen, die kein interagierendes Protein exprimieren. Um dies zu vermeiden, wurden die Zellen vor der Transformation in *E. coli* 2 - 3 Mal auf DDO/X Platten zur Segregation ausgestrichen.

Nach dem ersten Ausstrich waren blaue (positive Interaktoren) und weiße Kolonien (keine Interaktoren) sichtbar. Jedoch, nach jedem weiteren Ausstrich, wurden es immer weniger weiße und mehr blaue Kolonien. Nach dem dritten Ausstrich wurde eine blaue Kolonie auf QDO/X umgestrichen. Es erfolgte anschließend eine Plasmidisolation (pGADT7 *Library*-Plasmid) aus den Hefezellen mit anschließender Transformation der Plasmide in *E. coli* DH5 α -Zellen und einer Minipräparation. Die Überprüfung der Plasmide erfolgte auf einem 1 %igen Agarosegel (Abbildung 12 und Abbildung 13). Fast alle Plasmide in den Spuren 2 - 10 (Abbildung 12) befinden sich auf einer Höhe von ca. 10.000 bp, nur die Bande des Plasmids in Spur 11 liegt etwas darüber. In diesem Vektor (pGADT7) wurde ein Stück von

ca. 1500 bp eingebaut. Dies ist eines der größten eingebauten Fragmente. Die Banden in Abbildung 13 (Spuren 2 - 11) befinden sich alle auf einer Höhe von etwas über 10.000 bp.

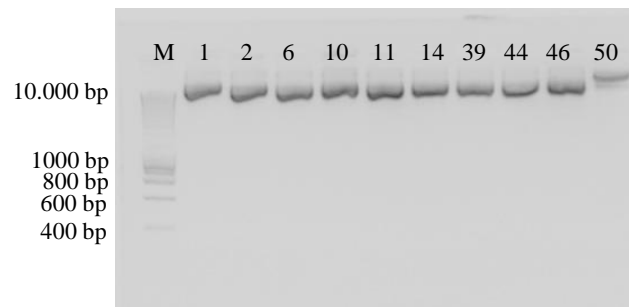


Abbildung 12: Minipräparation des *Library Rescues*.

M: Marker [*HyperLadder I*]; Klone 1 bis 50

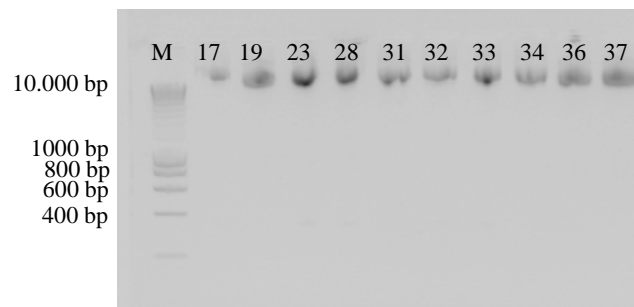


Abbildung 13: Minipräparation des *Library Rescues*.

M: Marker [*HyperLadder I*]; Klone 17 bis 37

3.2.5.3 Unterscheidung von falsch positiven Klonen

Nach der Segregation und der Isolierung der 20 verbliebenen Klone (*prey*-Plasmide) wurden diese weiter auf falsch positive Interaktionen getestet. Normalerweise sollten das *bait*-Protein (CTSX) und das *prey*-Protein nur in Kombination in der Lage sein, die Gal4-Reportergene zu aktivieren. Wenn es sich jedoch um einen falsch positiven Klon handelt, kann möglicherweise auch das *prey*-Protein allein die Reportergene ohne CTSX aktivieren. Um dies auszuschließen, wurden die Protein-Interaktionen in der Hefe nochmals auf Selektionsmedien getestet.

Hierfür wurden die Klone (in pGADT7) zusammen mit dem *bait* (pGBKT7/CTSX) in kompetente Y2H Gold-Zellen co-transformiert und auf DDO/X und QDO/X/A Platten plattiert (Tabelle 24). Zeitgleich wurden sowohl eine Positiv- (pGBKT7-53 [Y2H Gold] + pGADT7 [Y187]) als auch eine Negativkontrolle (pGBKT7-Lam [Y2H Gold] + pGADT7 [Y187]) mitgeführt. Wie in Tabelle 24 zu erkennen ist, wachsen auf

den QDO/X/A Platten für pGBKT7/CTSX + pGADT/Klon X nicht überall blaue Kolonien, und wenn nur in geringer Zahl (siehe Klone + pGBKT7/CTSX + *prey* 28 und 46). Theoretisch sollte die Anzahl der Klone auf beiden Medien die gleiche sein. DDO selektiert für beide Plasmide und QDO/X/A selektiert zusätzlich für die Interaktion der beiden Hybrid-Proteine. Normalerweise wachsen auf QDO/X/A Platten gewöhnlich 10 - 60 % weniger Kolonien, als auf DDO/X. Da aber auf DDO/X ca. nur 1 - 6 Kolonien wuchsen, ist diese Beobachtung (Tabelle 24) nicht ungewöhnlich. Die mitgeführten Kontrollen zeigten die erwarteten Resultate auf. Jedoch präsentierten sich die beobachteten Kolonien auf QDO/X/A ebenfalls in einer hellblauen, einer blau/grünen oder blauen Färbung. Die interne Kontrolle (pGBKT7 allein) zeigte, dass es bei allen Klonen zu keiner Autoaktivierung der Reportergene ohne CTSX kam, denn sie wiesen eine weiße bis weiß/grüne Farbe auf den DDO/X Platten auf. Sie wuchsen gar nicht auf den QDO/X/A Platten (Tabelle 24). Ihnen fehlt CTSX für die Aktivierung der Reportergene.

Tabelle 24: Co-Transformation von pGBKT7/CTSX und *prey*/AD Library in Y2H Gold

Kontrolle [pGBKT7]	DDO/X [Kolonien]	QDO/X/A [Kolonien]	Klone + pGBKT7/CTSX	DDO/X [Kolonien]	QDO/X/A [Kolonien]
+ <i>prey</i> 1	grün/weiß	-	+ <i>prey</i> 1	2 × blau	-
+ <i>prey</i> 2	grün/weiß + weiß	-	+ <i>prey</i> 2	blau	2 × blau
+ <i>prey</i> 6	grün/weiß + weiß	-	+ <i>prey</i> 6	1 × blau	-
+ <i>prey</i> 10	-	-	+ <i>prey</i> 10	-	1 × blau
+ <i>prey</i> 11	weiß	-	+ <i>prey</i> 11	leicht blau/weiß	-
+ <i>prey</i> 14	-	-	+ <i>prey</i> 14	leicht blau/weiß	17 × blau
+ <i>prey</i> 39	grün/weiß	-	+ <i>prey</i> 39	blaue	-
+ <i>prey</i> 44	grün/weiß + weiß	-	+ <i>prey</i> 44	grün/blau + blau	7 × grün/blau
+ <i>prey</i> 46	grün/weiß	-	+ <i>prey</i> 46	grün/blau + blau	2 × blau
+ <i>prey</i> 50	weiß	-	+ <i>prey</i> 50	blau	-
+ <i>prey</i> 17	grün/blau + weiß + grün/weiß	-	+ <i>prey</i> 17	blau	-
+ <i>prey</i> 19	grün/blau + weiß + grün/weiß	-	+ <i>prey</i> 19	2 × blau	-
+ <i>prey</i> 23	weiß + grün/weiß	-	+ <i>prey</i> 23	blau	-
+ <i>prey</i> 28	weiß + grün/weiß	-	+ <i>prey</i> 28	grün/weiß + grün/blau	4 × blau
+ <i>prey</i> 31	weiß	-	+ <i>prey</i> 31	weiß + grün/weiß	-
+ <i>prey</i> 32	weiß	-	+ <i>prey</i> 33	weiß + grün/weiß	-
+ <i>prey</i> 33	weiß + grün/weiß	-	+ <i>prey</i> 33	weiß + grün/weiß + grün/blau	15 × grün/blau
+ <i>prey</i> 34	weiß + grün/weiß	-	+ <i>prey</i> 34	blau	-
+ <i>prey</i> 36	grün/blau	-	+ <i>prey</i> 36	grün/blau + blau	-
+ <i>prey</i> 37	grün/weiß + grün/blau	-	+ <i>prey</i> 37	blau	1 × blau

Ausnahmslos wurden erst einmal alle Klone mit einem Standard T7 Primer sequenziert, die erhaltenen Sequenzen mit dem BLAST Programm von NCBI *aligned* und anschließend mit den Originalsequenzen der Datenbank (NCBI, GenBank) verglichen. Nachfolgend sind die resultierenden Sequenzier-Ergebnisse zusammengefasst (Tabelle 25).

Tabelle 25: Nukleotid- und Protein-Homologie der positiven AD-Library Klone

Klon	Nukleotid und Protein-Homologie (human)	Nukleotid-GenBank-Zugangsnummer
1	<i>Homo sapiens E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific) (ELF3),transkript variant 1</i>	NM_004433.4
1	<i>Homo sapiens E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific). (ELF3),transkript variant 2</i>	NM_001114309.1
2	<i>Homo sapiens small proline-rich protein 2D (SPRR2D)</i>	NM_006945.4
2	<i>Homo sapiens small proline-rich protein 2A (SPRR2A)</i>	NM_005988.2
2	<i>Homo sapiens small proline-rich protein 2B (SPRR2B)</i>	NM_001017418.1
6	<i>Homo sapiens chromosome 19 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef), whole genome shotgun sequence</i>	NM_001838496.1
6	<i>Homo sapiens chromosome 19 genomic contig, GRCh37 reference primary</i>	NT_011109.16
10	<i>Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly. Synaptojanin 2 binding protein</i>	NT_026437.12
10	<i>Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef), whole genome shotgun sequence</i>	NW_001838113.2
11	<i>Homo sapiens lysozyme (renal amyloides) (LYZ)</i>	NT_029419.12
14	<i>Homo sapiens mucin 6. oligomeric mucus/gel-forming</i>	NM_005961.2
44	<i>Homo sapiens ribosomal protein, large, P0 (RPLP0)</i>	NM_001002.3
46	<i>Homo sapiens transglutaminase 3(E polypeptide, protein-glutamine gamma-glutamyltransferase) (TGM3)</i>	NM_003245.3
50	<i>Predicted.Homo Sapiens hypothetical protein LOC100289702 (LOC100289702)</i>	XM_002347476.1
50	<i>Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly</i>	NT_026437.12
17	<i>Homo sapiens chromosome 7 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef), whole genome shotgun sequence</i>	NW_001839003.1
19	kein Eintrag in der Datenbank	-
23	<i>Homo sapiens ribosomal protein L10a (RPL10a)</i>	NW_007104.4
28	<i>Homo sapiens chromosome 12 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly</i>	NT_009714.17
31	<i>Homo sapiens lectin, galactosidase-binding, soluble, 9 (LGALS9),transcript variant 3, transcribed RNA</i>	NR_024043.1
32	<i>Homo sapiens 18S ribosomal RNA (LOC100008588), non coding RNA</i>	NR_003286.1
33	<i>Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 2 (LGALS2), mRNA</i>	NM_006498.2
34	<i>Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly. Synaptojanin 2 binding protein</i>	NT_026437.12
36	<i>Homo sapiens mitochondrion, complete genome</i>	NC_001807.4
36	<i>Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly</i>	NT_005612.16
37	<i>Homo sapiens chromosome 11 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef), whole genome shotgun sequence</i>	NW_001838022.2

Von den 20 co-transformierten Plasmiden konnten nach DNA-Sequenzierung schließlich acht verschiedene potentiell interagierende humane Proteine identifiziert werden: *E 74-like factor 3* (ELF3), *small-proline rich protein 2D* (SPRR2), *Synaptojanin 2 binding protein*, *mucin 6 oligomeric mucus/gel-forming* (MUC6), *ribosomal protein, large P0* (RPLP0), *transglutaminase 3* (TGM3), *chromosome12 genomic contig*, *lectin galactoside –binding, soluble, 2* (LGALS2) (Tabelle 25).

3.2.5.4 Sequentielle Transformation

Um weitere falsch positive Klone auszuschließen, wurden die *Inserts in-frame* in pGDADT7/Rec re-kloniert und die Interaktionen mithilfe der sequentiellen Transformation und dem *Yeast-Mating* erneut überprüft. Es sollte sichergestellt werden, dass die vier Reportergene *AbA^R*, *ADE2*, *HIS3*, und *MEL1* aktiviert werden, wenn der *bait* (CTSX) vorhanden ist. Hefen tolerieren translationelle Leserahmenverschiebungen (*framshifts*). Deshalb ist es wichtig, das Vorhandensein eines offenen Leserahmens (*open reading frame* (ORF)), der im Rahmen mit der GAL4-AD-Sequenz verbunden ist, zu verifizieren.

Hierfür wurden die Klone - 1, 2, 10, 14, 28, 33, 44 und 46 - mit dem LD-Insert Amplimer Mix amplifiziert und je 5 µl Probe auf ein 1,5 %iges Agarosegel geladen. Alle acht Klon-Inserts konnten erfolgreich amplifiziert werden (Abbildung 14 und Abbildung 15). Die Größe der Klone variierte von 600/700 bp bis zu 1800 bp.

Anschließend wurden die PCR-Produkte gereinigt, in den geschnittenen Vektor pGADT7-Rec kloniert und die Plasmide durch Minipräparation isoliert. Danach schlossen sich sowohl die sequentielle Transformation in Y2H Gold-Zellen oder Y187-Zellen an. Hierfür wurde pGADT7 und je ein gereinigtes PCR-Produkt der Klone 1, 2, 10, 14, 28, 33, 44 und 46 in Y2H Gold-Zellen (enthalten pGBKT7/CTSX) oder Y187-Zellen transformiert. Als Negativkontrolle fungierte ein Y2H Gold-Stamm mit dem leeren pGBKT7-Vektor. Für das *Yeast-Mating* wurden die Y187-Zellen (pGADT7-Rec + jeweiliges Klonstück) mit Y2H Gold-Zellen (pGBKT7/CTSX) verpaart. Als Negativkontrolle fungierte wieder der Y2H Gold-Stamm mit dem leeren pGBKT7 Plasmid. Je 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf DDO, TDO, QDO, DDO/X und QDO/X/A plattiert.

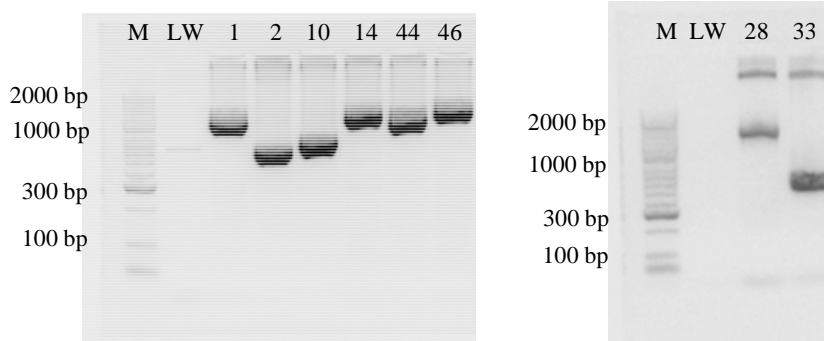


Abbildung 14/15: Amplimer PCR I/II zu Re-Klonierung in pGADT7.

M: Marker [*HyperLadder II*]; LW: Leerwert; Kone 1 bis 46; Klone 28 und 33

Teilweise war die Anzahl der blauen Kolonien auf den DDO/X Platten etwas gering (Tabelle 26, z. B. Klon 14 und Klon 33). Nur bei fünf Klonen (K1, 2, 14, 44, und 33) wuchsen auch Kolonien auf den QDO/X/A Platten. Diese Platten selektieren sowohl für das Vorhandensein beider Plasmide (pGBKT7/CTSX, pGADT7-*prey*) als auch für die Interaktion der beiden Hybrid-Proteine. Dies ermöglicht den Klonen unter anderem das Wachstum auf dem hoch-stringenten Aureobasidin. Im Gegensatz dazu wuchsen mit dem leeren pGBKT7-Vektor nur weiße bzw. grün/weiße Kolonien auf DDO/X und keine Kolonien auf QDOX/A. Diesen Zellen fehlt CTSX für die Interaktion mit den *prey*-Proteinen sowie die daraus resultierende Schaltung der vier Reportergene, um auf den Selektionsmedien wachsen zu können bzw. das Chromogen für die blaue Farbe zu spalten.

Tabelle 26: Auswertung der sequentiellen Transformation

Klon	DDO [Kolonien]	TDO [Kolonien]	QDO [Kolonien]	DDO/X [Kolonien]	QDO/X/A [Kolonien]
Y2H Gold/pGBKT7/CTSX + AD Library Plasmid					
1	58	52	32	63 × grün/blau	2 × blau
2	14	10	6	14 × grün/blau	1 × blau
10	20	9	1	4 × blau	/
14	14	4	5	5 × blau	1 × blau
44	32	32	18	20 × grün/blau	3 × blau
46	23	2	2	4 × blau	/
28	26	1	3	3 × blau	/
33	31	7	2	4 × blau	3 × blau
Y2H Gold/pGBKT7 leer + AD Library Plasmid					
1	79	/	/ (2)	72 × grün/weiß, weiß	/
2	85	15	/ (3)	77 × grün/weiß, weiß	/
10	101	29	/	106 × grün/weiß, weiß	/
14	32	/	/	36 × weiß, grün/weiß	/
44	27	/	/	2 × grün/blau 27 weiß	/
46	34	/	/	44 × weiß	/
28	27	/	/	25 × weiß, 1 × blau	/
33	24	/	/	39 × weiß	/

Die markierten Klone (K1, 2, 14, 44, 33) in Tabelle 26 wurden für die Plasmidisolierung auf QDO/X Platten umgestrichen, aus den Hefezellen isoliert, in DH5 α *E. coli*-Zellen transformiert (Selektion für die *prey*-Proteine auf LB/-Kan Platten) und durch Minipräparation isoliert. Zum Schluss wurden die fünf Plasmide nochmals mit 5' und 3' *Amplimer* Primern sequenziert.

Aufgrund der ausgewerteten Sequenzen in den jeweiligen Klonen wurden drei Proteine für die Weiterarbeit und Charakterisierung der Interaktion mit CTSX ausgesucht. Diese drei Klone waren: Klon 14, der für einen Teilabschnitt im Mucin 6 (MUC6) kodiert. Klon 44, der ein ribosomales Phosphoprotein codiert (RPLP0) und Klon 33, welcher Galectin-2 (LGLAS2) exprimiert. Die Sequenz dieser drei Proteine wurde mit dem *ORF-Finder (Open-reading-frame)* von NCBI nochmals überprüft. Für alle drei Klone konnte ein ORF gefunden werden, der innerhalb der Sequenzen putative konservierte Domänen aufwies. Diese gehörten zur *GHB Superfamily (MUC6)*, zur *Ribosomal L10 P0 Family (RPLP0)* und zur *GLECT Superfamily (LGALS2)*.

Mucin 6 ist ein Glycoprotein, das eine Hauptkomponente des mukosen und viskosen Gels im Magen darstellt, während RPLP0 als eine zentrale Komponente des ribosomalen „Stalk“ (ER) wirkt und essentiell für die Ribosomenaktivität verantwortlich ist. Galectin-2 hingegen lässt sich in die Gruppe der Galectinfamilie einordnen und ist ein Kohlenhydrat-bindendes Protein. Sowohl MUC6 als auch Galectin-2 sind im Gastrointestinaltrakt vorhanden und wurden teilweise im Magen beschrieben. Auch die Familie der ribosomalen Phosphoproteine scheint im Magen bzw. Magenkarzinom eine Rolle zu spielen. Jedoch ist RPLP0 in der aktuellen Literatur noch nicht näher im Magen dargestellt worden. Diese Eigenschaften spielten unter anderem eine Rolle, sich in weiteren Experimenten näher mit diesen Proteinen zu beschäftigen.

Nach der Identifizierung neuer Interaktionspartner von CTSX mithilfe des *Yeast Two-Hybrid* Systems wurden **MUC6**, **RPLP0** und **Galectin-2** in den nächsten Kapiteln näher auf ihre Interaktion mit CTSX untersucht und charakterisiert.

3.3 Chemilumineszente Co-Immunopräzipitation

Um die mögliche Interaktion zwischen CTSX und MUC6, RPLP0 und LGALS2 näher zu charakterisieren, wurde als nächster Schritt eine chemilumineszente Co-Immunopräzipitation (Co-IP) durchgeführt. Co-Immunopräzipitationen sind eine geeignete Methode, in der Proteinbiochemie Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Die hier verwendete chemilumineszente Co-IP ist ein besonders sicheres und sensitives Verfahren, um direkte physikalische Interaktionen zwischen post-translational veränderten Proteinen zu untersuchen. Ein fluoreszierender AcGFP1 *tag* und ein enzymatischer ProLabelTM Reporter wurden hierbei für die chemilumineszente Detektion von post-translational veränderten Protein-Protein-Interaktionen in Säugetierzellen genutzt.

3.3.1 Klonierung des pAcGFP1-C *bait* und des pProLabel-C *prey*

Hierfür wurden der Vektor pGBKT7/CTSX und die Vektoren pGADT7/K14, K33 und K44 mit *Universal In-Fusion* Primern amplifiziert, sodass spezifische DNA-Produkte mit einer definierten Länge der Vektorabschnitte von CTSX, K14, K33 und K44 entstanden, die später mit den Enzymen SalI/HindII und SalI/BamHI verdaut und in die Vektoren pAcGFP1-C und pProLabel-C kloniert wurden.

3.3.2 Verifizierung der pAcGFP1-C *bait* und der pProLabel-C *prey*-Expression

Bevor das eigentliche Co-IP Experiment durchgeführt wurde, wurde die Expression des *bait* und des *prey* in Säugetierzellen getestet. Dafür wurden die zuvor angefertigten Vektor-Konstrukte in HEK293-T-Zellen transfiziert und 48 h nach Transfektion die Expression des pAcGFP1-C *bait* (CTSX) unter dem Mikroskop kontrolliert. Es wurde jeweils eine Kontrolle von pAcGFP1-C und pProLabel-C allein mitgeführt (Abbildung 16).

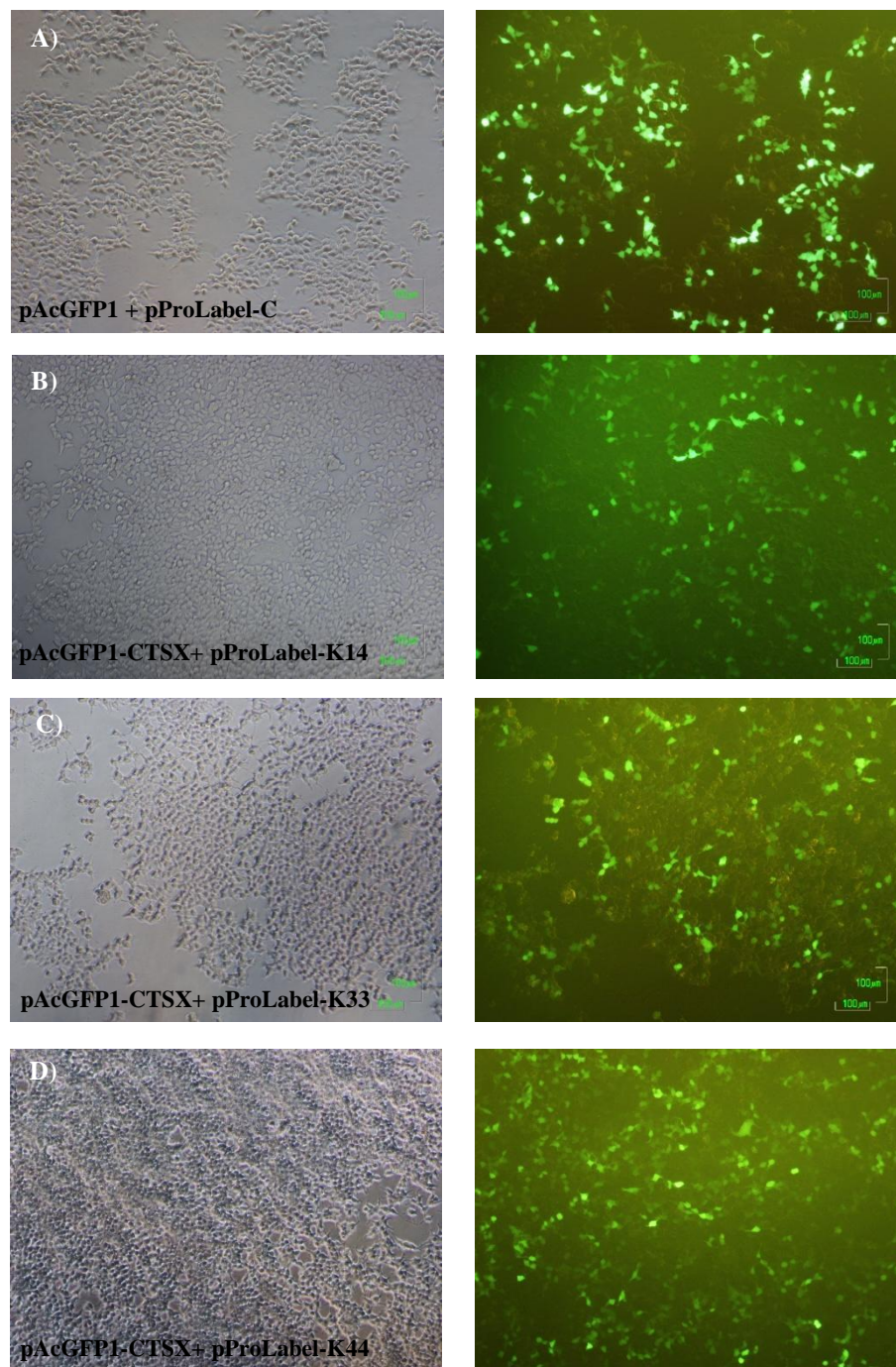


Abbildung 16: Verifizierung der pAcGFP1-C *bait*-Expression in HEK293-T Zellen.

Sowohl die transfizierten Zellen mit pAcGFP1-C und mit pProLabel-C als auch die Zellen mit dem pAcGFP1-C *bait* (CTS X) und pProLabel-C *prey* (K14, K44, K33) leuchten grün (Abbildung 16). Jedoch unterscheidet sich die pAcGFP1-C *bait*-Fusion im Expressionslevel und der Helligkeit von der Kontrolle. Hier exprimieren mehr Zellen AcGFP und auch die Signalstärke des grün-fluoreszierenden Farbstoffes ist im Gegensatz zur pAcGFP1-C *bait*-Fusion erhöht.

Für die Detektion der pProLabel-C *prey*-Expression wurden die Zellen gesammelt und mit einem Substrat-Mix behandelt. Die ProLabel-Detektion benötigt zwei Komponenten, zum einen das EA Reagenz (ein inaktives Enzymfragment) und den ProLabel *tag* (in der Form des Fusionsproteins). Diese beiden Komponenten bilden zusammen ein aktives Enzym, das durch die Hydrolyse eines chemilumineszenten Substrates detektiert wird. Anschließend wurde die ProLabel-Aktivität alle 15 min an einem Luminometer gemessen. In Abbildung 17 wurde die Zeit (max. 60 min) gegen die RLU (*relative light units*) aufgetragen. Im Gegensatz zur Kontrolle steigt die ProLabel-Aktivität der Klone 14, 33 und 44 stetig im Zeitverlauf an. Für K14 konnte eine 1,6-fache Steigerung, für K33 eine 1,9-fache Steigerung und für K44 eine 13-fache Steigerung der RLU gegenüber der Negativkontrolle erreicht werden. Verschiedene ProLabel-Fusionen können in unterschiedlichen Levels der ProLabel-Aktivität resultieren. Dies wiederum erklärt die unterschiedliche ProLabel-Aktivität zwischen den verschiedenen Fusionen.

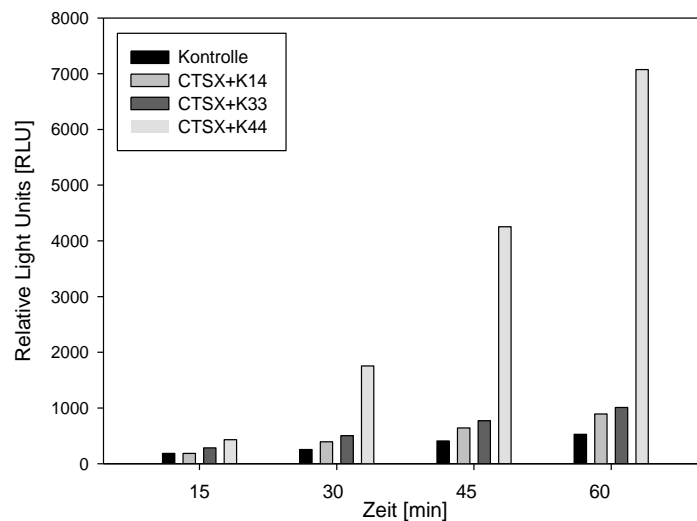


Abbildung 17: Verifizierung der pProLabel-C Expression.

Schwarz: Kontrolle (pAcGFP1-C + pProLabel-C); grau: pAcGFP1-CTSX + pProLabel-K14; dunkelgrau: pAcGFP1-CTSX + pProLabel-K33; hellgrau: pAcGFP1-CTSX + pProLabel-K44

Nachdem die korrekte Expression der pAcGFP1-C *bait*-Fusion und der pProLabel-C *prey*-Fusion gezeigt werden konnte, wurden erneut HEK293-T-Zellen co-transformiert mit:

Positivkontrolle:	pAcGFP1-p53 + pProLabel-T
Experimentelle Kontrollen:	pAcGFP1-C + pProLabel-C <i>prey</i> (K14, K33, K44)
Proben:	pAcGFP1-C <i>bait</i> (CTSX) + pProLabel-C
	pAcGFP1-C <i>bait</i> (CTSX) + pProLabel-C <i>prey</i> (K14)
	pAcGFP1-C <i>bait</i> (CTSX) + pProLabel-C <i>prey</i> (K33)
	pAcGFP1-C <i>bait</i> (CTSX) + pProLabel-C <i>prey</i> (K44)

48 h nach der Transfektion wurde die Expression der pAcGFP1-Fusion unter dem Mikroskop überprüft und die Zellen für die Co-IP gesammelt. Sie wurden aufgearbeitet und mit Protein G Plus/A *Agarose Beads* und einem anti-AcGFP Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurde die ProLabel-Detektion der potentiellen Protein-Protein-Interaktionen durchgeführt. Wie oben beschrieben, wurde den Proben ein Substrat-Mix hinzugefügt und die ProLabel-Aktivität in einem 96-well Platten *reader* nach bestimmten Zeitintervallen (0, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 min) gemessen. Für die Auswertung wurde aus vier unabhängigen Versuchen der höchste Wert in einem linearen Bereich ausgewählt, um die x-fache Expression zu ermitteln.

In Abbildung 18 wurde die ProLabel-Aktivität der Protein-Protein-Interaktionen (gemessen in RLU) dargestellt. Im Vergleich zu den Kontrollen (pAcGFP1-C, ohne CTSX) ist die relative Stärke der Interaktion zwischen CTSX und MUC6, RPLP0 und LGALS2 um das 1,6-fache, das 1,9-fache und das 1,5-fache höher (Abbildung 18). CTSX interagiert spezifisch und unterschiedlich mit jedem der *prey*-Proteine, wie der durchschnittliche relative physikalische Interaktions-Wert zeigt (50 für RPLP0 und bis zu 40 für LGALS2). In Abwesenheit von CTSX sind die relativen physikalischen Interaktions-Werte niedrig und lassen sich gut zwischen den *prey*-Proteinen vergleichen (26 - 29 *relative light units*). Es konnte keine Protein-Protein-Interaktion zwischen pAcGFP1-C CTSX und pProLabel-C beobachtet werden, wie der relativ niedrige Wert der RLU (31) zeigt (Abbildung 18).

Die Ergebnisse verifizieren, dass die Anwesenheit eines spezifischen *prey*-Proteins für die Interaktion von CTSX/*prey* (K14, K33, K44) vorhanden sein muss. Zusammenfassend konnten die *Yeast Two-Hybrid* Ergebnisse bestätigt werden und es wurde die Interaktion zwischen CTSX und MUC6, RPLP0 sowie LGALS2 gezeigt.

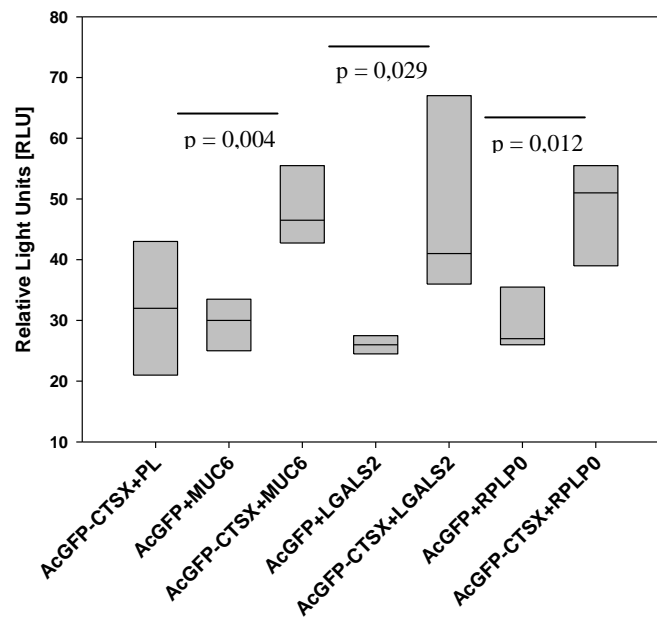


Abbildung 18: Interaktion von CTSX mit verschiedenen humanen Proteinen.

pAcGFP1-C (Kontrolle, ohne Insert) und AcGFP-CTSX wurden mit pProLabel-C (Kontrolle, ohne Insert) und pProLabel-C MUC6, RPLP0, LGALS2 als Fusionsproteine in HEK293-T-Zellen co-exprimiert. Die ProLabel-Aktivität wurde nach unterschiedlichen Zeitintervallen und nach Zugabe eines Substrates gemessen. Hierbei ist der ProLabel *tag* die limitierende Konstante und wird durch seine Interaktion mit dem pAcGFP1-C CTSX Fusionsprotein beeinflusst. Die Stärke und Interaktion von pAcGFP1-C und pAcGFP1-C CTSX mit pProLabel-C RPLP0, LGALS2, MUC6 wurde als RLU gemessen (*relativ light units*). Statistische Analysen wurden mit einem Student's *t*-test ($p < 0,05$) durchgeführt.

3.4 Ko-Lokalisation von CTSX und MUC6, RPLP0 und LGALS2 im humanen Magenkarzinomgewebe

Nachdem die Ergebnisse des *Yeast Two-Hybrid Screens* mithilfe der chemilumineszenten Co-IP bestätigt werden konnten, lag das Augenmerk der weiteren Arbeit *in vivo* auf der Verteilung und möglichen Ko-Lokalisation von CTSX mit MUC6, RPLP0 und LGALS2 im Magenkarzinomgewebe.

Um die Ko-Lokalisation immunfluoreszenzchemisch zu überprüfen, wurden Paraffin-Gewebeschnitte mit Antikörpern gegen CTSX (FITC-grün), MUC6 (Cy3-rot), RPLP0 (Cy3-rot) und LGALS2 (Cy3-rot) gefärbt. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit DAPI (Abbildung 19).

Die Überlagerung von CTSX mit RPLP0 sowie von CTSX mit LGALS2 zeigt eine deutliche Ko-Lokalisation (Abbildung 19, D und H) beider Proteine. Während bei MUC6 nur ein paar

einzelne Spots der Ko-Lokalisation mit CTSX ausgeprägt sind (Abbildung 19, L). Das Expressions-/Verteilungsmuster im Karzinomgewebe konzentriert sich für LGALS2 und RPLP0 auf die inflammatorischen Stroma-Zellen im Zytoplasma, wobei RPLP0 zusätzlich eine basale Koexpression mit CTSX in den Tumordrüsen zeigt (Abbildung 19, D und H).

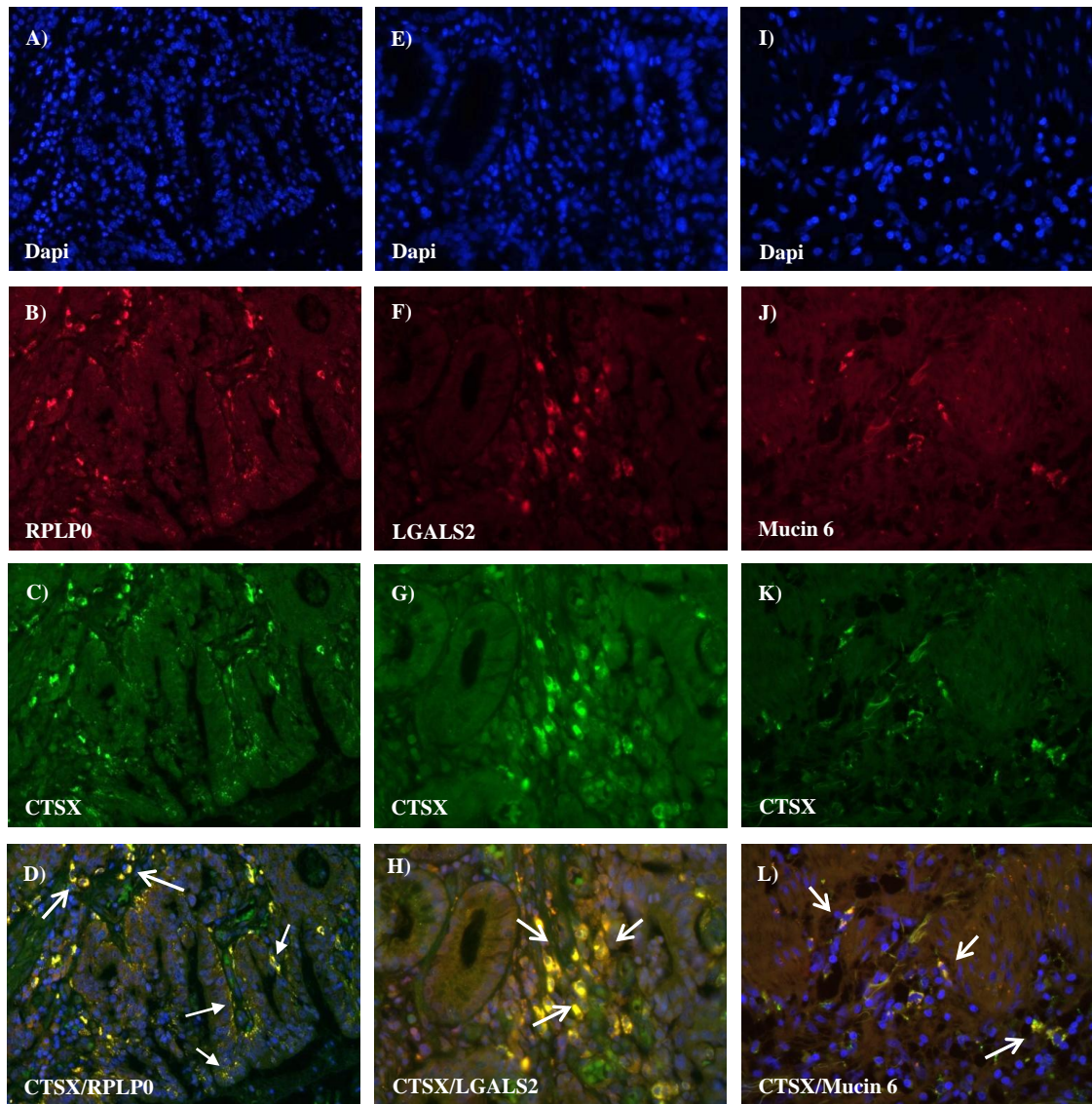


Abbildung 19: Ko-Lokalisation von MUC6, RPLP0 und LGALS2 mit CTSX in humanem Magenkarzinomgewebe.

Färbung von CTSX mit FITC Phalloidin (grün), anti-MUC6 (rot), anti-RPLP0 (rot), anti-LGALS2 (rot) und Kernfärbung mit DAPI (blau). Die Überlagerung wurde in D, H und L dargestellt. Die offenen Pfeile deuten auf die Ko-Lokalisation von CTSX mit RPLP0/LGALS2/MUC6 in den inflammatorischen Stroma-Zellen hin. Die geschlossenen Pfeile zeigen die basale Expression im Drüsenepithel. (Fluoreszenzmikroskop Nikon, 40 × Vergrößerung)

3.5 Co-Immunopräzipitation

3.5.1 Gewebe Co-Immunopräzipitation

Um die Protein-Protein-Interaktionen zwischen CTSX und MUC6, RPLP0 und LGALS2 ein weiteres Mal zu bestätigen, wurde eine Immunopräzipitation mit Magenkarzinomgewebe durchgeführt.

Dafür wurden Magenkarzinomgewebelysate mit einem spezifischen anti-CTSX-Antikörper inkubiert, an magnetische *Beads* gekoppelt und später gereinigt.

Die IP-Lysate wurden auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel geladen. In Abbildung 20 sind RPLP0, LGALS2, MUC6 und CTSX dargestellt. In Spur 1 wurde die Negativkontrolle (kein CTSX-Antikörper, nur ein *goat* IgG), in Spur 2 das IP-Lysat und in Spur 3 das gesamte Zelllysate (Positivkontrolle) aufgetragen. Sowohl RPLP0 (35 kDa) als auch LGALS2 (14 kDa) konnten in der IP detektiert werden. Bei MUC6 (150 kDa) hingegen lässt sich keine Bande im IP-Lysat erkennen. Um die Spezifität der Protein-Protein-Interaktionen zu bestätigen, wurden die Gewebelysate ohne spezifischen CTSX-Antikörper (*goat* IgG) inkubiert und die Co-IP durchgeführt (Negativkontrolle). Die Negativkontrolle (Spur 1, Abbildung 20) zeigte keine unspezifische Bindung von RPLP0, LGALS2 und MUC6 an die magnetischen *Beads* und demonstriert somit, dass die Anwesenheit eines spezifischen CTSX-Antikörpers für die Protein-Interaktion zwischen CTSX/RPLP0 und CTSX/LGALS2 nötig ist (Abbildung 20).

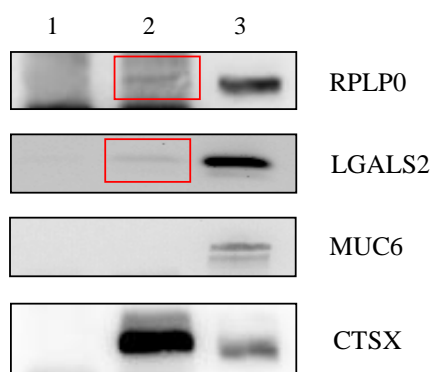


Abbildung 20: Gewebe Co-Immunopräzipitation mit einem spezifischen CTSX-Antikörper.

Spur 1: Negativkontrolle (*goat* IgG); Spur 2: IP-Lysat; Spur 3: gesamtes Zelllysate (Positivkontrolle)

3.5.2 Co-Immunopräzipitation an N87-Magenkarzinomzellen

Nachdem die Protein-Protein-Interaktion von CTSX mit RPLP0 und LGALS2 im Tumorgewebe bestätigt werden konnte, wurde diese ebenfalls *in vitro* in N87-Magenkarzinomzellen untersucht.

Die N87-Zellen wurden mit einem spezifischen anti-CTSX-Antikörper und magnetischen *Beads* inkubiert, an magnetische *Beads* gekoppelt und später gereinigt. Anschließend wurden die Lysate auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel geladen (Abbildung 21).

In Spur 1 wurde die Negativkontrolle (kein CTSX-Antikörper, nur ein *goat* IgG), in Spur 2 das IP-Lysat und in Spur 3 das gesamte Zelllysate (Positivkontrolle) aufgetragen. RPLP0 (35 kDa) konnte in der IP detektiert werden - aber nicht LGALS2. Wie sich später herausstellte, weisen N87-Zellen nicht genug LGALS2 Protein für eine Detektion in der IP bzw. im Westernblot auf.

Die Spezifität der Protein-Protein-Interaktion in N87-Zellen wurde bestätigt, indem die Zellen ohne spezifischen CTSX-Antikörper (*goat* IgG) inkubiert wurden (Negativkontrolle) und sich daraufhin keine Bindung von RPLP0 an die magnetischen *Beads* zeigte (Spur 1, Abbildung 21).

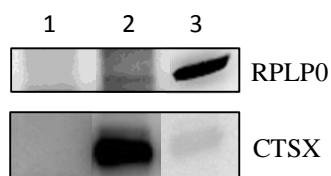


Abbildung 21: N87 Co-Immunopräzipitation mit einem CTSX-spezifischen Antikörper.

Spur 1: Negativkontrolle (*goat* IgG); Spur 2: IP-Lysat; Spur 3: gesamtes Zelllysate (Positivkontrolle)

3.6 Charakterisierung der Interaktion von CTSX mit Galectin-2 (LGALS2)

Nach den Vorarbeiten im *Yeast Two-Hybrid* System und der sich anschließenden Co-Immunopräzipitation und Ko-Lokalisation konnte Galectin-2 als neuer Interaktionspartner von CTSX identifiziert werden. In den nachfolgenden Kapiteln wird die Charakterisierung dieser Protein-Protein-Interaktion fortgeführt.

3.6.1 LGALS2-Expression in humanem Gewebe

Um die Expression von Galectin-2 (LGALS2) im Magenkarzinom näher zu untersuchen, wurden Paraffin-Gewebeschnitte immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. In Abbildung 22 A wurden sowohl das Oberflächenepithel als auch die intestinale Metaplasie angefärbt. Der Begriff Metaplasie bezeichnet die Umwandlung eines differenzierten Gewebes in ein ortsunübliches Gewebe. Im Magen wird bei der intestinalen Metaplasie die normale Mukosa durch Schleimhaut ersetzt, die teilweise oder vollständig dem Aufbau der Dünn- bzw. Dickdarmschleimhaut entspricht. Im gesunden Gewebe scheint keine positive LGALS2-Expression aufzutreten, während sie wieder verstärkt in der intestinalen Metaplasie zunimmt und sich im Tumor leicht abschwächt (Abbildung 22 B). Daneben weisen ebenfalls einwandernde Makrophagen im Entzündungsfiltrat eine positive LGALS2-Färbung auf (Abbildung 22 C).

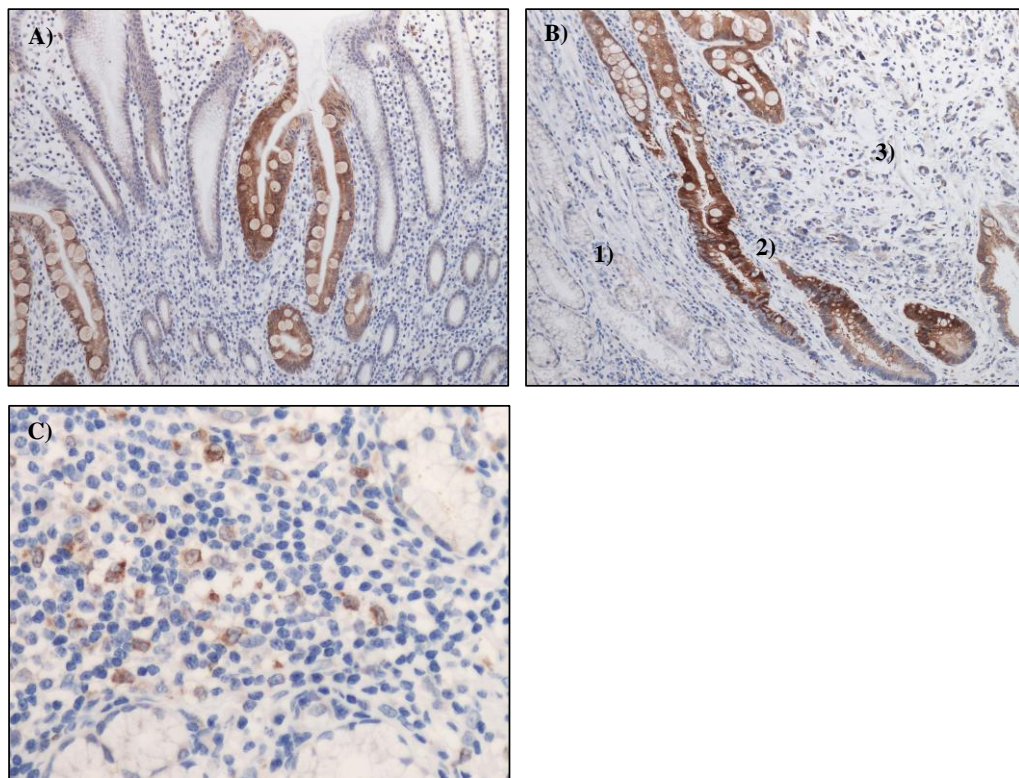


Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis mit anti-LGALS2.

A) Oberflächenepithel und intestinale Metaplasie; B) Magenkarzinom, 1: gesundes Gewebe, 2: intestinale Metaplasie, 3: Karzinom; C) Makrophagen im Entzündungsfiltrat

3.6.2 LGALS2-Expression in *H. pylori*-negativer und -positiver Gastritis und im Magenkarzinom

Die *H. pylori*-Infektion gilt als eine der Hauptursachen der chronischen Gastritis und nimmt eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Magenkarzinoms ein [86]. Die Interaktion von LGALS2 mit CTSX konnte im Magenkarzinom mithilfe der IP nachgewiesen werden (siehe 3.5.1). Um die Expression von LGALS2 in der Karzinogenese eingehender zu betrachten, wurden sowohl *H. pylori*-positive (+) als auch -negative (-) Biopsien und Magenkarzinome im Westernblot näher untersucht. In den Spuren 1 - 6 wurden *H. pylori*-positive und -negative Biopsien von Gastritiden und in den Spuren 7 - 9 unterschiedliche Magenkarzinome aufgetragen (Abbildung 23). CTSX steigt zunehmend mit dem Grad der Entzündung an. In den *H. pylori* +/- Proben ist dagegen kein LGALS2 vorhanden. Es tritt erst im Karzinom auf (Abbildung 23, Spur 9).

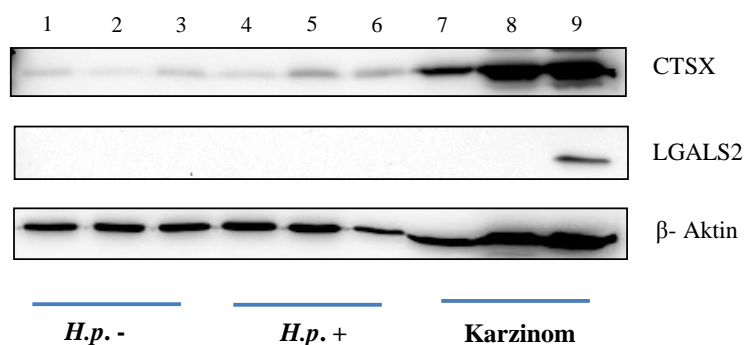


Abbildung 23: Untersuchung der LGALS2-Expression an *H. pylori* +/- Gastritis und am Magenkarzinom.

Spur 1: Biopsie 78; Spur 2: Biopsie 11; Spur 3: Biopsie 29; Spur 4: Biopsie 40;
Spur 5: Biopsie 44; Spur 6: Biopsie 99; Spur 7: Karzinom 12944/07; Spur 8:
Karzinom 8534/04; Spur 9: Karzinom 4956/04

Funktionelle Charakterisierung im Zellkulturmodell

3.6.3 Ko-Lokalisation von LGALS2/CTSX im Zellkulturmodell

Weitere Untersuchungen der Interaktion zwischen CTSX und LGALS2 wurden in HepG2-Zellen, die sowohl CTSX als auch LGALS2 in ausreichender Menge exprimieren, durchgeführt. Diese Karzinomzelllinie stammt ursprünglich aus der Leber. (Eine geeignete Magenkarzinomzelllinie, die genug LGALS2 für den Nachweis exprimierte, stand nicht zur Verfügung). Zur näheren Charakterisierung wurden die HepG2-Zellen immunfluoreszenzchemisch untersucht. Gefärbt wurde mit anti-CTSX (Fluoreszin) und anti-LGALS2 (Cy3). In Abbildung 24 sind sowohl die Einzel- als auch die Doppelfluoreszenzen dargestellt (A - C). Nicht nur CTSX, sondern auch LGALS2 liegt in einer grobkörnigen Struktur im Zytoplasma der Zellen vor (Abbildung 24 A und B). Die Färbung mit beiden Antikörpern resultiert in einer deutlichen Ko-Lokalisation der Proteine in zytoplasmatischen Vesikeln (Abbildung 24 C).

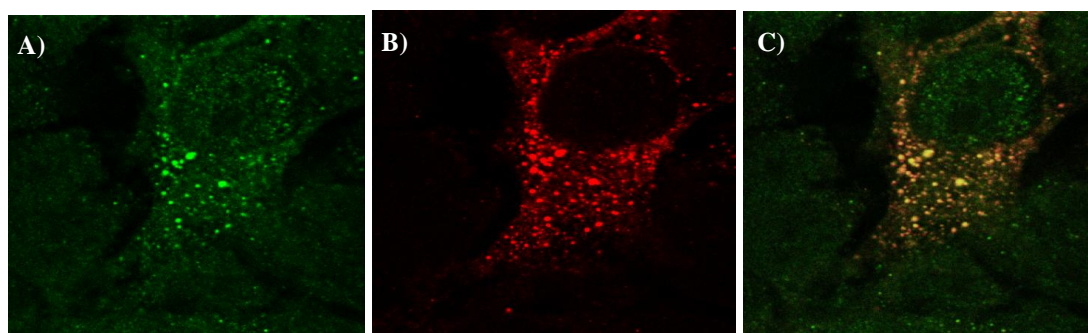


Abbildung 24: CTSX und LGALS2 Doppelfluoreszenz an HepG2-Zellen.

A) anti-CTSX (grün); B) anti-LGALS2 (rot); C) Doppelfluoreszenz; (Leica Laserscanmikroskop, 63 × Vergrößerung).

3.6.4 Knockdown von CTSX in HepG2-Zellen

Funktionelle Konsequenzen der Interaktion von CTSX mit LGALS2 wurden mithilfe einer siRNA getestet. Hierfür wurden HepG2-Zellen mit einer für CTSX spezifischen siRNA und einer Kontroll-siRNA, die keine Homologie mit irgendeiner bekannten Sequenz im humanen Genom besitzt, transfiziert. Die erfolgreiche Reduktion der CTSX-Expression wurde mit der β -Aktin-Expression im Immunoblot verglichen (Abbildung 25 A). Die CTSX-Herunterregulierung nach siRNA-Behandlung liegt bei ca. 40 bis 50 % (Abbildung 25 A, Spur 2).

Die Westernblot-Analysen weisen auf eine inverse Expression von CTSX und LGALS2 hin. Densiometrische Analysen für die Quantifizierung der Proteinexpression zeigen einen signifikanten Anstieg von LGALS2 nach 48 h, der mit einer reduzierten CTSX-Expression einhergeht (Abbildung 25 B). Hierfür wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

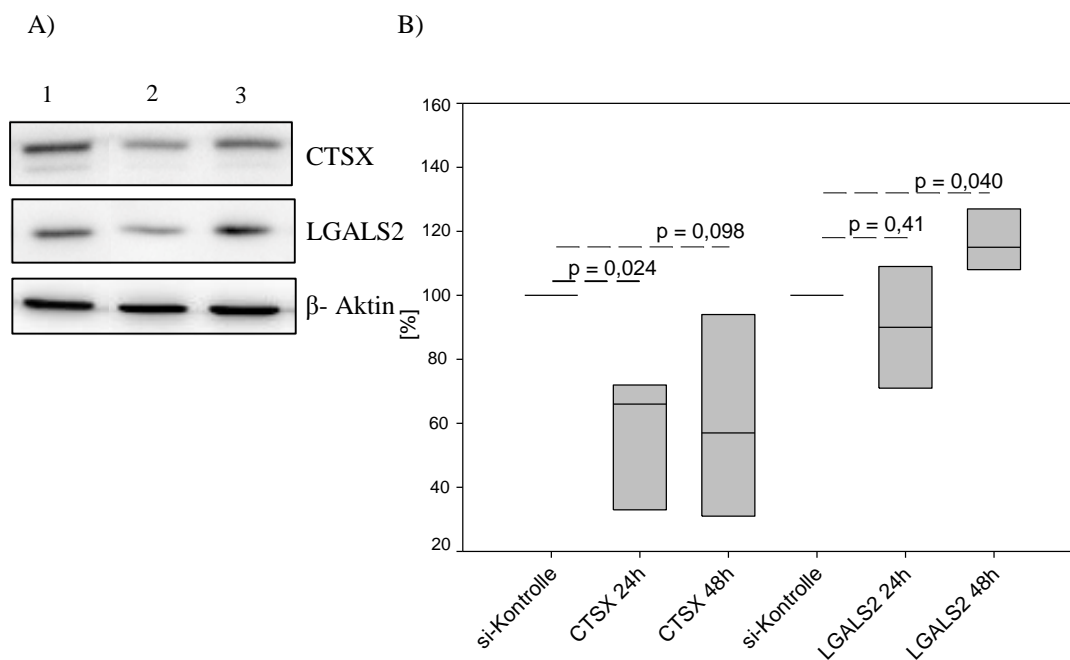


Abbildung 25 A) und B): Knockdown von CTSX in HepG2-Zellen.

A) Spur 1: si-Kontrolle; Spur 2: CTSX siRNA 24 h; Spur 3: CTSX siRNA 48 h; B) CTSX wird nach siRNA-Behandlung von HepG2-Zellen nach 48 h um ca. 50 % reduziert, während LGALS2 im Vergleich zur si-Kontrolle leicht ansteigt (Student's *t*-test, $p < 0,05$).

Um die unterschiedliche Expression der Proteine in Bezug auf ihre Lokalisation innerhalb der Zellen näher zu untersuchen, wurden HepG2-Zellen auf *cover-slips* ausgesät und einer siRNA-Behandlung unterzogen. Gleichzeitig wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen immunfluoreszenzchemisch mit anti-CTSX (grün), anti-LGALS2 (rot) und mit DAPI (blau) gefärbt.

Beide Proteine ko-lokalisieren als grobkörnige Strukturen im Zytoplasma der Zellen. Jedoch kommt es zu keiner denkbaren Kernverschiebung (Kern-Lokalisation) nach 24 h und 48 h siRNA-Behandlung (Abbildung 26 H und L). Die Expression von LGALS2 steigt nach 48 h siRNA-Behandlung im Gegensatz zur Kontrolle leicht an.

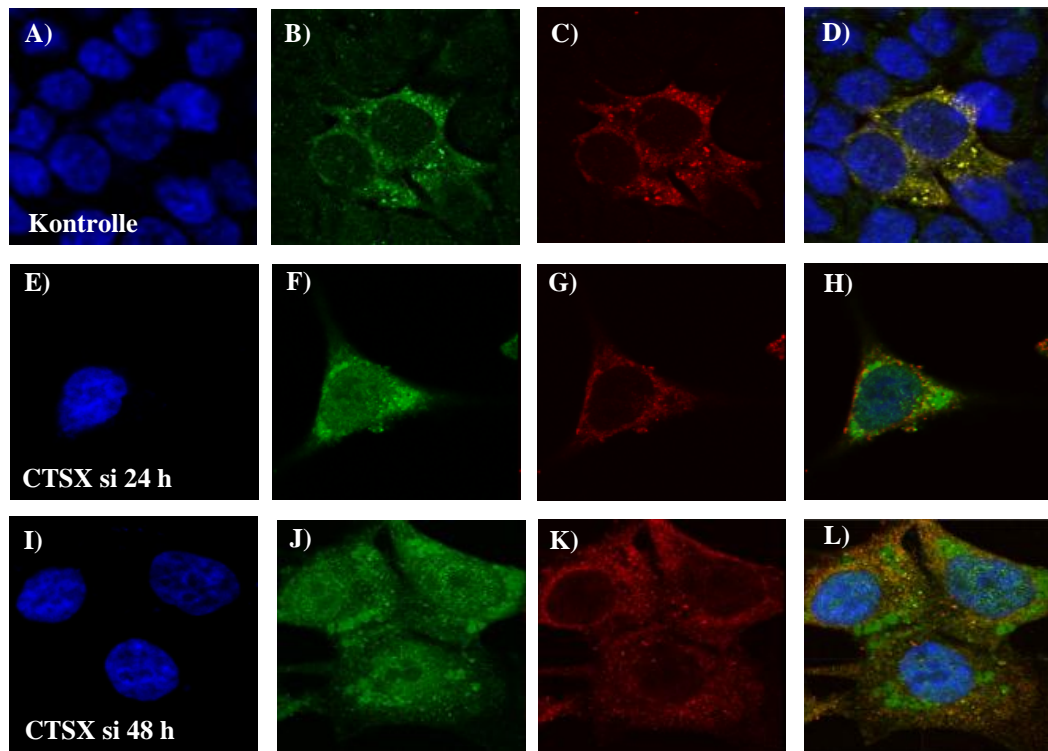


Abbildung 26: CTSX siRNA behandelte HepG2-Zellen (24 h, 48 h).

Die Zellen wurden mit anti-CTSIX (grün; B, F, J), anti-LGALS2 (rot; C, G, K) und DAPI (blau; A, E, I) gefärbt (Leica Laserscanmikroskop 63 × Vergrößerung). Die Überlagerung beider Proteine ist in D, H und L dargestellt.

3.7 Charakterisierung der Interaktion von CTSX mit RPLP0

Ein weiterer positiv getesteter Interaktionspartner von CTSX ist RPLP0, ein ribosomales Phosphoprotein.

Nach der Bestätigung der Interaktion durch Co-Immunopräzipitation und Ko-Lokalisation wird in den weiterführenden Abschnitten die Interaktion von CTSX mit RPLP0 näher untersucht.

3.7.1 RPLP0-Expression in humanem Gewebe

Um die Expression von RPLP0 im Magenkarzinom näher zu bestimmen, wurden humane Paraffin-Gewebeschnitte mit anti-RPLP0 immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. In Abbildung 27 wurden sowohl das Epithel als auch die intestinale Metaplasie und das Karzinom angefärbt (A - D).

Die Expression von RPLP0 beschränkt sich nicht nur auf das Epithel, sondern tritt auch in der intestinalen Metaplasie und im Karzinom auf (Abbildung 27 A - D). Hierbei zeigt RPLP0

eine deutlich verstärkte Färbung in tieferen Infiltrationsschichten im Karzinom als im normalen Epithel (Abbildung 27 A, D). RPLP0 befindet sich tief in den Krypten, während das Oberflächenepithel schwächer angefärbt wurde (Abbildung 27 A). Zusammenfassend wird RPLP0 stärker im Karzinom als im gesunden Gewebe exprimiert.

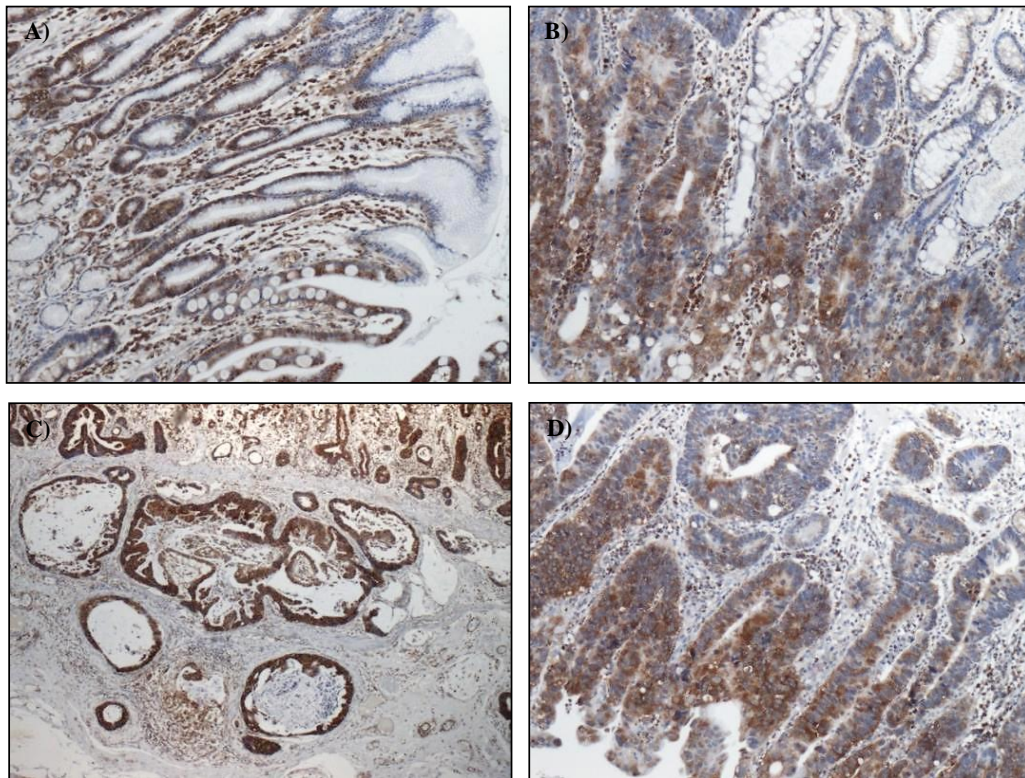


Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis der RPLP0-Expression mit anti-RPLP0.

A) Oberflächenepithel und intestinale Metaplasie; B) intestinale Metaplasie und Übergang zum Karzinom; C) intestinales Karzinom-tiefe Infiltration; D) intestinales Karzinom

3.7.2 RPLP0-Expression in *H. pylori*-negativer und -positiver Gastritis und im Magenkarzinom

Die Interaktion von RPLP0 mit CTSX konnte im Magenkarzinom mithilfe der IP nachgewiesen werden (siehe 3.5.1). Um die Expression von RPLP0 in der Magenkarzinogenese eingehender zu betrachten, wurden sowohl *H. pylori*-positive (+) als auch -negative(-) Biopsien und Magenkarzinome im Westernblot näher untersucht. In Abbildung 28 sind die *H. pylori*-positiven und -negativen Biopsien in den Spuren 1 - 6 und die Magenkarzinome in den Spuren 7 - 9 dargestellt. RPLP0 wird gleichmäßig in den *H. pylori*-positiven und -negativen Biopsien exprimiert und steigt erst im Karzinom an (Abbildung 28), während CTSX stetig mit dem Grad der Entzündung ansteigt (Abbildung 28).

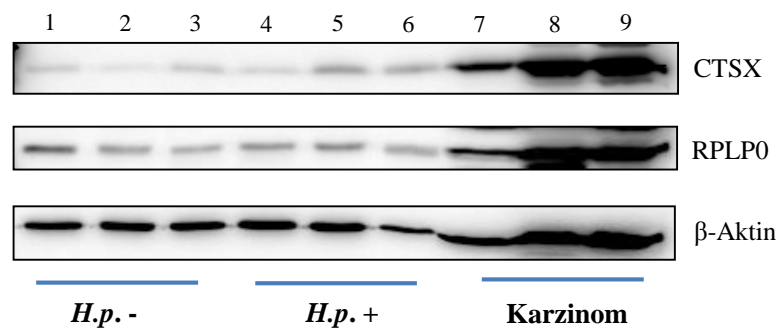


Abbildung 28: Untersuchung der RPLP0-Expression an *H. pylori* +/- Gastritis und am Magenkarzinom.

Spur 1: Biopsie 78; Spur 2: Biopsie 11; Spur 3: Biopsie 29; Spur 4: Biopsie 40; Spur 5: Biopsie 44; Spur 6: Biopsie 99; Spur 7: Karzinom 12944/07; Spur 8: Karzinom 8534/04; Spur 9: Karzinom 4956/04

Funktionelle Charakterisierung im Zellkulturmodell

3.7.3 Ko-Lokalisation von RPLP0/CTSX im Zellkulturmodell

Weitere Untersuchungen der Interaktion zwischen CTSX und RPLP0 wurden in N87-Zellen durchgeführt. Diese humane Magenkarzinomzelllinie exprimiert sowohl CTSX als auch RPLP0 in ausreichender Menge.

Zur näheren Charakterisierung wurden die N87-Zellen immunfluoreszenzchemisch untersucht. Gefärbt wurde mit anti-CTSX (FITC) und anti-RPLP0 (Cy3). In Abbildung 29 sind sowohl die Einzel- als auch die Doppelfluoreszenzen dargestellt (A - C). CTSX befindet sich vorwiegend im Zytoplasma der Zellen und zeigt eine schwache Reaktion im Nucleus, während RPLP0 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert ist (Abbildung 29 A - B). Die Färbung mit beiden Antikörpern resultiert in einer Ko-Lokalisation der Proteine im Zytoplasma und im Nucleus (Abbildung 29 C).

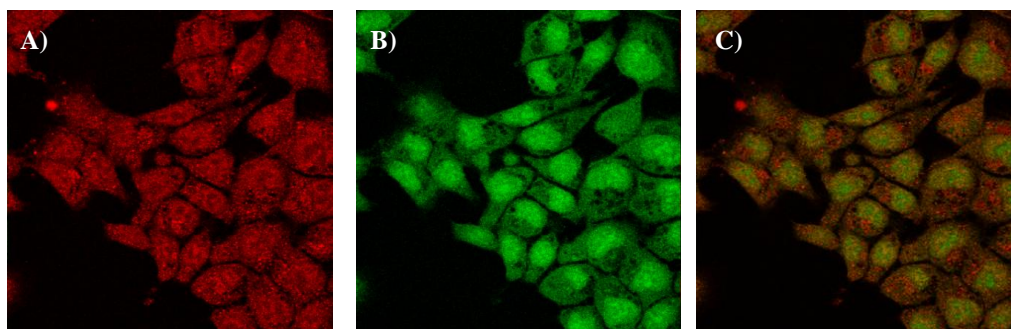


Abbildung 29: CTSX und RPLP0 Doppelfluoreszenz an N87-Zellen.

A) anti-CTSX (rot); B) anti-RPLP0 (grün); C) Doppelfluoreszenz; (Leica Laserscanmikroskop, 63 × Vergrößerung).

3.7.4 *Knockdown* von CTSX in N87-Zellen

Funktionelle Konsequenzen der Interaktion von CTSX mit RPLP0 wurden mithilfe einer siRNA getestet. Hierfür wurden N87-Zellen mit einer für CTSX-spezifischen siRNA und einer Kontroll-siRNA transfiziert.

Die erfolgreiche Reduktion der CTSX-Expression wurde mit der β -Aktin-Expression im Immunoblot verglichen (Abbildung 30 A). Die Expression der Kontrolle (Spur 1) entspricht 100 %. Die CTSX-Herunterregulierung nach siRNA-Behandlung liegt unter 50 % (Abbildung 30 A, Spur 2 - 3). Das Expressionslevel von RPLP0 weist weder nach 24 h CTSX siRNA noch nach 48 h CTSX siRNA Veränderungen auf. Grundsätzlich zeigen die Westernblot-Analysen keine Abhängigkeit der Expression von CTSX mit RPLP0.

Densiometrische Analysen für die Quantifizierung der Proteinexpression zeigen eine minimale Herunterregulierung von RPLP0 nach 48 h (Abbildung 30 B). Diese ist jedoch nicht signifikant. Für die statistischen Analysen wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

Aufgrund der Tatsache, dass keine quantitative Abhängigkeit der Expression von CTSX mit RPLP0 nachgewiesen werden konnte, wurde nachfolgend nach möglichen intrazellulären Lokalisationsänderungen gesucht.

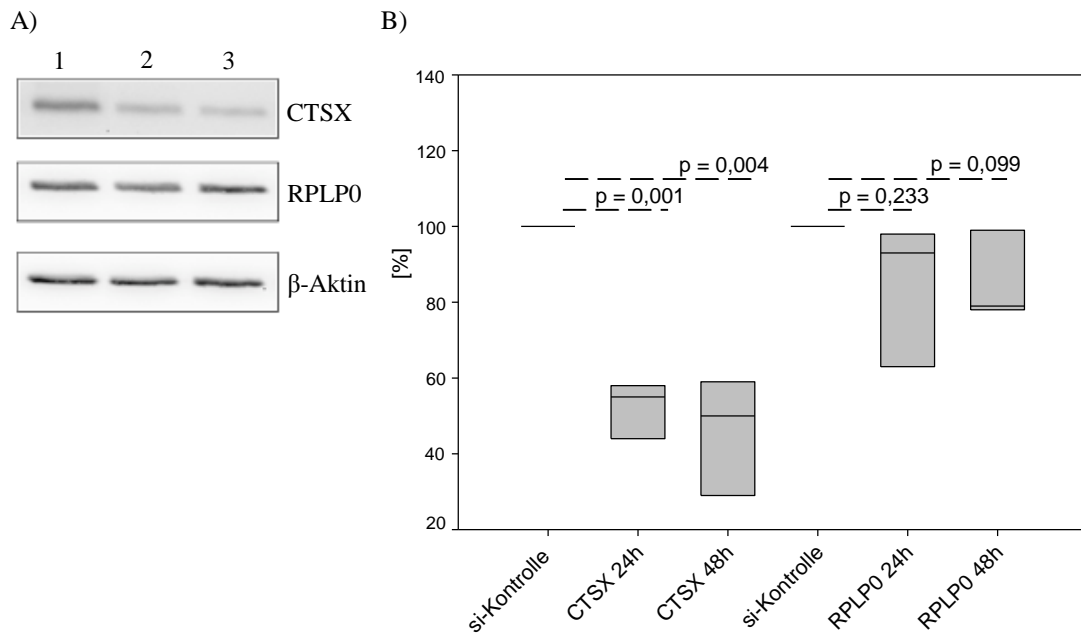


Abbildung 30 A) und B): Knockdown von CTSX in N87-Zellen.

A) Spur 1: si-Kontrolle; Spur 2: CTSX siRNA 24 h; Spur 3: CTSX siRNA 48 h; B) CTSX und RPLP0 Expression nach siRNA-Behandlung von N87-Zellen nach 24 h und 48 h (Student's *t*-test, $p < 0,05$)

N87-Zellen wurden auf *cover-slips* ausgesät und mit einer CTSX siRNA behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen immunfluoreszenzchemisch mit anti-CTSX (rot), anti-RPLP0 (grün) und mit DAPI (blau) gefärbt. In Abbildung 31 sind sowohl die Einzelfluoreszenz als auch die Überlagerung von CTSX und RPLP0 dargestellt. Beide Proteine ko-lokalisieren im Zytoplasma und im Nucleus der Zellen. Jedoch kommt es zu einer unterschiedlichen Verteilung der Proteine nach 24 h und 48 h siRNA-Behandlung (Abbildung 31, F, J und G, K). CTSX befindet sich in der Kontrolle im Zytoplasma und ist schwach im Kern lokalisiert, während RPLP0 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma der Zellen auftritt (Abbildung 31 B, C). Nach 24 h siRNA-Behandlung verändert sich die Verteilung von RPLP0 zu einem gleichmäßigeren Vorkommen zwischen Kern und Zytoplasma, während die Verteilung von CTSX bestehen bleibt. Nach einer Zeitspanne von 48 h nach siRNA-Behandlung lokalisiert RPLP0 überwiegend im Kern im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 31 K). Die gleiche Beobachtung lässt sich für CTSX schließen. Es kommt zu einer Verlagerung von CTSX in den Zellkern (Abbildung 31 J).

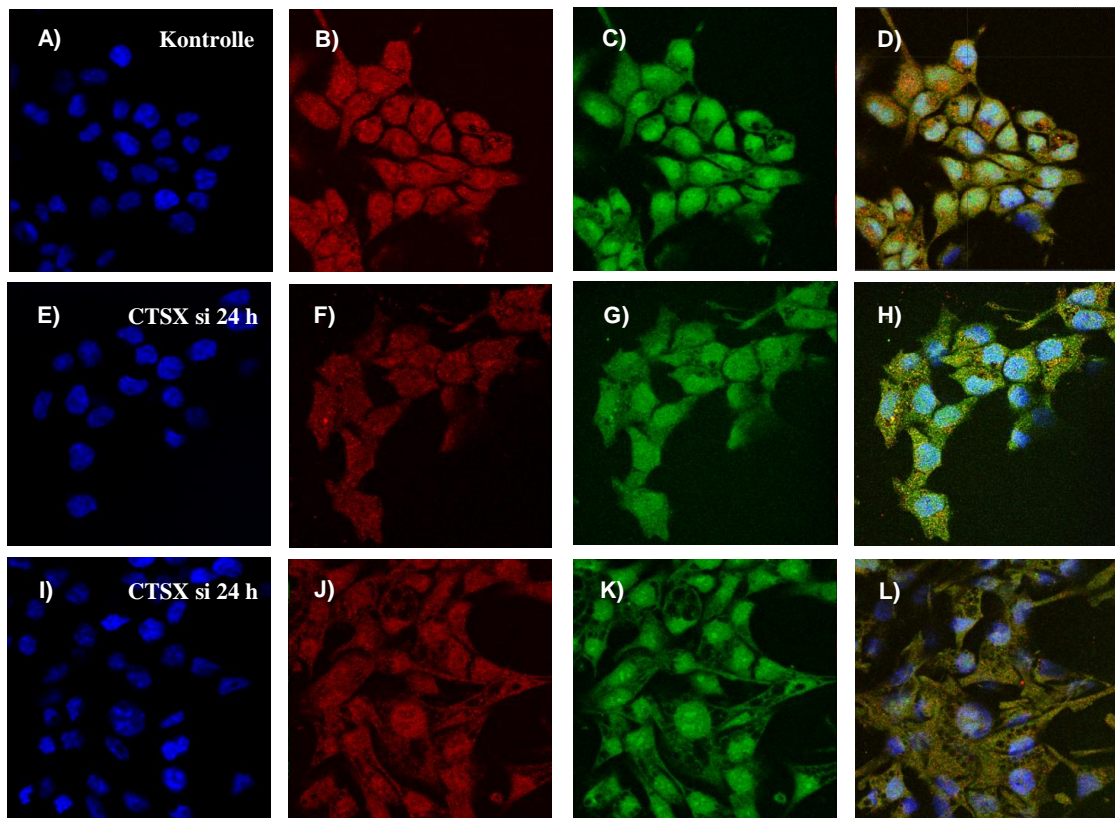


Abbildung 31: CTSX siRNA behandelte N87-Zellen (24 h, 48 h).

Die Zellen wurden mit anti-CTSIX (rot; B, F, J), anti-RPLP0 (grün; C, G, K) und DAPI (blau; A, E, I) gefärbt (Leica Laserscannmikroskop 63 × Vergrößerung). Die Überlagerung beider Proteine ist in D, H und L dargestellt. Kontrolle: A – D, CTSX si 24 h: E – H, CTSX si 48 h: I – L.

3.7.5 Analyse des Zellzyklus mittels *Knockdown* von RPLP0 in N87-Zellen

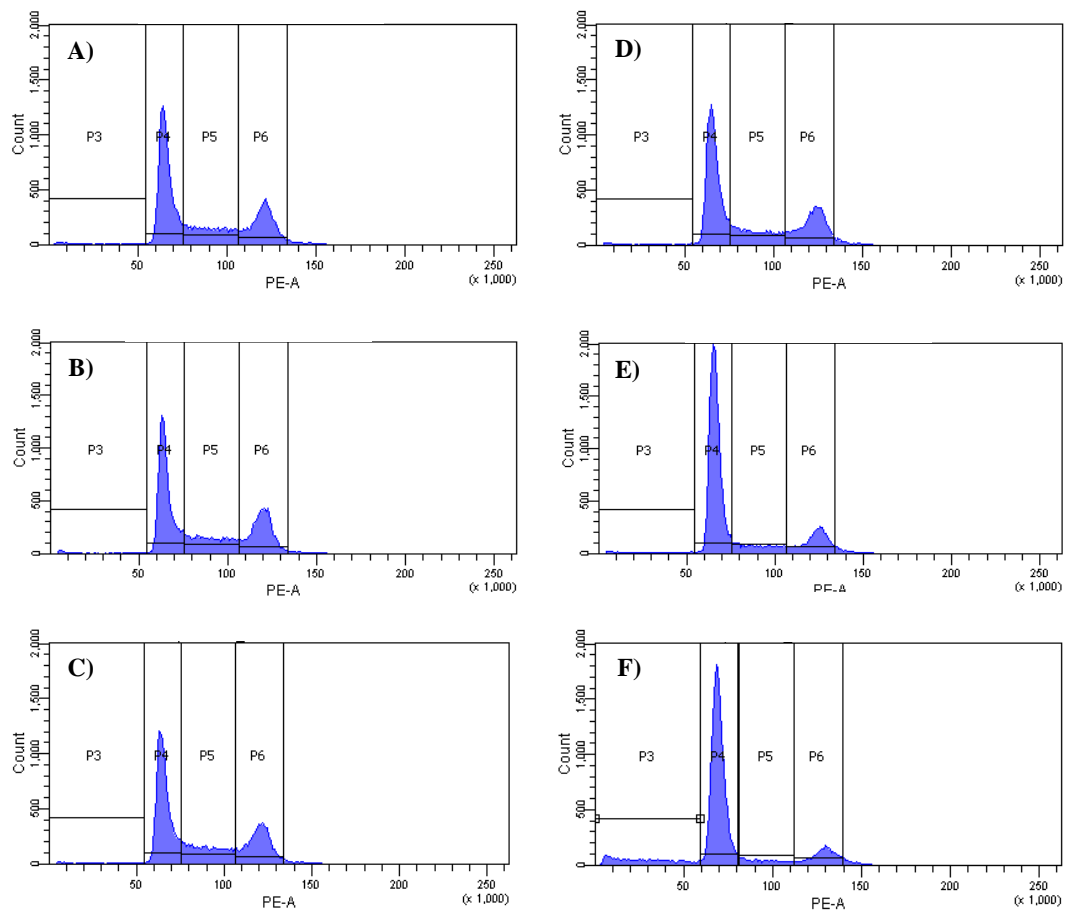
In der Literatur wurde RPLP0 noch nicht hinreichend im Magenkarzinom beschrieben. Es könnte aber nicht nur an der Proteinsynthese, sondern auch an translationalen Prozessen, der DNA-Reparatur, der Zellentwicklung, der Zell-Apoptose und der Tumorgenese beteiligt sein [87-90]. Ein weiteres ribosomales Protein RPLP15 fördert die Zellproliferation und weist eine erhöhte Expression im Magenkarzinom auf [91]. Die Herunterregulierung von RPLP6 unterstützt das Zellwachstum und die Zellzyklus-Progression [92]. Diese vielfältigen Funktionen lassen auf eine mögliche Rolle von RPLP0 in der Zellproliferation und im Tumorwachstum schließen.

Aufgrund dieser Annahmen wurde RPLP0 im Zellzyklus mittels *Knockdown* in N87-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit einer für RPLP0-spezifischen siRNA und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Anschließend wurden sie gesammelt, mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und mittels FACS-Analysen die Zellzyklusparameter bestimmt (Abbildung 32 A und B). Mitgeführt wurden jeweils eine unbehandelte Kontrolle und Zellen, die nur mit

Transfektionsmedium und Transfektionsreagenz behandelt wurden (TM/TR). Wie in Abbildung 32 B zu erkennen ist nimmt die Zellzahlverteilung in der G0/G1-Phase in den siRNA-behandelten Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h zu und erreicht mit fast 20 % im Gegensatz zur si-Kontrolle ihr Maximum bei 72 h. Im Gegensatz dazu nimmt die Zellzahl in den anderen Phasen des Zellzyklus ab (Abbildung 32, S-Phase, G2/M-Phase). Die Mehrheit der Zellen befindet sich in der G0/G1-Phase und wird am Übergang in die S-Phase gehindert. Es wird von einem G1-Arrest gesprochen.

RPLP0 scheint somit für eine verstärkte Proliferation innerhalb der Magenkarzinomzelllinie N87 zu sorgen.

A)



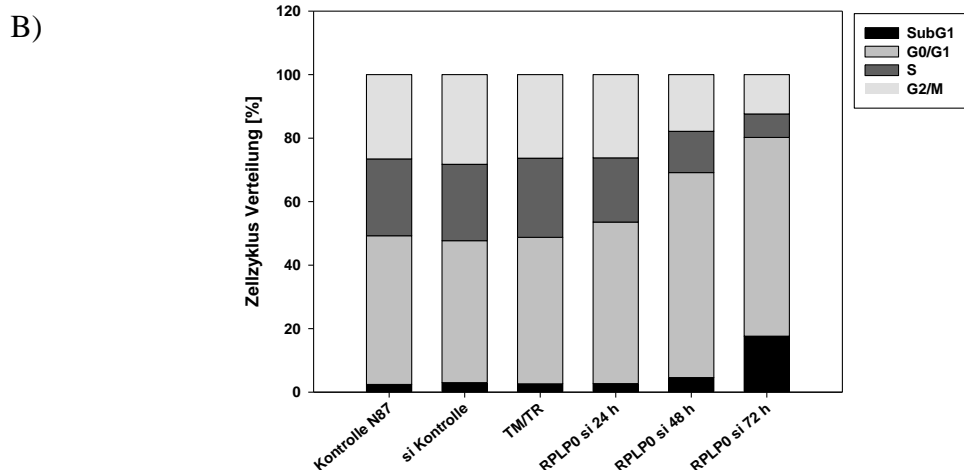


Abbildung 32: A) Zellzyklusanalysen nach RPLP0 siRNA-Behandlung.

A) Kontrolle; B) si-Kontrolle; C) TM/TR Kontrolle; D) RPLP0 si 24 h; E) RPLP0 si 48 h; F) RPLP0 si 72 h; P3: SubG1-Phase; P4: G0/G1-Phase; P5: S-Phase; P6: G2/M-Phase; **B) Zellzyklusverteilung nach RPLP0 siRNA-Behandlung.**

3.7.6 Analyse des Zellzyklus mittels *Knockdown* von CTSX in N87-Zellen

Unter anderem wird CTSX als eine Cysteinprotease beschrieben, die, wenn sie herunterreguliert wird, zelluläre Seneszenz in verschiedenen Zelltypen und eine verminderte Proliferation induzieren kann [61]. Um diese Annahmen in Verbindung mit RPLP0 näher zu prüfen, wurden die verschiedenen Zellzyklusphasen nach Herunterregulierung von CTSX untersucht.

N87-Zellen wurden mit einer CTSX siRNA und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Ihre Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.7.5.

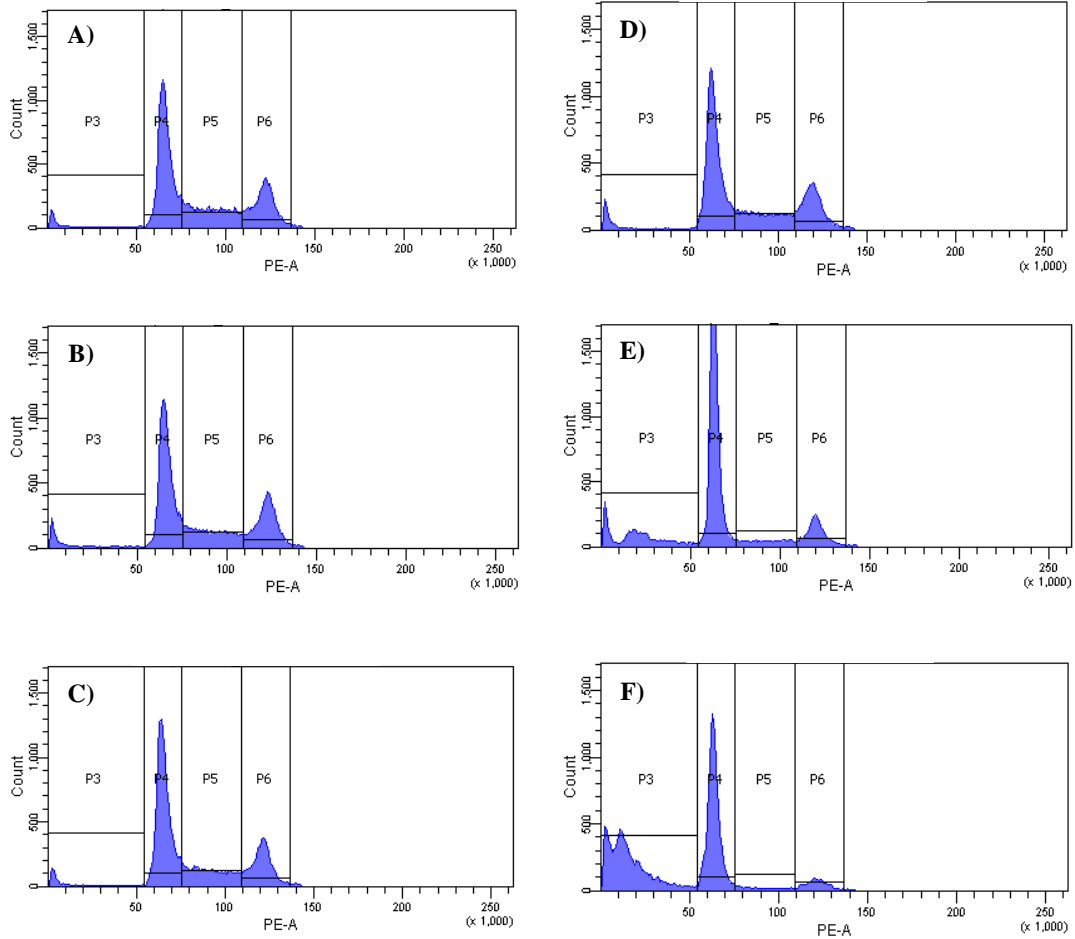
Die Zellzahlverteilung der siRNA-behandelten Zellen nimmt in der G0/G1-Phase langsam zu und erreicht ihren Maximalwert nach 48 h mit ca. 14 % Unterschied im Vergleich zur si-Kontrolle (Abbildung 33 B). Die Erhöhung der Zellzahl deutet auf einen Arrest in der G0/G1-Phase des Zellzyklus hin. Dieser verhindert das weitere Durchlaufen der Zellen im Zellzyklus, es treten weniger Zellen in die S- und G2/M-Phase ein (Abbildung 33 A, A - F).

Gleichzeitig steigt die Zahl der Zellen nach 72 h Behandlung in der SubG1-Phase bedeutend an. Es treten immer mehr Zellen in den apoptotischen Zelltod ein (Abbildung 33 B). Dies führt letztendlich zu einer 6-fachen Hochregulation gegenüber der si-Kontrolle.

Die Herunterregulierung von CTSX ist durch einen leichten G1-Arrest gekennzeichnet, der mit einer verstärkten Apoptose einhergeht. Im Zellzyklus scheint CTSX eine bestimmende

Funktion bei der Förderung der Proliferation in der Magenkarzinomzelllinie N87 einzunehmen.

A)



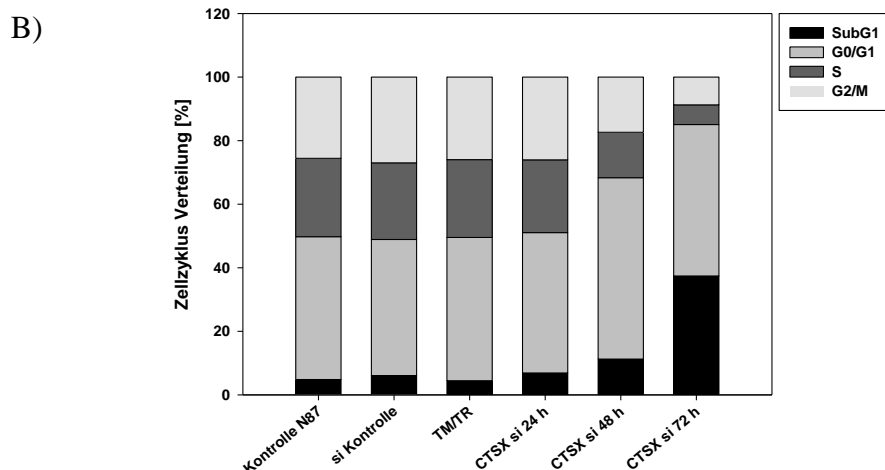


Abbildung 33: A) Zellzyklusanalysen nach CTSX siRNA-Behandlung.

A) Kontrolle; B) si-Kontrolle; C) TM/TR Kontrolle; D) CTSX si 24 h; E) CTSX si 48 h; F) CTSX si 72 h; P3: SubG1-Phase; P4: G0/G1-Phase; P5: S-Phase; P6: G2/M-Phase; **B) Zellzyklusverteilung nach CTSX siRNA-Behandlung.**

3.7.7 Doppelter *Knockdown* von CTSX und RPLP0 in N87-Zellen

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die Auswirkungen eines *Knockdown* in Magenkarzinomzellen (N87) von RPLP0 und CTSX einzeln untersucht wurden, wurden im folgenden Experiment beide Gene gleichzeitig durch eine Doppel-siRNA herunterreguliert. Darauf wurden die einzelnen Zellzyklusphasen auf eine Verstärkung oder Veränderung sowohl im G1-Arrest als auch in der Apoptose näher untersucht.

N87-Zellen wurden je mit einer CTSX und RPLP0 siRNA und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Anschließend wurden sie mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und mittels FACS-Analysen ausgewertet (Abbildung 34 A und B).

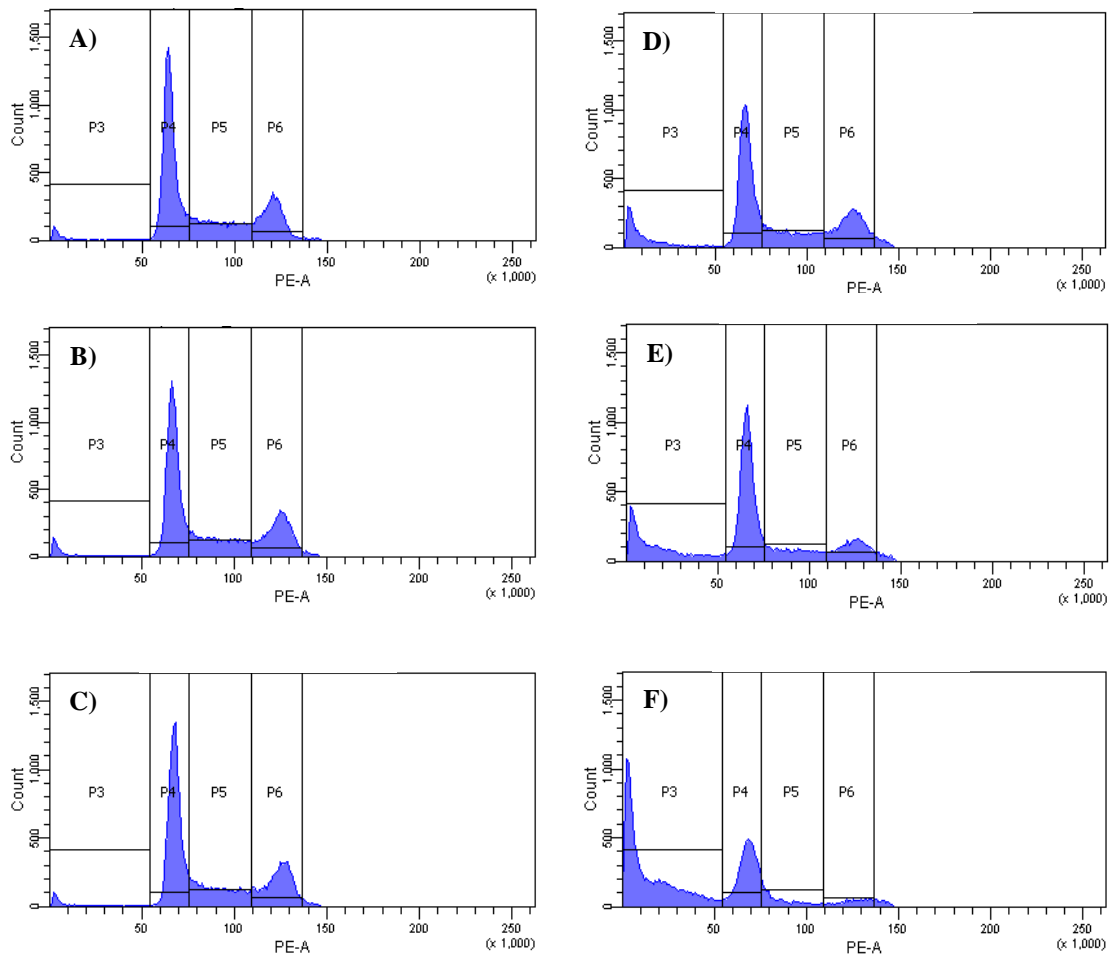
In Abbildung 34 B ist die Zellzyklusverteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen dargestellt. Die G0/G1-Phase ist durch eine Abnahme der Zellen um 6 % und 18 % nach 48 h und 72 h siRNA-Behandlung gekennzeichnet. Dies spiegelt sich ebenfalls in der S- und G2/M-Phase wider. Die Zellen nehmen um mehr als die Hälfte ab. Im Gegensatz dazu steigt die Zahl der Zellen, die in Apoptose gehen, in der SubG1-Phase stark an. Mit 55 % apoptotischen Zellen nach 72 h siRNA-Behandlung erreicht sie ihr Maximum.

Die Herunterregulierung von RPLP0 ist durch einen G1-Arrest gekennzeichnet, der ebenfalls nach dem *Knockdown* von CTSX auftritt. Jedoch kommt es schon in CTSX-defizienten

Zellen zu einem Anstieg der Apoptose. Dieser findet seinen Höhepunkt bei der doppelten Herunterregulierung von RPLP0 und CTSX.

Der *Knockdown* beider Proteine führt zu einer verstärkten Apoptose der N87-Magenkarzinomzellen.

A)



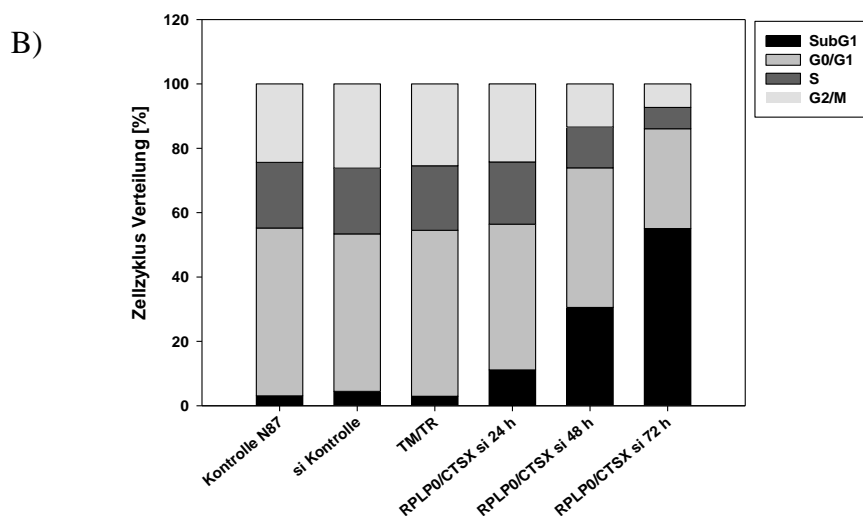


Abbildung 34: A) Zellzyklusanalysen nach RPLP0/CTSX siRNA-Behandlung.
 A) Kontrolle; B) si-Kontrolle; C) TM/TR Kontrolle; D) RPLP0/CTSX si 24 h; E) RPLP0/CTSX si 48 h; F) RPLP0/CTSX si 72 h; P3: SubG1-Phase; P4: G0/G1-Phase; P5: S-Phase; P6: G2/M-Phase; **B) Zellzyklusverteilung nach RPLP0/CTSX siRNA-Behandlung.**

Die statistischen Analysen konnten signifikante Unterschiede zwischen den Zellzyklen feststellen ($p < 0,0001$). In den paarweisen Tests zeigte sich, dass dieser Unterschied jeweils in den Phasen SubG1, G0/G1, S und G2/M auftrat (jeweils $p < 0,0001$). In der Gegenüberstellung der S-Phase mit der G2/M-Phase konnte kein signifikanter Unterschied der Zellen im Zellzyklus ermittelt werden ($p = 0,4021$). Der Vergleich erfolgte für die Zellzyklen getrennt und zeigte innerhalb der Phasen SubG1, S und G2/M jeweils hoch signifikante Divergenzen (jeweils $p < 0,0001$; $p = 0,2757$ in G0/G1). Innerhalb dieser Phasen konnten zudem für den Vergleich der si-Kontrolle gegen die siRNA-Behandlungen (RPLP0, CTSX, CTSX/RPLP0) 24 h, 48 h und 72 h signifikante Unterschiede bei 48 h und 72 h siRNA-Behandlung nachgewiesen werden (z. B. in der S-Phase, siRNA 48 h ($p < 0,0001$); siRNA 72 h ($p < 0,0001$)).

3.7.8 Analysen von Zellzyklusproteinen nach Herunterregulierung von CTSX und RPLP0

Durch die Herunterregulierung von RPLP0 als auch von CTSX werden in den Zellen verschiedene Prozesse im Zellzyklus beeinflusst. Zellbiologisch betrachtet sind die Zellen in dieser Form nicht mehr in der Lage, den Übergang in die S-Phase zu erreichen und den Zellzyklus vollständig zu durchlaufen. Hierbei können unterschiedliche Proteine, sogenannte Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) oder auch Cyclin-abhängige Inhibitoren (CDKIs) beteiligt sein. Um diese möglichen Regulatoren näher zu untersuchen, wurden N87-Karzinomzellen mit je einer für RPLP0 und je einer für CTSX spezifischen siRNA und nach unterschiedlichen Zeitpunkten der siRNA-Behandlung (24 h, 48 h und 72 h) gesammelt. Die Zellpellets wurden aufgearbeitet, der Proteingehalt bestimmt und je 30 µg auf ein 12 %iges Acrylamidgel geladen (Abbildung 35).

In Spur 1 wurde die N87 Kontrolle, in Spur 2 die si-Kontrolle, in Spur 3 die Transfektionsmedium/Transfektionsreagenz-Kontrolle (TM/TR) und in den Spuren 4 - 6 die RPLP0 siRNA 24 - 72 h aufgetragen.

Die N87-Zellen wurden erfolgreich mit der RPLP0 siRNA transfiziert. Die Reduktion von RPLP0 liegt nach der densitometrischen Auswertung bei ca. 57 % nach 72 h. Als Vergleichskontrolle wurden die Proben gegen das Referenzgen β -Aktin gerechnet und mit der si-Kontrolle verglichen. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt und densitometrisch ausgewertet.

Auf CTSX scheint der RPLP0 *knockdown* nach der densitometrischen Auswertung kaum Auswirkungen zu zeigen, denn die Expression bleibt im Vergleich zur si-Kontrolle annähernd gleich (Abbildung 35, Spur 4 - 6). Das Expressionsmuster für Cyclin E zeigt einen leichten Anstieg nach 48 h siRNA Behandlung (Spur 5). Im Gegensatz dazu nimmt die Expression von CDK2 nach der siRNA-Behandlung stark ab (Spur 4 - 6). Nur die Proteine p21, p 27 und p53 weisen eine zyklische Zunahme der Proteinexpression nach 24 h siRNA und eine Abnahme der Expression nach 72 h (Spur 4 - 6) auf.

RPLP0 scheint sowohl p21 und p27 als auch CDK2 zu regulieren (Abhängigkeit). Diese Änderungen im Expressionsmuster sind vermutlich der Grund für den erhaltenen G1-Arrest der Zellzyklusanalysen.

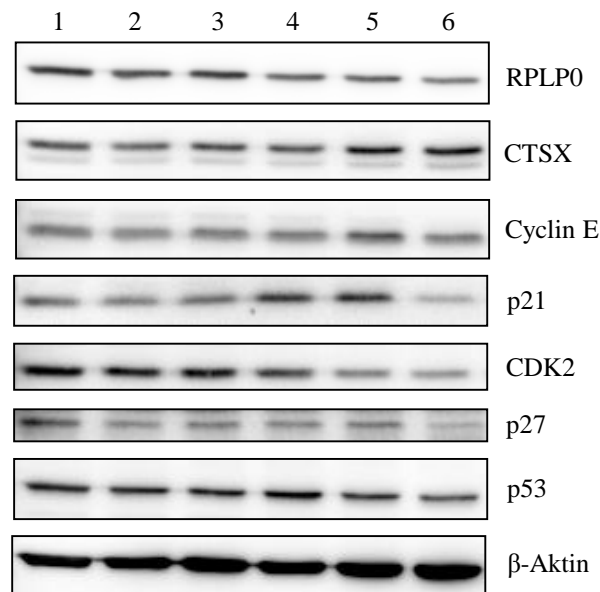


Abbildung 35: RPLP0 siRNA Westernblotanalysen.

Spur 1: Kontrolle; Spur 2: si-Kontrolle; Spur 3: TM/TR; Spur 4: RPLP0 siRNA 24 h; Spur 5: RPLP0 siRNA 48 h; Spur 6: RPLP0 siRNA 72 h

Nachdem die N87-Zellen mit der CTSX siRNA transfiziert wurden, konnte eine Reduktion von CTSX nach der densitometrischen Auswertung von ca. 75 % nach 72 h beobachtet werden. Die Proben wurden ebenfalls mit der si-Kontrolle verglichen und gegen das Referenzgen β -Aktin gerechnet.

Die Expression von RPLP0 bleibt im Vergleich zur si-Kontrolle bis zu 48 h CTSX siRNA konstant (Abbildung 36, Spur 1 - 5). Erst nach 72 h CTSX siRNA ist eine verringerte Expression von RPLP0 erkennbar (Abbildung 36, Spur 6). Hingegen stagniert die Expression für Cyclin E auf einem annähernd gleichen Niveau (Abbildung 36). Im Gegensatz zu Cyclin E nimmt die Proteinmenge von CDK2 leicht nach 72 h siRNA-Behandlung ab (Spur 6). Während bei der RPLP0 siRNA p21 nach 24 h siRNA zyklisch ansteigt, nimmt es beim CTSX *Knockdown* ab (Abbildung 36, Spur 4 - 6). Bei p53 und p27 konnte ein leichter Anstieg der Expression nach 24 h verzeichnet werden. Dagegen sinkt die Expression von p53 nach 72 h siRNA-Behandlung stark (Spur 4 - 6), während p27 nach 72 h leicht zunimmt (Abbildung 36, Spur 6).

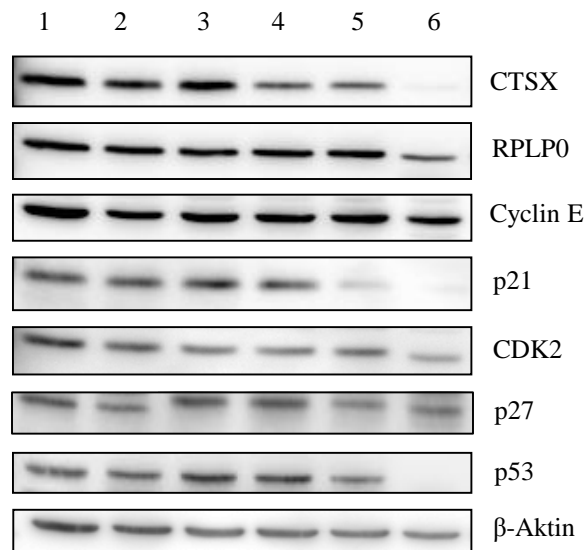


Abbildung 36: CTSX siRNA Westernblotanalysen.

Spur 1: Kontrolle; Spur 2: si-Kontrolle; Spur 3: TM/TR; Spur 4: CTSX siRNA 24 h; Spur 5: CTSX siRNA 48 h; Spur 6: CTSX siRNA 72 h

Abschließend wurden die N87-Zellen mit RPLP0 und mit CTSX transfiziert. Diese Doppel-Transfektion sollte etwaige Expressionsveränderungen der Zellzyklusproteine bei gleichzeitigem *Knockdown* beider Proteine überprüfen.

Nach Aufarbeitung der Zellen (siehe oben) wurden die Proben auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel geladen. In Spur 1 wurde die N87 Kontrolle, in Spur 2 die si-Kontrolle, in Spur 3 die Transfektionsmedium-/Transfektionsreagenzkontrolle (TM/TR) und in den Spuren 4 - 6 die CTSX/RPLP0 siRNA 24 - 72 h aufgetragen (Abbildung 37).

Die Reduktion von RPLP0 liegt nach der densitometrischen Auswertung (3-fach Bestimmung) bei ca. 45 % nach 72 h. Von CTSX befindet sich die Reduktion bei ca. 57 % nach 72 h siRNA-Behandlung.

Das Expressionsmuster für Cyclin E bleibt nach 24 h, 48 h und 72 h siRNA-Behandlung (Spur 5) gleich. Im Gegensatz dazu nimmt die Expression von CDK2 nach der siRNA-Behandlung ab (Spur 4 - 6). Im Vergleich zur RPLP0 siRNA ist diese Expressionsabnahme jedoch nicht so stark ausgebildet (Abbildung 37, Spur 4 - 6).

Die Expression der Proteine der Cip/Kip-Familie der CDK-Inhibitoren (CKI) - p21 und p27 - nimmt nach der siRNA-Behandlung bei p21 (63 % Expressionsabnahme nach 72 h) stark ab. Während bei p27 nur ein leichte Expressionsabnahme zu verzeichnen ist (23 % nach 48 h, Abbildung 37, Spur 4 - 6). Eine Verringerung der Expression von p53 ist nach 48 h und 72 h (Spur 4 - 6) (Densitometrische Auswertung) erkennbar.

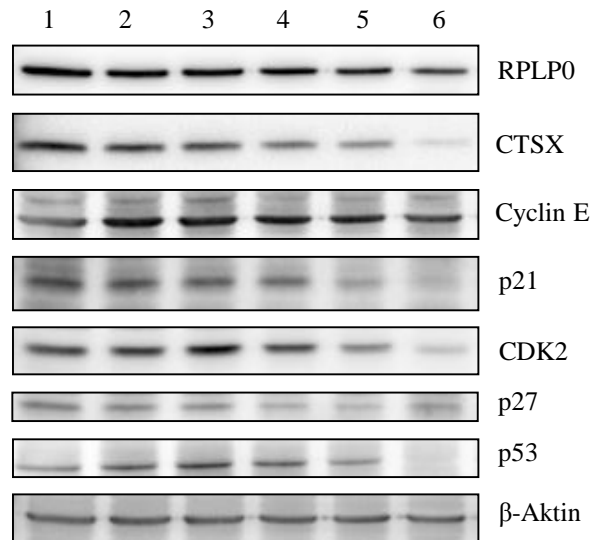


Abbildung 37: CTSX/RPLP0 siRNA Westernblotanalysen.

Spur 1: Kontrolle; Spur 2: si-Kontrolle; Spur 3: TM/TR; Spur 4: CTSX/RPLP0 si 24 h; Spur 5: CTSX/RPLP0 si 48 h; Spur 6: CTSX/RPLP0 si 72 h

4 Diskussion

Das Studium von Protein-Protein-Interaktionen stellt heutzutage eine wichtige Grundlage für die Erforschung von biologischen Prozessen, wie z. B. der Signaltransduktion, der Transkription und von sekretorischen Prozessen dar. Sie haben eine immer größere Bedeutung in der biomedizinischen Forschung und tragen zu einem essentiellen Verständnis molekularer Wechselwirkungen bei, die unter anderem bei der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum und in apoptotischen Prozessen eine Rolle spielen.

Eine Methode für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen ist das *Yeast Two-Hybrid* System, dessen Basis die Grundlage der vorliegenden Arbeit darstellt.

4.1 Potentielle Interaktion mit MUC6

Mucin 6 (MUC6) konnte als eines von drei potentiellen Interaktionspartnern von Cathepsin X im *Yeast Two-Hybrid* System identifiziert werden. Für die weitere Überprüfung der Interaktion mit Cathepsin X wurde MUC6 näher in Co-IP Studien (chemilumineszente Co-IP und Gewebe Co-IP) untersucht. Nachfolgend schlossen sich Ko-Lokalisierungsexperimente an.

Als eine der Hauptkomponenten der Magenschleimhaut übernehmen Mucine eine Schutzfunktion gegenüber luminalen Säuren und den im Magensaft auftretenden proteolytischen Enzymen [93]. Sie sind epitheliale Glycoproteine, die einen hohen Anteil an Oligosacchariden besitzen [94; 95] und entweder membran-gebunden vorliegen oder sekretorisch ausgeschieden werden [96]. MUC6 ordnet sich in die Familie der humanen Mucine ein, die mittlerweile 21 Vertreter umfasst (MUC1-21). Das besondere Merkmal dieser Familie sind die *tandem-repeat*-Domänen [97]. Diese so genannten PTS-Domänen (Pro/Thr/Ser) sind an den Serin und Threonin Aminosäureresten umfangreich glykosyliert [97]. Die Expression von Mucinen ist gewebespezifisch und verschieden stark ausgeprägt. Während der Tumorgenese und Tumorprogression können sie abweichend eine erhöhte oder erniedrigte Transkription aufweisen [98].

MUC6 nimmt eine zytoprotektive Wirkung gegenüber einer Vielzahl von Substanzen ein [99]. Das Vorkommen reicht vom Dünndarm, über die Gallenblase, die Bronchien bis hin zur Endocervix und dem Pankreas [94; 95; 98; 100]. Ebenso wird es im Magen in den mucopeptidischen Zellen des Fundus sowie in den pylorischen Drüsen des Antrum exprimiert [101]. Eine Expression von MUC 6 findet sowohl im Magenkarzinom als auch im Adenom und der normalen Mucosa statt. Im Vergleich mit Adenomen und der normalen Mucosa tritt

eine geringere Expression von MUC6 im Magenkarzinom auf [102]. Dies könnte unter anderem erklären, weshalb MUC6 in der immunhistochemischen Färbung schwach bzw. kaum angefärbt werden konnte. Bei den Gewebeschnitten handelte es sich um Magenkarzinome vom intestinalen Typ nach Lauren. Zwar konnten Zheng *et al.* zeigen, dass die MUC6-Expression im intestinalen Typ deutlich höher ausgeprägt ist als im diffusen Typ, jedoch scheint der unterschiedliche Grad der Entwicklung des Magenkarzinoms eine Rolle hinsichtlich der MUC6-Expression zu spielen [95; 103]. Für weitere hinreichend signifikante Aussagen hätte eine noch größere Anzahl von Magenkarzinomen bzw. ein Magenkarzinomkollektiv mit den entsprechenden Vorläuferläsionen immunhistochemisch ausgewertet werden müssen.

Aufgrund der positiven Ergebnisse der chemilumineszenten Co-IP und der vorhandenen gegenläufigen schwachen Ko-Lokalisation sollte die mögliche Interaktion zwischen Cathepsin X und MUC6 in einer weiteren Co-IP, diesmal an humanem Magenkarzinomgewebe, endgültig verifiziert werden.

In der Gewebe Co-IP konnte jedoch keine Expression für MUC6 im Westernblot nachgewiesen werden. Die zuvor schon schwache Ko-Lokalisation bestätigte den Verdacht auf scheinbar falsch positive Ergebnisse. Die positiven Resultate der chemilumineszenten Co-IP für MUC6 sind möglicherweise auf eine verkürzte Version des Proteins in der Co-IP zurückzuführen. MUC6-DNA weist eine Länge von ca. 23,8 Kb auf. Für die chemilumineszente Co-IP wurde nur die Region des Klons amplifiziert und kloniert, der im *Yeast Two-Hybrid Screen* erfolgreich selektiert werden konnte. Diese hatte eine Länge von ca. 520 bp und stellt somit nur einen minimalen Ausschnitt des gesamten Proteins MUC6 dar. Charakteristisch war die konservierte Domäne der GHB *Superfamily* [104]. Die GHB *Superfamily* besteht aus Glycoproteinormon- β -Ketten Homologen (Gonadotropine). Glycoproteinormone besitzen zwei glykosylierte α - und β -Ketten. Zu dieser Familie gehören ebenfalls die humanen Hormone Follitropin (FSH), Lutropin (LSH) und Thyrotropin (TSH) [105; 106]. Allen zu dieser Familie gehörigen Proteinen ist das Vorhandensein von sechs Cysteinen, verbunden zu einem Cystein-Knoten, gemein [107]. Die konservierte Domäne könnte ein möglicher Grund für die falsch positiven Ergebnisse der Bindung von Cathepsin X an MUC6 gewesen sein. Letztlich konnte nach der Gewebe Co-IP für die gesamte Länge von MUC6 keine Interaktion mit Cathepsin X bestätigt werden. Für die weiteren Arbeiten wurden daher nur RPLP0 und Galectin-2 auf ihre Interaktion mit Cathepsin X näher untersucht und charakterisiert.

4.2 Charakterisierung der Interaktion von Cathepsin X und Galectin-2

Mithilfe des *Yeast Two-Hybrid* Systems konnte Galectin-2 als ein potentieller Interaktionspartner von Cathepsin X identifiziert werden. Die Interaktion wurde durch verschiedene Methoden bestätigt und verifiziert (chemilumineszente Co-IP, Gewebe IP und Ko-Lokalisation) als auch in nachfolgenden Experimenten funktionell charakterisiert.

4.2.1 Galectine

Die Familie der Galectine gehört zu den Kohlenhydrat-bindenden Proteinen. Allen Galectinen ist die gemeinsame konservierte Kohlenhydrat-erkennende Domäne (CRD) und die Affinität für β -Galactosidase gemein [108]. Ihr ubiquitäres Vorkommen reicht von den Vertebraten (Fische, Vögel, Amphibien) bis über die Invertebraten, Würmer und Pilze hinaus [109].

Galectine können aufgrund ihrer charakteristischen CRD-Domäne in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Zu den Prototyp-Galectinen gehören die Galectine-1, -2, -5, -7, -10, -13, -14, und -15. Sie besitzen nur eine einzelne CRD-Domäne, während die *tandem-repeat*-Galectine (Galectine-4, -6, -8 und -9) aus zwei CRD-Domänen bestehen und über eine einzelne Polypeptidkette miteinander verbunden sind. Die Ausnahme innerhalb der Galectin-Familie stellt Galectin-3 dar. Dieses Galectin ist eine Chimäre und setzt sich aus einer einzelnen CRD-Domäne, die an unübliche *tandem-repeats* bindet, zusammen [110] (Abbildung 38).

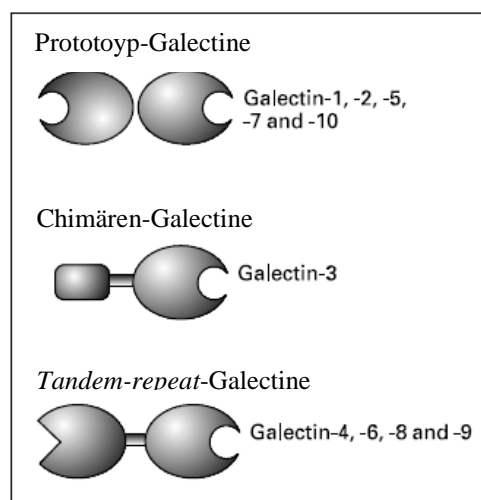


Abbildung 38: Schematische Übersicht der Galectin-Familie.
Einteilung der Galectine in Prototyp-, Chimären- und *tandem-repeat*-Galectine [111].

Aufgrund ihrer Struktur sind Galectine in der Lage, Glykokonjugate, bestehend aus Sequenzen mit Gal β 1,4GlcNAc (LacNAc) (N-Acetyllactosamin), zu identifizieren und zu binden [112; 113]. Dies ermöglicht ihnen, im extrazellulären Raum z. B. an die extrazelluläre Matrix und an Zelloberflächen-Adhäsionsmoleküle zu binden und verschiedene Glykokonjugate miteinander zu vernetzen [114-117]. Durch ihre Eigenschaften gewinnen sie immer mehr an Bedeutung als Regulatoren von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen [118; 119].

Galectine können durch die Bindung verschiedener Liganden intrazelluläre Prozesse über Protein-Protein-Interaktionen steuern. Diese Prozesse schließen mRNA *splicing*, Zellzyklusprogression, Apoptose und Zellproliferation ein [120].

4.2.2 Galectine und ihr Expressionsprofil im Magen

Während manche Galectine ubiquitär vorkommen, sind andere spezifisch in einzelnen Entitäten oder Zellen exprimiert [121]. So tritt Galectin-1 in aktivierten Ratten-Makrophagen, aktivierten B-Zellen und effektorischen T-Zellen auf [122-124], während Galectin-7 auf Keratinozyten und Galectin-12 in Adipozyten lokalisiert werden konnten [125; 126].

Der Verdauungstrakt von Säugetieren ist reich an Galectinen [127]. Im humanen Magen sind bislang Galectin-1, Galectin-2, Galectin-3, Galectin-7, Galectin-8 und Galectin-9 nachgewiesen worden [111; 128-132].

4.2.2.1 Expression von Galectin-2 im Magengewebe

Die epitheliale Expression von Galectin-2 findet vorrangig im gastrointestinalen Trakt statt [130; 132].

In der vorliegenden Arbeit konnte eine positive Galectin-2 Expression sowohl in der intestinalen Metaplasie als auch im Magenkarzinom beobachtet werden. Im Gegensatz zur intestinalen Metaplasie nimmt die Expression im Tumor leicht ab. Infiltrierende Makrophagen konnten ebenso positiv für Galectin-2 angefärbt werden. Diese zeigten in der immunfluoreszenzchemischen Analyse eine deutliche Ko-Lokalisation von Galectin-2 und Cathepsin X. Die Interaktion der Proteine konnte in der Gewebe Co-IP bestätigt werden.

Jung et *al.* zeigten, dass eine geringere Expression von Galectin-2 im Magenkarzinom mit einer Lymphknotenmetastasierung assoziiert ist [133]. Sie vermuten hierbei sowohl eine Rolle in der Tumorsuppression als auch in der Tumorprogression von Galectin-2 im Magenkarzinom.

Eine eindeutige Rolle für die Galectine im Magenkarzinom ist jedoch immer noch umstritten. Takaishi und Wang publizierten eine reduzierte Galectin-2-Expression im Magenkarzinom von *Helicobacter* infizierten Mäusen [134]. Dies korreliert mit den Daten aus dem humanen System, wo in 77 % der Tumoren keine oder nur eine schwache Expression (0, 1+) von Galectin-2 gezeigt werden konnte, wohingegen die Cathepsin X-Expression mit der Schwere der Erkrankung zunimmt [133].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit korrelieren mit den bisher veröffentlichten Publikationen und zeigen durch die Interaktionsstudien neue Anknüpfungspunkte für weitere Analysen auf.

4.2.2.2 Untersuchung der *H. pylori*-abhängigen Galectin-2-Expression

Die Galectin-2-Expression im Tumorepithel ist nur schwach ausgeprägt, womit eine inverse Korrelation zum Cathepsin X vorliegt. Da für Cathepsin X eine *H. pylori*-abhängige Expressionssteigerung, beginnend bei der entzündlichen Veränderung der Schleimhaut bis hin zum Magenkarzinom, gezeigt werden konnte, wurde in dieser Arbeit das analoge Verhalten von Galectin-2 in der frühen Magenkarzinogenese verfolgt. In dem untersuchten Kollektiv, das Gastritis-Proben (+/- *H. pylori*) und Magenkarzinomproben enthielt, nimmt Cathepsin X erwartungsgemäß mit dem Grad der Entzündung zu, während Galectin-2 nur in einer Probe im Karzinom detektiert werden konnte. Das Vorhandensein von *H. pylori* hat hier offensichtlich keinen Einfluss auf die Expression von Galectin-2.

Die Ergebnisse für die Heraufregulation von Cathepsin X nach einer Infektion mit *H. pylori* korrelieren mit den publizierten Daten von Krueger *et al.* [39]. Galectin-2 konnte nicht in jedem Magenkarzinom und in keiner der Gastritisproben detektiert werden. Diese reduzierte Expression bzw. der Verlust lässt sich mit Daten aus dem Humanen Proteinatlas (www.proteinatlas.org) vergleichen. Dort wurden Magenkarzinome (Adenokarzinome) immunhistochemisch mit Galectin-2 gefärbt. Von 20 verschiedenen Tumoren wurden 13 negativ, vier schwach und nur drei stark angefärbt [135]. Die Expression von Galectin-2 im Magenkarzinom ist sehr heterogen, wobei bislang neben der Korrelation zum Lymphknotenstatus kein Bezug zum Tumorstadium, zur Differenzierung oder zur Tumorklassifikation gezeigt werden konnte [133]. Immunhistochemisch konnten Saal *et al.* eine positive Galectin-2 Reaktion im gesunden Magenepithel zeigen, ohne eine Veränderung in entsprechenden Gastritisproben zu beobachten. Aber auch hier fiel die Galectin-2-Expression im Magenkarzinom gegenüber den Vorläuferläsionen deutlich ab [132]. Obwohl der *H. pylori*-Infektion der Magenschleimhaut keine Bedeutung hinsichtlich der

Expressionsregulation von Galectin-2 zuzukommen scheint, wären direkte funktionelle Targets im Rahmen der bakteriellen Entzündung denkbar. Als Mitglied der Galectin-Familie ist Galectin-3 in der Lage, an das O-Antigen von *H. pylori* zu binden. Die Adhäsion des O-Antigens an Galectin-3 ermöglicht es *H. pylori*, eine verstärkte Bindung an der Oberfläche von AGS Zellen aufzubauen [136]. Diese Bindung ist entscheidend für eine erfolgreiche, persistierende Kolonisation von *H. pylori* an der Magenschleimhaut. Für Cathepsin X ist bereits eine Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane beschrieben worden [53]. Diese Proteoglykane haben möglicherweise einen Einfluss auf die *H. pylori*-vermittelte Adhäsion [137; 138]. Beide Proteine, Cathepsin X und Galectin-2, könnten aufgrund ihrer Funktionen sowohl auf die O-Antigen-spezifische Adhäsion als auch auf die Entwicklung von metaplastischen Läsionen in frühen Stadien der Magenkarzinogenese wirken.

4.2.3 Ko-Lokalisation von Galectin-2/Cathepsin X im Zellkulturmodell

Im Zellkulturmodell (mit HepG2-Zellen) konnte wie auch schon zuvor im Magenkarzinomgewebe eine Ko-Lokalisation von Galectin-2 und Cathepsin X beobachtet werden. Beide Proteine lokalisierten mit annähernd gleicher Verteilung im Zytoplasma der Zellen.

Cathepsine sind normalerweise in den perinukleären Regionen der Lysosomen lokalisiert. Jedoch können sie in der Karzinomentwicklung auf der Zelloberfläche lokalisiert sein bzw. werden von den Zellen sekretiert [32; 139]. Durch ihre Oberflächenpräsenz sind sie in der Lage, extrazelluläre proteolytische Mechanismen in Gang zu setzen. In den HepG2-Zellen könnten mögliche Signalkaskaden mit Galectin-2 im Zytoplasma der Zellen aktiviert werden. Szpaderska *et al.* unterstützen diese Aussage, indem sie eine intrazelluläre Form von Cathepsin B in Melanom- und Prostatakarzinomzelllinien nachwiesen [140]. Die zytoplasmatische Lokalisation von Galectin-2 befürworteten Studien von Saal *et al* [132]. Hier wird ein nukleärer Verlust von Galectin-2 in cholangiozellulären Karzinomen, Leberkarzinomen, Mammakarzinomen und im Magen-Adenokarzinom beschrieben [132].

Die Art der Interaktion von Cathepsin X mit Galectin-2 in HepG2-Zellen könnte mit den Studien von Cathepsin X und ERGIC-53 verglichen werden [141]. ERGIC-53 ist ein homo-oligomerisches Transmembranprotein und durchläuft die frühen sekretorischen Wege innerhalb der Zelle [59; 60]. Mit seiner funktionellen Lectin-Domäne zeigt es eine direkte und Kohlenhydrat-abhängige Interaktion mit Cathepsin X [59]. Ebenso wie ERGIC-53 besitzt auch Galectin-2 eine - für Kohlenhydrat-bindende Proteine typische - charakterisierende CRD-Domäne [110]. Diese Domäne scheint ausschlaggebend für die Bindung von

Cathepsin X an ERGIC-53 zu sein und wird durch ein N-Glycan-Lectin vermittelt [59]. Eine ähnliche Bindung könnte auch für Cathepsin X und Galectin-2 stattfinden. ERGIC-53 spielt darüber hinaus im intrazellulären Transport von Cathepsin C eine Rolle [142]. Deshalb wäre ein Einfluss von Cathepsin X und Galectin-2 auf dem Gebiet der ER (endoplasmatischen Retikulum) Qualitätsmaschinerie, d. h. dem Transport von lysosomalen Proteinen, denkbar.

Ein weiterer Ansatz für eine mögliche funktionelle Erklärung der Interaktion zwischen Cathepsin X und Galectin-2 beruht auf der Tatsache, dass Galectine an Integrin-Untereinheiten von β 1- und β 2-Integrinen binden und so PI3K- und ERK-Signalwege sowie Zelladhäsion, zytoskelettale Reorganisation und Migration induzieren [130; 143-147]. In der Tumormetastasierung kommt den Integrinen eine herausragende Bedeutung in ihren Interaktionen mit der extrazellulären Matrix zu [148]. Galectin-2 ist in der Lage, an β 1-Integrine auf der Zelloberfläche von T-Zellen zu binden [130]. Aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften besitzt Cathepsin X ebenfalls die Möglichkeit, über das RGD-Motiv an Integrine zu binden [5]. Cathepsin X ermöglicht diese Bindung, die Immunantwort über die vermittelte Aktivierung des β 2-Integrin Rezeptors Mac1 zu regulieren [54; 149]. Sowohl Cathepsin X als auch Galectin-2 weisen einige gleiche molekulare Eigenschaften auf, die es beiden Proteinen erlauben würden, zusammen in der Adhäsion, der Zellmigration oder sogar in der Invasion im Magenkarzinom zu agieren bzw. interagieren. Ein Nachweis über die Bindung von Galectin-2/Cathepsin X an β 1-, β 2- oder β 3-Integrine im Magenkarzinom könnte in immunhistochemischen Studien weiter verfolgt werden.

4.2.4 Inverse Regulation von Cathepsin X und Galectin-2 in HepG2-Zellen

Nachdem HepG2-Zellen mit einer für Cathepsin X-spezifischen siRNA behandelt wurden, konnte nach 48 h eine signifikant erhöhte Expression für Galectin-2 im Westernblot nachgewiesen werden. Diese inverse Regulation der Galectin-2 mRNA-Expression wurde ebenfalls an fixierten HepG2-Zellen, die fluoreszenzchemisch mit Antikörpern gegen Cathepsin X und Galectin-2 gefärbt wurden, beobachtet. Hierbei blieb die Verteilung beider Proteine auf das Zytoplasma beschränkt.

Die signifikant erhöhte Expression von Galectin-2 stimmt mit Daten aus einem *H. pylori*-infizierten Mausmodell überein. Dort wurde Galectin-2 größtenteils in der nicht infizierten Magenmucosa detektiert, wohingegen nach einer *H. pylori*-Infektion die Abnahme bzw. der Verlust von Galectin-2 erfasst werden konnte. Gleichzeitig resultierte die *H. pylori*-Infektion in einer starken Expression von Cathepsin X (nicht veröffentlichte Daten, AG Krueger, Otto-v.-Guericke-Universität Magdeburg).

Das Mausmodell unterstützt somit die hier gezeigte inverse Regulation von Galectin-2 mit Cathepsin X. Im Mausmodell von Takaishi und Wang konnte ebenfalls eine Herabregulation des Galectin-2 Gens in *Helicobacter felis*-infizierten INS-GAS Mäusen, einhergehend mit einer Induktion von proteolytischen Enzymen (MMP-10, MMP-13, uPA), beobachtet werden [134].

Die Rolle von Galectinen im Karzinomgeschehen ist manifest. Sie wirken dort unter anderem an der neoplastischen Transformation, dem Tumorzell-Überleben, der Angiogenese und der Tumormetastasierung mit [146]. Für die Tatsache, dass Galectine einen Einfluss auf die Modulation der Tumorprogression besitzen, scheint ein Abfall der Galectin-2-Expression für eine Tumorsuppression zu sprechen.

4.3 Charakterisierung der Interaktion von Cathepsin X und RPLP0

Die Identifizierung von RPLP0, als potentieller Interaktionspartner von Cathepsin X erfolgte mithilfe des *Yeast Two-Hybrid* Systems und konnte in verschiedenen Co-Immunopräzipitationen (Gewebe Co-IP, chemilumineszente Co-IP und Co-IP an N87-Zellen) bestätigt werden. Ko-Lokalisationsexperimente konnten für beide Proteine als positiv verifiziert werden.

Weitere Einblicke in die Interaktion zwischen RPLP0 und Cathepsin X wurden nachfolgend eingehender charakterisiert und zusammengefasst.

4.3.1 Ribosomale Phosphoproteine

Die 60S ribosomale Untereinheit der Ribosomen in Eukaryoten bildet sich aus säurehaltigen, ribosomalen Phosphoproteinen, die auch P-Proteine genannt werden [150]. Zu jenen zählen RPLP0, RPLP1 und RPLP2 [151]. Sie weisen eine Größe von 11 kDa für P1/P2 und 34 – 36 kDa für P0 auf [150]. Entdeckt wurden P-Proteine zuerst in Bakterien. Ihre Proteinhomologe bestehen dort aus L10 und den zwei Dimeren L7 und L12 [152]. P-Proteine setzen sich aus einem stark konservierten C-terminalen Dodecanpeptid sowie aus einer N-terminalen Domäne und zentralen Regionen zusammen. Gemeinsam mit P0 sind P1 und P2 in der Lage, pentamerische Komplexe zu formen. Hierbei treffen zwei P1 und zwei P2 Moleküle auf ein P0 Protein [152] (Abbildung 39).

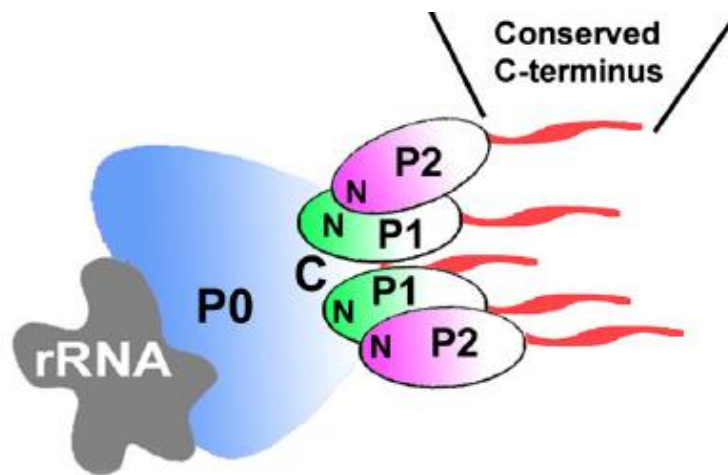


Abbildung 39: Übersicht der humanen Phosphoproteine P0, P1 und P2.

Die N-Termini der Dimere P1 und P2 binden an den C-Terminus von P0.

Rot: konservierte C-terminale Regionen [153]

P-Proteine befinden sich frei im Zytoplasma und verbleiben dort nach ihrer Synthese, wo sie nach ihrer Phosphorylierung mit der 60S ribosomalen Untereinheit verschmelzen [154; 155]. Trotz ihrer Zugehörigkeit zu den Ribosomen, sind P-Proteine scheinbar nicht nur an translationalen Prozessen in der Proteinsynthese, sondern auch in der Zellentwicklung, DNA-Reparatur, Apoptose und Tumorgenese beteiligt [87-90]. Sie sind einzigartig und spezifisch im Vergleich mit anderen ribosomalen Proteinen (RPs) [156]. Ein hohes Expressionslevel an ribosomalen Proteinen (auch RPLP0) konnte in humanen Tumoren detektiert werden [157-159]. Des Weiteren spielen P-Proteine auch in einigen immun-vermittelten Krankheiten, der Zellproliferation, im Zellwachstum und der Zellzyklusprogression eine Rolle [92; 160; 161].

4.3.2 Ribosomale Proteine im Magen

Wang *et al.* konnten die Überexpression des ribosomalen Proteins L15 mit einem begünstigten Zellwachstum im Magenkarzinom in Verbindung bringen [91]. Ebenfalls sind die ribosomalen Proteine S13 und RPL6 für ein begünstigendes Wachstum im Magenkarzinom bzw. in Magenkarzinomzelllinien verantwortlich [92; 162]. Hierbei fördert S13 das Wachstum durch die Herunterregulierung von p27^{Kip} [162]. Umgekehrt führt eine Abnahme von RPL6 zu einer Supprimierung der Transition von der G1- in die S-Phase in Magenkarzinomzellen [92].

Eine erhöhte Expression von RPLP0 konnten Kim *et al.* während ihrer Gen-Katalogisierungs- und Expressionsstudien in verschiedenen Magenkarzinomzelllinien zeigen [163]. Gen-Expressionsprofil-Analysen an Magenkarzinomen identifizierten ein Panel von 28 Genen,

darunter RPLP0, die in Kombination eine Vorhersage des Risikos von Lymphknotenmetastasen ermöglichen [164].

Trotz dieser Voraussagen und Profilanalysen gibt es kaum Studien über die Expression von RPLP0 oder seine funktionelle Charakterisierung im Magenkarzinom.

4.3.3 Expression von RPLP0 im humanen Magengewebe

RPLP0 ist ein neutrales Phosphoprotein, das sich in der großen Untereinheit der Ribosomen befindet und im Zytoplasma und im Kern der Zellen lokalisiert ist [151; 154].

In immunhistochemischen Färbungen konnten sowohl das Magenepithel als auch die intestinale Metaplasie und das Magenkarzinom angefärbt werden. Im Vergleich zu dem gesunden Epithel zeigte sich eine weitaus stärkere Expression von RPLP0 in den tieferen Infiltrationsschichten des Karzinoms. RPLP0 und Cathepsin X ko-lokalisieren in den Entzündungsinfiltraten, aber auch basal in den Drüsenepithelzellen, das in der Gewebe Co-IP bestätigt werden konnte.

Eine verstärkte mRNA-Expression von RPLP0 im Tumor konnten Artero-Castro *et al.* in Endometriumkarzinomen zeigen [157]. Dort entdeckten sie sowohl die P-Protein-Expression im normalen als auch im Tumorgewebe, wobei eine deutlich erhöhte Expression der P-Proteine im Tumor festgestellt werden konnte. Die Lokalisation der P-Proteine fand bevorzugt an den Infiltrationsrändern des Endometriumkarzinoms statt [157]. Diese Beobachtungen konnten ebenfalls in der vorliegenden Arbeit registriert werden. Auch hier trat eine verstärkte Expression von RPLP0 in den tieferen Infiltrationsschichten des Magenkarzinoms auf.

Laut Literaturvergleich liegt eine hohe Expression von ribosomalen Proteinen auch in anderen Tumorarten vor. Sowohl für das Kolonkarzinom als auch für das Leberkarzinom konnte eine gesteigerte RPLP0-Expression nachgewiesen werden [160; 165].

Die immunhistochemische Lokalisation von RPLP0 im Magenkarzinom zeigt sich homolog zur Expression von Cathepsin X. Dies stellt die Ausgangsbasis für weitere Charakterisierungen der Interaktion von RPLP0 und Cathepsin X dar.

4.3.4 Untersuchung der RPLP0-Expression im Verlauf der Karzinogenese

Nachdem RPLP0 immunhistochemisch an Magen-Karzinomschnitten nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression von RPLP0 während der Entzündung bis zum Karzinom an *H. pylori*-negativen und -positiven Gewebebiopsien untersucht.

RPLP0 ist sowohl in den *H. pylori*-positiven als auch in den -negativen Biopsien vorhanden. Hierbei scheint die Ursache der Entzündung keinen Einfluss auf das Expressionsniveau zu haben, denn die Expression ist unabhängig vom *H. pylori*-Status annähernd gleich. Den einzigen Hinweis auf einen Zusammenhang der Expression von ribosomalen Proteinen und *H. pylori* geben *in vitro* Versuche mit angereicherten L11 und L1 Proteinen in Überständen von *H. pylori*-Kulturen [166]. Cathepsin X nimmt mit dem Grad der Entzündung zu, während bei RPLP0 erst im Karzinom eine Zunahme der Expression erfolgt. Diese Aussagen stimmen mit den immunhistochemischen Färbungen für RPLP0 überein (4.3.3). Eine Zunahme der Expression von RPLP0 ergibt sich unabhängig vom Grad der Entzündung erst im Karzinom. Im Gegensatz zur inversen Regulation bei Cathepsin X und Galectin-2 besteht eine analoge Regulation zwischen Cathepsin X und RPLP0.

4.3.5 Einfluss der Cathepsin X-Defizienz auf die RPLP0-Expression

Für weitere funktionelle Studien wurden N87-Zellen mit einer für Cathepsin X-spezifischen siRNA behandelt. Für Cathepsin X konnte eine Reduktion der Expression um ca. 50 % im Westernblot beobachtet werden, während die Expression für RPLP0 annähernd gleich blieb. Aufgrund der gleich bleibenden Expression von RPLP0 auf Proteinebene wurden die N87-Zellen immunfluoreszenzchemisch gefärbt und ausgewertet. Die Ergebnisse zeigten eine Verschiebung der Verteilung von RPLP0 nach dem Verlust von Cathepsin X. In unbehandelten Zellen trat RPLP0 im Kern und im Zytoplasma auf, während Cathepsin X leicht im Kern und vorwiegend im Zytoplasma exprimiert wurde. Nach 48 h siRNA-Behandlung kommt es sowohl von RPLP0 als auch vom verbliebenen Cathepsin X zu einer verstärkten Kernverschiebung.

Wie schon unter 4.2.3 beschrieben, sind Cathepsine generell in den Lysosomen lokalisiert. Sie konnten während der Karzinomentwicklung auf den Zelloberflächen und intrazellulär nachgewiesen werden [32; 139; 140]. RPLP0 wurde ebenfalls sowohl im Zytoplasma der Zellen als auch im Kern, wobei die Nucleoli davon ausgeschlossen werden, beschrieben [154]. Die zytoplasmatische Akkumulation von RPLP0 wird teilweise durch die Zugehörigkeit

zu der großen Untereinheit der Ribosomen begründet. Diese befindet sich mit den ribosomalen Partikeln im Zytoplasma der Zellen [151].

Die Funktionen von RPLP0 sind nicht nur auf die ribosomale Biogenese beschränkt, sondern weiten sich auch auf extra-ribosomale Bereiche aus. Diese spiegeln sich in transkriptionellen Prozessen, DNA-Reparatur, Zellentwicklung, Apoptose und Tumorgenese wider [87-90]. Denkbar wäre ein Einfluss der Interaktion von RPLP0 mit Cathepsin X nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im nukleären Kompartiment. Unterstützt wird diese Hypothese durch Goulet *et al.*, die zeigten, dass Cathepsin L während der G1/S-Transition des Zellzyklus im Zellkern lokalisiert und dort in die proteolytische Prozessierung des CDP/Cux Transkriptionsfaktors involviert ist [167]. Cathepsin L nimmt in diesem Fall Einfluss auf die Regulation der Zellzyklusprogression. Cysteinproteasen werden damit nicht nur für die terminale Proteindegradation in den Lysosomen verantwortlich gemacht, sondern können auch in anderen Kompartimenten (gewebe- und zellspezifisch), abhängig von ihrer physiologischen Funktion, eine Rolle spielen [168]. In diesem Fall wäre eine Funktion von Cathepsin X mit RPLP0 in der Kontrolle der Zellzyklusprogression vorstellbar. Diese Hypothese wird durch die Wirkungsweise der ribosomalen Proteine auf den Zellzyklus in Magenkarzinomzellen bestätigt. Das ribosomale Protein S13 fördert durch die Herunterregulierung von p27^{Kip} das Wachstum in Magenkarzinomzellen [162]. Der *Knockdown* von RPL6 führt zu einer Supprimierung der Transition von der G1- in die S-Phase in Magenkarzinomzellen [92].

Eine potentielle interaktive Rolle von Cathepsin X und RPLP0 in der Zellzyklusprogression von Magenkarzinomzellen wurde in weiteren funktionellen Tests analysiert.

4.3.6 Einfluss von RPLP0 und Cathepsin X auf den Zellzyklus

Der Zellzyklus wird in zwei Phasen unterteilt, die Interphase, zur Vorbeitung auf die Mitose, und die Mitose (kennzeichnend für die Kernteilung). Die Mitose beinhaltet die Prophase, die Metaphase, die Anaphase und die Telophase, während die Interphase aus den G1-, S- und G2-Phasen besteht [169]. In der S-Phase findet die Replikation der DNA statt. Sie wird flankiert durch die so genannten Kontrollpunkte G1 und G2. Diese bereiten die Zellen sowohl auf die DNA-Synthese (G1) als auch auf die Mitose vor (G2). Zusammenfassend besteht ein normaler Zellzyklus aus der G1-, S-, G2- und der M-Phase [170] (Abbildung 40). In der Zwischenphase G0, einer so genannten Ruhephase, können die Zellen verweilen, bevor sie weiter im Zyklus Richtung S-Phase (DNA Replikation) wandern. Diese Phase wird durch apoptotische und nicht-proliferierende Zellen charakterisiert [170].

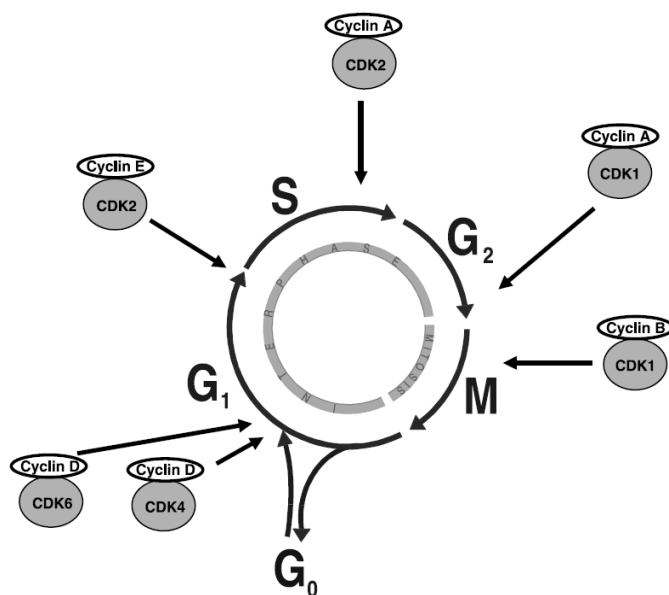


Abbildung 40: Die Phasen des Zellzyklus [170].

Für RPLP0 konnte nach der Behandlung mit einer RPLP0-spezifischen siRNA ein G₁-Arrest gezeigt werden. Die Zellzahl nahm in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus nach siRNA-Behandlung über 24 h, 48 h und 72 h zu, während immer weniger Zellen den Eintritt in die S-Phase vollzogen.

RPLP0 ist somit für eine verstärkte Proliferation innerhalb der Magenkarzinomzelllinie N87 verantwortlich. In der Literatur wurde diese Tatsache ebenfalls für andere ribosomale Proteine beschrieben. Die Herunterregulierung von RPL6 unterdrückt das Zellwachstum und die Zellzyklusprogression in den Magenkarzinomzelllinien SGC7901 und AGS [92]. Gleichzeitig findet eine Herunterregulierung von Cyclin E statt [92]. Für ein verstärktes Magenkarzinomwachstum ist auch das ribosomale Protein S13 verantwortlich [162]. Das Fehlen von S13 sorgt für einen G₁-Arrest in Magenkarzinomzellen und ist außerdem in der Lage, die Expression von p27^{Kip}, einem CDK-Inhibitor, herunterzuregulieren [162]. Ein weiteres ribosomales Protein, das die Zellproliferation im Magenkarzinom fördert, ist RPL15 [91].

Für den *Knockdown* von Cathepsin X in N87-Zellen konnte gleichfalls ein leichter G₁-Arrest nachgewiesen werden. Dieser geht mit einer verstärkten Apoptose in der SubG₁-Phase nach 48 h und 72 h siRNA-Behandlung einher. Die zunehmende Apoptose könnte auf der zeitmäßig langen Kultivierung der Zellen beruhen. Ein p53-unabhängiger G₁-Arrest ist fest mit der Apoptose verbunden [171] und könnte ebenso ein möglicher Grund für den starken

Anstieg der Apoptose nach 72 h sein. Ob ein p53-abhängiger oder -unabhängiger Arrest vorliegt, müsste in weiterführenden Experimenten überprüft werden.

Ursache für den verminderten Zellzyklusarrest bei einer Cathepsin X-Defizienz könnte eine zelluläre Seneszenz sein. Kraus *et al.* zeigten eine beschleunigte Seneszenz und eine verminderte Proliferation und Migration an primären Fibroblasten, bei denen eine Cathepsin X-Defizienz vorlag [61]. Neben zellmorphologischen Veränderungen kann eine verstärkte Expression von Seneszenz-assoziierten Genen, wie p53, p21 und p16, zur Induktion von seneszenten Signalwegen führen, die teilweise in einen Zellzyklusarrest münden. Eine weitere Erklärung für die Zunahme der Apoptose liefern Nogueira *et al.* und Weinmann *et al.* [172; 173]. So wiesen seneszente Zellen eine veränderte Anfälligkeit für die Induzierung von Apoptose auf und konnten diese sogar fördern [172; 173]. Eine verminderte Tumorzellproliferation wurde nach dem *Knockdown* der Cathepsine B und L nachgewiesen [18].

Nachdem die Effekte der Herunterregulierung von RPLP0 und Cathepsin X einzeln analysiert wurden, erfolgte der *Knockdown* beider Proteine gleichzeitig. Die zuvor auftretenden G1-Arreste konnten in diesem Fall nicht beobachtet werden. Es kam nach der siRNA-Behandlung zu einer verstärkten Apoptose in der SubG1-Phase nach 48 h und 72 h. Diese ging einher mit einer verstärkten Abnahme der Zellen in den G0/G1-, S- und G2/M-Phasen. Die schon in den Cathepsin X-defizienten Zellen stattfindende Apoptose findet im *Knockdown* beider Proteine ihren Höhepunkt. Offenbar sind die sich im G1-Arrest befindenden Zellen, ausgelöst durch die RPLP0 siRNA-Behandlung, sensitiver gegenüber der Cathepsin X-induzierten Apoptose [172; 173].

Auch die p53-Expression spielt eine Rolle in der Kommunikation zwischen Apoptose und zellulärer Seneszenz [174]. Eine Reihe von Tumorsuppressorgenen (Rb, p53 und p21) wird in der Literatur während der Seneszenz als heraufreguliert beschrieben [175-177]. Rb formt mit E2F Komplexe, die wiederum einen Wachstumsarrest fördern, indem sie die Aktivierung bestimmter E2F-Gene verhindern [178-180]. Wenn jedoch eine Phosphorylierung von Rb durch CDK/Cyclin-Komplexe erfolgt, resultiert dies in der Freisetzung von E2F. Der damit verbundene Eintritt in die S-Phase sorgt für eine weiterführende Proliferation der Zellen [179]. Die Seneszenz-regulierten Gene Rb, p53 und p21 ermöglichen es, die Zellproliferation zu steuern [177; 181]. Gleichzeitig können Rb und p53 ebenso die Apoptose regulieren [182-184]. Die Balance zwischen Rb und p53 stellt einen interessanten Mechanismus dar, der eventuell auch Auswirkungen in den RPLP0 und Cathepsin X ausgeknockten N87-Karzinomzellen zeigt.

4.3.6.1 Einfluss von RPLP0 und Cathepsin X auf Zellzyklusregulatoren

Die Proteinexpression einzelner Zellzyklusregulatoren nach RPLP0 und Cathepsin X *Knockdown* wurde im Westernblot eingehender betrachtet, um die molekularen Mechanismen der vorangegangenen Ergebnisse im Zellzyklus detaillierter zu untersuchen.

Nach der Herunterregulierung von RPLP0 konnte ein Anstieg von p21, p53 und p27 sowie ein Abfall der Expression von CDK2 beobachtet werden. Cyclin E stieg nach 48 h siRNA-Behandlung ebenfalls leicht an.

Um die Zellen durch die einzelnen Phasen des Zellzyklus zu führen, ist eine Reihe von verschiedensten zellulären Proteinen notwendig. Hierbei spielen Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) eine entscheidende Rolle. Sie werden an unterschiedlichen Punkten des Zellzyklus aktiviert und sind in der Lage, durch Phosphorylierung ausgewählter Zielproteine den Zellzyklus zu steuern. Hierzu gehören CDK4 (G1), CDK6 (G1), CDK2 (G1, S) und CDK1 (G2/M) [185; 186] (Abbildung 40). Während die CDK-Expression gleich bleibend stabil über den Zellzyklus verteilt ist, schwankt die Expression der Cycline phasenweise [187]. Aufgrund ihrer Spezifität agieren die Cycline in unterschiedlichen Phasen des Zyklus. Cyclin E reguliert durch die Bindung an CDK2 die Progression von der G1- in die S-Phase [188].

Während der Expressionsabnahme von CDK2 nach 24 h, 48 h und 72 h siRNA-Behandlung kommt es vermutlich zu keiner bzw. einer geringeren Bindung an Cyclin E. Der CDK/Cyclin-Komplex ist nicht vollständig und verhindert somit den Übergang von der G1- in die S-Phase sowie eine weitere Proliferation.

Die Regulation der CDK-Aktivität findet durch CDK-Inhibitoren (CKI) statt, die entweder CDKs allein oder im Komplex mit Cyclinen binden. Es können zwei Familien von Inhibitoren unterschieden werden: die INK4-Familie und die Cip/Kip-Familie [189]. Die INK4-Familie schließt p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) und p19 (INK4d) ein. Diese Inhibitoren sind in der Lage, die G1 CDKs CDK4 und CDK6 zu inaktivieren. Dabei formen sie stabile Komplexe mit den CDKs und verhindern so die Bindung an die Cycline [190]. Zur Cip/Kip-Familie gehören p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2) und p57 (Kip2). Ihre inhibitorischen Funktionen ergeben sich aus der Inaktivierung der CDK-Cyclin-Komplexe [191; 192], z. B. in der G1-Phase. Des Weiteren folgen externe Signalregulationen, wie die Aktivierung der Expression von p21 über das Tumorsuppressorgen p53 [193]. Die erhöhte Expression von p21 führt zu einer Inhibierung der CDKs und resultiert damit in einem Zellzyklusarrest [194]. Durch die Inhibierung des CDK2/Cyclin E-Komplexes wird die Phosphorylierung des Rb Proteins und damit die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F unterdrückt, so dass eine G1/S-Transition verhindert wird (Abbildung 41) [195].

Die hier gezeigte Expressionssteigerung von p21 stellt einen nachvollziehbaren Mechanismus für die Inhibierung von CDK2 dar. Auf Proteinebene korrelieren die Daten mit dem in den FACS-Analysen gezeigten G1-Arrest nach RPLP0 *Knockdown*. Für nachfolgende Arbeiten müsste geklärt werden, ob es sich um einen p53-abhängigen oder -unabhängigen Mechanismus von p21 handelt. Zusätzlich könnte die Aktivität der CDK2 Kinase überprüft werden.

Zusammenfassend fördert RPLP0 das Wachstum und die Zellzyklusprogression in N87-Magenkarzinomzellen über die Inhibierung von p21 und p53.

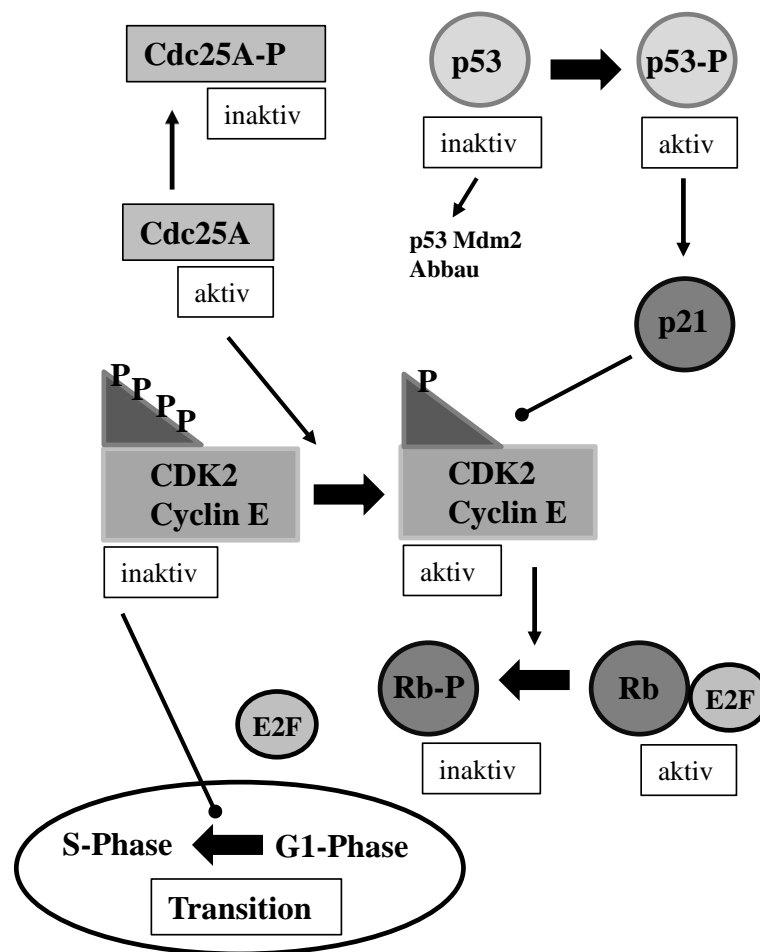


Abbildung 41: Regulation des G1/S-Kontrollpunktes.

P: Phosphor, Rb: Retinoblastom (in Anlehnung an Poehlmann und Roessner, 2010) [196]

Der *Knockdown* von Cathepsin X in N87-Zellen führte zu einem leichten G1-Arrest und einer verstärkten Apoptose nach 72 h. Für die Aufklärung auf zellulärer Ebene wurden dieselben Proteine wie schon zuvor beim RPLP0 *Knockdown* (siehe 4.3.6), näher untersucht. Hierbei

blieb die Expression von Cyclin E annähernd gleich, während die Proteinmenge bei CDK2 minimal zurückging. Nach 24 h zeigten p27 und p53 eine Zunahme der Expression, nach 72 h war eine Abnahme zu verzeichnen. Im Gegensatz zur RPLP0 siRNA nahm der CDK-Inhibitor p21 nach 48 h siRNA-Behandlung stark ab. Es ist somit nicht in der Lage, eine Inaktivierung des CDK2/Cyclin E-Komplexes zu erwirken. Da sich die Proteinexpression von CDK2 kaum und von Cyclin E nicht verändert, könnte auch eine verminderte CDK2 Kinase-Aktivität der Auslöser für den G1-Arrest sein. Diese müsste aber in weiteren Experimenten überprüft werden.

Cdc25A kann ebenso in die Inaktivierung des CDK2/Cyclin E-Komplexes eingreifen. Es ist eine Phosphatase, die aktiviert nicht phosphoryliert und für eine Dephosphorylierung des CDK/Cyclin-Komplexes verantwortlich ist. Der aktive Komplex sorgt für eine G1/S-Transition (Abbildung 41). Wird im Signalweg Cdc25A durch Chk1/2 Phosphorylierung abgebaut, bleibt der CDK2/Cyclin-Komplex hyperphosphoryliert. Es erfolgt ein G1-Arrest [196].

Eine der Methoden, wie p53 einen Zellzyklusarrest auslösen kann, ist die transkriptionell induzierte p21 Expression [197]. Über die Transkription von Mdm2 zeigt sich p53 für ein regulatorisches Feedback und seinen damit verbundenen Abbau verantwortlich (Abbildung 41) [198; 199]. Eine weitere Rolle spielt p53 in der p53-abhängigen Stimulation der Apoptose [200].

Cathepsin X begünstigt somit das Wachstum in N87-Magenkarzinomzellen und stellt ein anti-apoptotisches/protumorales Werkzeug des Magenkarzinoms dar.

Die im RPLP0 und Cathepsin X *Knockdown* aufgezeigten G1-Arreste konnten bei gleichzeitiger Herunterregulierung beider Proteine nicht beobachtet werden. Hier kam es zu einer verstärkten Apoptose der Zellen. Auf Proteinebene äußerte sich dies in einer Abnahme der Expression von p21, CDK2, p27 und p53. Die Expression von Cyclin E blieb wiederholt gleich.

Manche Zelllinien besitzen die Möglichkeit, in Abwesenheit von CDK2 zu proliferieren, während in Glioblastom- und Osteosarcomzellen eine Herunterregulierung bzw. Inhibierung für eine verhinderte Proliferation sorgt [201; 202]. Verschiedene Tumorzellen wiesen offenbar eine selektive Abhängigkeit von CDK2 auf. E-Typ Cycline zeigen eine Überexpression in humanen Tumoren [203]. Dies würde das gleich bleibend starke Signal von Cyclin E erklären.

Üblicherweise würde eine Herunterregulierung von p21 die Proliferation von Zellen unterstützen, da es nicht in der Lage ist, den CDK2/Cyclin E-Komplex zu inhibieren [194].

Aufgrund der Tatsache, dass es in den RPLP0/Cathepsin X-defizienten Zellen zu einer verstärkten Apoptose kommt, wirken hier vermutlich andere molekulare Mechanismen. Diese Schlussfolgerungen treffen ebenso für den Inhibitor p27 zu. Seine verringerte Expression lässt es nicht zu, seine inhibitorische Funktion über die Inaktivierung der CDK/Cyclin-Komplexe auszuüben [191; 192]. In einigen Tumoren wurde eine verringerte Expression von p27, unter anderem auch im Magenkarzinom, mit einer aggressiven Tumorentwicklung und einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht [204-211]. Die der Literatur entnommenen Aussagen konnten mit der vorliegenden Arbeit nicht hinreichend bestätigt werden, da es zu einer verstärkten Apoptose der Magenkarzinomzellen kommt.

Eine der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren, p21, wird nicht nur mit der Kontrolle der Zellzyklusregulation und Seneszenz, sondern auch mit zellulärem Stress und Apoptose in Zusammenhang gebracht [212]. Proapoptotischen Signalmolekülen und zelltod-induzierenden Signalkomplexen kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu [213-215]. So ergibt sich nach der Herunterregulierung von p21 in HepG2-Zellen eine IFN- γ -vermittelten Apoptose [216]. SiRNA-Experimente an Neuroblastomzellen zeigten nach der Suppression von p21 eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Apoptose [217].

Die Herunterregulierung von p21 in N87-Magenkarzinomzellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit könnte zu einer Induktion der Apoptose geführt haben. Aufgrund der Komplexität der Zellzyklusregulierung bedarf es jedoch weiterer Experimente für eine Aufklärung im Cathepsin X/RPLP0 vermittelten *Knockdown*.

5 Zusammenfassung

Cathepsin X (CTSX auch Cathepsin Z/P genannt) ist eine Cysteinprotease, die noch immer eine relativ unbekannt Rolle in Tumoren spielt. CTSX ist in der Lage, an Heparansulphat-Proteoglykane und Integrine zu binden, sodass mögliche Funktionen in der zellulären Adhäsion, der Phagozytose und der Immunantwort vermutet werden. Frühere Studien zeigten eine Assoziation zwischen einer *Helicobacter pylori*-Infektion, der starken Hochregulation von CTSX und der Entwicklung von Magenkarzinomen.

In dieser Arbeit wurden mithilfe des *Yeast Two-Hybrid* Systems neue Interaktionspartner von CTSX im Magenkarzinom identifiziert. Aus diesem System wurden letztlich zwei Proteine für die weitere Charakterisierung der Interaktion mit CTSX ausgewählt. Humanes Galectin-2 (LGALS2) ist ein lösliches Kohlenhydrat-(Lectin)-bindendes Protein. Der zweite Interaktionspartner RPLP0 lässt sich in die Gruppe der ribosomalen Proteine einordnen. Um die identifizierten Interaktionen mit CTSX zu verifizieren, wurden Co-Immunopräzipitations- und Ko-Lokalisationsstudien in Karzinomzelllinien (N87 und HepG2) und im Magenkarzinomgewebe durchgeführt. Für beide Proteine konnte eine Interaktion mit CTSX bestätigt werden. Immunfluoreszenzchemische Analysen für LGALS2 und RPLP0 wiesen eine Ko-Lokalisation mit CTSX im Zytoplasma von Entzündungs- bzw. Epithelzellen nach.

Funktionelle Analysen der Interaktion wurden in CTSX-defizienten humanen Karzinomzellen getestet und anschließend immunhistochemisch untersucht. Eine CTSX-Abnahme ging mit einer signifikant erhöhten LGALS2-Expression einher, die eine inverse Regulation zwischen CTSX und LGALS2 beschreibt. Die Expression von RPLP0 zeigte sich dahingehend unabhängig vom CTSX *Knockdown*. Immunhistochemische Analysen wiesen eine Kerntranslokation von RPLP0 und CTSX nach 48 h siRNA-Behandlung nach, das wiederum für LGALS2 nicht zutraf.

Da ribosomale Proteine nicht nur an der Proteinsynthese, sondern auch an anderen Prozessen, wie der DNA-Reparatur, der Zellentwicklung und dem Zellzyklus beteiligt sind, wurde das Verhalten von RPLP0 nach einem RPLP0 *Knockdown* im Zellzyklus näher untersucht. Nach 48 h siRNA-Behandlung, basierend auf einem Anstieg der Proteinexpression von p21 und p53 und einer Abnahme von CDK2, konnte ein G1-Arrest nachgewiesen werden. RPLP0 fördert somit die Proliferation innerhalb der Magenkarzinomzelllinie N87. Für den sich anschließenden CTSX *Knockdown* wurde ebenfalls ein leichter G1-Arrest gezeigt, der einherging mit einer verstärkten Apoptose und der Abnahme bzw. dem teilweisen Verlust der Expression von p21, p53 und CDK2. CTSX wirkt demnach anti-apoptotisch auf

Magenkarzinomzellen. Dieser Effekt potenziert sich in der Kombination beider Moleküle, wobei CTSX für die ablaufenden molekularen Mechanismen ausschlaggebend ist.

Die Interaktion von CTSX und RPLP0 resultiert in einer Dysregulation von apoptotischen Signalwegen und könnte somit einen integralen Bestandteil der Tumorprogression im Magenkarzinom darstellen.

Abstract

Cathepsin X (CTSX, also cathepsin Z/P) is a cysteine proteinase that still plays an unknown role in tumor formation. CTSX can link to heparan sulphate proteoglycan and integrins, indicating possible functions in cellular adhesion, phagocytosis and immune response. Previous studies have established an association of a *Helicobacter pylori* infection with the huge upregulation of CTSX and the development of gastric carcinoma.

Using the Yeast Two-Hybrid system, new interaction partners of CTSX have been discovered in the gastric carcinoma. To further characterization the interaction with CTSX, two proteins are chosen at least from this system. Human Galectin-2 (LGALS2) is a soluble carbohydrate (lectin) binding protein. The second interaction partner RPLP0 can be classified into the group of ribosomal proteins. To verify the identified interactions with CTSX, immunoprecipitation and colocalization were carried out in cell lines N87 and HepG2 and tissue of gastric carcinoma. The study confirms an interaction with CTSX for both proteins. An immunofluorescent analysis of LGALS2 and RPLP0 verified a colocalization with CTSX in the cytoplasm of inflammatory and epithelial cells.

Functional analyses of the interaction were used in CTSX-deficient human carcinoma cells, and were immunohistochemically examined afterwards. A decrease in CTSX was associated with a significantly increased LGALS2 expression, characterizing an inverse regulation between CTSX and LGALS2. Consequently, the RPLP0 expression is independent of the CTSX knockdown. Immunohistochemical analyses demonstrated a nuclear translocation of RPLP0 and CTSX after 48 h siRNA treatment which, in turn, did not apply to LGALS2.

Since ribosomal proteins are involved in protein synthesis and other processes, such as DNA repair, cell development and cell cycle, we examined in detail the behavior of RPLP0 after its knockdown in the cell cycle. After 48 h, siRNA treatments revealed G0/G1 arrest, possibly based on an increase in the protein expression of p21 and p53, and a decrease in CDK2. Therefore, RPLP0 promotes the proliferation within the gastric carcinoma cell line N87. In the subsequent CTSX knockdown, a moderate G0/G1 arrest was also shown to be associated with enhanced apoptosis and a decrease or partial loss of the expression of p21, p53 and CDK2. CTSX thus has an anti-apoptotic effect on gastric carcinoma cells. Combining both molecules, this effect clearly shows that CTSX is decisive for the ongoing molecular mechanisms. The interaction of CTSX and RPLP0 results in a dysregulation of apoptotic signaling pathways and could, therefore, become an integral part in the tumor progression of gastric carcinoma.

6 Literaturverzeichnis

- [1] R.Willstaetter, E.Bamann, Über die Proteasen der Magenschleimhaut Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 180, (1929) 127-143.
- [2] J.W.Coffey, D.C.De, Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes J.Biol.Chem. 243, (1968) 3255-3263.
- [3] A.J.Barrett, N.D.Rawlings, E.A.O'Brien, The MEROPS database as a protease information system J.Struct.Biol. 134, (2001) 95-102.
- [4] N.D.Rawlings, D.P.Tolle, A.J.Barrett, Evolutionary families of peptidase inhibitors Biochemical Journal 378, (2004) 705-716.
- [5] J.Kos, Z.Jevnikar, N.Obermajer, The role of cathepsin X in cell signaling Cell Adhesion & Migration 3, (2009) 164-166.
- [6] V.Turk, B.Turk, D.Turk, Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities Embo Journal 20, (2001) 4629-4633.
- [7] V.Stoka, B.Turk, V.Turk, Lysosomal cysteine proteases: Structural features and their role in apoptosis Iubmb Life 57, (2005) 347-353.
- [8] M.E.McGrath, The lysosomal cysteine proteases Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct. 28, (1999) 181-204.
- [9] H.Kirschke, A.J.Barrett, N.D.Rawlings, Proteinases .1. Lysosomal cysteine proteinases Protein Profile 2, (1995) 1587-1643.
- [10] A.H.Erickson, Biosynthesis of lysosomal endopeptidases J.Cell Biochem. 40, (1989) 31-41.
- [11] A.J.Barrett, H.Kirschke, Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L Methods Enzymol. 80 Pt C, (1981) 535-561.
- [12] I.Klemencic, A.K.Carmona, M.H.S.Cezari, M.A.Juliano, L.Juliano, G.Guncar, D.Turk, I.Krizaj, V.Turk, B.Turk, Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase European Journal of Biochemistry 267, (2000) 5404-5412.
- [13] M.R.Buck, D.G.Karustis, N.A.Day, K.V.Honn, B.F.Sloane, Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues Biochem.J. 282 (Pt 1), (1992) 273-278.
- [14] K.Ishidoh, E.Kominami, Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro Biochemical and Biophysical Research Communications 217, (1995) 624-631.
- [15] J.X.Mai, M.Sameni, T.Mikkelsen, B.F.Sloane, Degradation of extracellular matrix protein tenascin-C by cathepsin B: An interaction involved in the progression of gliomas Biological Chemistry 383, (2002) 1407-1413.

-
- [16] V.Gocheva, W.Zeng, D.X.Ke, D.Klimstra, T.Reinheckel, C.Peters, D.Hanahan, J.A.Joyce, Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis *Genes & Development* 20, (2006) 543-556.
- [17] M.Guo, P.A.Mathieu, B.Linebaugh, B.F.Sloane, J.J.Reiners, Phorbol ester activation of a proteolytic cascade capable of activating latent transforming growth factor-beta - A process initiated by the exocytosis of cathepsin B *Journal of Biological Chemistry* 277, (2002) 14829-14837.
- [18] V.Gocheva, J.A.Joyce, Cysteine Cathepsins and the cutting edge of cancer invasion *Cell Cycle* 6, (2007) 60-64.
- [19] A.J.Barret, N.D.Rawlings, J.F.Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press London, 1998
- [20] H.A.Chapman, R.J.Riese, G.P.Shi, Emerging roles for cysteine proteases in human biology *Annual Review of Physiology* 59, (1997) 63-88.
- [21] G.P.Shi, R.A.R.Bryant, R.Riese, S.Verhelst, C.Driessen, Z.Q.Li, D.Bromme, H.L.Ploegh, H.A.Chapman, Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages *Journal of Experimental Medicine* 191, (2000) 1177-1185.
- [22] C.Linnevers, S.P.Smeekens, D.Bromme, Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8(+) T-lymphocytes *Febs Letters* 405, (1997) 253-259.
- [23] D.Bromme, Z.Q.Li, M.Barnes, E.Mehler, Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization *Biochemistry* 38, (1999) 2377-2385.
- [24] C.Jedeszko, B.F.Sloane, Cysteine cathepsins in human cancer *Biological Chemistry* 385, (2004) 1017-1027.
- [25] B.D.Gelb, G.P.Shi, H.A.Chapman, R.J.Desnick, Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency *Science* 273, (1996) 1236-1238.
- [26] L.M.Allende, M.A.Garcia-Perez, A.Moreno, A.Corell, M.Carasol, P.Martinez-Canut, A.rnaiz-Villena, Cathepsin C gene: First compound heterozygous patient with Papillon-Lefevre syndrome and a novel symptomless mutation *Hum.Mutat.* 17, (2001) 152-153.
- [27] A.Trabandt, U.Mullerladner, J.Kriegsmann, R.E.Gay, S.Gay, Expression of Proteolytic Cathepsin-B, Cathepsin-D, and Cathepsin-I in Periodontal Gingival Fibroblasts and Tissues *Laboratory Investigation* 73, (1995) 205-212.
- [28] U.Mullerladner, R.E.Gay, S.Gay, Cysteine proteinases in arthritis and inflammation *Perspectives in Drug Discovery and Design* 6, (1996) 87-98.
- [29] C.Tepel, D.Bromme, V.Herzog, K.Brix, Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin *Journal of Cell Science* 113, (2000) 4487-4498.

-
- [30] U.Felbor, L.Dreier, R.A.R.Bryant, H.L.Ploegh, B.R.Olsen, W.Mothes, Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII *Embo Journal* 19, (2000) 1187-1194.
- [31] I.Podgorski, B.F.Sloane, Cathepsin B and its role(s) in cancer progression *Proteases and the Regulation of Biological Processes* 70, (2003) 263-276.
- [32] S.Roshy, B.F.Sloane, K.Moin, Pericellular cathepsin B and malignant progression *Cancer and Metastasis Reviews* 22, (2003) 271-286.
- [33] B.F.Sloane, S.Q.Yan, I.Podgorski, B.E.Linebaugh, M.L.Chen, J.X.Mai, D.Cavallo-Medved, M.Sameni, J.Dosescu, K.Moin, Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment *Seminars in Cancer Biology* 15, (2005) 149-157.
- [34] A.R.Poole, K.J.Tiltman, A.D.Recklies, T.A.Stoker, Differences in secretion of the proteinase cathepsin B at the edges of human breast carcinomas and fibroadenomas *Nature* 273, (1978) 545-547.
- [35] S.Kruger, C.Haackel, F.Buehling, A.Roessner, Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line *Cancer Research* 59, (1999) 6010-6014.
- [36] S.Mohanam, S.L.Jasti, S.R.Kondraganti, N.Chandrasekar, S.S.Lakka, Y.Kin, G.N.Fuller, A.W.K.Yung, A.P.Kyritsis, D.H.Dinh, W.C.Olivero, M.Gujrati, F.Ali-Osman, J.S.Rao, Down-regulation of cathepsin B expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells *Oncogene* 20, (2001) 3665-3673.
- [37] S.Krueger, U.Kellner, F.Buehling, A.Roessner, Cathepsin L antisense oligonucleotides in a human osteosarcoma cell line: Effects on the invasive phenotype *Cancer Gene Therapy* 8, (2001) 522-528.
- [38] M.M.Mohamed, B.F.Sloane, Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer *Nature Reviews Cancer* 6, (2006) 764-775.
- [39] S.Krueger, T.Kalinski, T.Hundertmark, T.Wex, D.Kuster, U.Peitz, M.Ebert, D.K.Nagler, U.Kellner, P.Malfertheiner, M.Naumann, C.Rocken, A.Roessner, Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer *Journal of Pathology* 207, (2005) 32-42.
- [40] D.K.Nagler, S.Krueger, A.Kellner, E.Ziomek, R.Menard, P.Buhtz, M.Krams, A.Roessner, U.Kellner, Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia *Prostate* 60, (2004) 109-119.
- [41] D.K.Nagler, R.Menard, Human cathepsin X: A novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions *Febs Letters* 434, (1998) 135-139.
- [42] I.Santamaria, G.Velasco, A.M.Pendas, A.Fueyo, C.Lopez-Otin, Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location *Journal of Biological Chemistry* 273, (1998) 16816-16823.

-
- [43] G.Guncar, I.Klemencic, B.Turk, V.Turk, A.Karaoglanovic-Carmona, L.Juliano, D.Turk, Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease *Structure with Folding & Design* 8, (2000) 305-313.
- [44] J.Sivaraman, D.K.Nagler, R.L.Zhang, R.Menard, M.Cygler, Crystal structure of human procathepsin X: A cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine *Journal of Molecular Biology* 295, (2000) 939-951.
- [45] D.K.Nagler, R.L.Zhang, W.Tam, T.Sulea, E.O.Purissima, R.Menard, Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity *Biochemistry* 38, (1999) 12648-12654.
- [46] N.Obermajer, A.Premzl, T.Z.Bergant, B.Turk, J.Kos, Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta(2)-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells *Experimental Cell Research* 312, (2006) 2515-2527.
- [47] A.M.Lechner, I.ssfalg-Machleidt, S.Zahler, M.Stoeckelhuber, W.Machleidt, M.Jochum, D.K.Nagler, RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin alpha(v)beta(3) mediates cell-adhesive properties *Journal of Biological Chemistry* 281, (2006) 39588-39597.
- [48] J.Kos, A.Sekirnik, A.Premzl, V.Z.Bergant, T.Langerholc, B.Turk, B.Werle, R.Golouh, U.Repnik, M.Jeras, V.Turk, Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues *Experimental Cell Research* 306, (2005) 103-113.
- [49] N.Obermajer, A.Premzl, T.Z.Bergant, B.Turk, J.Kos, Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta(2)-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells *Experimental Cell Research* 312, (2006) 2515-2527.
- [50] N.Obermajer, A.Premzl, T.Z.Bergant, B.Turk, J.Kos, Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta(2)-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells *Experimental Cell Research* 312, (2006) 2515-2527.
- [51] Z.Jevnikar, N.Obermajer, B.Doljak, S.Turk, S.Gobec, U.Svajger, S.Hailfinger, M.Thome, J.Kos, Cathepsin X cleavage of the beta(2) integrin regulates talin-binding and LFA-1 affinity in T cells *Journal of Leukocyte Biology* 90, (2011) 99-109.
- [52] Z.Jevnikar, N.Obermajer, M.Bogyo, J.Kos, The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes *Journal of Cell Science* 121, (2008) 2652-2661.
- [53] F.D.Nascimento, C.C.A.Rizzi, I.L.Nantes, L.Stefe, B.Turk, A.K.Carmona, H.B.Nader, L.Juliano, I.L.S.Tersariol, Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans *Archives of Biochemistry and Biophysics* 436, (2005) 323-332.
- [54] N.Obermajer, U.Repnik, Z.Jevnikar, B.Turk, M.Kreft, J.Kos, Cysteine protease cathepsin X modulates immune response via activation of beta(2) integrins *Immunology* 124, (2008) 76-88.

-
- [55] C.M.Costa-Neto, P.Ilenburg-Pilla, T.A.Heinrich, Parreiras-e-Silva LT, M.G.Pereira, R.I.Reis, P.P.Souza, Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies *Int.Immunopharmacol.* 8, (2008) 135-142.
- [56] A.H.Schmaier, K.R.McCrae, The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation *J.Thromb.Haemost.* 5, (2007) 2323-2329.
- [57] D.K.Nagler, S.Kraus, J.Feierler, R.Mentele, F.Lottspeich, M.Jochum, A.Faussner, A cysteine-type carboxypeptidase, cathepsin X, generates peptide receptor agonists *International Immunopharmacology* 10, (2010) 134-139.
- [58] N.D.Staudt, W.K.Aicher, H.Kalbacher, S.Stevanovic, A.K.Carmona, M.Bogyo, G.Klein, Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts *Haematologica-the Hematology Journal* 95, (2010) 1452-1460.
- [59] C.Appenzeller, H.Andersson, F.Kappeler, H.P.Hauri, The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins *Nature Cell Biology* 1, (1999) 330-334.
- [60] B.Nyfelner, H.P.Hauri, Visualization of protein interactions inside the secretory pathway *Biochemical Society Transactions* 35, (2007) 970-973.
- [61] S.Kraus, T.Bunsen, S.Schuster, M.A.Cichon, M.Tacke, T.Reinheckel, C.P.Sommerhoff, M.Jochum, D.K.Nagler, Cellular senescence induced by cathepsin X downregulation *European Journal of Cell Biology* 90, (2011) 678-686.
- [62] C.T.K.H.Stadtlander, J.W.Waterbor, Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer *Carcinogenesis* 20, (1999) 2195-2207.
- [63] S.I.Meireles, E.B.Cristo, A.F.Carvalho, R.Hirata, A.Pelosof, L.I.Gomes, W.K.Martins, M.D.Begnami, C.Zitron, A.L.Montagnini, F.A.Souares, E.J.Neves, L.F.L.Reis, Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa *Cancer Research* 64, (2004) 1255-1265.
- [64] P.Correa, V.W.Chen, Gastric cancer *Cancer Surv.* 19-20, (1994) 55-76.
- [65] R.M.Peek, M.J.Blaser, *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas *Nature Reviews Cancer* 2, (2002) 28-37.
- [66] S.Suerbaum, P.Michetti, *Helicobacter pylori* infection *N.Engl.J.Med.* 347, (2002) 1175-1186.
- [67] Y.Yamaoka, M.Kita, T.Kodama, N.Sawai, K.Kashima, J.Imanishi, Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains *Gut* 41, (1997) 442-451.
- [68] J.E.Crabtree, J.I.Wyatt, L.K.Trejdosiewicz, P.Peichl, P.H.Nichols, N.Ramsay, J.N.Primrose, I.J.D.Lindley, Interleukin-8 Expression in *Helicobacter-Pylori* Infected, Normal, and Neoplastic Gastroduodenal Mucosa *Journal of Clinical Pathology* 47, (1994) 61-66.

-
- [69] S.Krueger, T.Hundertmark, T.Kalinski, U.Peitz, T.Wex, P.Malfertheiner, M.Naumann, A.Roessner, Helicobacter pylori encoding the pathogenicity island activates matrix metalloproteinase 1 in gastric epithelial cells via JNK and ERK *Journal of Biological Chemistry* 281, (2006) 2868-2875.
- [70] S.Krueger, T.Kalinski, T.Hundertmark, T.Wex, D.Kuster, U.Peitz, M.Ebert, D.K.Nagler, U.Kellner, P.Malfertheiner, M.Naumann, C.Rocken, A.Roessner, Up-regulation of cathepsin X in Helicobacter pylori gastritis and gastric cancer *Journal of Pathology* 207, (2005) 32-42.
- [71] F.Buhling, U.Peitz, S.Krueger, D.Kuster, M.Vieth, I.Gebert, A.Roessner, E.Weber, P.Malfertheiner, T.Wex, Cathepsins K, L, B, X and W are differentially expressed in normal and chronically inflamed gastric mucosa *Biological Chemistry* 385, (2004) 439-445.
- [72] S.Krueger, D.Kuester, A.Bernhardt, T.Wex, A.Roessner, Regulation of cathepsin X overexpression in H-pylori-infected gastric epithelial cells and macrophages *Journal of Pathology* 217, (2009) 581-588.
- [73] B.Alberts, J.Johnson, M.Lewis, M.Raff, K.Roberts, P.Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, Garland Science, 2002
- [74] H.Lodish, A.Berk, L.Zirpusky, P.Matsudaira, D.Baltimore, J.Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4 th ed., W.H. Freeman, New York, 2000
- [75] P.Uetz, E.Pohl, *Protein-Protein und Protein-DNA-Interaktionen Molecular Biotechnology*(2004).
- [76] E.Golemis, P.D.Adams, *Protein-protein interactions; A molecular cloning manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005
- [77] E.M.Phizicky, S.Fields, *Protein-protein interactions: methods for detection and analysis Microbiol.Rev.* 59, (1995) 94-123.
- [78] C.T.Chien, P.L.Bartel, R.Sternglanz, S.Fields, The two-hybrid system:a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest *PNAS* 88, (991) 9578-9582.
- [79] S.Fields, O.Song, A novel genetic system to detect protein-protein interactions *Nature* 340, (1989) 245-246.
- [80] C.V.Dang, J.Barrett, M.Villa-Garcia, L.M.Resar, G.J.Kato, E.R.Fearon, Intracellular leucine zipper interactions suggest c-Myc hetero-oligomerization *Mol.Cell Biol.* 11, (1991) 954-962.
- [81] J.Luban, S.P.Goff, The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions *Curr.Opin.Biotechnol.* 6, (1995) 59-64.
- [82] S.Fields, *The Two-Hybrid System to Detect Protein-Protein Interactions Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 5, (1993) 116-124.
- [83] B.Li, S.Fields, *FASEB* 7, (1993) 957-963.

-
- [84] C.Bendixen, S.Gangloff, R.Rothstein, A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions *Nucleic Acids Res.* 22, (1994) 1778-1779.
- [85] R.L.Finley, Jr., R.Brent, Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, (1994) 12980-12984.
- [86] P.Malfertheiner, *Helicobacter pylori- Von der Grundlage zur Therapie*, Thieme, 2000
- [87] D.T.Grabowski, W.A.Deutsch, D.Derda, M.R.Kelley, *Drosophila* AP3, a presumptive DNA repair protein, is homologous to human ribosomal associated protein P0 *Nucleic Acids Res.* 19, (1991) 4297.
- [88] A.Jin, K.Itahana, K.O'Keefe, Y.Zhang, Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23 *Molecular and Cellular Biology* 24, (2004) 7669-7680.
- [89] M.A.Terkawi, H.L.Jia, J.L.Zhou, E.G.Lee, I.Igarashi, K.Fujisaki, Y.Nishikawa, X.N.Xuan, *Babesia gibsoni* ribosomal phosphoprotein P0 induces cross-protective immunity against B-microti infection in mice *Vaccine* 25, (2007) 2027-2035.
- [90] I.G.Wool, Extraribosomal functions of ribosomal proteins *Trends in Biochemical Sciences* 21, (1996) 164-165.
- [91] H.Wang, L.N.Zhao, K.Z.Li, R.Ling, X.J.Li, L.Wang, Overexpression of ribosomal protein L15 is associated with cell proliferation in gastric cancer *Bmc Cancer* 6, (2006).
- [92] Q.Wu, Y.W.Gou, Q.M.Wang, H.F.Jin, L.N.Cui, Y.G.Zhang, L.J.He, J.B.Wang, Y.Z.Nie, Y.Q.Shi, D.M.Fan, Downregulation of RPL6 by siRNA Inhibits Proliferation and Cell Cycle Progression of Human Gastric Cancer Cell Lines *Plos One* 6, (2011).
- [93] A.E.Bartman, M.P.Buisine, J.P.Aubert, G.A.Niehans, N.W.Toribara, Y.S.Kim, E.J.Kelly, J.E.Crabtree, S.B.Ho, The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues *Journal of Pathology* 186, (1998) 398-405.
- [94] J.C.Byrd, R.S.Bresalier, Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer *Cancer and Metastasis Reviews* 23, (2004) 77-99.
- [95] J.Pinto-de-Sousa, C.A.Reis, L.David, A.Pimenta, M.Cardoso-de-Oliveira, MUC5B expression in gastric carcinoma: relationship with clinico-pathological parameters and with expression of mucins MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 *Virchows Archiv* 444, (2004) 224-230.
- [96] A.Magalhaes, C.A.Reis, *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells is mediated by glycan receptors *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 43, (2010) 611-618.
- [97] D.W.Kufe, Mucins in cancer: function, prognosis and therapy *Nature Reviews Cancer* 9, (2009) 874-885.

-
- [98] P.J.Cozzi, J.Wang, W.Delprado, A.C.Perkins, B.J.Allen, P.J.Russell, Y.Li, Muc1, Muc2, Muc4, Muc5Ac and Muc6 Expression in the Progression of Prostate Cancer *Clinical & Experimental Metastasis* 22, (2005) 565-573.
- [99] S.D.Babu, V.Jayanthi, N.Devaraj, C.A.Reis, H.Devaraj, Expression profile of mucins (MUC2, MUC5AC and MUC6) in Helicobacter pylori infected pre-neoplastic and neoplastic human gastric epithelium *Molecular Cancer* 5, (2006).
- [100] A.Hamamoto, Y.Abe, M.Nishi, S.Fujimori, Y.Ohnishi, H.Yamazaki, Y.Oida, N.Miyazaki, K.I.Inada, Y.Ueyama, M.Iwasaki, H.Inoue, M.Nakamura, Aberrant expression of the gastric mucin MUC6 in human pulmonary adenocarcinoma xenografts *International Journal of Oncology* 26, (2005) 891-896.
- [101] S.B.Ho, K.Takamura, R.Anway, L.L.Shekels, N.W.Toribara, H.Ota, The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins *Digestive Diseases and Sciences* 49, (2004) 1598-1606.
- [102] H.C.Zheng, H.Takahashi, T.Nakajima, Y.Murai, Z.G.Cui, K.Nomoto, K.Tsuneyama, Y.Takano, MUC6 down-regulation correlates with gastric carcinoma progression and a poor prognosis: an immunohistochemical study with tissue microarrays *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 132, (2006) 817-823.
- [103] J.Pinto-de-Sousa, L.David, C.A.Reis, R.Gomes, L.Silva, A.Pimenta, Mucins MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 expression in the evaluation of differentiation and clinico-biological behaviour of gastric carcinoma *Virchows Archiv* 440, (2002) 304-310.
- [104] A.Marchler-Bauer, S.Lu, J.B.Anderson, F.Chitsaz, M.K.Derbyshire, C.Weese-Scott, J.H.Fong, L.Y.Geer, R.C.Geer, N.R.Gonzales, M.Gwadz, D.I.Hurwitz, J.D.Jackson, Z.Ke, C.J.Lanczycki, F.Lu, G.H.Marchler, M.Mullokandov, M.V.Omelchenko, C.L.Robertson, J.S.Song, N.Thanki, R.A.Yamashita, D.Zhang, N.Zhang, C.Zheng, S.H.Bryant, CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins *Nucleic Acids Res.* 39, (2011) D225-D229.
- [105] J.G.Pierce, T.F.Parsons, Glycoprotein hormones: structure and function *Annu.Rev.Biochem.* 50, (1981) 465-495.
- [106] H.A.Stockell, A.G.Renwick, Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components *Biochem.J.* 287 (Pt 3), (1992) 665-679.
- [107] P.D.Sun, D.R.Davies, The cystine-knot growth-factor superfamily *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 24, (1995) 269-291.
- [108] M.T.Elola, C.Wolfenstein-Todel, M.F.Troncoso, G.R.Vasta, G.A.Rabinovich, Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, (2007) 1679-1700.

-
- [109] G.R.Vasta, H.Ahmed, E.W.Odom, Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates *Current Opinion in Structural Biology* 14, (2004) 617-630.
- [110] G.A.Rabinovich, F.T.Liu, M.Hirashima, A.Anderson, An emerging role for galectins in tuning the immune response: Lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer *Scandinavian Journal of Immunology* 66, (2007) 143-158.
- [111] M.Hirashima, Ecalectin/galectin-9, a novel eosinophil chemoattractant: Its function and production *International Archives of Allergy and Immunology* 122, (2000) 6-9.
- [112] M.T.Elola, M.E.Chiesa, A.F.Alberti, J.Mordoh, N.E.Fink, Galectin-1 receptors in different cell types *Journal of Biomedical Science* 12, (2005) 13-29.
- [113] S.Nakahara, N.Oka, A.Raz, On the role of galectin-3 in cancer apoptosis *Apoptosis* 10, (2005) 267-275.
- [114] H.J.Allen, D.Sucato, B.Woynarowska, S.Gottstine, A.Sharma, R.J.Bernacki, Role of galaptin in ovarian carcinoma adhesion to extracellular matrix in vitro *J.Cell Biochem.* 43, (1990) 43-57.
- [115] N.K.Mahanthappa, D.N.W.Cooper, S.H.Barondes, G.A.Schwartz, Rat Olfactory Neurons Can Utilize the Endogenous Lectin, L-14, in A Novel Adhesion Mechanism *Development* 120, (1994) 1373-1384.
- [116] F.A.Vandenbrule, C.Buicu, M.Baldet, M.E.Sobel, D.N.W.Cooper, P.Marschal, V.Castronovo, Galectin-1 Modulates Human-Melanoma Cell-Adhesion to Laminin *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209, (1995) 760-767.
- [117] D.N.W.Cooper, S.H.Barondes, God must love galectins; He made so many of them *Glycobiology* 9, (1999) 979-984.
- [118] P.Bornstein, E.H.Sage, Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function *Current Opinion in Cell Biology* 14, (2002) 608-616.
- [119] J.E.Murphy-Ullrich, The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *Journal of Clinical Investigation* 107, (2001) 785-790.
- [120] F.T.Liu, R.J.Patterson, J.L.Wang, Intracellular functions of galectins *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1572, (2002) 263-273.
- [121] G.A.Rabinovich, L.G.Baum, N.Tinari, R.Paganelli, C.Natoli, F.T.Liu, S.Iacobelli, Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends in Immunology* 23, (2002) 313-320.
- [122] G.A.Rabinovich, M.M.Iglesias, N.M.Modesti, L.F.Castagna, C.Wolfenstein-Todel, C.M.Riera, C.E.Sotomayor, Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: Biochemical and functional characterization *Journal of Immunology* 160, (1998) 4831-4840.

-
- [123] E.Zuniga, G.A.Rabinovich, M.M.Iglesias, A.Gruppi, Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis *Journal of Leukocyte Biology* 70, (2001) 73-79.
- [124] C.Blaser, M.Kaufmann, C.Muller, C.Zimmermann, V.Wells, L.Mallucci, H.Pircher, Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells *Eur.J.Immunol.* 28, (1998) 2311-2319.
- [125] F.Bernerd, A.Sarasin, T.Magnaldo, Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, (1999) 11329-11334.
- [126] R.Y.Yang, D.K.Hsu, L.Yu, J.Ni, F.T.Liu, Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily *J.Biol.Chem.* 276, (2001) 20252-20260.
- [127] P.Demetter, N.Nagy, B.Martin, A.Mathieu, P.Dumont, C.Decaestecker, I.Salmon, The galectin family and digestive disease *Journal of Pathology* 215, (2008) 1-12.
- [128] S.E.Baldus, T.K.Zirbes, M.Weingarten, S.Fromm, J.Glossmann, F.G.Hanisch, S.P.Monig, W.Schroder, U.Flucke, J.Thiele, A.H.Holscher, H.P.Dienes, Increased galectin-3 expression in gastric cancer: Correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation *Tumor Biology* 21, (2000) 258-266.
- [129] E.Mizoguchi, A.Mizoguchi, Is the sugar always sweet in intestinal inflammation? *Immunologic Research* 37, (2007) 47-60.
- [130] A.Sturm, M.Lensch, S.Andre, H.Kaltner, B.Wiedenmann, S.Rosewicz, A.U.Dignass, H.J.Gabius, Human galectin-2: Novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation *Journal of Immunology* 173, (2004) 3825-3837.
- [131] N.Bidon-Wagner, J.P.Le Pennec, Human galectin-8 isoforms and cancer *Glycoconjugate Journal* 19, (2002) 557-563.
- [132] I.Saal, N.Nagy, M.Lensch, M.Lohr, J.C.Manning, C.Decaestecker, S.Andre, R.Kiss, I.Salmon, H.J.Gabius, Human galectin-2: expression profiling by RT-PCR/immunohistochemistry and its introduction as a histochemical tool for ligand localization *Histol.Histopathol.* 20, (2005) 1191-1208.
- [133] J.H.Jung, H.J.Kim, J.Yeom, C.Yoo, J.Shin, J.Yoo, C.S.Kang, C.Lee, Lowered expression of galectin-2 is associated with lymph node metastasis in gastric cancer *Journal of Gastroenterology* 47, (2012) 37-48.
- [134] S.Takaishi, T.C.Wang, Gene expression profiling in a mouse model of Helicobacter-induced gastric cancer *Cancer Science* 98, (2007) 284-293.
- [135] Anonymous, LGALS2 in gastric cancer, in: Anonymous, 2013
- [136] M.Fowler, R.J.Thomas, J.Atherton, I.S.Roberts, N.J.High, Galectin-3 binds to Helicobacter pylori O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to H-pylori adhesion *Cellular Microbiology* 8, (2006) 44-54.

-
- [137] M.Utt, T.Wadstrom, Identification of heparan sulphate binding surface proteins of *Helicobacter pylori*: Inhibition of heparan sulphate binding with sulphated carbohydrate polymers *Journal of Medical Microbiology* 46, (1997) 541-546.
- [138] C.C.Lopez-Bolanos, M.A.Guzman-Murillo, E.Ruiz-Bustos, F.Ascencio, The role of heparan sulfate on adhesion of 47 and 51 kDa outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells *Canadian Journal of Microbiology* 55, (2009) 450-456.
- [139] B.A.Frosch, I.Berquin, M.R.Emmert-Buck, K.Moin, B.F.Sloane, Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B *APMIS* 107, (1999) 28-37.
- [140] A.M.Szpaderska, A.Frankfater, An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer *Cancer Res.* 61, (2001) 3493-3500.
- [141] B.Nyfeler, S.W.Michnick, H.P.Hauri, Capturing protein interactions in the secretory pathway of living cells *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, (2005) 6350-6355.
- [142] F.Vollenweider, F.Kappeler, C.Itin, H.P.Hauri, Mistargeting of the lectin ERGIC-53 to the endoplasmic reticulum of HeLa cells impairs the secretion of a lysosomal enzyme *J.Cell Biol.* 142, (1998) 377-389.
- [143] C.Carcamo, E.Pardo, C.Oyanadel, M.Bravo-Zehnder, P.Bull, M.Caceres, J.Martinez, L.Massardo, S.Jacobelli, A.Gonzalez, A.Soza, Galectin-8 binds specific beta 1 integrins and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells *Experimental Cell Research* 312, (2006) 374-386.
- [144] Y.R.Hadari, R.rbel-Goren, Y.Levy, A.Amsterdam, R.Alon, R.Zakut, Y.Zick, Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis *Journal of Cell Science* 113, (2000) 2385-2397.
- [145] Y.Levy, R.rbel-Goren, Y.R.Hadari, S.Eshhar, D.Ronen, E.Elhanany, B.Geiger, Y.Zick, Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion *Journal of Biological Chemistry* 276, (2001) 31285-31295.
- [146] F.T.Liu, G.A.Rabinovich, Galectins as modulators of tumour progression *Nature Reviews Cancer* 5, (2005) 29-41.
- [147] E.P.Moiseeva, B.Williams, A.H.Goodall, N.J.Samani, Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310, (2003) 1010-1016.
- [148] J.D.Hood, D.A.Cherness, Role of integrins in cell invasion and migration *Nat.Rev.Cancer* 2, (2002) 91-100.
- [149] N.Obermajer, S.Magister, A.N.Kopitar, B.Tepes, A.Ihan, J.Kos, Cathepsin X prevents an effective immune response against *Helicobacter pylori* infection *European Journal of Cell Biology* 88, (2009) 461-471.

-
- [150] I.G.Wool, Y.L.Chan, A.Gluck, K.Suzuki, The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1, and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins *Biochimie* 73, (1991) 861-870.
- [151] B.E.Rich, J.A.Steitz, Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly *Mol.Cell Biol.* 7, (1987) 4065-4074.
- [152] A.Liljas, Comparative biochemistry and biophysics of ribosomal proteins *Int.Rev.Cytol.* 124, (1991) 103-136.
- [153] A.J.McCluskey, G.M.K.Poon, E.Bolewska-Pedyczak, T.Srikumar, S.M.Jeram, B.Raught, J.Gariepy, The catalytic subunit of Shiga-like toxin 1 interacts with ribosomal stalk proteins and is inhibited by their conserved C-terminal domain *Journal of Molecular Biology* 378, (2008) 375-386.
- [154] M.Tchorzewski, D.Krokowski, W.Rzeski, O.G.Issinger, N.Grankowski, The subcellular distribution of the human ribosomal ("stalk" components: P1, P2 and P0 proteins *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, (2003) 203-211.
- [155] S.Zinker, J.R.Warner, The ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Phosphorylated and exchangeable proteins *J.Biol.Chem.* 251, (1976) 1799-1807.
- [156] K.Ishii, T.Washio, T.Uechi, M.Yoshihama, N.Kenmochi, M.Tomita, Characteristics and clustering of human ribosomal protein genes *Bmc Genomics* 7, (2006).
- [157] A.Artero-Castro, J.Castellvi, A.Garcia, J.Hernandez, S.R.Y.Cajal, M.E.LLeonart, Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors *Human Pathology* 42, (2011) 194-203.
- [158] G.F.Barnard, R.J.Staniunas, S.Bao, K.Mafune, G.D.Steele, Jr., J.L.Gollan, L.B.Chen, Increased expression of human ribosomal phosphoprotein P0 messenger RNA in hepatocellular carcinoma and colon carcinoma *Cancer Res.* 52, (1992) 3067-3072.
- [159] S.Bortoluzzi, F.d'Alessi, C.Romualdi, G.A.Danieli, Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues *Bioinformatics* 17, (2001) 1152-1157.
- [160] G.F.Barnard, R.J.Staniunas, M.Mori, M.Puder, M.J.Jessup, G.D.Steele, Jr., L.B.Chen, Gastric and hepatocellular carcinomas do not overexpress the same ribosomal protein messenger RNAs as colonic carcinoma *Cancer Res.* 53, (1993) 4048-4052.
- [161] K.U.Kumar, S.P.Srivastava, R.J.Kaufman, Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is negatively regulated by 60S ribosomal subunit protein L18 *Molecular and Cellular Biology* 19, (1999) 1116-1125.

-
- [162] X.Y.Guo, Y.Q.Shi, Y.W.Gou, J.P.Li, S.A.Han, Y.Q.Zhang, J.H.Huo, X.X.Ning, L.Sun, Y.Chen, S.R.Sun, D.M.Fan, Human ribosomal protein S13 promotes gastric cancer growth through down-regulating p27(Kip1) *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15, (2011) 296-306.
- [163] N.S.Kim, Y.Hahn, J.H.Oh, J.Y.Lee, K.J.Oh, J.M.Kim, H.S.Park, S.Kim, K.S.Song, S.M.Rho, H.S.Yoo, Y.S.Kim, Gene cataloging and expression profiling in human gastric cancer cells by expressed sequence tags *Genomics* 83, (2004) 1024-1045.
- [164] M.J.Korenberg, B.J.Dicken, S.Damaraju, K.Graham, C.E.Cass, Predicting node positivity in gastric cancer from gene expression profiles *Biotechnology Letters* 31, (2009) 1381-1388.
- [165] K.Pogue-Geile, J.R.Geiser, M.Shu, C.Miller, I.G.Wool, A.I.Meisler, J.M.Pipas, Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein *Mol.Cell Biol.* 11, (1991) 3842-3849.
- [166] N.Kim, D.L.Weeks, J.M.Shin, D.R.Scott, M.K.Young, G.Sachs, Proteins released by *Helicobacter pylori* in vitro *Journal of Bacteriology* 184, (2002) 6155-6162.
- [167] B.Goulet, A.Baruch, N.S.Moon, M.Poirier, L.L.Sansregret, A.Erickson, M.Bogyo, A.Nepveu, A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor *Molecular Cell* 14, (2004) 207-219.
- [168] T.Reinheckel, J.Deussing, W.Roth, C.Peters, Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L *Biol.Chem.* 382, (2001) 735-741.
- [169] C.Norbury, P.Nurse, Animal cell cycles and their control *Annu.Rev.Biochem.* 61, (1992) 441-470.
- [170] K.Vermeulen, D.R.Van Bockstaele, Z.N.Berneman, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer *Cell Proliferation* 36, (2003) 131-149.
- [171] A.Strasser, A.W.Harris, T.Jacks, S.Cory, DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2 *Cell* 79, (1994) 329-339.
- [172] V.Nogueira, Y.Park, C.C.Chen, P.Z.Xu, M.L.Chen, I.Tonic, T.Unterman, N.Hay, Akt Determines Replicative Senescence and Oxidative or Oncogenic Premature Senescence and Sensitizes Cells to Oxidative Apoptosis *Cancer Cell* 14, (2008) 458-470.
- [173] L.Weinmann, J.Wischhusen, M.J.Demma, U.Naumann, P.Roth, B.DasMahapatra, M.Weller, A novel p53 rescue compound induces p53-dependent growth arrest and sensitises glioma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis *Cell Death and Differentiation* 15, (2008) 718-729.

-
- [174] A.Seluanov, V.Gorbunova, A.Falcovitz, A.Sigal, M.Milyavsky, I.Zurer, G.Shohat, N.Goldfinger, V.Rotter, Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53 *Molecular and Cellular Biology* 21, (2001) 1552-1564.
- [175] J.A.Bond, J.P.Blaydes, J.Rowson, M.F.Haughton, J.R.Smith, D.Wynfordthomas, F.S.Wyllie, Mutant P53 Rescues Human-Diploid Cells from Senescence Without Inhibiting the Induction of Sdi1/Waf1 *Cancer Research* 55, (1995) 2404-2409.
- [176] H.P.Jiang, J.Lin, Z.Z.Su, F.R.Collart, E.Huberman, P.B.Fisher, Induction of Differentiation in Human Promyelocytic HL-60 Leukemia-Cells Activates P21, Waf1/Cip1, Expression in the Absence of P53 *Oncogene* 9, (1994) 3397-3406.
- [177] C.Missero, E.Calautti, R.Eckner, J.Chin, L.H.Tsai, D.M.Livingston, G.P.Dotto, Involvement of the Cell-Cycle Inhibitor Cip1/Waf1 and the E1A-Associated P300 Protein in Terminal Differentiation *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, (1995) 5451-5455.
- [178] S.P.Chellappan, S.Hiebert, M.Mudryj, J.M.Horowitz, J.R.Nevins, The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein *Cell* 65, (1991) 1053-1061.
- [179] B.D.Dynlacht, O.Flores, J.A.Lees, E.Harlow, Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes *Genes Dev.* 8, (1994) 1772-1786.
- [180] K.Helin, E.Harlow, A.Fattaey, Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein *Mol.Cell Biol.* 13, (1993) 6501-6508.
- [181] S.B.Parker, G.Eichele, P.Zhang, A.Rawls, A.T.Sands, A.Bradley, E.N.Olson, J.W.Harper, S.J.Elledge, p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells *Science* 267, (1995) 1024-1027.
- [182] Y.Haupt, S.Rowan, M.Oren, p53-mediated apoptosis in HeLa cells can be overcome by excess pRB *Oncogene* 10, (1995) 1563-1571.
- [183] M.Oren, Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death *Semin.Cancer Biol.* 5, (1994) 221-227.
- [184] E.Yonish-Rouach, D.Resnitzky, J.Lotem, L.Sachs, A.Kimchi, M.Oren, Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6 *Nature* 352, (1991) 345-347.
- [185] D.O.Morgan, Principles of Cdk Regulation *Nature* 374, (1995) 131-134.
- [186] J.Pines, Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations *Adv.Cancer Res.* 66, (1995) 181-212.
- [187] J.Pines, Cyclins: wheels within wheels *Cell Growth Differ.* 2, (1991) 305-310.
- [188] M.Ohtsubo, A.M.Theodoras, J.Schumacher, J.M.Roberts, M.Pagano, Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition *Mol.Cell Biol.* 15, (1995) 2612-2624.

-
- [189] C.J.Sherr, J.M.Roberts, Inhibitors of Mammalian G(1) Cyclin-Dependent Kinases
Genes & Development 9, (1995) 1149-1163.
- [190] A.Carnero, G.J.Hannon, The INK4 family of CDK inhibitors
Curr.Top.Microbiol.Immunol. 227, (1998) 43-55.
- [191] K.Polyak, M.H.Lee, H.Erdjument-Bromage, A.Koff, J.M.Roberts, P.Tempst,
J.Massague, Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a
potential mediator of extracellular antimitogenic signals Cell 78, (1994) 59-66.
- [192] M.H.Lee, I.Reynisdottir, J.Massague, Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase
inhibitor with unique domain structure and tissue distribution Genes Dev. 9,
(1995) 639-649.
- [193] W.S.el Deiry, T.Tokino, V.E.Velculescu, Levy D.B., R.Parsons, J.M.Trent, D.Lin,
W.E.Mercer, K.W.V.B.Kinzler, WAF1, a potential mediator of p53 tumor
suppression Cell 75, (1993) 817.
- [194] L.J.Ko, C.Prives, p53: Puzzle and paradigm Genes & Development 10, (1996) 1054-
1072.
- [195] J.Bartek, J.Lukas, J.Bartkova, DNA damage response as an anti-cancer barrier -
Damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency' Cell
Cycle 6, (2007) 2344-2347.
- [196] A.Poehlmann, A.Roessner, Importance of DNA damage checkpoints in the
pathogenesis of human cancers Pathology Research and Practice 206, (2010)
591-601.
- [197] T.Waldman, K.W.Kinzler, B.Vogelstein, P21 Is Necessary for the P53-Mediated G(1)
Arrest in Human Cancer-Cells Cancer Research 55, (1995) 5187-5190.
- [198] D.S.Haines, J.E.Landers, L.J.Engle, D.L.George, Physical and Functional Interaction
Between Wild-Type P53 and Mdm2 Proteins Molecular and Cellular Biology
14, (1994) 1171-1178.
- [199] X.Wu, J.H.Bayle, D.Olson, A.J.Levine, The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop
Genes Dev 7, (1993) 1126-1132.
- [200] A.R.Clarke, S.Gledhill, M.L.Hooper, C.C.Bird, A.H.Wyllie, p53 dependence of early
apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium
following gamma-irradiation Oncogene 9, (1994) 1767-1773.
- [201] O.Tetsu, F.McCormick, Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition Cancer
Cell 3, (2003) 233-245.
- [202] H.S.van den, E.Harlow, Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle
control Science 262, (1993) 2050-2054.
- [203] M.Malumbres, M.Barbacid, To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer
Nat.Rev.Cancer 1, (2001) 222-231.

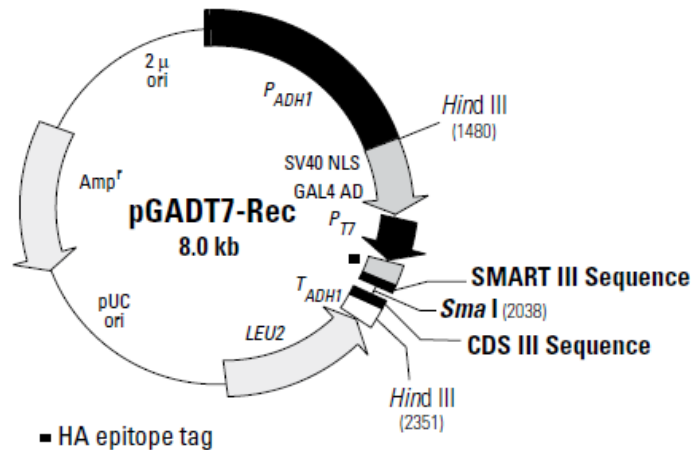
- [204] C.Catzavelos, N.Bhattacharya, Y.C.Ung, J.A.Wilson, L.Roncari, C.Sandhu, P.Shaw, H.Yeger, I.Morava-Protzner, L.Kapusta, E.Franssen, K.I.Pritchard, J.M.Slingerland, Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer *Nat.Med.* 3, (1997) 227-230.
- [205] A.M.De Marzo, A.K.Meecker, J.I.Epstein, D.S.Coffey, Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells *Am.J.Pathol.* 153, (1998) 911-919.
- [206] V.Esposito, A.Baldi, L.A.De, A.M.Groger, M.Loda, G.G.Giordano, M.Caputi, F.Baldi, M.Pagano, A.Giordano, Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer *Cancer Res.* 57, (1997) 3381-3385.
- [207] M.Loda, B.Cukor, S.W.Tam, P.Lavin, M.Fiorentino, G.F.Draetta, J.M.Jessup, M.Pagano, Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas *Nat.Med.* 3, (1997) 231-234.
- [208] M.Mori, K.Mimori, T.Shiraishi, S.Tanaka, H.Ueo, K.Sugimachi, T.Akiyoshi, p27 expression and gastric carcinoma *Nature Medicine* 3, (1997) 593.
- [209] M.Sanchez-Beato, A.I.Saez, J.C.Martinez-Montero, M.M.Sol, L.Sanchez-Verde, R.Villuendas, G.Troncone, M.A.Piris, Cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 in lymphoid tissue: p27KIP1 expression is inversely proportional to the proliferative index *Am.J.Pathol.* 151, (1997) 151-160.
- [210] J.Tsihlias, L.R.Kapusta, G.DeBoer, I.Morava-Protzner, I.Zbieranowski, N.Bhattacharya, G.C.Catzavelos, L.H.Klotz, J.M.Slingerland, Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma *Cancer Res.* 58, (1998) 542-548.
- [211] W.Yasui, Y.Kudo, S.Semba, H.Yokozaki, E.Tahara, Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas *Jpn.J.Cancer Res.* 88, (1997) 625-629.
- [212] G.P.Dotto, p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim.Biophys.Acta* 1471, (2000) M43-M56.
- [213] M.Asada, T.Yamada, H.Ichijo, D.Delia, K.Miyazono, K.Fukumuro, S.Mizutani, Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation *EMBO J.* 18, (1999) 1223-1234.
- [214] A.Suzuki, T.Ito, H.Kawano, M.Hayashida, Y.Hayasaki, Y.Tsutomi, K.Akahane, T.Nakano, M.Miura, K.Shiraki, Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death *Oncogene* 19, (2000) 1346-1353.
- [215] S.Q.Xu, W.S.El-Deiry, p21(WAF1/CIP1) inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4 *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 269, (2000) 179-190.

-
- [216] K.M.Detjen, D.Murphy, M.Welzel, K.Farwig, B.Wiedenmann, S.Rosewicz, Downregulation of p21(waf/cip-1) mediates apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in response to interferon-gamma *Exp.Cell Res.* 282, (2003) 78-89.
- [217] W.Poluha, D.K.Poluha, B.Chang, N.E.Crosbie, C.M.Schonhoff, D.L.Kilpatrick, A.H.Ross, The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1) is required for survival of differentiating neuroblastoma cells *Mol.Cell Biol.* 16, (1996) 1335-1341.

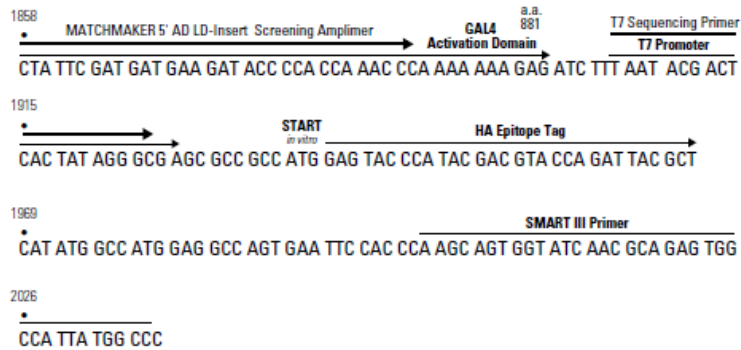
7 Anhang

7.1 Plasmidkarten

7.1.1 pGADT7-Rec Plasmid für den Aufbau der cDNA-Bibliothek



SMART IIITM terminus



CDS III terminus

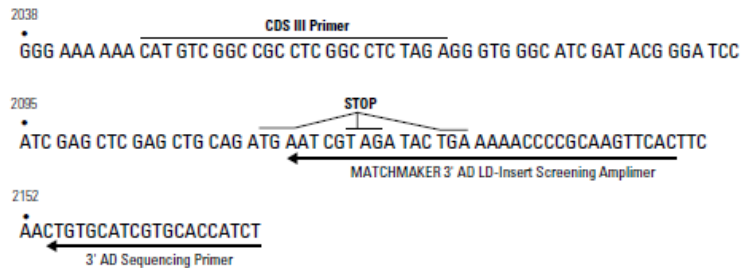


Abbildung 42: Restriktionskarte und Klonierungsstellen von pGADT7-Rec. (Make Your Own „Mate & PlateTM“ Library System User Manual, Clontech).

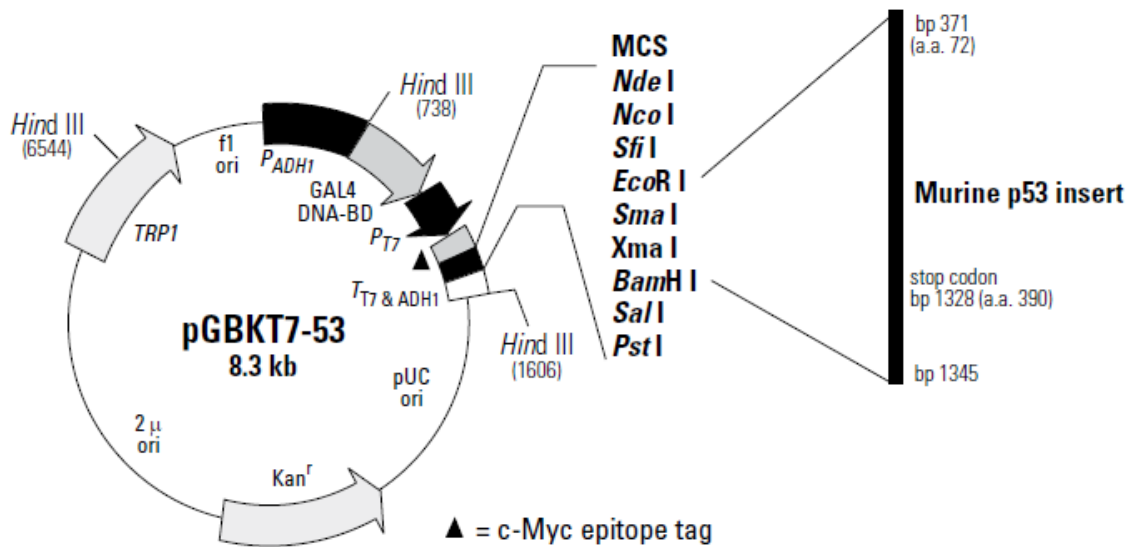
7.1.2 Kontrollplasmide für den *Yeast Two-Hybrid Assay*

Abbildung 43: Plasmidkarte vom pGBKT7-p53 DNA-BD Kontrollplasmid.

pGBKT7-p53 ist ein positives Kontrollplasmid, das für die Fusion von der Gal4-DNA-BD (a.a. 1-147) mit dem murinen p53 Insert codiert. (*MatchmakerTM Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual*, Clontech).

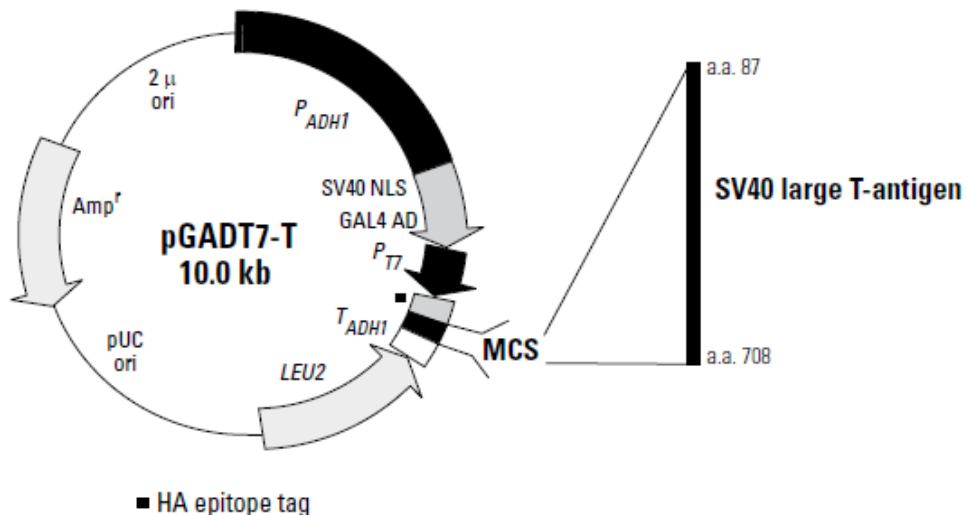


Abbildung 44: Plasmidkarte vom pGADT7-T AD Kontrollplasmid.

pGADT7 ist ein positives Kontrollplasmid, das für die Fusion von der Gal4-AD (a.a. 768-881) mit dem SV40 *large T-antigen* Insert codiert. (*MatchmakerTM Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual*, Clontech).

7.1.3 pGBKT7 Plasmid für die Klonierung mit CTSX im *Two-Hybrid Assay*

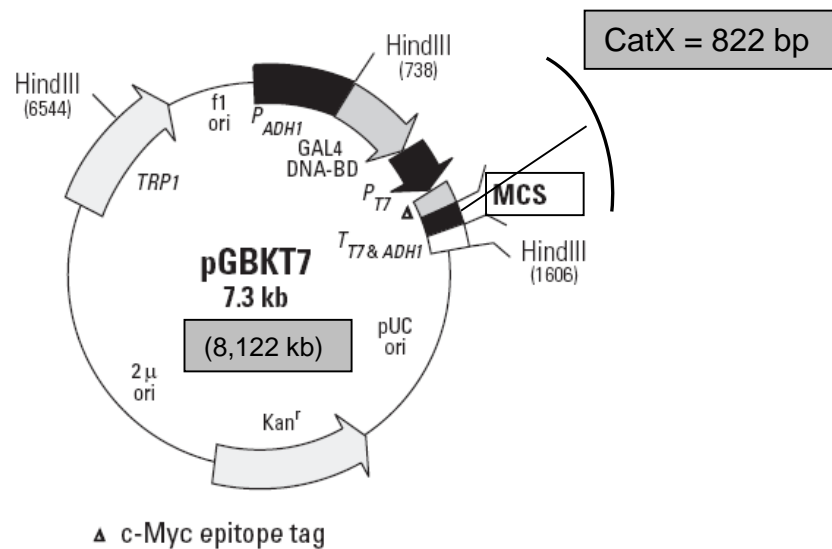


Abbildung 45: Plasmidkarte vom pGBKT7 DNA-BD Fusionsplasmid.
(*Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual*, Clontech).

7.1.4 Plasmidkarten für die chemilumineszente Co-IP

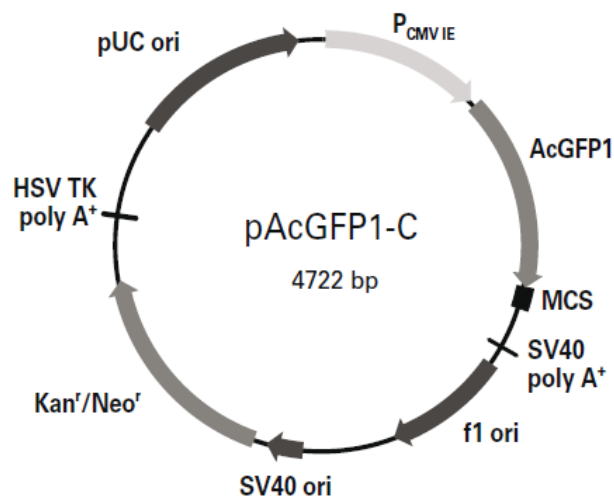


Abbildung 46: Plasmidkarte für den Klonierungsvektor pAcGFP1-C.
(*Matchmaker™ Chemiluminescent Co-IP System User Manual*, Clontech).

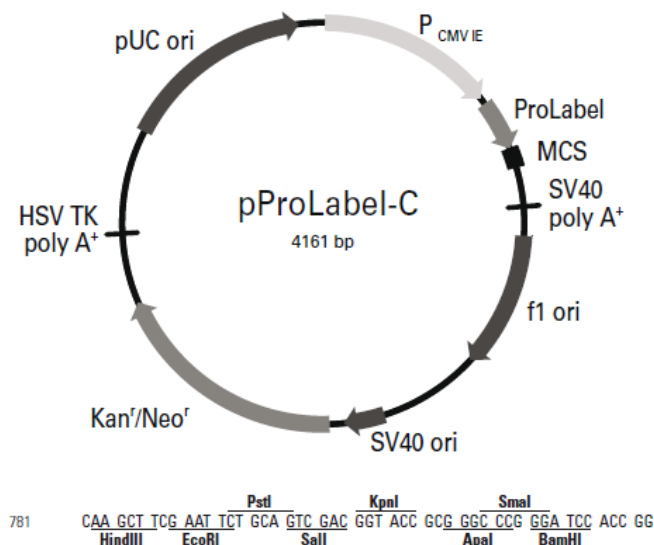


Abbildung 47: Plasmidkarte für den Klonierungsvektor pProLabel-C.
(Matchmaker™ Chemiluminescent Co-IP System User Manual, Clontech).

7.2 Konstruktion des DNA-BD/*bait*-Fusionsproteins

7.2.1 Sequenzen und Referenzen der Klone 4 und 5

Klon 4 Sequenzierung mit T7 forward

Referenz in NCBI-NM_001336

CACCNCTNTGGNGGACAGAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCATGG
 AGGCCGAATTC¹ACAGACCTGCTACCGGCCTCTGC²GGGGGGACGGGCTGGCTCCG
 CTGGGGCGCAGCACATACCCCGGCTCATGAGTACCTGTCCCAGCGGATCTGC
 CCAAGAGCTGGGACTGGCGCAATGTGGATGGTGTCAACTATGCCAGCATCACCCG
 GAACCAGCACATCCCCAATACTGCGGCTCCTGCTGGGCCCACGCCAGCACCAGC
 GCTATGGCGGATCGGATCAACATCAAGAGGAAGGGAGCGTGGCCCTCCACCCTC
 CTGTCCGTGCAGAACGTCATCGACTGCGGTAACGCTGGCTCCTGTGAAGGGGGTA
 ATGACCTGTCCGTGTGGGACTACGCCACCAGCACGGCATCCCTGACGAGACCTG
 CAACAACCTACCAGGCCAAGGACCAGGAGTGTGACAAGTTTAACCAATGTGGGAC
 ATGCAATGAATTCAAAGAGTGCCACGCCATCCGGAACCTACACCCTCTGG³AGAGT
 GGGAAACTACNGCTCCCCCTCTGGGAGGGAGAAATATGGAGAAATCTCCCAATG
 GTCCATCACTGTGGAATATGGCACAGAAAACCTGGTAATAACNCCGAGGATNNTGC
 CAAACNAGAACNATATTAACATGTCNTTCTGGTTGGTNGGGATNNNATGGATGA
 TCTGATGCCGATTATGGGNAACCTGGCANAAGCTGTTGNNTNCCCCTTAGGGGAGG
 CCCAACTTCNCGGAATNATTGN

¹ Schnittstelle, zwischen pGBKT7 und Cathepsin X → CatX wurde in frame richtig kloniert

² Gelb: T7 forward Primer, der zum Teil aus pGBKT7 und CatX Sequenzen besteht

³ Teil des Klon 4 der mit Originalsequenz von CatX übereinstimmt (bis zum ca. 690 bp), danach treten Fehler auf

Klon 5 Sequenzierung mit T7 forward

Referenz in NCBI-NM_001336

GCCACCCCTCTGGAGGACAGAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATGGCCAT
 GGAGGCCGAATTCACAGACCTGCTACCGGCCTCTGC GGGGGGACGGGCTGGCTC
 CGCTGGGGCGCAGCT⁴CATACCCCCGGCCTCATGAGTACCTGTCCCCAGCGGATCT
 GCCAAGAGCTGGGAC⁵GGCGCAATGTGGATGGTGTCAACTATGCCAGCATCAC
 CCGGAACC⁶GCACATCCCCCAATACTGCGGCTCCTGCTGGGCCACGCCAGCAC
 CAGCGCTATGGCGGATCGGATCAACATCAAGAGGAAGGGAGCGTGGCCCTCCAC
 CCTCCTGTCCGTGCAGAACGTCATCGACTGCGGTAACGCTGGCTCCTGTGAAGGG
 GGTAATGACCTGTCCGTGTGGGACTACGCCACCAGCACGGCATCCCTGACGAGA
 CCTGCAACAACCTACCAGGCCAAGGACCAGGAGTGTGACAAGTTTAACCAATGTG
 GGACATGCAATGAATT⁷CAAAGAGTGCACGCCTCCGGAACCTACACCTTCTGGAGA
 GTGGGAAAATACNGCTCCCTCTCTGGGAGGAAAAGATATGGCANAATTACNCAA
 TGGTCCCTCACTGCGGATATGGAACGAAAACCTGGTAACNCCCCGAGGATTNTCCC
 AAACCAGANCCNATTTAACATGTCTTTCTGGTGGTGGGCNCATATGGACGANNTG
 GTGNCGATTTGGNGACCNGGGAGNAGNGGTNGTCCCCCCNAAGNGAGGCNAAN
 CTCTCGANT

Rot: Primer (Anfänge von CatX)**Rote Kästchen :** Fehler, Basenaustausche**Blau:** Base dazu geschrieben, welche der Sequenzer nicht erkannt hatKlon 4 Sequenzierung mit 3`DNA-BD Sequencing Primer (reverse)

Referenz in NCBI-NM_001336

ATTTAAAATTTGTTACCTTATTTTTTTTATAACTTATTTAATAATAAAAAATCATAA
 ATCATAAGAAATTCGCCCCGAATTAGCTTGGCTGCAAGCGCGCAAAAAACCCCTC
 AAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTC
 GACGGATCC⁸TTAAACGATGGGGTCCCCAAATGT⁸ACAGTGCTCCTCGATGGCAAG
 GTTGATCTGGCGCCCTTCCCATCCTTATAGGTGCTGGTCACGATCCTCAGCCAGC
 CTCTCTCGCCCCATGGTTCACCCCATGAATCCGGACAATCCAGTACTCAGTCCCA
 TCACTGATGCCCCACCCAGCCAC⁹GAAACGACATGGTTTATATATGTGGTGTCTC
 GGTATTCGGCATAGATGCCTCCGGTGTAGTTAGCCAGTCTTTCTGTTGCCATTATT
 CCAACAGCTGATGGGACCATTGCGTAGATTTCTGCCATCATCTTCTCCCTCCAGA
 G¹⁰AGGGAGCCGTAGTCTCC¹⁰ACT¹¹CT¹¹CCAGA¹²GGGTGTAGTTCCGGA¹²TGGCGTGG

⁴ Fehlerhafte Base⁵ Fehlerhafte Base⁶ Fehlerhafte Base⁷ Teil des Klon 5 der mit der Originalsequenz von CatX übereinstimmt (bei ca. 660 bp)⁸ CatX reverse Primer⁹ A ursprünglich wurde durch G ersetzt; Substitution → Transition weil eine Purinbase durch eine andere Purinbase ersetzt wurde¹⁰ T ist zu viel - Insertion¹¹ Anschluss der Sequenzierung mit T7 forward (die mit GGT weitergeht), nach der 12 fängt das Ende vom T7 forward (Klon 4) an

CACTCTTTGAATTATTGNATGTCCAATTGGTNAACTTGTCCACTCTGGGTCTTGNC
TGGANTTGTGANGTCTCGTANGGATGCCTGTGTGGCGTATCCNACGGNGGTNTN
CCCTTAAAGANCANGTCCNATCATACTTTGACGACGAGGGGGGCNCTCTTNTTNT
TNN

Klon 5 Sequenzierung mit 3' DNA-BD Sequencing Primer (reverse)

Referenz in NCBI-NM_001336

NATTTAAAATTTGTATACACTTATTTTTTTTATAACTTATTTAATAATAAAAATCA
TAAATCATAAGAAATTCGCCCCGGAATTAGCTTGGCTGCAAGCGCGCAAAAACC
CCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCA
GGTCGACGGATCC**T**TAAACGATGGGGTCCCAAATGT¹³ACAGTGCTCCTCGATGG
CAAGGTTGTATCTGGCGCCCTTCCCATCCTTATAGGTGCTGGTCACGATCCTCAGC
CAGCCTCTCTCGCCCCATGGTTCACCCCATGAATCCGGACAATCCAGTACTCAGT
CCCATCACTGATGCCCCACCCAGCCAC**G**¹⁴GAAACGACATGGTTTATATATGTGGT
GTCCTGGTATTCGGCATAGATGCCTCCGGTGTAGTTAGCCAGTCTTTCTGTTGCCA
TTATTCC**G**¹⁵CAGCTGATGGGACCATTGCGTAGATTTCTGCCATCATCTTCTCCCT
CCCAGAGAGGGAGCCGTAGTCTCCACT**T**¹⁶CTCCAGA¹⁷GGGTGTAGTTCGGATGG
CGTGGCACTCTTTGAATTATTGATGTCCACATTGGTTAACTTGTACACTCTGGGTC
TTGGCTGGAGTTGTTGANGTCTCGTAGGATGCCTGTGGTGGCGTATCCAACGANG
GTNTTACCCTTAAGGACCAGGTNCCCATCATACTTTTACGAAGANGTGNGGCCCT
CTTCNTTGTTCCTCCN

Cathepsin X Sequenz (Klon 4 zusammengesetzt)

Referenz in NCBI-AF_136273

AAAGTGCGGGGTCGGCCGGGTGCTGGGCCGAGGCCGAGGCCGGGGCGGGATCCA
GAGCGGGAGCCGGCGCGGGATCTGGGACTCGGAGCGGGATCCGGAGCGGGACCC
AGGAGCCGGCGCGGGGCC**ATG**GCGAGGCGCGGGCCAGGGTGGCGGCCGCTTCTG
CTGCTCGTGCTGCTGGCGGGCGCGGCCAGGGCGGCCTCTACTTCCGCCGGGG**AC**
AGACCTGCTACCGGCCTCTGC¹⁸GGGGGACGGGCTGGCTCCGCTGGGGCGCAGC
ACATACCCCCGGCCTCATGAGTACCTGTCCCCAGCGGATCTGCCAAGAGCTGGG
ACTGGCGCAATGTGGATGGTGTCAACTATGCCAGCATCACCCGGAACCAGCAT
CCCCAATACTGCGGCTCCTGCTGGGCCACGCCAGCACCAGCGCTATGGCGGAT
CGGATCAACATCAAGAGGAAGGGAGCGTGGCCCTCCACCCTCCTGTCCGTGCAG
AACGTCATCGACTGCGGTAACGCTGGCTCCTGTGAAGGGGGTAATGACCTGTCCG
TGTGGGACTACGCCACCAGCACGGCATCCCTGACGAGACCTGCAACAACACTACCA

¹² TCTGG Ende der Sequenzierung mit T7 forward Primer

¹³ CatX reverse Primer

¹⁴ A ursprünglich wurde durch G ersetzt; Substitution → Transition, weil eine Purinbase durch eine andere Purinbase ersetzt wurde

¹⁵ A ursprünglich wurde durch G ersetzt; Substitution → Transition, weil eine Purinbase durch eine andere Purinbase ersetzt wurde

¹⁶ T ist zu viel - Insertion

¹⁷ TCTGG Ende der Sequenzierung mit T7 forward Primer

¹⁸ Forward Primer CatX

GGCCAAGGACCAGGAGTGTGACAAGTTTAACCAATGTGGGACATGCAATGAATT
CAAAGAGTGCCACGCCATCCGGAACACTACACCCTCTGG¹⁹²⁰AGA²¹GTGGGAGACTA
CGGCTCCCT²²CTCTGGGAGGGAGAAGATGATGGCAGAAATCTACGCAAATGGTC
CCATCAGCTGTGGAATAATGGCAACAGAAAGACTGGCTAACTACACCGGAGGCA
TCTATGCCGAATACCAGGACACCACATATATAAACCATGTTCGTTTCT²³GTGGCTG
GGTGGGGCATCAGTGATGGGACTGAGTACTGGATTGTCCGGAATTCATGGGGTGA
ACCATGGGGCGAGAGAGGCTGGCTGAGGATCGTGACCAGCACCTATAAGGATGG
GAAGGGCGCCAGATAACAACCTTGCCATCGAGGAGCACTGTACATTTGGGGACCC
CATCGTTTAA²⁴GGCCATGTCACTAGAAGCGCAGTTTAAGAAAAGGCATGGTGACC
CATGACCAGAGGGGATCCTATGGTTATGTGTGCCAGGCTGGCTGGCAGGAACTGG
GGTGGCTATCAATATTGGATGGCGAGGACAGCGTGGCACTGGCTGCGAGTGTTCC
TGAGAGTTGAAAGTGGGATGACTTATGACACTTGCACAGCATGGCTCTGCCTCAC
AATGATGCAGTCAGCCACCTGGGAAGAAGTGACCTGCGACACAGGAAACGATGG
GACCTCAGTCTTCTTCAGCAGAGGACTTGATATTTTGTATTTGGCAACTGTGGGCA
ATAATATGGCATTAAAGAGGTGAAAGAGTTCAGACTTATCACCATTCTTATGTCA
CTTTAGAATCAAGGGTGGGGGAGGGAGGGAGGGAGTTGGCAGTTTCAAATCGCC
CAAGTGATGAATAAAGTATCTGGCTCTGCACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Sequenz Abgleich mit AF136273

Korrektur Teil des Klon 4, der *in frame* in pGBKT7 sequenziert wurde.

Cathepsin X Sequenz

1	aaagtgcggg	gtcggccggg	tgctgggccc	aggccgaggc	cggggcggga	tccagagcgg
61	gagccggcgc	gggatctggg	actcggagcg	ggatccggag	cgggaccag	gagccggcgc
121	ggggccatgg	cgaggcgcgg	gccagggctg	cggccgcttc	tgctgctcgt	gctgctggcg
181	ggcgcggcgc	agggcggcct	ctacttccgc	cggggacaga	cctgctaccg	gcctctgcgg
241	ggggacgggc	tggctccgct	ggggcgcagc	acataccccc	ggcctcatga	gtacctgtcc
301	ccagcggatc	tgcccaagag	ctgggactgg	cgcaatgtgg	atggtgtcaa	ctatgccagc
361	atcaccggga	accagcacat	cccccaatac	tgcggtcctc	gctgggceca	cgccagcacc
421	agcgctatgg	cggatcggat	caacatcaag	aggaagggag	cgtggccctc	caccctctctg
481	tccgtgcaga	acgtcatcga	ctgcggtaac	gctggctcct	gtgaagggg	taatgacctg
541	tccgtgtggg	actacgcca	ccagcacggc	atccctgacg	agacctgcaa	caactaccag
601	gccaaggacc	aggagtgtga	caagttaaac	caatgtggga	catgcaatga	attcaaagag
661	tgccacgcca	tccggaacta	caccctctgg	aggggtgggag	actacggctc	cctctctggg
721	agggagaaga	tgatggcaga	aatctacgca	aatggtccca	tcagctgtgg	aataatggca
781	acagaaagac	tggctaacta	caccggaggc	atctatgccg	aataccagga	caccacatat
841	ataaaccatg	tcgtttcgt	ggctgggtgg	ggcatcagtg	atgggactga	gtactggatt
901	gtccggaatt	catgggggtga	accatggggc	gagagaggct	ggctgaggat	cgtgaccagc
961	acctataagg	atgggaagg	cgccagatac	aaccttgcca	tcgaggagca	ctgtacattt
1021	ggggacccca	tcgttttaagg	ccatgtcact	agaagcgcag	tttaagaaa	ggcatggtga
1081	cccatgacca	gaggggatcc	tatggttatg	tgtgccaggc	tggctggcag	gaactggggt
1141	ggctatcaat	attggatggc	gaggacagcg	tggcactggc	tcgagtggt	cctgagagtt
1201	gaaagtggga	tgacttatga	cacttgca	gcatggctct	gcctcacaat	gatgcagtca

¹⁹ Korrektur Teil des Klon 4 der *in frame* in pGBKT7 sequenziert wurde

²⁰ Schnittstelle für Sequenzierung mit 3`DNA-BD sequencing primer

²¹ Insertion, ein A (T reverse) zu viel

²² ursprünglich T (A reverse)- Sequenzierfehler? Laut Sequenzer G, trotzdem minimaler peak zu sehen

²³ Substitution = Transition, da A reverse (T) durch G ersetzt wurde

²⁴ Reverse Primer CatX

```

1261 gccacctggt gaagaagtga cctgcgacac aggaaacgat gggacctcag tcttcttcag
1321 cagaggactt gatattttgt atttggcaac tgtgggcaat aatatggcat ttaagaggtg
1381 aaagagttca gacttatcac cattcttatg tcactttaga atcaaggggtg ggggagggag
1441 ggagggagtt ggcagtttca aatcgcccaa gtgatgaata aagtatctgg ctctgcacga
1501 aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

²² Substitution, aus A wurde G; Base 851 befindet sich in der STS-Region (761-913), Proprotein von Base 196-1035

```

1      ggggtcggcc ggggtgctagg ccggggccga ggccgaggcc ggggcgggat ccagagcggg
61     agccggcgcg ggatctggga ctcgagcgcg gatccggagc gggaccagg agccggcgcg
121    gggccatggc gaggcgcggg ccagggtggc ggccgcttct gctgctcgtg ctgctggcgg
181    gcgcgcgca  gggcggcctc tacttccgcc ggggacagac ctgctaccgg cctctgcggg
241    gggacgggct ggctccgctg gggcgagca  catacccccg gcctcatgag tacctgtccc
301    cagcggatct gcccaagagc tgggactggc gcaatgtgga tgggtgcaac tatgccagca
361    tcaccgggaa ccagcacatc cccaataact gcggctcctg ctgggccac  gccagacca
421    gcgctatggc ggatcggatc aacatcaaga ggaagggagc gtggccctcc accctcctgt
481    ccgtgcagaa cgtcatcgac tgcggtaacg ctggctcctg tgaagggggt aatgacctgt
541    ccgtgtggga ctacggccac cagcacggca tcctgacga  gacctgcaac aactaccagg
601    ccaaggacca ggagtgtgac aagttaacc  aatgtgggac atgcaatgaa ttcaaagagt
661    gccacgcat  ccggaactac accctctgga gagtgggaga ctacggctcc ctctctggga
721    gggagaagat gatggcagaa atctacgcaa atggtcccat cagctgtgga ataatggcaa
781    cagaaagact ggctaactac accggaggca tctatgccga ataccaggac accacatata
841    taaaccatgt cgtttccgtg gctgggtggg gcatcagtga tgggactgag tactggattg
901    tccggaattc atggggtgaa ccattgggcg agagaggctg gctgaggatc gtgaccagca
961    cctataagga tgggaagggc gccagataca accttgccat cgaggagcac tgtacatttg
1021   gggaccccat cgtttaaggc catgtcacta gaagcgagc ttaagaaaag gcatggtgac
1081   ccatgaccag aggggatcct atggttatgt gtgccaggct ggctggcagg aactgggggtg
1141   gctatcaata ttggatggcg aggacagcgt ggtactggct gcgagtgttc ctgagagttg
1201   aaagtgggat gacttatgac acttgcacag catggctctg cctcacaatg atgcagtcag
1261   ccacctgggtg aagaagtgac ctgcaacaca ggaacgatg  ggacctcagt cttcttcagc
1321   agaggacttg atattttgta tttggcaact gtgggcaata atatggcatt taagaggtga
1381   aagagttcag acttatcacc attcttatgt cactttagaa tcaaggggtg gggagggagg
1441   gagggagttg gcagtttcaa atcgcccaac tgataaataa agtatctggc tctgcacgag

```

7.3 Sequenzen des AD Library Screening

Klon 14 → Mucin6 (MUC6)

Referenz in NCBI-NM_005961.2

Klon 14

NCGCNCCTGGAGACCCATACGACGTACCAGATACGCTCATATG²⁵GCCATGGAG
 GCNAGTGAATTCCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCG
 GG²⁶TGGAAG²⁷CACCCCTGCTTCTGCCCCGGTATCTTCTCTCGGGACACCTACGCC
 ACCTCACCCGGGGTCTGCAGTGTGCGGGAGCAGCAGGAGGAGATCACGTTCAAG
 GGGTGCATGGCGAACGTGACGGTGACCCGCTGTGAGGGCGCCTGCATTTCCGCTG
 CCAGCTT²⁸CAACATCATCACCCAGCAGGTGGATGCCCGCTGCAGCTGCTGCCGCC
 CCCTCCACTCCTATGAGCAGCAGCTGGAGCTGCCCTGCCCCGATCCCAGCACGCC
 TGGCCGGCGGCTCGTACTCACCCCTGCAGGTGTTTCAGCCACTGCGTGTGCAGCTCT
 GTGGCCTGTGGAGACTAGCAGGGTTCGCTGCCTGCTCTCCTGGGGCTGAAGGACTG
 CAGATGACAGACAGGAAACACCACCAGCCCCTTCCCCTTGTGCCCACTGCTTTC
 TGGTACAGGCTGGCCCCAAGTGCCCTGGGGCCGTGCTCCTGGGGCACGGTTGGAAGG
 GCTGCCAAGCAGGGTTANCTACACATCTGCAACCTGACACCAAAGGATTNGGGG
 NANGTACGGCCCCGCNCGNAAAAAGAANCCATCGGGGNANGGGGCNGGNGG
 ACCCCCTCNCGAAGCCCNCCCCCCTTTNNGGGCCGA

7029-7549 bp → 96 % Übereinstimmung
 Gesamt 520 bp

Klon 33 → Galectin-2 (LGALS2)

Referenz in NCBI-NM_006498.2

Klon 33

NCNCGCCTGGNATCCCATACGACGTACCAGATACGCTCATATG²⁹GCCTGGAGGCC
 AGTGAATTCCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGG³⁰
 GCAAGAA²⁷CAACGGGAAGATCACCTGTGCTTCAGCCCAGGGTCAGAGGTCAAGTT
 CACAGTGACCTTTGAGAGTGACAAATTCAAGGTGAAGCTGCCAGATGGGCACGA
 GCTGACTTTTCCAACAGGCTGGGTCACAGCCACCTGAGCTACCTGAGCGTAAGG

²⁵ *In vitro* Start site of pGADT7-Rec

²⁶ Ende des Smart 3 Primers

die unterstrichenen Nucleotide zeigen die homologe Rekombinations *site* zwischen pGADT7-Rec und den SMART III oligos der cDNA

²⁷ Anfang und Ende der Sequenzen in Rot dargestellt

²⁸ Sequenzanfang gehört auch zu Mucin 6

²⁹ *In vitro* Start site of pGADT7-Rec

³⁰ Ende des Smart 3 Primers

die unterstrichenen Nucleotide zeigen die homologe Rekombinations *site* zwischen pGADT7-Rec und den SMART III oligos der cDNA

GGCGGGTTCAACATGTCCTCTTTCAAGTTAAAAGAATAAAAAGACTTCCNGCANNAN
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA **AAA**NCCTGTGCGGCCGCCTCGGCCTCTAGAGGGTGGG
 CATCGATACGGGATCCATCGAGCTCGAGCTGCAGATGAATCGTAGATACTGAAA
 AACCCCGCAAGTTCACTTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTNATTTCTTTATTATC
 ATCGTTTTGCCTTCTTTATGNACTATCTCCTCTAAGTTCAATCTTGGCATGTACCTC
 TGTCTATGAATTTTAATGACTGAATAAGCCATCTTTTTTGGCCTAATCTTATGAAA
 ATNTACAGGCTATTANACTTGGCTNTTNCAGGGTGGNANNTCAAAGGTGGGGTTT
 TCCTGCNAATTNAAAGGAAGNACTGGGACCTTGCCTAACGTTTTNTNTTTTA
 AAANAAAAGNAATTAGGTGTAAAATTTATTTTGGGGTTAAGGCTTCCCCCNCCA
 AATTTNTNAAAAAAAAAACTCN

Klon 44 → RPLP0

Referenz in NCBI-NM_001002.3

Klon 44

CGGCNCGCCTGGNGTCCCATACGACGTACCAGATTCGCTCATATG³¹GCCTGGAGG
 CCAGTGAATTCCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTAC **GACCGG**
A³²CATGTTGCTGGCCAATAAGGTGCCAGCTGCTGCCCCGTGCTGGTGCCATTGCC
 CATGTGAAGTCACTGTGCCAGCCCAGAACACTGGTCTCGGGCCCCGAGAAGACCTC
 CTTTTCCAGGCTTTAGGTATCACCCTAAAATCTCCAGGGGCACCATTGAAATCC
 TGAGTGATGTGCAGCTGATCAAGACTGGAGACAAAGTGGGAGCCAGCGAAGCCA
 CGCTGCTGAACATGCTCAACATCTCCCCCTTCTCCTTTGGGCTGGTCATCCAGCAG
 GTGTTGACAATGGCAGCATCTACAACCCTGAAGTGCTTGATATCACAGAGGAAA
 CTCTGCATTCTCGTTCTGGAGGGTGTCCCAATGTTGCCAGTGTCTGTCTGCAAAT
 TGGTACCCACTGTGGATTAGTCCCCATTTTATNTNAAGGGACNAACAATCTGGCC
 TTGTTTGGGGACCGATAAACTTCCCCTTGTGAAAAGGNAGGCCTT **TTGG**NGGNCA
 CCGCTT

³¹ *In vitro* Start site of pGADT7-Rec

³² Ende des Smart 3 Primers

die unterstrichenen Nukleotide zeigen die homologe Rekombinations *site* zwischen pGADT7-Rec und den SMART III oligos der cDNA

In rot werden hier aber Mutationen angezeigt → ursprünglich: GGCC GGG

Danksagung

Die Unterstützung der nachfolgend genannten Personen war ein wesentlicher Garant für ein effektives Arbeiten und Gelingen der Promotion.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med Albert Roessner (Direktor des Instituts für Pathologie an der Otto-v.-Guericke-Universität Magdeburg) meinen Dank aussprechen, für die Möglichkeit, unter seiner Leitung zu promovieren und sein reges Interesse am Verlauf der Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Sabine Krueger für ihre ausgezeichnete Betreuung sowie die Bereitschaft, ein Thema innerhalb ihres Forschungsauftrages zu bearbeiten. Weiterhin möchte ich meinen Dank für ihre tatkräftige Unterstützung, die konstruktiven Diskussionen und ihre menschliche Wärme zum Ausdruck bringen.

Frau Simone Staeck und Frau Hiltraud Scharfenort (DNA-Labor) bin ich für ihre tatkräftige Unterstützung dankbar. Sie hatten immer ein offenes Ohr für mich und waren stets bereit, mir zu helfen. Dabei kam der Spaß im Laboralltag nicht zu kurz.

Frau Kirsten Hermanns und Frau Doreen Medau danke ich für die positive Arbeitsatmosphäre und ihren Rückhalt. Immer konnte ich mich mit Fragen an sie wenden. Ihre Hilfsbereitschaft erleichterte mir oft den Laboralltag.

Für die gute Zusammenarbeit mit Frau Dr. Anja Bernhardt möchte ich meinen Dank ausdrücken. Die Diskussionen mit ihr bestärkten mich positiv.

Zu großem Dank bin ich Herrn Dr. Roland Hartig (Institut für Molekulare und Klinische Immunologie Magdeburg) für die Durchführungen der FACS-Analysen sowie das stundenlange Ausharren vor dem Laserscanmikroskop verpflichtet.

Frau Hella Wolf danke ich für ihren Beistand im Immunohistologischen-Labor.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie für die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Frau Kathrin Reißig sage ich Dank für ihre Verbundenheit und für die wunderbare gemeinsame Zeit während der Promotion.

Meinen Freunden gilt mein Dank aus tiefstem Herzen - besonders meinen Studienkollegen/innen aus Halle. Ohne sie wäre vieles nicht möglich gewesen.

Meinem Freund möchte ich für das immer wieder kehrende Herunterholen auf den Boden der Tatsachen danken. Er war mein Halt und Anker während dieser Zeit.

Die größte Dankbarkeit fühle ich für meine Eltern, die mich durch ihren bedingungslosen Rückhalt und ihre aufbauenden Worte stärkten.

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name	Anne Teller
Geburtsdatum	21.04.1984
Geburtsort	Magdeburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Anschrift	Tismarstraße 18, 39108 Magdeburg

Schulische Ausbildung

1990 - 1994	Grundschule Stormstraße in Magdeburg
1994 - 2003	Norbertusgymnasium in Magdeburg
März 2003	Abitur (1,8)

Hochschulausbildung

2003 - 2008	Studium der Biologie an der MLU Halle/Saale
Oktober 2007 - September 2008	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema „Charakterisierung des Zytoskeletumbaus in einer apoptose- resistenten kolorektalen HCT116 Zelllinie (Diplom bewertet mit der Note 1,4)
Oktober 2008	Beginn der Promotion innerhalb des GRK1197 an der Otto-v.-Guericke- Universität Magdeburg bei Frau Prof. Schneider-Stock Wechsel des Promotionsthemas, durch den Weggang von Frau Prof. Schneider-Stock nach Erlangen
Seit April 2009	Promotionsarbeit bei Herrn Prof. Dr. A. Roessner und Dr. S. Krueger am Institut für Pathologie der medizinischen Fakultät der Otto-v.-Guericke-Universität Magdeburg Thema: Identifikation von Interaktionspartnern des Cathepsin X und deren funktionelle Charakterisierung im Magenkarzinom

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation über die:

Identifikation von Interaktionspartnern des Cathepsin X und deren funktionelle Charakterisierung im Magenkarzinom

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Magdeburg, 28.05.2013

Anne Teller