Aus der Klinik für Neurologie

(Prof. Dr. med. M. Bähr)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Zur Rolle des Co-Chaperons BAG-1
im Glioblastoma-multiforme-Zellkulturmodell**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Michael Müther

aus

Haltern am See

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Kermer

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Stockhammer

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 01.08.2016

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
AK	Adenylatkinase
AMC	7-Amino-4-Methylcumarin
ATP	Adenosintriphosphat
BAG-1	Bcl-2 associated athanogene 1
BCA	Bicinochoninsäure
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
BSA	bovines Serumalbumin
CHIP	<i>C-terminus of Hsc70-interacting protein</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
g	Gramm, <i>gravity</i>
GBM	Glioblastoma multiforme
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)- Ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Hsc70	<i>heat shock cognate 70</i>
Hsp70	<i>heat shock protein 70</i>
IGEPAL	Octylphenoxypolyethoxyethanol
kDa	Kilodalton
LC3	<i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
mg	Milligramm
min.	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>

mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NGS	<i>normal goat serum (Ziegenserum)</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K-AKT-mTOR	<i>phosphatidylinositol-3-kinase - protein-kinase-b - mammalian target of rapamycin</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf-1	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma 1</i>
Ras-MAPK	<i>rat sarcoma - mitogen activated protein kinase</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Siah	<i>human homologue drosophila seven in absentia</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TP53	Tumorsuppressor 53
UBL	<i>ubiquitin-like domain</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WHO	World Health Organization
μg	Mikrogramm

INHALT

1 EINLEITUNG	8
1.1 Glioblastoma multiforme	8
1.1.1 Definition und Epidemiologie	8
1.1.2 Pathologie	8
1.1.3 Klinische Symptome und Diagnostik	9
1.1.4 Therapie und Prognose	10
1.2 BAG-1	11
1.2.1 BAG-Familie	11
1.2.2 BAG-1-Isoformen und zelluläre Verteilungsmuster	11
1.2.3 Interaktionspartner und Funktionen	13
1.2.3.1 Bcl-2	13
1.2.3.2 Hsp70	13
1.2.3.3 Raf-1	14
1.2.3.4 Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren	14
1.2.3.5 DNA und nukleäre Hormonrezeptoren	14
1.2.3.6 Autophagie und proteasomale Funktion	15
1.2.3.7 Zelldifferenzierung	16
1.3 BAG-1 in der Tumorgenese	17
1.4 BAG-1 in GBM	20
1.5 Fragestellung dieser Arbeit	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Chemikalien und Enzyme	22
2.2 Hergestellte Lösungen	23
2.3 Verbrauchsmaterialien	23
2.4 Geräte und Software	24
2.5 Antikörper	24
2.6 Etablierte Zelllinien	25
2.7 Zellkultur	25
2.7.1 Zellkulturmedien	25
2.7.2 Kultivierung	25
2.7.3 Passage	26
2.7.4 Quantifizierung der Zellen	26
2.7.5 Einfrieren und Auftauen der Zellen	26
2.8 Transiente Transfektion mit small interfering RNA	27
2.9 Proteinanalysen	28
2.9.1 Herstellung von Zelllysaten	28
2.9.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	28
2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	29
2.9.4 Western Blot	29

2.9.5 Immunodetektion von Proteinen	30
2.10 Bestimmung der Halbwertszeit von BAG-1-Protein	31
2.11 Subzelluläre Fraktionierungen	31
2.12 Immunzytochemie	31
2.13 Erstellung von Wachstumskurven	32
2.14 Kombination aus WST-1-Assay und ToxiLight® BioAssay	33
2.15 Zellzyklusbestimmung mithilfe der Durchflusszytometrie	34
2.16 Messung der Autophagie	35
2.17 Proteasomenaktivitätsmessungen	36
2.18 Bestrahlung der Zelllinien und Colony Forming Assay	36
 3 ERGEBNISSE	 37
3.1 Quantitative Exploration von BAG-1 im GBM-Zellkulturmodell	37
3.1.1 BAG-1 Isoformen	37
3.1.2 Subzelluläre Verteilung der BAG-1-Isoformen	38
3.1.3 Immunzytochemische Darstellung von BAG-1 in G112	40
3.1.4 Bestimmung der Halbwertszeit von BAG-1-Isoformen	42
3.2 Reduktion der BAG-1-Expression durch RNA-Interferenz	43
3.3 Einfluss von BAG-1 siRNA-Transfektion auf die Proliferation von GBM-Zelllinien	45
3.3.1 Proliferation unter Normalbedingungen und unter Serumentzug	45
3.3.2 Proliferation unter gleichzeitiger Berücksichtigung von Zytolyse	47
3.4 Einfluss von BAG-1 siRNA-Transfektion auf den Zellzyklus von GBM-Zelllinien	49
3.5 Einfluss von BAG-1 siRNA-Transfektion auf Mechanismen der Proteindegradation	51
3.5.1 Makroautophagie	51
3.5.2 Proteasomale Funktion	53
3.6 Einfluss von BAG-1 siRNA-Transfektion auf die Radiosensitivität von GBM-Zelllinien	55
 4. DISKUSSION	 56
4.1 Expression von BAG-1 im GBM-Zellkulturmodell	56
4.1.1 Isoformen und deren Halbwertszeiten	56
4.1.2 Subzelluläre Verteilung	57
4.2 Experimentelle Reduktion der BAG-1-Expression durch RNA-Interferenz	59
4.3 Einfluss von BAG-1 auf Proliferation und Zelltod im GBM-Zellkulturmodell	60
4.4 Einfluss von BAG-1 auf Mechanismen der Proteindegradation im GBM-Zellkulturmodell	63
4.5 BAG-1 und Radiosensitivität	64
4.6 Ausblick	65

5. ZUSAMMENFASSUNG	67
6. LITERATURVERZEICHNIS	68

1 EINLEITUNG

1.1 Glioblastoma multiforme

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das GBM zählt nach der Klassifikation der WHO zu den bösartigsten und epidemiologisch häufigsten hirneigenen Tumoren des erwachsenen Menschen.

Ionisierende Strahlung ist der einzige gesicherte Risikofaktor. Einige genetische Syndrome prädisponieren für die Entstehung eines GBM (Preston-Martin 1996). Ansonsten haben Prävention oder Früherkennung keinen Stellenwert.

Man geht von einem jährlichen Neuauftreten von drei bis vier Fällen pro 100.000 Einwohner aus. Der Haupterkrankungsgipfel liegt in der sechsten bis siebten Lebensdekade für neu (de novo) entstandene GBM. Darüber hinaus unterscheidet man sekundäre, d.h. aus weniger bösartigen Hirntumoren entstandene GBM, die früher auftreten können.

Bei Kindern und Jugendlichen sind seltene Fälle von GBM beschrieben worden (DeAngelis 2001; DGN 2012; Louis et al. 2007).

1.1.2 Pathologie

Es handelt sich um eine Entartung und unkontrollierte Neubildung neuro-epithelialer Zellen aus der astrozytären Zellreihe, die vor allem im Bereich der weißen Substanz der Großhirnhälften auftritt. Vielfältige histopathologische Charakteristika des Tumors wie Gefäßneubildungen, arterio-venöse Fistelbildungen, Thrombosen, Blutungen oder zentrale Nekrosen haben zu der Bezeichnung Glioblastoma multiforme geführt (Louis et al. 2007). Darüber hinaus wird diskutiert, ob ein GBM auch aus im Tumor enthaltenen neuro-ektodermalen Stammzellen entstehen kann (Galli et al. 2004; Singh et al. 2004). Die Eigenschaften dieser Tumorstammzellen werden für Resistenzen gegenüber Chemo- und Strahlentherapien verantwortlich gemacht (Bao et al. 2006; Dean et al. 2005).

Für das Wachstum von GBM werden vor allem genetische Veränderungen verantwortlich gemacht. Diese wirken sich über komplexe molekulare Veränderungen auf das Tumorstadium begünstigende Signalwege wie PI3K-AKT-mTOR oder Ras-MAPK aus. Dadurch kommt es unter anderem zum Kontrollverlust des Zellzyklus und

Tumorzellinvasion in umliegendes Gewebe. Einige der molekularen Veränderungen spielen bereits wegen ihrer klinischen Bedeutsamkeit eine wichtige Rolle in Diagnostik und Prognosebestimmung.

Häufig sind Mutationen des PTEN-Tumorsuppressorgens, welche in etwa 20% der Fälle von GBM beobachtet wurden. Das Resultat ist ein weniger funktionsfähiges Genprodukt, was mit einer vergleichsweise schlechteren Prognose einhergeht (Duerr et al. 1998).

Das TP53-Tumorsuppressorgen ist häufiger bei sekundären GBM mutiert (Louis 1994). De novo entstandene GBM zeigen in einem Drittel der Fälle Amplifikationen von Genabschnitten des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Onkogens, ein Beispiel für bei GBM häufig beobachtete Überexpressionen von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (Fuller und Bigner 1992). Die Veränderungen bei primären und sekundären GBM weisen auf unterschiedliche Entstehungsmechanismen hin.

Mutationen in Genen für die Enzyme Isocitratdehydrogenase 1 und 2 (IDH-1 und IDH-2), die deren biochemische Aktivität herabsetzen, wirken sich positiv auf die Prognose aus (Yan et al. 2009).

Die Methyl-Guanin-Methyltransferase (MGMT) ist ein DNA-Reparaturenzym. In 45% der Fälle von GBM ist der Promotor des MGMT-Gens im Tumorgewebe methyliert und das Gen wird nicht abgelesen. Unter der Behandlung mit alkylierenden Chemotherapeutika ergibt sich dadurch eine bessere Prognose (Hegi et al. 2005).

In der Zusammenschau häufiger molekularer Veränderungen konnten kürzlich vier Subtypen von GBM identifiziert werden, welche sich in ihrem Ansprechen auf Chemo- und Strahlentherapie unterscheiden (Verhaak et al. 2010).

1.1.3 Klinische Symptome und Diagnostik

Erste Symptome dieses vergleichsweise schnell wachsenden Hirntumors sind oft psychopathologische Veränderungen, epileptische Anfälle und im weiteren Verlauf Zeichen erhöhten Hirndrucks durch verdrängendes Wachstum. Erhöhter Hirndruck äußert sich anfangs in Kopfschmerzen, später in Übelkeit, Erbrechen und Schwindel. Je nach Lokalisation des Tumorwachstums entstehen darüber hinaus fokalneurologische Symptome wie Lähmungen, Sprach-/Sprechstörungen oder Sehstörungen.

Im Rahmen der Diagnosestellung ist die bildgebende Diagnostik mittels Magnetresonanztomographie das Mittel der Wahl. Charakteristische Befunde erhärten den Verdacht und machen die pathologische Untersuchung von Tumorgewebe zur definitiven Diagnosesicherung notwendig.

Aufgrund der oben beschriebenen häufigen molekularen Veränderungen ist die genaue Untersuchung entnommenen Gewebes neben der Diagnosestellung auch hinsichtlich der Prognose- und weiterer Therapiefestlegung unverzichtbar.

1.1.4 Therapie und Prognose

Die Therapie beschränkt sich gemäß aktueller Leitlinien auf drei Komponenten (DGN 2012). Bestenfalls erfolgt eine chirurgische Reduktion der Tumormasse unter Beachtung der Integrität von Hirnnachbarstrukturen. Anhand des entfernten Tumormaterials erfolgt die Diagnosesicherung mittels pathologischer Aufarbeitung. Falls der Tumor wichtige Strukturen der Hirnfunktion wie z.B. der Sprache einschließt oder andere Gründe gegen eine offene Operation vorliegen, erfolgt lediglich die Entnahme einer kleinen Tumorprobe (sog. stereotaktische Biopsie).

Nach pathologischer Diagnosesicherung schließt sich eine Kombination aus Chemotherapie mit dem Zytostatikum Temozolomid und einer fraktionierten Strahlentherapie des Tumors an (Stupp et al. 2005).

Sollte es zu einem Wiederauftreten der Erkrankung kommen, stehen in Deutschland aktuell wiederum das Chemotherapeutikum Temozolomid oder die Kombinationschemotherapie mit den Substanzen Procarbazin, Lomustin (Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea, CCNU) und Vincristin (sog. PCV-Schema) als Rezidivtherapien zur Verfügung. Eine erneute Operation sollte in Betracht gezogen werden. Die Behandlung mit anti-angiogenen Substanzen wie Bevacizumab ist in einigen Ländern bereits zugelassen. Weitere molekulare Therapien befinden sich in Erprobung (DGN 2012).

Die mittlere Überlebenszeit beträgt unter Ausschöpfung der derzeitig verfügbaren Therapiemöglichkeiten 14,6 Monate (Stupp et al. 2005). Eine letztendliche Heilung konnte bisher nicht erzielt werden.

1.2 BAG-1

1.2.1 BAG-Familie

Das untersuchte Protein BAG-1 ist erstentdecktes Mitglied in der Familie der BAG-Proteine (Takayama et al. 1995). Das Akronym BAG steht für *bcl-2 associated athanogene* und bezieht sich auf den erstbeschriebenen Interaktionspartner Bcl-2. In Säugetieren sind sechs verschiedene Mitglieder der Proteingruppe bekannt (BAG-1 – BAG-6). Diese Proteine eint die molekulare Unterstützerfunktion der Chaperone, sie werden demnach als Co-Chaperone bezeichnet. Chaperone helfen, die Struktur durch verschiedene Einflüsse fehlgefalteter Proteine wiederherzustellen. Viele Chaperone sind auch als Hitzeschockproteine beziehungsweise *heat shock proteins* bekannt.

Auf molekularer Ebene eint alle BAG-Proteine die sich im Bereich des C-terminalen Abschnitts der Polypeptidkette befindliche phylogenetisch hoch konservierte BAG-Domäne. Diese ermöglicht die Interaktion mit Proteinen der Hsp-70-Familie (Takayama et al. 1999). Zum N-terminalen Abschnitt hin unterscheiden sich die Proteine in Länge und weiteren Domänen. BAG-1 und BAG-6 beispielsweise weisen hier eine *ubiquitin-like* (UBL)-Domäne auf. Es wird vermutet, dass die Proteine der BAG-Familie als Bindeglieder zwischen den Chaperonen der Hsp-70-Familie und deren Substraten fungieren (Takayama und Reed 2001). Neben der Bedeutung als direkte Partnerproteine der Chaperone haben die einzelnen Mitglieder der BAG-Familie eine Vielzahl weiterer Interaktionspartner.

1.2.2 BAG-1-Isoformen und zelluläre Verteilungsmuster

Das Gen für BAG-1 ist auf dem Abschnitt 12 des langen Arms von Chromosom 9 lokalisiert. Aus einem einzigen mRNA-Abschnitt werden von verschiedenen Start-Codons vier Isoformen (Abbildung 1.1) translatiert (Yang et al. 1998). Alle besitzen eine C-terminale BAG-Domäne und eine N-terminale UBL-Domäne, die Länge und weiteren Eigenschaften des N-terminalen Abschnitts sind jedoch unterschiedlich. BAG-1 L ist mit einer molekularen Masse von 50 kDa die längste Isoform. Darüber hinaus besitzt BAG-1 L eine *nuclear localization sequence* (NLS), die den post-

translationalen Ortswechsel aus dem Zytosol in den Zellkern festlegt. Das Protein ist damit vorwiegend im Zellkern zu finden.

Darüber hinaus unterscheidet man die kürzeren Isoformen BAG-1 M (46 kDa), BAG-1 S (36 kDa) und BAG-1 (29 kDa). Diese sind fast ausschließlich im Zytosol lokalisiert. BAG-1 M ist anteilig zwischen Zellkern und Zytoplasma verteilt (Takayama et al. 1998).

Unter Bedingungen von Zellstress kann es jedoch zu einer Umverteilung der Isoformen kommen. BAG-1 M wechselt dann in eine vorwiegend nukleäre Verteilung (Zeiner et al. 1999). Vermutlich geschieht dies über Bindung an Interaktionspartner, die ihren Ort wechseln (Matsuzawa et al. 1998).

Je nach Zellkompartiment kommen verschiedene Interaktionspartner in Betracht. Isoformen, die vorwiegend in einem Zellkompartiment auftreten, interagieren demnach vorwiegend mit sich dort befindlichen Molekülen. Es bleibt unklar, ob alle Isoformen in gleicher Weise an die bekannten Interaktionspartner binden. Für einige Interaktionspartner wurden gegensätzliche Einflüsse bestimmter Isoformen beschrieben (Luders et al. 2000b).

Die Mengenverhältnisse, in denen die einzelnen Isoformen zueinander stehen, sind gewebeabhängig. Vermutlich nehmen bisher unbekannte Faktoren Einfluss auf die Translation der vier verschiedenen Start-Codons (Takayama et al. 1998).

Abbildung 1.1 BAG-1-Isoformen, Proteindomänen und Molekulargewichte; modifiziert nach Cutress et al. 2002. NLS, *nuclear localization sequence*; ULD, *ubiquitin-like domain*. BAG-1 (29 kDa) nicht abgebildet.

1.2.3 Interaktionspartner und Funktionen

1.2.3.1 Bcl-2

Erstbeschriebener Interaktionspartner von BAG-1 ist Bcl-2, ein anti-apoptotisch wirkendes und an das Mitochondrium assoziiertes Protein. Apoptose ist Hauptmechanismus der Zellelimination im Menschen. Durch externe oder interne Stimuli angeregt, vermitteln verschiedene Reaktionsabfolgen schließlich die Fragmentation der Zelle zu apoptotischen Körperchen, welche von Nachbarzellen oder spezialisierten Fresszellen verwertet werden.

Es wird vermutet, dass BAG-1 gemeinsam mit Hsp70 die Funktion von Bcl-2 beeinflusst und so eine stärkere Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli vermittelt (Takayama et al. 1997). Unabhängig davon kann Bcl-2 auch Einfluss auf die Kontrolle des Zellteilungszyklus nehmen und einen Zellzyklusarrest vermitteln (Huang et al. 1997).

1.2.3.2 Hsp70

Die Chaperone der Hsp70-Familie besitzen eine Domäne zur Bindung von umzusetzenden Substraten und eine ATPase-Domäne, die Substratbindung und –freisetzung reguliert. BAG-1 interagiert mit letzterer und kann so die Chaperon-Funktion beeinflussen (Hohfeld 1998). Im Zusammenspiel mit anderen regulatorischen Co-Chaperonen kann BAG-1 die Hsp70-Aktivität herabsetzen (Nollen et al. 2001). Dies gilt aber vor allem für die BAG-1 M-Isoform. BAG-1 S hingegen zeigt einen entgegengesetzten Effekt (Luders et al. 2000b).

In einem BAG-1 überexprimierenden Mausmodell konnten erhöhte Mengen von Hsc70-Protein, nicht aber Hsc70-mRNA nachgewiesen werden. Hsc70 ist ein Mitglied der Hsp70-Familie. Dieser anscheinend post-transkriptionelle Effekt auf die Expression von Hsp70-Chaperonen wird für neuro-protective Effekte von BAG-1 verantwortlich gemacht (Kermer et al. 2003). Dies gilt vor allem für die Expression von BAG-1 Isoformen im Zytosol (Liman et al. 2008).

BAG-1 kann Chaperone mit einer Vielzahl weiterer Moleküle in Berührung bringen und so einen Beitrag zur Kontrolle des Zellwachstums leisten (Takayama und Reed 2001).

Es ist nicht abschließend geklärt, wie viele der bisher beschriebenen BAG-1-Interaktionen nicht indirekt über Hsp70 vermittelt werden (Hohfeld 1998).

1.2.3.3 Raf-1

Raf-1 ist wesentlicher Bestandteil des Ras-MAPK-Signalwegs, der die Zellproliferation begünstigt. Zum Anfang der Signalkaskade steht normalerweise das Protein Ras. BAG-1 ist in der Lage, unabhängig von Ras auf Raf-1 und damit stimulatorisch auf diesen Signalweg zu wirken (Song et al. 2001).

Nahe der BAG-Domäne kann Raf-1 an BAG-1 binden und damit in Konkurrenz zur Bindung von Hsp70 stehen. Unter Bedingungen von Zellstress mit konsekutiver Überexpression von Hsp70 werden so BAG-1/Raf-1-Komplexe von BAG-1/Hsp70-Komplexen verdrängt. Daraus resultiert eine verringerte Aktivität im Ras-MAPK-Signalweg und eine Reduktion der Zellproliferation. BAG-1 kann hier als molekularer Schalter zwischen ungünstigen Wachstumsbedingungen wie Zellstress und günstigen Wachstumsbedingungen gesehen werden (Song et al. 2001).

1.2.3.4 Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren

BAG-1 bindet an die zytosolische Seite von transmembranösen Rezeptoren vom Tyrosinkinase-Typ der Wachstumsfaktoren HGF (*hepatocyte growth factor*) und PDGF (*platelet derived growth factor*). Eine Interaktion mit diesen Rezeptoren erhöht die Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli (Bardelli et al. 1996).

1.2.3.5 DNA und nukleäre Hormonrezeptoren

Für BAG-1 L und BAG-1 M wurden Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren und auch direkt mit der DNA im Zellkern beschrieben (Niyaz et al. 2001; Takahashi et al. 2001). Es bestehen Assoziationen zu nukleären Steroidhormon- und Retinsäurerezeptoren. Vermutlich wird dies über sich wiederholende Sequenzen saurer Aminosäuren in der BAG-1-Polypeptidkette vermittelt (Demand et al. 2001; Schneikert et al. 1999). Eine Vermittlerfunktion der Hsp70-Familie ist aber auch hier nicht ausgeschlossen (Hohfeld 1998). BAG-1 kann auf diesen Wegen direkten Einfluss auf die Expression verschiedener Gene nehmen.

Interaktionen mit dem Vitamin-D-Rezeptor führen zu verminderter Vitamin-D-induzierter Apoptose (Witcher et al. 2001). Die Wirkung auf den Retinsäure-Rezeptor unterdrückt eine Retinsäure-vermittelte Apoptose (Liu et al. 1998).

1.2.3.6 Autophagie und proteasomale Funktion

Wege der Proteindegradation wie Autophagie und proteasomale Funktion spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Durch verschiedene Einflüsse beschädigte oder fehlgefaltete Proteine können so beseitigt werden. Die genauen Mechanismen dieser Qualitätskontrolle zellulärer Proteine sind weitestgehend unklar.

Man unterscheidet drei Formen der Autophagie. Die Makroautophagie stellt eine unspezifische Form der Autophagie dar. Das zu degradierende Substrat wird in Doppelmembranen eingeschlossen. Das sich dadurch formierte sog. Autophagosom verschmilzt dann mit der Membran des Lysosoms, ein viele Verdauungsenzyme enthaltendes Zellorganell. Mikroautophagie ist ein ähnlicher Prozess, bei dem das Substrat direkt in das Lysosom übertritt (Mizushima et al. 2008). Die Chaperon-vermittelte Autophagie funktioniert als selektiver Weg der Proteindegradation. Ein Zusammenspiel von Chaperonen der Hsp70 Familie und Co-Chaperonen wie BAG-1 bindet ausgewählte Substrate. Nach Interaktion mit bestimmten Rezeptoren in der Membran des Lysosoms erfolgt die Autophagie (Arias und Cuervo 2011). Der Autophagie werden verschiedene teilweise gegensätzliche Funktionen zugeordnet. Während ungünstiger Wachstumsbedingungen kann Autophagie im Sinne eines katabolen Mechanismus zelleigene Moleküle aufschließen und zur Energiebereitstellung beitragen. Zellen können so kurzfristig dem Zelltod entgehen (Meijer und Codogno 2004). In Situationen, in denen Mechanismen der Apoptose eingeschränkt sind, kann Autophagie den Zelltod initiieren (Gozuacik und Kimchi 2004). Die Autophagie könnte so unter bestimmten Bedingungen die Funktionen der Apoptose ergänzen (Yu et al. 2004).

In Herzmuskelzellen vermutet man eine Autophagie-stimulierende Funktion über die Assoziation von BAG-1 zu dem sich in der autophagosomalen Zellmembran befindlichen Protein LC3-II. In der Membran des Autophagosoms wurden außerdem große Mengen eines Hsp70-Proteins nachgewiesen. Man geht davon aus, dass

BAG-1 über Hsp70 geschädigte Proteine an die Autophagosomen heranführt (Gurusamy et al. 2009a; Gurusamy et al. 2009b). Der BAG-1-vermittelten Autophagie wird in diesem Zusammenhang eine kardio-protective Wirkung zugeschrieben.

Neben dem System der Autophagie stellt die proteasomale Funktion einen nicht-lysosomalen Weg zur Degradation von Proteinen dar. Vor Verwertung über das proteasomale System bedarf es einer Ubiquitinierung und damit Markierung des entsprechenden Substrats. Man spricht auch vom Ubiquitin-Proteasom-System. In einem mehrschrittigen Prozess katalysieren drei Gruppen von Enzymen (E1-E3) zunehmend selektiv die Übertragung des Proteins Ubiquitin auf das Substrat. BAG-1 interagiert mit den E3-Ligasen CHIP und Siah-1 und stimuliert so die Ubiquitinierung proteasomaler Substrate (Demand et al. 2001). Das Proteasom ist ein aus Untereinheiten zusammengesetztes Zellorganell, das durch Aktivität verschiedener Peptidasen die Degradation von Polypeptidketten katalysiert (Kisselev et al. 1999).

BAG-1 interagiert auch direkt mit dem Proteasom, die BAG-1-ULD-Domäne scheint dafür von Bedeutung zu sein (Demand et al. 2001; Luders et al. 2000a). Möglich ist die gleichzeitige Bindung an das Proteasom und Präsentation von an Hsp70 gebundene Substratproteine aus Zytosol oder Zellkern (Kriegenburg et al. 2014; Luders et al. 2000a). BAG-1 kann so von Hsp70-vermittelter Wiederherstellung fehlgefalteter Proteine zu proteasomal vermittelter Proteindegradation umschalten (Demand et al. 2001).

Das Verhältnis von BAG-1 zu BAG-3 scheint den Schwerpunkt in der Degradation von Proteinen zwischen Makroautophagie und proteasomalen Vorgängen zu verschieben. Eine relative Abnahme der Expression von BAG-1, beispielsweise in alternden Zellen, geht mit gesteigerter Makroautophagie und verringerter proteasomaler Aktivität einher (Gamerding et al. 2009).

1.2.3.7 Zelldifferenzierung

In hämatopoietischen und neuronalen Vorläuferzellen scheint BAG-1 ein wichtiger Vermittler zwischen extrazellulären Signalen und zellulären Mechanismen zum Schutz vor Apoptose zu sein (Gotz et al. 2005). Die zytosolische Expression von BAG-1 ist essentiell für den anti-apoptotischen Effekt (Liman et al. 2008).

Während der neuronalen Zelldifferenzierung ist BAG-1 hauptsächlich im Bereich des Zellkerns zu finden. Nach Abschluss der Differenzierung sind wieder vorwiegend zytosolische Expressionsmuster zu beobachten (Kermer et al. 2002). Durch Bindung an Raf-1 unterstützt BAG-1 die zelluläre Differenzierung. Dies gilt vor allem für die Expression von BAG-1-Isoformen im Zytosol (Liman et al. 2008).

Es wird vermutet, dass auch die Interaktion mit nukleären Hormonrezeptoren für die neuronale Differenzierung von Bedeutung ist (Liman et al. 2008).

Je weiter der Differenzierungsgrad epidermaler Keratinozyten, desto überwiegender ist auch das Auftreten von BAG-1 im Zytosol (Takayama et al. 1998).

Transgene BAG-1-*knock-out*-Mäuse sterben während der Embryogenese (Kermer et al. 2003).

Abbildung 1.2 Zusammenschau direkter BAG-1-Interaktionspartner.

1.3 BAG-1 in der Tumorgenese

In vielen Tumoren wird eine Überexpression von BAG-1 beobachtet (Takayama et al. 1998). Bereits in Vorstufen des Colon-Karzinoms werden erhöhte Expressionsmuster beschrieben (Clemo et al. 2008). In einer Arbeit zur Expression von BAG-1 in 67 humanen Tumorzelllinien ist BAG-1 S in den meisten Fällen die häufigste Isoform.

Die Expression der längeren Isoformen BAG-1 L und BAG-1 M war hingegen deutlich unterschiedlich (Takayama et al. 1998).

BAG-1 nimmt über komplexe und zahlreiche Mechanismen Einfluss auf entscheidende Tumorcharakteristika wie Proliferation, Resistenz gegenüber Apoptose und Migration. Erstbeschriebener Interaktionspartner von BAG-1 ist Bcl-2, ein anti-apoptotisches Protein (Takayama et al. 1995). Reduzierte Empfindlichkeit gegenüber apoptotischen Stimuli zählt zu den Eigenschaften neoplastischer Zellen und wird für deren Resistenzen gegenüber Strahlen- und Chemotherapie verantwortlich gemacht. In Zellen des Cervix-Karzinoms wirken sich die BAG-1-Isoformen unterschiedlich auf die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika aus (Chen et al. 2002).

Ein Bcl-2-vermittelter Zellzyklusarrest könnte Tumorzellen helfen, ungünstige Bedingungen wie Hypoxie im Tumor zu überdauern (Roth et al. 2000). Experimentelle BAG-1-Überexpression konnte eine murine Lymphoblastomzelllinie von ihrer Abhängigkeit gegenüber Interleukin-3 befreien (Clevenger et al. 1997).

Durch Zellstress ausgelöste Akkumulation des Tumorsuppressors p53 führt zu einem Zellzyklusarrest und kann Apoptose auslösen. BAG-1 vermindert teilweise die durch p53 vermittelte Reduktion des Tumorzellwachstums. Vermutlich spielt dabei das Protein Siah-1 eine entscheidende Rolle (Matsuzawa et al. 1998). Darüber hinaus wurde eine inhibierende Wirkung von BAG-1 S auf p73 beschrieben. P73 ist ein Protein aus der Gruppe der p53-Tumorsuppressoren (Wang et al. 2009).

BAG-1 beeinflusst das Ubiquitin-Proteasom-System. Durch Zellstress wie Bestrahlung oder Chemotherapie veränderte Proteine können durch die proteasomale Funktion beseitigt werden. Zellstresssignale und apoptotische Stimuli werden so abgeschwächt. Proteasom-Inhibitoren finden bereits Anwendung in der Behandlung des Multiplen Myeloms.

Interaktionen mit proliferativen Signalwegen wie Ras-MAPK spielen eine große Rolle in der Tumorgenese. Eigenschaften wie Metastasierung und Tumorzellmigration scheinen ebenfalls durch BAG-1 beeinflusst zu werden. Experimentell herbeigeführte BAG-1-Überexpression kann das Potential zur lokalen Metastasierung in einem Mausmodell des Magenkarzinoms erhöhen (Yawata et al. 1998). Eine andere Arbeit

berichtet von häufiger vorhandenen Lymphknotenmetastasen bei positiver BAG-1-Expression (Shindoh et al. 2000).

Der Einfluss auf verschiedene Hormonrezeptoren im Zellkern ist vor allem für hormonabhängige Tumoren von Bedeutung. Für das Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass BAG-1 die Funktion Androgenrezeptor-tragender Zellen verändert und die Empfindlichkeit gegenüber anti-androgenen Therapeutika reduziert (Froesch et al. 1998).

BAG-1 scheint sich auf die Aktivität von NF- κ B in Colon-Karzinomzellen auszuwirken. Erhöhte BAG-1-Expression geht mit erhöhter Aktivität dieses mit der Tumorprogression korrelierenden Transkriptionsfaktors einher (Clemo et al. 2008).

Ob BAG-1 sich günstig auf die klinische Prognose einer Tumorerkrankung auswirkt, scheint von der Art des Tumors abzuhängen. Die beschriebenen molekularbiologischen Interaktionen deuten auf experimenteller Ebene jedenfalls auf einen das Tumorwachstum begünstigenden Einfluss hin. Korrelationen mit klinischen Daten weisen teilweise in eine andere Richtung. Schließlich konnte auch dem anfangs ausschließlich als anti-apoptotisch verstandenen Bcl-2 eine prognostisch günstige Bedeutung im Pankreaskarzinom zugeschrieben werden (Nio et al. 2001).

Bis jetzt sind hauptsächlich immunhistochemische Untersuchungen mit klinischen Daten korreliert worden. Einige Arbeiten gehen dabei von einem Zusammenhang zwischen subzellulärer Distribution von BAG-1 und Prognose der Tumorerkrankung aus. Immunhistochemisch vorwiegend zytosolisch verteiltes BAG-1 scheint, im Vergleich zu einer nukleären Verteilung, eine bessere klinische Prognose voraussagen zu können. Bei Patientinnen in frühen Stadien des Mamma-Karzinoms zeigte sich beispielsweise eine Korrelation zwischen zytosolischer Expression von BAG-1 und längerem Überleben (Turner et al. 2001). Eine Arbeit zum nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom weist in dieselbe Richtung (Rorke et al. 2001). Nukleäre Expression in Proben des Leberzellkarzinoms gehen mit einer signifikant schlechteren Prognose einher (Ni et al. 2013). In Untersuchungen zum Pankreaskopf-Karzinom korreliert eine vorwiegend nukleäre Expression hingegen mit einer besseren Prognose nach Tumorentfernung (van der Zee et al. 2013).

Analysen der BAG-1-mRNA bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom unter platinbasierter Chemotherapie haben ein signifikant längeres

Gesamtüberleben bei negativer BAG-1-Gesamtexpression gezeigt (Leng et al. 2012). Experimentelle Reduktion der BAG-1-mRNA führte sogar zu einer Sensibilisierung gegenüber einer Chemotherapie mit Cisplatin. Es kam zu einer Deregulation von für den apoptotischen Zelltod relevanten Molekülen (Liu et al. 2010).

Hingegen desensibilisiert die experimentelle Reduktion von BAG-1-Protein gegenüber Strahlentherapie in einem Modell für das Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus (Yoshino et al. 2011).

Genannte Beispiele und Unterschiede hinsichtlich der Bedeutung von BAG-1 in der Tumorgenese weisen darauf hin, dass BAG-1 je nach Entität der Neoplasie vorwiegend mit ausgewählten Partnerproteinen interagiert (Cutress et al. 2002). Auch unterschiedliche post-translationale Modifikationen wie Ubiquitinierungen oder Phosphorylierungen sind möglich und können die BAG-1-Funktion individuell verändern (Cato und Mink 2001; Sourisseau et al. 2001).

Fasst man zusammen, so spielt BAG-1 durch seinen Einfluss auf zahlreiche zelluläre Signalwege und Vorgänge eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums. Unter expliziter Beachtung der jeweiligen Entität der Neoplasie könnte BAG-1 als Tumormarker prognostische Bedeutung erlangen (Cutress et al. 2002).

1.4 BAG-1 in GBM

Auch für GBM werden starke BAG-1-Expressionsmuster in verschiedenen etablierten Zelllinien und primären Biopsaten beschrieben (Roth et al. 2000; Takayama et al. 1998).

Eine Untersuchung von 29 Biopsaten hat keine Korrelation zwischen immunhistochemischer BAG-1-Expression und Gesamtüberleben zeigen können. Allerdings hat diese Studie neben GBM auch eine unbekannte Anzahl anaplastischer Astrozytome eingeschlossen (Batistatou et al. 2006).

Zur genaueren Bedeutung von BAG-1 in GBM ist im Wesentlichen erst eine Arbeit veröffentlicht worden. Dabei konnte bei 19 untersuchten Patienten keine Korrelation zwischen immunhistochemischer BAG-1-Darstellung und klinischen Überlebensdaten gezeigt werden.

Experimentell wurde murines BAG-1 mithilfe von Expressionsvektoren in zwei GBM Zelllinien überexprimiert. Dabei kam es zu einer signifikanten Reduktion von Wachstum und Klonogenität in BAG-1-überexprimierenden Zellen. Bei gleichzeitiger Co-Expression von Bcl-2 war der Effekt wieder aufgehoben. In ein Mausmodell implantierte BAG-1-transfizierte GBM-Zellen zeigten im Vergleich jedoch keine signifikante Wachstumsreduktion. Unter Serum-Deprivation, einer für Tumorzellen ungünstigen Bedingung, stellt die gleichzeitige Expression von BAG-1 und Bcl-2 einen deutlichen Wachstumsvorteil dar. BAG-1 scheint in diesem Zusammenhang einen Bcl-2-vermittelten Zellzyklusarrest zu unterbinden. Unter Anwesenheit verschiedener Chemotherapeutika konnte BAG-1 auch wieder nur in Gegenwart von Bcl-2 einen Wachstumsvorteil zeigen (Roth et al. 2000).

In einer GBM Zelllinie hat BAG-1 L Überexpression zu einer Steigerung der Wachstumsrate und Funktionsstörung des nukleären Vitamin-D Rezeptors geführt (Witcher et al. 2001).

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Für Entstehung und Wachstum von GBM werden verschiedene molekulare Veränderungen verantwortlich gemacht. Es ist notwendig, ein möglichst detailliertes Bild wichtiger molekularer Pathologien zu zeichnen, um zukünftig zielgerichtete und individualisierte Therapien ermöglichen zu können. Für BAG-1 sind Interaktionspartner beschrieben worden, die auf vielfältige Weise Zellfunktionen beeinflussen. Zur Bedeutung von BAG-1 in GBM ist wenig bekannt. Bereits beschriebene Erkenntnisse sind mit experimenteller Überexpression gewonnen worden. Diese Zusammenhänge sollen mit einer methodisch andersartigen Herangehensweise überprüft werden. Die genauere Betrachtung von proteasomalen Vorgängen und Autophagie bildet einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit. Zum Einfluss von BAG-1 auf diese Zellfunktionen in GBM liegen bisher keine Erkenntnisse vor.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalie oder Enzym	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aprotinin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bafilomycin A1	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
BCA-Assay	Pierce, Bonn, Deutschland
BOC-LAA-AMC	Peptide Institute, Osaka, Japan
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Pierce, Bonn, Deutschland
CHAPS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cycloheximide	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
DAPI	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dinatrium-EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Life Techn., Darmstadt, Deutschland
DMSO	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Glutaraldehyd	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HEPES	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
IGEPAL	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
MEM	Life Techn., Darmstadt, Deutschland
MG132	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Moviol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NGS	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Nonidet P-40	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Opti-MEM	Life Techn., Darmstadt, Deutschland
PageRuler	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
PBS-Pulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Penicillin	PAA, Cölbe, Deutschland
PFA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMSF	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Propidiumiodid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Proteinase Inhibitor	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Rapamycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Rinder-Fibronectin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Rotiphorese Gel (30 %)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ToxiLight® BioAssay Kit	Cambrex, Rockland, ME, USA
Tris-Chlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton-X 100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tween	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
WST-1	Roche, Mannheim, Deutschland
Z-LLE-AMC	BostonBiochem, Cambridge, MA, USA
Z-LLL-AMC	BostonBiochem, Cambridge, MA, USA

Tabelle 2.1 Chemikalien und Enzyme

2.2 Hergestellte Lösungen

Lösung	Herstellung
0,25 % Trypsin	25 mg Trypsin in 10 ml EDTA
BCA-Farblösung	2 % Reagenz B in 98 % Reagenz A
Blocking Solution	5 % Magermilchpulver in TBS-T
BSA Standardprotein Stocklösung	10 µg/µl BSA in Lysepuffer
DAPI Lösung	2 µg/ml DAPI in PBS
ECL	Lösung I: 2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Coumarsäure, 0,1 M Tris-Chlorid in H ₂ O dest; pH 8.5
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris-Chlorid, 192 mM Glycin, 0,1 % H ₂ O dest; pH 8.3
Glycin/SDS	0,2 M Glycin, 0,5 % SDS in PBS
HKME-Puffer	10 mM HEPES, pH 7,2, 142 mM Kaliumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid, 1 mM EGTA in H ₂ O dest.
Hypotoner Lysepuffer	5 ml HKME-Puffer, 200 µl Proteinase-Inhibitor, 50 µl IGEPAL
Kristallviolett-Lösung	0,5 g Kristallviolett in 5 ml Ethanol, aufgefüllt auf 500 ml H ₂ O dest. Lösung II: 18 % H ₂ O ₂ , 0,1 M Tris-Chlorid in H ₂ O dest.; pH 8.5
Lysepuffer	20 µl Proteinase-Inhibitor in 1 ml RIPA-Puffer
PBS	9,55 g PBS Pulver in 1000 ml H ₂ O dest.; steril filtriert
Proteinase-Inhibitor Stocklösung	2 Tabletten in 840 µl H ₂ O dest.
RIPA-Puffer	20 mM Tris-Chlorid (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS in H ₂ O dest.
Sammelgel für Western Blot (5 %)	0,68 ml purifiziertes H ₂ O, 0,17 ml Rotiphorese Gel, 0,13 ml 1 M Tris-Chlorid/SDS (4x, pH 6,8), 0,01 ml 10 % SDS, 0,01 ml 10 % Ammoniumperoxidsulfat, 0,001 ml TEMED (Angaben für 1 ml)
Substratpuffer für Proteasomenaktivitätsmessung	25 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM DTT, 0,1 % CHAPS, 0,5 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 20 µM eines fluorogenen Substrats (Z-LLL-AMC, Z-LLE-AMC, BOC-LAA-MCA)
TBE	84 mM Tris-Chlorid, 89 mM Borsäure, 2 mM Dinatrium-EDTA in H ₂ O dest.
TBS	150 mM NaCl, 10 mM Tris-Chlorid in H ₂ O dest.; pH 9.0
TBS-T	0,1 % Tween in TBS; pH 7.6
Transfer-Puffer	25 mM Tris-Chlorid, 192 mM Glycin, 20 % Methanol in H ₂ O dest.; pH 8.3
Trenngel für Western Blot (12 %)	1,6 ml purifiziertes H ₂ O, 2 ml 30 % Rotiphorese Gel, 1,3 ml 1,5 M Tris-Chlorid/SDS (4 x, pH 8,8), 0,05 ml 10 % SDS, 0,05 ml 10 % Ammoniumperoxidsulfat, 0,002 ml TEMED (Angaben für 5 ml)
Trenngel für Western Blot (15 %)	1,1 ml purifiziertes H ₂ O, 2,5 ml 30 % Rotiphorese Gel, 1,3 ml 1,5 M Tris-Chlorid/SDS (4 x, pH 8,8), 0,05 ml 10 % SDS, 0,05 ml 10 % Ammoniumperoxidsulfat, 0,002 ml TEMED (Angaben für 5 ml)
TrisCl/SDS 4x pH 6.8	0,5 M Tris-Chlorid, 0,4 % SDS in H ₂ O dest.; pH 6,8
TrisCl/SDS 4x pH 8.8	1,5 M Tris-Chlorid, 0,4 % SDS in H ₂ O dest.; pH 8.8
Western Blot Ladepuffer (6 x)	Verwendung im Verhältnis 1:1 7 ml 4 x TrisCl/SDS (pH 6,8), 3 ml Glycerol, 1 g SDS, 0,93 g DTT, 1,2 mg Bromphenolblau
Zähllösung	40 % Trypanblau, 60 % PBS

Tabelle 2.2 Hergestellte Lösungen

2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Blotting-Papiere	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chemilumineszenzfilme, Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Combitips für Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einfriergefäß	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kavitätenplatten; 6, 24 und 96 Kavitäten; transparent	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
Kavitätenplatten; 96 Kavitäten; weiß	Nunc, Roskilde, Dänemark
Nitrocellulose PROTEAN®	Schleicher & Schüll Bioscience, Dassel, Deutschland
Objekträger	Waldemar Knittel, Braunschweig, Deutschland
Pipetten	Sarstedt, Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen, RNase-frei	Sarstedt, Sarstedt, Deutschland
PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reagenzgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reagenzgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
Zellkulturschalen rund, 10 cm	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland

Tabelle 2.3 Verbrauchsmaterialien

2.4 Geräte und Software

Gerät oder Software	Hersteller
8-Kanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Autoklav	Memmert, Schwabach, Deutschland
AxioVision Software Package	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Eismaschine, Scotman®	Frimont, Mailand, Italien
Elektrophoresekammer für Western Blot	BioRad, München, Deutschland
ELISA-Photometer Rainbow	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme, Crurix 60	Agfa, Düsseldorf, Deutschland
FACS Diva 6.1.3	BD Biosciences, Burlington, NC, USA
Flow-Zytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Burlington, NC, USA
Fluoreszenzmikroskop AxioVision	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau, Deutschland
Heizblock, ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ImageJ	open source
Inkubator für Zellkultur	Sanyo, Bad Nenndorf, Deutschland
Kühlschränke	Liebherr, Biberach, Deutschland
Luminometer Wallac 1450 Microbeta Trilux	PerkinElmer, Branford, CT, USA
Mikroskop ID 02	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer improved	Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland
pH-Meter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Photometer SpectraFluor Plus	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Pipetten	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Pipettierhilfe Accu Jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
PRISM	Graph Pad, CA, USA
Quantity One 4.2.1	BioRad, München, Deutschland
Röntgenstrahler Gulmay RS225 GS014	Gulmay Medical Ltd, Camberley, Surrey, Großbritannien
Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Sonicator	Bandelin, Berlin, Deutschland
Transferkammer für Western Blot	BioRad, München, Deutschland
Vortex, Mixer für Reagenzgefäße	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wallac 1450 MicroBeta Workstation	PerkinElmer, Branford, CT, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wasserreiniger Purelab Plus	ELGA, High Wycombe, Großbritannien
Zellkulturbank, Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zellkulturschrank	Panasonic Healthcare, Wood Dale, IL, USA
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.4 Geräte und Software

2.5 Antikörper

Antikörper und Verdünnung	Hersteller
<u>Primärantikörper</u>	
Anti-BAG-1; monoklonal, IgG, Maus; gegen humanes Epitop; 1:500	Imgenex, San Diego, CA, USA
Anti-BAG-1; polyklonal, IgG, Kaninchen; gegen humanes Epitop; 1:100	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA
Anti-LC3; monoklonal, IgG, Maus; gegen humanes Epitop; 1:300	nanoTools, Teningen, Deutschland
Anti-β-Tubulin; monoklonal, Maus; gegen humanes Epitop; 1:1000	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
<u>Sekundärantikörper</u>	
Anti-Kaninchen-HRP; IgG, Ziege; 1:2000	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA
Anti-Maus-HRP; IgG, Ziege; 1:2000	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA
Cy3 monoklonal (Maus) gegen Kaninchen-Epitop; 1:200	Life Techn., Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.5 Antikörper

2.6 Etablierte Zelllinien

Zelllinien G28, G112 und U87

Die aus humanen GBM-Tumoren abgeleiteten Zelllinien G28, G112 und U87G wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch die Neurochirurgische Klinik an der Universitätsmedizin Göttingen, Arbeitsgruppe für experimentelle Neuro-Onkologie (Kantelhardt et al. 2010).

Zelllinie U-251

Die humane Zelllinie U251 wurde aus GBM-Tumorgewebe eines männlichen kaukasischen Patienten gewonnen und kultiviert (Ponten und Macintyre 1968).

2.7 Zellkultur

2.7.1 Zellkulturmedien

Folgende Kulturmedien wurden auf Grundlage o.g. Chemikalien und Lösungen hergestellt:

Medium	Zusammensetzung
DMEM full	87 % DMEM, 10 % FCS, 1% Natrium-Pyruvat, 1% Penicillin+Streptomycin, 1% L-Glutamat
Einfriermedium	10% DMSO in FCS
MEM full	87 % MEM, 10 % FCS, 1% Natrium-Pyruvat, 1% Penicillin+Streptomycin, 1% L-Glutamat
MEM full, ohne Antibiotika	88 % MEM, 10 % FCS, 1% Natrium-Pyruvat, 1% L-Glutamat
MEM full, ohne Serum	97 % MEM, 1% Natrium-Pyruvat, 1% Penicillin+Streptomycin, 1% L-Glutamat

Tabelle 2.6 Zellkulturmedien

2.7.2 Kultivierung

Die Zelllinien werden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C in 10 cm Rundschalen kultiviert. Für die Zelllinien U251, G28 und G112 wird ein Zellkulturmedium auf MEM-Basis verwendet, für die Zelllinie U87G ein Zellkulturmedium auf DMEM-Basis.

2.7.3 Passage

Die Passage der Zellen findet unter möglichst sterilen Bedingungen statt. Nach Absaugen des Zellkulturmediums werden die am Boden der Rundschale adhärenen Zellen zweimal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen wird der Boden der Kulturschalen für 5 min mit 1 ml 1 % Trypsin benetzt. Anschließend werden die nun in 1 % Trypsin suspendierten Zellen zusammen mit 2 ml des entsprechenden Zellkulturmediums in ein Reagenzgefäß überführt. Es folgt eine Zentrifugation mit 1000 x g über 4 Minuten. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium suspendiert. Bei einem üblichen Passageverhältnis von 1:10 werden 100 µl der Zellsuspension und 8ml Kulturmedium in eine neuen 10 cm Rundschale hinzugegeben. Bis zur nächsten Passage erfolgt eine Inkubation über ca. vier Tage.

2.7.4 Quantifizierung der Zellen

In Kulturmedium gelöste Zellen werden in einem Verhältnis von 1:10 mit der Zählösung verdünnt und über eine Neubauer-Zählkammer und ein Lichtmikroskop ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl in 1 ml Zellsuspension ist Grundlage für die weitere Umrechnung bzw. Aufteilung der Zellen je nach Versuchsaufbau.

2.7.5 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Zellen werden wie bei der Passage von der Kulturschale gelöst und nach Zentrifugation in kaltem Einfriermedium suspendiert. Einer langsamen Abkühlung auf -80°C folgt die Lagerung in flüssigem Stickstoff in einem speziellen Einfriergefäß.

Zum Auftauen wird das Einfriergefäß 5 min. bei 37 °C aufgewärmt. Die im Einfriermedium gelösten Zellen werden in 2 ml Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wird in Kulturmedium suspendiert und in eine neue Kulturschale gegeben.

2.8 Transiente Transfektion mit small interfering RNA

Für die Transfektion mit small interfering RNA (siRNA) wurden RNA-Oligonukleotide unten stehender Sequenzen (Sinn-Strang) von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die kurzen RNA-Sequenzen binden komplementär an BAG-1 mRNA und der entstandene doppelsträngige RNA-Abschnitt wird durch zelleigene Prozesse abgebaut. Die BAG-1-mRNA erreicht nicht mehr das Ribosom. Durch diese Methode der RNA-Interferenz kann die Proteinsynthese gezielt herunterreguliert werden. Vorlage für die ausgewählten Oligonukleotide bildete eine Arbeit, in der BAG-1 erfolgreich auf Protein- und RNA-Ebene herunterreguliert werden konnte (Gamerding et al. 2009).

Unspezifische Kontroll siRNA	5' – AGGUAGUGUAAUCGCCUUG – 3'
BAG-1 siRNA No.1	5' – ACACCGUUGUCAGCACUUG – 3'
BAG-1 siRNA No.2	5' – GCACGACCUUCAUGUUACC – 3'

24 Stunden vor geplanter Transfektion werden 1×10^5 Zellen pro Kavität einer 6-Kavitäten-Platte in jeweils 2 ml MEM full ohne Antibiotikum ausgebracht. Zum Zeitpunkt der Transfektion weisen die Zellen eine Konfluenz von 30-50 % auf.

Pro zu transfizierender Kavität werden zwei 1,5 ml Reagenzgefäße mit jeweils 250 µl Opti-MEM vorbereitet. In einem dieser Reagenzgefäße wird 150 pmol der siRNA gelöst, in dem anderen 5 µl Lipofectamine™2000. Die Reagenzgefäße werden dabei leicht geschwenkt. Lipofectamine™2000 dient als Vehikel für die siRNA. Die Oligonukleotide können durch diese Lipofektion in kleinen Fettkörperchen die Biomembranen der Zellen passieren und in das Zellinnere gelangen.

Nachdem das Lipofectamine™2000-Opti-MEM-Gemisch 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert hat, kann dieses zum siRNA-Opti-MEM-Gemisch hinzugegeben werden. Es folgt eine Inkubationszeit von ca. 20 min. bei Raumtemperatur.

Schließlich werden 500 µl des Gesamtgemisches in die mit Zellen bewachsene Kavität gegeben. Die Kavitätenplatte wird leicht geschwenkt. 4-6 Stunden nach Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel zu dem der Zelllinie entsprechenden Kulturmedium. Zur gewünschten Zeit, jedoch mindestens 24 Stunden nach der Transfektion, kann die Lyse des Zellmaterials vorgenommen werden. Alle Pipettierschritte erfolgen mit RNase-freien Pipettenspitzen.

In Versuchen im Format von 24- oder 96-Kavitäten-Platten variieren einzelne Schritte und Mengen an Reagenzien wie in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.9 Proteinanalysen

2.9.1 Herstellung von Zelllysaten

Bei der Lyse von Zellkulturmaterial werden Proteine aus den Zellen herausgelöst, um diese in nachfolgenden Untersuchungen zu analysieren.

Das Medium wird aus den Kavitäten der 6-Kavitäten-Platte abgenommen und jede Kavität zweimal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend werden 50 µl Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellkratzer wird das Material vom Boden der Kavität mechanisch gelöst und in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt. Nach 15 min. Inkubation auf Eis erfolgt eine Ultraschallbehandlung mittels Sonicator. Damit werden die Zellkompartimente weiter aufgeschlossen. Schließlich werden die Zellen bei 16000 x g 10 min. zentrifugiert, der Proteinüberstand in ein neues Reagenzgefäß gegeben und dieses bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gefroren gehalten.

2.9.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) dient der quantitativen unspezifischen Bestimmung von Proteinmengen. In alkalischem Milieu kommt es zur Komplexbildung von Proteinen mit Kupferionen, wobei Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert wird. Cu^{1+} -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen stabilen violettfarbenen Komplex. Der Farbumschlag kann bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch quantifiziert werden. Die Messwerte der Zelllysate werden mit einer Messreihe von Standardproteinkonzentrationen abgeglichen. In einer 96-Kavitätenplatte wird dabei bovines Serumalbumin (BSA) in verschiedenen definierten Konzentrationen in die Kavitäten eingebracht und ebenso wie die Proben der Zelllysate mit jeweils 200 µl BCA-Farblösung versetzt. Von jedem Zelllysate werden 3 Messungen von jeweils 3 µl durchgeführt. Nach Zugabe der Farblösung wird das Gemisch für 25 min. bei

Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Es folgt die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem ELISA-Photometer Rainbow.

2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts. Dabei wandern die Proteine in einem elektrischen Feld vom negativen zum positiven Pol.

Für die Proteinauftrennung der Lysate wird zunächst die Kombination aus einem 12%-Trenngel und einem 5%-Sammelgel polymerisiert. Gleiche Mengen der einzelnen Proteinlysate werden mit H₂O auf 15 µl verdünnt und mit 3 µl 6x SDS versetzt. Fünfminütiges Kochen bei 95°C sorgt für eine gleichmäßige Negativladung der Proteine. Anschließend werden die Proben über vorpräparierte Taschen in das Sammelgel eingebracht. In eine der Taschen wird 5 µl des Page-Rulers gegeben. Dieser entwickelt farbige Banden, die eine Beurteilung der Proteinauftrennung nach Molekulargewicht ermöglichen.

Für die Elektrophorese wird bis zum Erreichen des Trenngels für ca. 10 min. eine Spannung von 75 Volt angelegt. Anschließend folgt die Auftrennung über ca. 2 h bei 100 V.

2.9.4 Western Blot

Die sich durch die Elektrophorese über das Gel verteilten Proteine werden beim Western Blot auf eine Membran übertragen. Auch hier wird die Negativladung der Proteine und deren Wanderung im elektrischen Feld genutzt. In einer Transferkammer werden das Gel und die Nitrocellulosemembran zwischen zwei Blotting-Papieren in Transferpuffer gelagert. Zuvor erfolgte die Equilibrierung von Blotting-Papieren, Nitrocellulosemembran und Elektrophoresegel in Transferpuffer für 10 min.

Für ca. 1,5 Stunden wird eine Spannung von 100 V angelegt. Der Vorgang geschieht bei einer Umgebungstemperatur von 4°C unter zusätzlicher Kühlung mit Eis.

2.9.5 Immunodetektion von Proteinen

Nach dem Western Blot der Proteine wird die Nitrocellulosemembran eine Stunde lang in 5% Magermilch in TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu belegen. Zur Detektion des gewünschten Proteins erfolgt die Inkubation mit dem Primär-Antikörper über mindestens 12 Stunden bei 4°C. Die Membranen werden in drei Schritten von jeweils 20 min. in TBS-T gewaschen und anschließend über zwei Stunden mit dem Sekundär-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wird erneut in drei Schritten gewaschen.

Alle Antikörper werden in einer individuellen Verdünnung in 5% Magermilch in TBS-T eingesetzt. Zum Nachweis von BAG-1 werden der monoklonale Maus-Antikörper als Primär-Antikörper und ein Kaninchen-HRP-Sekundär-Antikörper gegen Maus-Epitop verwendet (Tabelle 2.5).

Die ECL-Lösungen reagieren in einer Peroxidase-Reaktion gemeinsam mit der an den Sekundär-Antikörper gekoppelten HRP unter Emission eines Chemolumineszenz-Signals. ECL-Lösung I und II werden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute belichtet das Chemolumineszenz-Signal in einer Dunkelkammer einen Chemilumineszenzfilm. Die Belichtung kann mit einer Entwicklermaschine für das Auge auf dem Film sichtbar gemacht werden. Die Intensität der Signale wird in Graustufen entwickelt.

Zum Nachweis weiterer Proteine auf einer Membran wird vor der nächsten Antikörper-Inkubation der vorherige Antikörper durch einstündiges Waschen der Membran in Glycin/SDS-Lösung bei Raumtemperatur entfernt.

Die Graustufen auf den Filmen können mit der Software ImageJ umgerechnet und analysiert werden. Um sicherzustellen, dass jeweils gleich große Mengen an Proteinlysate verglichen werden, werden die einzelnen Werte an das jeweilige Signal für das Protein β -Tubulin angeglichen. β -Tubulin hat ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa und gilt als ein Protein, dessen zelluläre Menge unter den meisten Umständen konstant bleibt.

2.10 Bestimmung der Halbwertszeit von BAG-1-Protein

1×10^5 Zellen einzelner Zelllinien werden im Format von 6-Kavitäten-Platten ausgebracht. 24 Stunden später wird jeder Kavität $40 \mu\text{g/ml}$ Cycloheximide, gelöst in Zellkulturmedium, zugesetzt. Cycloheximide verhindert die Translation von mRNA in Polypeptidketten und verhindert damit die Proteinbiosynthese.

Zu den Zeitpunkten 2, 4, 7, 24 und 48 Stunden nach Zugabe von Cycloheximide werden die Zellen lysiert und der Proteinanalyse von BAG-1 zugeführt. Aus der Abnahme des BAG-1-Signals über die Zeit kann auf die Halbwertszeit rückgeschlossen werden.

2.11 Subzelluläre Fraktionierungen

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung von BAG-1 und der Isoformen wird ein ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit verwendet. Unbehandelte Zellen der Linien U87G, G112 und U251 werden lysiert. Durch aufeinander folgende Zentrifugationsschritte und Inkubation mit verschiedenen Puffern und Enzymen lassen sich aus den untersuchten Zellen nacheinander vier Zellfraktionen extrahieren: Zytosol, Membranen, Zytoskelett und Zellkern. Die einzelnen Fraktionen werden der oben beschriebenen Proteinanalyse von BAG-1 zugeführt.

2.12 Immunzytochemie

Zur immunochemischen Darstellung von BAG-1 in einzelnen Zellen wurde das Protokoll zur siRNA-Transfektion leicht modifiziert. Die Transfektion erfolgt hier nicht direkt auf der Kavitäten-Platte, sondern vor Ausbringen der Zellen noch innerhalb der Zellsuspension.

Auf Basis einer 24-Kavitäten-Platte werden pro Kavität jeweils $50 \mu\text{l}$ Opti-MEM mit 40 pmol siRNA und $2 \mu\text{l}$ Lipofectamine™2000 über 20 min. inkubiert. Anschließend werden die Reagenzien mit 3×10^4 Zellen, gelöst in $500 \mu\text{l}$ MEM full ohne Antibiotika, zusammengeführt. Nach 45 min. Inkubation bei 37°C im Reagenzgefäß wird das Gemisch auf die Kavität einer 24-Kavitäten-Platte ausgebracht. Zuvor wird auf dem Boden der Kavität eine mit Fibronectin beschichtete Glasscheibe ausgelegt, auf der die Zellen später anwachsen. Die Glasscheibe wird dazu über 2 Stunden bei

Raumtemperatur mit 400 μ l einer Lösung aus 5 μ g / ml Rinder-Fibronectin in H₂O dest. behandelt und anschließend zweimal vorsichtig mit 400 μ l PBS gewaschen.

Vier Stunden nach der Transfektion in Suspension erfolgt ein Mediumwechsel zu MEM full.

Zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion wird das Kulturmedium abgenommen und die Kavität vorsichtig mit PBS gewaschen. Für 20 min. werden die Zellen auf der Glasscheibe mit einer Lösung von 4 % PFA in PBS fixiert. Nach einem Wasch-Schritt mit PBS erfolgt die Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,1 % TritonX 100 in PBS über 5 min. und 50 mM Glycin in PBS über 10 min. Es wird erneut mit PBS gewaschen, anschließend blockiert eine Lösung aus 2 % BSA und 5 % NGS in PBS über 30 min. unspezifische Bindungsstellen.

Die Glasscheiben werden aus den Kavitäten entfernt und fünf Stunden lang mit dem polyklonalen BAG-1-Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS erfolgt die Inkubation mit dem rötlich fluoreszierenden Sekundär-Antikörper Cy3 im Dunkeln für eine Stunde. Der Primär-Antikörper wird in einer individuellen Verdünnung in 2 % BSA in PBS, der Sekundär-Antikörper allein in PBS gelöst (Tabelle 2.5).

Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS wird DNA-Material eine Minute lang mit DAPI gefärbt. Es folgt ein Waschgang mit PBS.

Die bewachsene Seite der Glasscheibe wird mit Moviol auf einem Objektträger fixiert. Die erstellten immunzytochemischen Präparate werden bei -4°C im Dunkeln gelagert und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.13 Erstellung von Wachstumskurven

Zur Erstellung einer Wachstumskurve über die Zeit wurde eine 96-Kavitäten-Platte jeweils zur Hälfte mit Kontroll siRNA und mit BAG-1 siRNA transfiziert. Für die Transfektion werden pro Kavität 7,5 pmol siRNA in 10 μ l Opti-MEM und 0,25 μ l Lipofectamine™2000 in 10 μ l Opti-MEM gelöst. Anschließend werden die siRNA- und Lipofectamine™2000-Opti-MEM-Gemische zusammengegeben. Während einer Inkubationszeit von 20 min. bei Raumtemperatur werden 5000 Zellen in 100 μ l MEM full ohne Antibiotika in jede Kavität der 96-Kavitäten-Platte eingebracht. Jede Kavität wird dann mit 20 μ l des siRNA- Lipofectamine™2000-Opti-MEM-Gemisches versetzt.

Sechs Stunden nach der Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel. Die Hälfte der mit jeweiliger siRNA transfizierten Zellen erhält 100 μ l MEM full, die andere Hälfte erhält 100 μ l MEM full ohne Serum.

24 Stunden nach der Transfektion wird das Zellkulturmedium vorsichtig abgesaugt, und die Kavitäten werden über 15 min. mit 100 μ l einer Lösung aus 3 % Glutaraldehyd in PBS fixiert. Anschließend werden die entsprechenden Kavitäten zweimal mit PBS gewaschen. Die fixierten Kavitäten werden mit 100 μ l PBS befüllt und die Kavitätenplatte bis zum nächsten Zeitpunkt der Fixierung (48, 72, 96, 120 und 144 Stunden nach Transfektion) im Zellkulturschrank inkubiert.

Nach dem letzten Zeitpunkt der Fixierung wird PBS aus allen Kavitäten abgesaugt und für 30 min. durch 100 μ l der Kristallviolett-Lösung ersetzt. Die Färbelösung wird vorsichtig mit Leitungswasser aus den Kavitäten ausgespült. Die Kavitäten-Platte trocknet über mindestens 12 Stunden.

In jede Kavität wird 200 μ l einer Lösung aus 10 % SDS in H₂O gegeben und für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Es entsteht in jeder Kavität eine homogene Lösung, deren Extinktionsverhalten bei einer Wellenlänge von 562 nm mit einem Photometer gemessen wird. Je stärker die Extinktion, desto höher der Gehalt an mit Kristallviolett gefärbtem Zellmaterial. Die einzelnen Werte werden in Wachstumskurven über die Zeit aufgetragen.

2.14 Kombination aus WST-1-Assay und ToxiLight® BioAssay

WST-1 ist ein Tetrazolium-Salz, welches durch zelluläre Dehydrogenasen energieabhängig in den Farbstoff Formazan gespalten wird. Die Bildung des Farbstoffs steht damit in proportionalem Verhältnis zur Anzahl vitaler Zellen in der gemessenen Probe.

Der ToxiLight® BioAssay misst die Freisetzung des zytosolischen Enzyms Adenylatkinase (AK) aus zerstörten Zellen und gibt somit Hinweise auf das Ausmaß der Zytolyse in den gemessenen Proben. Unter Anwesenheit von AK wird ADP zu ATP phosphoryliert. Das im Assay enthaltene Enzym Luciferase setzt das entstandene ATP und Luciferin unter Entstehung eines Chemilumineszenz-Signals um.

Die Transfektion der Zelllinien erfolgt im Format einer 96-Kavitäten-Platte in Suspension. Pro Kavität werden 8 pmol siRNA mit 10 μ l Opti-MEM und 0,4 μ l Lipofectamine™2000 mit Opti-MEM eingesetzt. Während der Inkubationszeit des siRNA-Lipofectamine™2000-Opti-MEM-Gemisches von 20 min. werden 3×10^4 Zellen in 100 μ l MEM full ohne Antibiotika pro Kavität vorbereitet. Ähnlich wie bei der Transfektion für die Immunzytochemie werden die Reagenzien gemeinsam mit den Zellen 45 min. bei 37°C inkubiert bevor 120 μ l des Gesamtgemisches in die Kavitäten der Platte gegeben werden. Vier Stunden nach der Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel zu 150 μ l MEM full. Pro siRNA und Messzeitpunkt werden vier Kavitäten vorbereitet. Die äußersten Kavitäten der Platte werden mit 100 μ l PBS gefüllt um ungleichmäßiger Evaporation des Zellkulturmediums in den Kavitäten vorzubeugen.

Zu den Messpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion wird pro Kavität 50 μ l des Kulturmediums abgenommen und der Messung der AK zugeführt. Nach Zugabe der Reagenzien des ToxiLight® BioAssay Kit und Ablauf der Inkubationszeit erfolgt die Messung des Chemilumineszenz-Signals mit einem Photometer. Die Werte werden mit einem Leerwert verrechnet, dabei wird reines Kulturmedium gemessen.

Die in den Kavitäten verbliebenen Zellen und 100 μ l Zellkulturmedium werden dem WST-1 Assay zugeführt. 10 μ l des WST-1-Reagenz inkubieren in jeder Kavität über 1,5 Stunden im Zellkulturschrank. In einem Photometer wird anschließend die Absorption von 100 μ l jeder Kavität bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Als Leerwert dient mit WST-1-Reagenz versetztes Zellkulturmedium.

Durch die Kombination der zwei Assays kann in gleicher Probe der Einflussfaktor der Zytolyse abgegrenzt werden. Letztere kann neben einer Veränderung der Proliferationsrate ebenfalls zu Unterschieden in der letztendlichen Zellzahl führen.

2.15 Zellzyklusbestimmung mithilfe der Durchflusszytometrie

48 Stunden nach Transfektion wurde die DNA der Zellen nach einem etablierten Protokoll mit Propidiumiodid gefärbt (Nicoletti et al. 1991). Die Analyse des DNA-Gehalts erfolgte mit einem Flow-Zytometer. Je nach DNA-Gehalt wurde durch die zugehörige Software den einzelnen Zellen jeweils ein Stadium innerhalb des

Zellzyklus zugeordnet. Die Anzahl der einzelnen Zellzyklusstadien G1, M und S wurde aufsummiert und prozentual zur Gesamtzellzahl angegeben.

2.16 Messung der Autophagie

Grundlage zur Analyse der Autophagie gibt eine methodische Leitlinie (Klionsky et al. 2012). Daraus folgt die experimentelle Auseinandersetzung mit allein der Makroautophagie als Form der Autophagie.

Zelllinien werden wie oben beschrieben im Format von 6-Kavitäten-Platten mit Kontroll-siRNA und BAG-1-siRNA transfiziert.

Zur Manipulation der Autophagie und Kontrolle des Systems werden die Substanzen Bafilomycin A1 und Rapamycin eingesetzt. Bafilomycin A1 erhöht den pH-Wert in den Lysosomen und verhindert damit die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen. Es kommt zu einer Akkumulation von Autophagosomen. Rapamycin ist ein mTOR-Inhibitor und damit Disinhibitor der Autophagie. Rapamycin ist somit als Induktor der Autophagie zu sehen.

Pro siRNA werden vier Versuchsbedingungen vorbereitet. 24 Stunden nach der Transfektion wird das Zellkulturmedium zweier Kavitäten mit 0,3 μ M in DMSO gelöstes Rapamycin versetzt. In eine weitere Kavität wird gleiches Volumen an DMSO als Kontrolle gegeben. 68 Stunden nach der Transfektion erfolgt der Zusatz von 15 nM in DMSO gelöstem Bafilomycin A1 in die vierte Kavität und in eine bereits mit Rapamycin versetzte Kavität. Vier Stunden später werden Zelllysate hergestellt und der beschriebenen Proteinanalyse zugeführt.

LC3-II ist ein Marker für die Makroautophagie. Das Protein findet sich vorwiegend gebunden in Membranen der Autophagosomen. Für dessen optimale Analyse wird der oben beschriebene Western Blot leicht abgeändert. Dabei werden ein Western Blot Trenngel (15 %) und PVDF-Membranen anstelle von Nitrocellulose verwendet. LC3-II ist mit einer Molekülgröße von 16 kDa von einer anderen LC3-Isoform, LC3-I mit einer Molekülgröße von 18 kDa, abzugrenzen.

2.17 Proteasomenaktivitätsmessungen

Zellen werden wie oben beschrieben mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA transfiziert. Pro siRNA werden zwei Versuchsbedingungen vorbereitet. 42 Stunden nach der Transfektion wird jeweils eine Kavität mit 20 μ M des Proteasom-Inhibitors MG132 versetzt. Sechs Stunden später erfolgt die Lyse der Zellen wie beschrieben, allerdings mit einem hypotonen Lysepuffer. Nach Proteinkonzentrationsbestimmung werden 30 μ g Protein jeden Lysats in einem 1,5 ml Reagenzgefäß mit dem Substratpuffer auf ein Gesamtvolumen von 247,5 μ l aufgefüllt. Pro Versuchsbedingung werden vier dieser Proben vorbereitet. Es folgt die Zugabe von 2,5 μ l fluorogenen Substrats. Nach einem mechanischen Mischvorgang werden 50 μ l einer jeden Probe in die Kavitäten einer schwarzen 96-Kavitäten-Platte gegeben und über 30 min. bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit beginnt die proteasomale Umsetzung des fluorogenen Substrats.

Jedes Substrat besteht aus einer Aminosäurekette und einer 7-Amino-4-Methylcumarin-Gruppe (AMC-Gruppe). Verschiedene Untereinheiten des Proteasoms hydrolysieren bestimmte Peptidbindungen und setzen die MCA-Gruppe frei. Je nach Substrat wird eine andere Aktivität des 20S-Proteasoms angesprochen: Chymotrypsin-ähnliche-Aktivität (Z-LLL-AMC), Caspase-ähnliche-Aktivität (Z-LLE-AMC) und Trypsin-ähnliche-Aktivität (BOC-LAA-AMC). Die zuvor inaktive MCA-Gruppe des Substrats wird in ein aktives Fluorogen umgesetzt. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgt 60 min. nach Zugabe eines fluorogenen Substrats mit dem Photometer SpectraFluor Plus bei einer Extinktionswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 480 nm. Als Referenzprobe gilt jeweils eine Messung von nur Substratpufferlösung.

2.18 Bestrahlung der Zelllinien und Colony Forming Assay

Der Röntgenstrahler wird über eine Spannung von 200 kV und eine Stromstärke von 15 mA auf die Abgabe einer Energiedosis von 1 Gy/min eingestellt.

48 Stunden nach wie oben beschriebener Transfektion der siRNA erfolgt die Ausplattierung der Zellen in neue Kavitäten-Platten. Die Kavitäten für die 0 Gy Kontrolle, 2 Gy und 4 Gy Bestrahlung werden mit jeweils 250 Zellen beimpft. Jeweils 500 Zellen werden in die Kavitäten für die 6 Gy und 8 Gy Bestrahlungen gegeben.

Pro Bestrahlung oder Kontrolle werden drei Kavitäten vorbereitet. Nach weiteren 24 Stunden erfolgt die Bestrahlung der Kavitäten-Platten. Direkt anschließend werden die Zellen wieder in den Inkubatorschrank gegeben.

Nach circa 10 Tagen Inkubation wird das Zellkulturmedium entfernt, und die Kavitäten werden zweimal vorsichtig mit PBS gespült. Anschließend folgt die Fixierung der Zellen für 15 min. mit Ethanol 70%. Der Alkohol wird verworfen und die Platten werden für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Färbung der Zellen erfolgt durch Benetzung der Kavitätenböden mit Kristallviolett-Lösung über 20 min. Nach Spülung mit Leitungswasser und Trocknung erfolgt die manuelle Zählung mit dem Mikroskop. Zellnester von mindestens 50 Zellen werden als eine Kolonie gewertet. Aus den Auszählungen wird eine Überlebenskurve erstellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Quantitative Exploration von BAG-1 im GBM-Zellkulturmodell

3.1.1 BAG-1 Isoformen

Im Western Blot der GBM Zelllinien G28, G112 und U251 erscheint BAG-1 in drei Haupt-Isoformen: BAG-1 L (50 kDa), BAG-1 M (46 kDa) und BAG-1 S (36 kDa). Letztere Isoform zeigt im Western Blot das stärkste Signal und kann somit als am stärksten vertretene Isoform gesehen werden. In der densitometrischen Auswertung des Western Blot zeigt die Zelllinie U251 den deutlich höchsten Anteil an BAG-1 S mit mehr als dem doppelten Signal der Zelllinie G112. Allerdings erscheint das U251- β -Tubulin-Signal im Western Blot sehr schwach, was die Vergleichbarkeit der BAG-1-Gesamt Mengen erschwert.

BAG-1 L und BAG-1 M imponieren deutlich signalärmer und in unterschiedlichen Verhältnissen zwischen den Zelllinien. In G112 ist mehr BAG-1 L als BAG-1 M zu sehen, der Gegensatz findet sich in U251. G28 enthält etwa ähnliche Mengen der zwei Isoformen.

Einzig in der Zelllinie G112 deutet sich ein BAG-1-Signal bei 29 kDa an. Dieses ist einer selten beschriebenen vierten BAG-1-Isoform zuzuschreiben.

G28 scheint insgesamt am wenigsten BAG-1-Protein zu synthetisieren.

Abbildung 3.1 Western Blot der vier BAG-1-Isoformen in den GBM-Zelllinien G28, G112 und U251.

Abbildung 3.2 Densitometrische Analyse der BAG-1-Haupt-Isoformen in den Zelllinien G28, G112 und U251. BAG-1 Signal jeweils im Verhältnis zum β -Tubulin-Signal gerechnet. S = BAG-1 S, M = BAG-1 M, L = BAG-1 L.

3.1.2 Subzelluläre Verteilung der BAG-1-Isoformen

Nach subzellulärer Fraktionierung kann die Verteilung der BAG-1-Isoformen über die Zellkompartimente Zytosol, Membranen, Zellkern und Zytoskelett im Western Blot studiert werden.

Die meisten Versuche dieser Arbeit vergleichen drei GBM-Zelllinien miteinander. Für die Kultivierung von U87G wird ein anderes Kulturmedium benötigt als für die restlichen verwendeten Zelllinien. U87G wurde demnach aus praktischen Gründen nur einmalig in diesem Versuch eingesetzt.

BAG-1 S ist in den Zelllinien U87G, U251 und G112 in den Kompartimenten Zytosol, Membranen und Zellkern zu finden. Überzeugende Signale für BAG-1 L und BAG-1 M erscheinen vorwiegend im Kompartiment des Zellkerns. Im Kompartiment des Zytoskeletts ist kein BAG-1 nachweisbar.

Es ist nicht gelungen, ein über alle Zellkompartimente gleich verteiltes Protein zur Kontrolle der einzelnen Proteinmengen darzustellen. Demnach können keine Aussagen über die quantitativen Verhältnisse der einzelnen Isoformen zueinander getroffen werden.

Aufgrund der relativen Mengen der Isoformen über die eingesetzten Zelllinien ist keine wesentliche differente Verteilung nachzuweisen.

Abbildung 3.3 BAG-1-Isoformen in den Zellkompartimenten Zytosol, Membranen, Zellkern und Zytoskelett, Western Blot nach subzellulärer Fraktionierung von Proteinlysaten der Zelllinien U87G, U251 und G112.

3.1.3 Immunzytochemische Darstellung von BAG-1 in G112

In der Fluoreszenzmikroskopie erscheint BAG-1 nach Sichtbarmachung durch den rötlich fluoreszierenden Sekundär-Antikörper cy3. Die DAPI Färbung erlaubt eine Lokalisation der Zellkerne.

Sowohl im Zytoplasma als auch im Bereich der Zellkerne zeigt sich ein rötlich fluoreszierendes Signal. Vor allem im Bereich der Zellkerne wird ein starkes Signal deutlich. Bis weit in viele der dendritischen Zellausläufer hinein ist ein homogenes Färbemuster zu erkennen.

Der für die Immunzytochemie verwendete polyklonale Anti-BAG-1-Antikörper zeigt im Western Blot bei circa 100 kDa eine unspezifische Bande, die deutlich signalstärker als alle sichtbaren BAG-1-Isoformen imponiert.

Abbildung 3.4 Immunzytochemische Darstellung von BAG-1 in Zellen der Linie G112, DAPI = Färbung der Zellkerne, cy3 = Sekundär-Antikörper gegen BAG-1-Antikörper.

Abbildung 3.4 Western Blot und Immunodetektion von BAG-1 in U251 unter Verwendung des polyklonalen Anti-BAG-1-Antikörpers.

3.1.4 Bestimmung der Halbwertszeit von BAG-1-Isoformen

Durch Zugabe von Cycloheximide kommt es zu einer unspezifischen Blockierung der Proteinbiosynthese an den Ribosomen. Der Zeitpunkt, an dem die Proteinexpression um die Hälfte des Ausgangswertes abnimmt, entspricht der Halbwertszeit des Proteins.

Der Western Blot von Zellmaterial der Linie U251 zeigt eine Signalabschwächung vor allem der Isoformen BAG-1 L und BAG-1 M über die 48 Stunden der Behandlung mit Cycloheximide. Nach densitometrischer Auswertung ergibt sich für die genannten Isoformen eine Halbwertszeit von circa fünf Stunden. Die Expression von BAG-1 L steigt nach Abfall auf ein Viertel der Ausgangssignalstärke an und erreicht nach 48 Stunden bereits wieder die Hälfte der Ausgangssignalstärke. Die Expression von BAG-1 M bleibt über den Beobachtungszeitraum stark reduziert ohne Tendenz zum Wiederanstieg.

Die Expression von BAG-1 S Protein nimmt wie bei den bereits genannten Isoformen durch die Behandlung mit Cycloheximide ab. Allerdings erreicht das Protein auch nach 48 Stunden nicht die Hälfte seines Ausgangswertes. Die stetig flache negative Steigung lässt ein Erreichen der Halbwertszeit nach dem Beobachtungszeitraum vermuten.

Abbildung 3.5 Western Blot von BAG-1-Isoformen während einer Behandlung von U251 Zellen mit 40 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximide.

Abbildung 3.6 Densitometrische Analyse von Abbildung 3.5 und grafische Auftragung der Ergebnisse. Die horizontale Hilfslinie markiert eine Signalabschwächung um die Hälfte des Ausgangswertes.

3.2 Reduktion der BAG-1-Expression durch RNA-Interferenz

Die erworbenen gegen BAG-1 gerichteten siRNA Oligonukleotide führen noch 48 Stunden nach Transfektion zu einer erheblichen Reduktion der BAG-1 Expression. Nach Etablierung der Transfektion im Format einer 24-Kavitäten-Platte führte eine Umrechnung der siRNA Mengen in das Format einer 6-Kavitäten-Platte ebenfalls zum gewünschten Transfektionserfolg. Da die Signale der Isoformen BAG-1 L und BAG-1 M im Western Blot häufig nur sehr schwach nachweisbar sind, erfolgt hier die Darstellung von allein BAG-1 S.

Die erworbene Kontroll-siRNA zeigt im Vergleich zu unbehandelten Zellen keinen Einfluss auf die BAG-1-Expression im Western Blot.

A **B** **C** **D**

Abbildung 3.7 Western Blot von BAG-1 zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion mit siRNA. Reduktion der Proteinexpression von BAG-1 S in den Zelllinien U251 (A) und G112 (B) nach Transfektion im Format einer 24-Kavitäten-Platte. Auch im Format einer 6-Kavitäten-Platte (C) ist nach Transfektion in der Zelllinie G112 eine Abnahme der BAG-1 S Expression zu beobachten. Die Kontroll siRNA zeigt im Vergleich zu unbehandelten Zellen der Linie G112 keine Änderung der BAG-1-Expression (D).

3.3 Einfluss von BAG-1 siRNA-Transfektion auf die Proliferation von GBM-Zelllinien

3.3.1 Proliferation unter Normalbedingungen und unter Serumentzug

Nach Transfektion mit siRNA wurden die Zelllinien über einen Zeitraum von 144 Stunden beobachtet und anschließend die Ergebnisse in Wachstumskurven aufgetragen. Jede Zelllinie wurde unter Normalbedingungen mit 10 % FCS im Zellkulturmedium und unter Serumentzug mit 0 % FCS im Zellkulturmedium untersucht.

Unter der Annahme multipler Niveaus der zahlreichen t-Tests zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten an derselben Versuchsanordnung erfolgt die Adjustierung der p-Werte nach der Holm-Šidák-Methode. Das Signifikanzniveau bleibt bei $\alpha = 5\%$ bestehen.

Für die Zelllinie G112 ergibt sich für Normalbedingungen zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den mit BAG-1 oder Kontroll siRNA transfizierten Zellen. Bei Serumentzug lässt sich zu den Beobachtungszeitpunkten 96, 120 und 144 Stunden nach Transfektion eine signifikant stärkere Proliferation der mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen messen.

BAG-1 siRNA transfizierte Zellen der Linie G28 proliferieren unter Normalbedingungen ab dem Zeitpunkt von 96 Stunden signifikant stärker als die mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen. Unter Serumentzug stellt sich dieser signifikante Unterschied bereits 72 Stunden nach der Transfektion ein.

BAG-1 transfizierte Zellen der Linie U251 proliferieren unter Normalbedingungen ab 72 Stunden nach Transfektion signifikant stärker als mit Kontroll siRNA transfizierte Zellen. Unter Serumentzug ist kein signifikanter Unterschied nachzuweisen. Es sind hier jedoch hohe Standardabweichungen ab 96 Stunden nach Transfektion zu beachten. Betrachtet man die p-Werte vor der Adjustierung, ist zu den Zeitpunkten 48, 72 und 96 Stunden nach Transfektion das Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ erreicht.

Abbildung 3.8 Wachstumskurve nach Transfektion von Zellen der Linie G112 mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA. Der Extinktionsmesswert nach Färbung mit Kristallviolett verhält sich proportional zur Menge an Zellmaterial. 10% FCS = Normalbedingung, 0% FCS = Serumentzug.

Abbildung 3.9 Wachstumskurve nach Transfektion von Zellen der Linie G28 mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA. Der Extinktionsmesswert nach Färbung mit Kristallviolett verhält sich proportional zur Menge an Zellmaterial. 10% FCS = Normalbedingung, 0% FCS = Serumentzug

Abbildung 3.10 Wachstumskurve nach Transfektion von Zellen der Linie U251 mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA. Der Extinktionsmesswert nach Färbung mit Kristallviolett verhält sich proportional zur Menge an Zellmaterial. 10% FCS = Normalbedingung, 0% FCS = Serumentzug.

3.3.2 Proliferation unter gleichzeitiger Berücksichtigung von Zytolyse

Ein Kombinationsversuch der Assays WST-1 und ToxiLight® erlaubt in gleicher Stichprobe die Untersuchung von proliferativer Aktivität und Zytolyse.

Nach Transfektion der Zelllinien G112 und U251 mit BAG-1 und Kontroll siRNA zeigt sich zu allen gemessenen Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion im WST-1 Assay ein signifikant stärkeres proliferatives Signal in mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen.

Ein signifikanter Unterschied in der Freisetzung von Adenylatkinase als Indikator für Zytolyse ergibt sich in beiden Zelllinien zu den ersten Messzeitpunkten 24 und 48 Stunden nach Transfektion nicht. Erst 72 Stunden nach Transfektion kann im Zellkulturmedium der mit BAG-1 siRNA transfizierten G112 und U251 Zellen eine signifikant geringere Konzentration von Adenylatkinase im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden.

Abbildung 3.11 Proliferative Aktivität von Zellen der Linie G112 zu den Zeitpunkten 24, 28 und 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA. Messung der Absorption nach WST-1-Assay. * $p < 0,05$.

Abbildung 3.12 ToxiLight® BioAssay in Zellen der Linie G112. Aus Zellen freigesetzte Adenylatkinase dargestellt durch ein Chemilumineszenzsignal. Messung zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA. * $p < 0,05$.

Abbildung 3.13 Proliferative Aktivität von Zellen der Linie U251 zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA. Messung der Absorption nach WST-1-Assay. * $p < 0,05$.

Abbildung 3.14 ToxiLight® BioAssay in Zellen der Linie U251. Aus Zellen freigesetzte Adenylatkinase dargestellt durch ein Chemilumineszenzsignal. Messung zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA. * $p < 0,05$.

3.4 Einfluss von BAG-1 siRNA-Transfektion auf den Zellzyklus von GBM-Zelllinien

48 Stunden nach der Transfektion mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA wurden Zellen der Linien G28, G112 und U251 mithilfe der Durchflusszytometrie auf die Verteilung der Zellzyklusphasen G1, S und G2/M untersucht.

Die Zelllinie G28 exponiert 48 Stunden nach Transfektion mit BAG-1 siRNA einen signifikant höheren Anteil an Zellen in den Zellzyklusphasen S und G2/M. Signifikant weniger Zellen finden sich in der Fraktion der G1-Phase des Zellzyklus.

In den Zelllinien G112 und U251 konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Zellzyklusphasen zwischen Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA transfizierten Zellen berechnet werden.

Abbildung 3.15 Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen G1, S und G2/M in Zellen der Linie G28, 48 Stunden nach Transfektion mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA. * $p < 0,05$.

Abbildung 3.16 Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen G1, S und G2/M in Zellen der Linie G112, 48 Stunden nach Transfektion mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA.

Abbildung 3.17 Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen G1, S und G2/M in Zellen der Linie U251, 48 Stunden nach Transfektion mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA.

3.5 Einfluss von BAG-1 siRNA-Transfektion auf Mechanismen der Proteindegradation

3.5.1 Makroautophagie

LC3-II wird als wesentlicher Bestandteil der Autophagosomen-Membranen und somit als ein mit der Makroautophagie korrelierender Marker im Western Blot analysiert. Rapamycin als ein Induktor der Makroautophagie stellt die Positivkontrolle in der Versuchsanordnung dar. Unter Einfluss von Rapamycin zeigen die in diesem Versuch analysierten GBM Zelllinien U251, G112 und G28 ein stärkeres LC3-II-Signal.

Unter DMSO-Kontrollbedingungen erscheinen die basalen LC3-II-Signale im Western Blot extrem schwach. Nach densitometrischer Analyse exponieren die unter diesen Bedingungen mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen ein signifikant stärkeres LC3-II-Signal als die mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen ($p = 0,0047$).

Bafilomycin A1 blockiert die Makroautophagie und führt zur Akkumulation von LC3-II. Die Differenz von LC3-II-Signal unter Behandlung mit Bafilomycin A1 und LC3-II-

Signal in der DMSO-Kontrolle beschreibt den makroautophagischen Flux. Bei den untersuchten Zelllinien ergibt sich für die mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen stets ein höherer makroautophagischer Flux als für die mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen. In der Zusammenschau der Zelllinien ergibt sich daraus ein signifikanter Unterschied von $p = 0,0331$.

Abbildung 3.18 Exemplarischer Western Blot eines Autophagie-Experiments mit der Zelllinie U251. Immunodetektion der LC3-Isoformen LC3-I und LC3-II mit korrespondierenden β -Tubulin-Kontrollen. Tub. = β -Tubulin.

Abbildung 3.19 Densitometrische Analyse von LC3-II in Western Blots der Zelllinien U251 (A), G112 (B) und G28 (C). (D) zeigt eine Zusammenschau der Werte aller drei untersuchten Zelllinien. * $p = 0,0047$.

3.5.2 Proteasomale Funktion

Die proteasomale Aktivität wird durch Umsetzung verschiedener fluorogener Substrate messbar.

Zwischen mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA transfizierten Zellen ohne Proteininhibitorzugabe sind in keiner der untersuchten Zelllinien U251 (nicht abgebildet), G112 und G28 signifikante Unterschiede in Chymotrypsin-ähnlicher-Aktivität (Substrat Z-LLL-AMC), Caspase-ähnlicher-Aktivität (Substrat Z-LLE-AMC) oder Trypsin-ähnlicher-Aktivität (Substrat BOC-LAA-AMC) zu messen.

Die Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 führt in mit BAG-1 siRNA behandelten Zellen der Linien G112 und G28 zu einer signifikant niedrigeren Chymotrypsin-ähnliche-Aktivität (Substrat Z-LLL-AMC) gegenüber mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen. In der Zelllinie G28 ist zusätzlich die Caspase-ähnliche-Aktivität (Substrat Z-LLE-AMC) signifikant geringer.

MG132 behandelte BAG-1 siRNA transfizierte Zellen der Linie G28 zeigen eine signifikant geringere Caspase-ähnliche-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen.

Abbildung 3.20 Chymotrypsin-ähnliche-Aktivität (Substrat Z-LLL-AMC) und Caspase-ähnliche-Aktivität (Substrat Z-LLE-AMC) des Proteasoms in Zellen der Linie G112. Messung der Fluoreszenz 48 Stunden nach Transfektion mit siRNA und 60 Minuten nach Zugabe eines fluorogenen Substrats. LLL = Substrat Z-LLL-AMC, LLE = Substrat Z-LLE-AMC, K = Kontroll siRNA, B = BAG-1 siRNA, -/+ = +/- Proteasominhibitor MG132, * $p < 0,05$.

Abbildung 3.21 Chymotrypsin-ähnliche-Aktivität (Substrat Z-LLL-AMC) und Caspase-ähnliche-Aktivität (Substrat Z-LLE-AMC) des Proteasoms in Zellen der Linie G28. Messung der Fluoreszenz 48 Stunden nach Transfektion mit siRNA und 60 Minuten nach Zugabe eines fluorogenen Substrats. LLL = Substrat Z-LLL-AMC, LLE = Substrat Z-LLE-AMC, K = Kontroll siRNA, B = BAG-1 siRNA, -/+ = +/- Proteasominhibitor MG132, * $p < 0,05$.

3.6 Einfluss von BAG-1 siRNA-Transfektion auf die Radiosensitivität von GBM-Zelllinien

Die GBM Zelllinien G112 und U251 wurden nach Transfektion mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA ionisierender Strahlung aufsteigender Dosiswerte ausgesetzt. Nach Normalisierung ausgezählter Zellkolonien auf die Anzahl unbestrahlter Zellenkolonien ergibt sich weder in G112 (nicht abgebildet) noch in U251 ein signifikanter Unterschied in der Radiosensitivität zwischen mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA transfizierten Zellen. Allenfalls in der Zelllinie U251 deutet sich ein Trend an, nach dem die mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen strahlenresistenter erscheinen.

Abbildung 3.22 Dosis-Wirkungs-Kurve von mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA transfizierten Zellen der Linie U251.

4. DISKUSSION

4.1 Expression von BAG-1 im GBM-Zellkulturmodell

4.1.1 Isoformen und deren Halbwertszeiten

In einer Untersuchung von 60 verschiedenen humanen Tumorzelllinien einschließlich der GBM-Zelllinie U251 stellt BAG-1 S ausnahmslos die am stärksten vertretene BAG-1-Isoform dar. Die Expression von BAG-1 M und BAG-1 L variiert zelllinienspezifisch (Takayama et al. 1998). Diese Beobachtungen decken sich mit den in vorliegender Arbeit untersuchten GBM-Zelllinien U251, G28 und G112. Neben den Haupt-Isoformen BAG-1 S, BAG-1 L und BAG-1 M ist die vierte Isoform p29 nur in wenigen Zelllinien nachweisbar (Yang et al. 1998). Von den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien weist nur G112 ein überzeugendes p29-Signal auf.

Bisher unbekannte Faktoren nehmen Einfluss auf die Translation der vier verschiedenen Start-Codons (Takayama et al. 1998). Die variierenden Verhältnisse der Isoformen zueinander könnten auf unterschiedlichen genetischen Veränderungen der einzelnen Zelllinien beruhen.

In der Literatur finden sich keine Angaben zu Halbwertszeiten von BAG-1-Isoformen. Es gilt zu beachten, dass Proteinhalbwertszeiten generell starken Änderungen

unterliegen und beispielsweise von Zellzyklusphase oder Wachstumsbedingung beeinflusst werden.

Nach Blockierung der Proteinbiosynthese von GBM-Zellen der Linie U251 mit Cycloheximide nimmt vor allem die Konzentration der längeren Isoformen BAG-1 L und BAG-1 M rasch ab, wobei sich eine Halbwertszeit von circa 5 Stunden ergibt. Die Konzentration von BAG-1 S nimmt hingegen nur sehr langsam ab. Möglicherweise ist BAG-1 S durch Bindung an Interaktionspartner länger vor den Mechanismen der Proteindegradation geschützt. Eine Blockierung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximide ist jedoch unspezifisch und betrifft selten das gesamte Proteom. Demgegenüber steht die viel deutlichere Reduktion des Signals von BAG-1 S nach gezielter Transfektion mit siRNA, siehe Kapitel 3.2.

Durch toxische Wirkung kann eine Selektion von Zellen stattgefunden haben, die weniger anfällig gegenüber der Wirkung von Cycloheximide sind. Durch dieses Phänomen lässt sich vermutlich der Wiederanstieg von BAG-1 L nach 6 Stunden erklären.

4.1.2 Subzelluläre Verteilung

Die verschiedenen Isoformen zeigen unterschiedliche zelluläre Verteilungsmuster. BAG-1 L ist in den untersuchten GBM-Zelllinien vorwiegend im Zellkern lokalisiert. Dieser Fakt trifft generell für die meisten Tumorzelllinien zu und ist auf eine *nuclear localization sequence* zurückzuführen, die den post-translationalen Ortswechsel in den Zellkern festlegt. (Takayama et al. 1998).

BAG-1 M ist anteilig zwischen Zellkern und Zytoplasma verteilt (Takayama et al. 1998). In den untersuchten GBM-Zelllinien findet sich jedoch für BAG-1 M nach subzellulärer Fraktionierung ausschließlich im Zellkern ein überzeugendes Signal. Diese Isoform ist demnach in GBM zum überwiegenden Teil im Zellkern lokalisiert.

Während für BAG-1 S ein vorwiegendes Vorhandensein im Zytoplasma beschrieben ist (Takayama et al. 1998), findet sich in den untersuchten Zelllinien darüber hinaus ein deutliches Signal in der Fraktion des Zellkerns. Die beschriebenen Verteilungsmuster spiegeln entweder eine für GBM-Zelllinien typische Konstellation wider oder stellen das Resultat einer dynamischen Umverteilung als Antwort auf spezielle Reize dar. BAG-1 S kann beispielsweise schon nach einstündigem

Hitzestress in den Bereich des Zellkerns überwechseln (Townsend et al. 2003). Für BAG-1 M ist ein ähnlicher Zusammenhang beschrieben worden (Zeiner et al. 1999). Die Translokation der Proteine geschieht möglicherweise unter Bindung an Interaktionspartner (Matsuzawa et al. 1998).

Auch immunzytochemische Analysen helfen, die subzelluläre Verteilung von BAG-1 zu begreifen. Entsprechende Versuche in dieser Arbeit weisen auf das Problem unspezifischer Antikörperreaktionen hin. Ein gut funktionierender monoklonaler Antikörper gegen BAG-1-Protein ließ sich für die immunzytochemischen Untersuchungen nicht verwenden. Für den daraufhin eingesetzten polyklonalen Antikörper konnte in einem korrespondierenden Western Blot ein starkes Signal nachgewiesen werden, welches sich nicht auf eine spezifische BAG-1-Reaktion zurückführen ließ. Von einem starken Immunfluoreszenzsignal war demnach nicht unmittelbar auf ein starkes BAG-1-Signal zu schließen.

Um klinische Daten mit der BAG-1 Expression zu vergleichen, werden häufig Biopsiepräparate solider Tumoren im Rahmen von immunhistochemischen Analysen untersucht. In einem eigenen Versuch ist es nicht gelungen, den etablierten monoklonalen Antikörper gegen BAG-1 für immunhistochemische Färbungen von GBM-Biopsiematerial einzusetzen.

In der Literatur zu BAG-1 in Brustkrebs finden sich teilweise abweichende Ergebnisse beim Einsatz unterschiedlicher Antikörper (Cutress et al. 2002). Möglicherweise zeigen die verwendeten Antikörper unterschiedliche Affinitäten zu den BAG-1-Isoformen. Schließlich können die unterschiedlichen Isoformen zwischen den Zellkompartimenten wechseln. Die deskriptive Immunfärbung bleibt damit ein unverlässliches Werkzeug, um beispielsweise vorwiegend zytoplasmatische Expression mit Überlebensdaten verschiedener Neoplasien zu korrelieren (siehe Einleitung).

Zusammengefasst gesagt, findet sich am meisten BAG-1-Protein im Zytosol und im Bereich der Membranen. Die verschiedenen BAG-1-Isoformen interagieren mit den sich im jeweiligen Zellkompartiment befindlichen Molekülen. Noch ist unklar, ob alle Isoformen in gleicher Weise an beschriebene Partner binden können (Luders et al. 2000b). Mögliche Hauptinteraktionspartner in den untersuchten GBM-Zelllinien sind damit Hsp70, Bcl-2, Raf-1, Wachstumsfaktorrezeptoren und Mechanismen der Proteindegradation.

4.2 Experimentelle Reduktion der BAG-1-Expression durch RNA-Interferenz

Die Ergebnisse der einzigen Vorarbeit zu BAG-1 in GBM wurden mithilfe von Expressionsvektoren gewonnen. Eine murine BAG-1-Isoform wurde dabei in GBM-Zellen überexprimiert und mit Wildtyp-GBM-Zellen verglichen, die ohnehin ein hohes BAG-1-Expressionsniveau aufweisen (Roth et al. 2000).

Das in der vorliegenden Arbeit benutzte Modell ermöglicht einen Vergleich zwischen unbehandelten BAG-1 exprimierenden GBM-Zellen und einem durch RNA-Interferenz stark reduzierten Expressionsniveau. Mithilfe dieser methodisch andersartigen Herangehensweise lassen sich Bedingungen evaluieren, in denen das Expressionsniveau und so vermutlich auch die BAG-1-Funktion weitgehend reduziert ist.

Es gilt zu beachten, dass die Zellkultur einem stark vereinfachten GBM-Modell aus vorwiegend monoklonalen Tumorzellen entspricht. Es steht damit im Gegensatz zu der für einen soliden Tumor wie GBM geltenden heterogenen Tumorbilogie, nach der viele genetisch unterschiedliche GBM-Zellen nebeneinander existieren. Komplizierend nehmen weitere Zell- und Gewebetypen der Tumor-Mikroumgebung Einfluss auf das Tumorwachstum (Hanahan und Weinberg 2000).

Die Methodik der RNA-Interferenz birgt die Gefahr von nicht spezifischen Effekten, bei denen die Oligonukleotide auch an RNA-Abschnitte binden, die nicht der gewünschten Zielsequenz entsprechen. Für die verwendete Kontroll siRNA konnte jedenfalls kein Unterschied in der BAG-1-Proteinexpression im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden.

Immunzytochemisch lässt sich nach Transfektion der Zelllinie G112 zwischen mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA behandelten Zellen kein Unterschied im Fluoreszenzmuster feststellen. Ganz im Gegenteil imponieren die mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen mit einem intensiveren Signalmuster insbesondere im Bereich der Zellfortsätze. Die in Kapitel 3.1.3 erwähnten unspezifischen Reaktionen des für die Immunzytochemie verwendeten polyklonalen Antikörpers können für dieses Phänomen verantwortlich gemacht werden und schmälern die Verwertbarkeit der immunzytochemischen Untersuchungen.

4.3 Einfluss von BAG-1 auf Proliferation und Zelltod im GBM-Zellkulturmodell

BAG-1 ist hauptsächlich als anti-apoptotisches und in vielen Entitäten tumorigenes Protein bekannt (Sharp et al. 2004). Die einzige Vorarbeit zu BAG-1 in GBM hingegen beschreibt bei BAG-1-Überexpression in vitro eine signifikante Erhöhung der Zellverdopplungszeit und Reduktion der Endpunktklonogenität (Roth et al. 2000). Zwei von drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien zeigen zum Endpunkt 144 Stunden nach Transfektion ebenfalls eine geringere Proliferation im Vergleich zu mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen. Dieser Effekt wurde noch deutlicher bei Wachstum unter Serumentzug. Eine im Vergleich höhere Expression von BAG-1-Protein bei Transfektion mit der Kontroll siRNA verlangsamt das GBM-Tumorwachstum in vitro.

Es stellt sich die Frage, warum die Zellen unter Kontrollbedingungen im Wachstum über die Zeit weniger zahlreich nachweisbar sind. Entweder proliferieren die Zellen allein weniger stark oder sie verhalten sich sensibler gegenüber Zelltodmechanismen wie Apoptose oder nekrotischer Zytolyse.

Um den Einflussfaktor Zytolyse zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Zellproliferation und Zytolyse parallel betrachtet. Die Reduktion von BAG-1-Protein durch siRNA steigert dabei die Proliferation bei kaum veränderter Zytolyse, gemessen über die Freisetzung eines zytoplasmatischen Enzyms. Demgegenüber setzen die mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen zum spätesten Beobachtungszeitpunkt signifikant mehr Adenylatkinase frei. Eine generell höhere Anfälligkeit gegenüber Zytolyse würde sich bereits weiter zu Anfang der Versuchsanordnung messen lassen (Heinrich et al. 2009). Neuerdings werden als Nekroptose bezeichnete Kombinationen der Zelltodmodelle Apoptose und nekrotischer Zytolyse diskutiert (Vanden Berghe et al. 2010). Die späte signifikant stärkere Zytolyse in mit Kontroll siRNA transfizierten GBM-Zellen könnte damit auf einen gemischt nekrotisch-apoptotischen Effekt zurückgeführt werden. Eine in der Versuchsanordnung nicht messbare Apoptose kann sekundär in einen späten zytolytischen Prozess gemündet haben.

Im Zusammenhang einer anti-proliferativen Wirkung können einige BAG-1-Interaktionspartner von besonderer Relevanz sein. Nach den Western Blot Analysen scheint die Isoform BAG-1 S am stärksten exprimiert zu werden. BAG-1 S erhöht die Aktivität eines Hsp70-Proteins (Luders et al. 2000b). Hsp70/BAG-1-Komplexe könnten Tumorsuppressorproteine konformell unterstützen und Onkoproteine der Proteindegradation zuführen. BAG-1-Überexpression führt zu erhöhten Mengen an Hsp70-Protein (Kermer et al. 2003). Durch Bildung von BAG-1/Hsp70-Komplexen wird Raf-1 vom BAG-1-Molekül verdrängt. Es reduziert sich der stimulierende Einfluss von Raf-1/BAG-1-Komplexen auf den proliferativen Ras-MAPK-Signalweg (Song et al. 2001).

Die genannten Interaktionen würden sich vermutlich auf den Zellzyklus der GBM-Zellen auswirken. Mit Kontroll siRNA und BAG-1 siRNA transfizierte Zellen der Linien G112 und U251 proliferieren 48 Stunden nach Transfektion signifikant unterschiedlich stark im WST-1 Assay. Dieser Effekt lässt sich jedoch wegen fehlender signifikanter Unterschiede nicht durch einen Einfluss von BAG-1 auf die Verteilung der Zellzyklusphasen zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion erklären. Auch eine BAG-1-Überexpression zeigt im Vergleich zu Kontrollbedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der Zellzyklusphasen in den GBM-Zelllinien LN-18 und LN-229 (Roth et al. 2000). Einzig nach Transfektion der Zelllinie G28 mit BAG-1 siRNA sind vergleichsweise signifikant mehr Zellen in den Zellzyklusphasen G2/Mitose und S, und weniger Zellen in der G1-Phase zu zählen. Dies spricht für eine stärkere Proliferation aufgrund eines beeinflussten Zellzyklus. Die Literatur gibt keinen Hinweis auf einen direkten Einfluss von BAG-1 auf den Zellzyklus. Bcl-2 als einer der BAG-1-Interaktionspartner jedoch kann einen Zellzyklusarrest vermitteln und in vitro das Wachstum von Brustkrebszellen verlangsamen (Huang et al. 1997; Knowlton et al. 1998).

Die Wirkung von BAG-1 auf den Zellzyklus erscheint in dieser Arbeit zelllinienspezifisch und insgesamt wenig eindeutig. Dennoch wirkt sich die Reduktion des Expressionsniveaus nach siRNA-Transfektion signifikant auf die Proliferationsrate der Zelllinien aus. Vorausgesetzt, dass BAG-1 nicht zu einer stärkeren Mitoserate im Sinne einer Änderung der Verteilung der Zellzyklusphasen führt, könnten sich die Zellen sensibler gegenüber bestimmten Zelltodmechanismen verhalten. Nachdem nekrotische Zytolyse in diesem Zusammenhang

nachgewiesenermaßen eine untergeordnete Rolle gespielt hat, bleibt der Mechanismus der Apoptose zur Erklärung der Wachstumsphänotypie. Apoptose kann als Antwort auf eine Vielzahl von Signalen eine Kaskade an Reaktionen auslösen, die schließlich in die Fragmentierung der Zelle mündet. Da dieses Phänomen in der vorliegenden Arbeit nicht direkt untersucht wurde, können im Folgenden nur Mutmaßungen angestellt werden. Wie oben beschrieben deuten jedoch auch späte zytolytische Prozesse auf einen Einfluss der Apoptose im Sinne einer Nekroptose hin.

Reduktion der BAG-1-Expression mittels siRNA führt zu Änderungen im Expressionsniveau von für die Apoptose wichtigen Effektoren in Adenokarzinomzellen der Lunge (Liu et al. 2010). Neben der klassischen anti-apoptotischen Wirkung auf Induktoren der Apoptose wie Staurosporin, vermittelt BAG-1 eine pro-apoptotische Wirkung nach Behandlung mit einem Apoptose auslösenden Retinoid, N-(4-hydroxyphenyl)retinamide, in Zellen des Gebärmutterhalskrebs und der GBM-Zelllinie U87G (Yang et al. 2000). Von einer rein anti-apoptotischen Wirkung ist demnach nicht auszugehen. Die BAG-Domäne von BAG-1 scheint für die anti-apoptotische Funktion unverzichtbar, wohingegen der UBL-Domäne eine große Bedeutung für die pro-apoptotische Funktion beigemessen wird (Yang et al. 2000).

Unter Annahme der Hypothese, dass BAG-1 im GBM-Zellkulturmodell pro-apoptotische Bedeutung besitzt, erklärt sich der deutlichere Wachstumsvorteil von mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen unter Serumentzug. Mit dem Serum werden auch Wachstumsfaktoren entzogen, es erschweren sich die Proliferationsbedingungen, und apoptotische Reize werden stärker. Die mit Kontroll siRNA transfizierten GBM-Zellen zeigen sich an den Versuchsendpunkten weniger zahlreich als die mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen. Experimentell überexprimiertes BAG-1 schützt GBM-Zellen nicht vor verschiedenen apoptotischen Stimuli (Roth et al. 2000). Wie genau BAG-1 für eine apoptotische Reaktion sensibilisiert ist bisher unklar. Für die Sensibilisierung gegenüber N-(4-hydroxyphenyl)retinamide wird ein Retinoidrezeptor als einer der nukleären Hormonrezeptoren verantwortlich gemacht (Yang et al. 2000).

4.4 Einfluss von BAG-1 auf Mechanismen der Proteindegradation im GBM-Zellkulturmodell

Die Betrachtung von Mechanismen der Proteindegradation stellt den zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Fehler in Mechanismen der Proteindegradation können zu einem Ungleichgewicht zwischen Onkoproteinen und Tumorsuppressorproteinen und damit zur Entstehung unkontrollierten Zellwachstums führen.

Zum Einfluss von BAG-1 auf Autophagie und proteasomale Funktion im GBM-Zellkulturmodell sind in der Literatur keine Arbeiten zu finden. In anderen Zelllinien konnte man für die Autophagie Einflüsse auf sowohl Überleben als auch Zelltod nachweisen (Eskelinen 2005). In Herzmuskelzellen wird der BAG-1 vermittelten Autophagie eine kardio-protective Wirkung zugeschrieben (Gurusamy et al. 2009a). Die vorliegende Arbeit konnte hingegen einen erhöhten makroautophagischen Flux in mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen nachweisen. Scheinbar hat BAG-1 in GBM einen hemmenden Einfluss auf die Makroautophagie. Im Kontext höherer proliferativer Aktivität der mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen können für eine verstärkte Makroautophagie zwei Erklärungen postuliert werden. Zum einen kann die höhere proliferative Aktivität die Notwendigkeit ebenfalls aktiverer Vorgänge zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase bedingen. Die Autophagie spielt in diesem Zusammenhang als Proteindegradationsweg eine wichtige Rolle zur Substratbereitstellung für den Energiemetabolismus und die Proteinbiosynthese. Autophagie stellt damit insbesondere unter erschwerten Wachstumsbedingungen einen Überlebensvorteil dar und kann Apoptose verhindern (Eskelinen 2005). Andersherum kann die verstärkte Makroautophagie über ein Ungleichgewicht zwischen Onkoproteinen und Tumorsuppressoren einen Wachstumsvorteil schaffen.

Ein wichtiger nicht-lysosomaler Weg der Proteindegradation ist das UPS. BAG-1 stimuliert die Ubiquitinierung proteasomaler Substrate und kann zusammen mit Hsp70 Substrat an das Proteasom binden (Demand et al. 2001). Es sind auch direkte Wirkungen von BAG-1 auf das Proteasom beschrieben worden (Demand et al. 2001; Luders et al. 2000a).

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit hat BAG-1 siRNA Transfektion keinen signifikanten Einfluss auf die Umsetzung proteasomaler Substrate in GBM-Zellen.

Der Proteasominhibitor MG132 wirkt sich auf die Chymotrypsin-ähnliche und Caspase-ähnliche Aktivität des Proteasoms aus (Han et al. 2009). Er sollte in der Versuchsanordnung ursprünglich als Positivkontrolle dienen. Tumorzellen mit hoher proliferativer Aktivität akkumulieren mehr fehlerhafte Proteine und sind daher empfindlicher gegenüber Proteasominhibitoren. Die Inhibition proteasomaler Vorgänge kann Apoptose in GBM-Zellen auslösen (Wagenknecht et al. 1999). BAG-1 siRNA transfizierte Zellen zeigen signifikant weniger proteasomale Substratumsetzung unter Behandlung mit MG132. Diese erhöhte Empfindlichkeit gegenüber MG132 könnte auf die stärkere Proliferationsrate in mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen zurückzuführen sein. Die mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen zeigen unter Behandlung mit MG132 keine Änderung der proteasomalen Aktivität.

BAG-1 könnte jedoch auch eine protektive Wirkung auf das Proteasom gegenüber dem Proteasominhibitor MG132 vermitteln. In diesem Fall könnte eine starke BAG-1 Expression in einem Tumor wie GBM die geringere Wirksamkeit einer möglichen Therapie mit einem Proteasomeninhibitor voraussagen.

Experimentelle Reduktion der BAG-1 Expression in der Zelllinie HEK 293 führt kompensatorisch zu einer Zunahme an BAG-3 Expression. Diese Änderung im Verhältnis zwischen BAG-1 und BAG-3 geht mit einer Steigerung der Makroautophagie und Verringerung der proteasomalen Aktivität einher (Gamerding et al. 2009). Mit BAG-1 siRNA transfizierte Zellen zeigen in der vorliegenden Arbeit tatsächlich einen gesteigerten makroautophagischen Flux. Eine Änderung der proteasomalen Funktion konnte allerdings nicht beobachtet werden.

4.5 BAG-1 und Radiosensitivität

In einer Arbeit zum Ösophaguskarzinom zeigte die Zelllinie mit der höchsten Radiosensitivität ein vergleichsweise hohes BAG-1-Expressionsniveau. Reduktion der Expression mit siRNA macht die Zellen weniger sensibel gegenüber ionisierender Strahlung. Die genauen Mechanismen dieser Beobachtungen sind noch unklar

(Yoshino et al. 2011). In den untersuchten GBM-Zelllinien U251 und G112 lässt sich dieses Ergebnis nicht signifikant reproduzieren. In Versuchen mit der Zelllinie U251 erscheinen die mit BAG-1 siRNA transfizierten Zellen jedoch tendenziell weniger radiosensibel.

Tumoren und Zelllinien sind unterschiedlich empfindlich gegenüber ionisierender Strahlung, wobei GBM zu den stärker strahlenresistenten Tumorentitäten gehört. Möglicherweise kommt deshalb eine Wirkung von BAG-1 auf die Radiosensitivität von GBM nicht deutlich zum Vorschein.

4.6 Ausblick

Durch die vorliegende Arbeit konnten neue Erkenntnisse zum Einfluss von BAG-1 auf verschiedene Zellfunktionen im GBM-Zellkulturmodell beigetragen werden. Es bleibt die Aufgabe, ein umfassendes und alle Einzelkomponenten integrierendes Bild zum Einfluss von BAG-1 auf GBM zu zeichnen. Um Therapien zu verbessern, wird es zunehmend wichtig, molekulare Zusammenhänge zu begreifen und die individuelle Tumorbilogie in aktuelle Behandlungskonzepte zu integrieren.

BAG-1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Sensibilisierung gegenüber ionisierender Strahlung in GBM. Es bleibt zu eruieren, ob die BAG-1-Expression gegenüber chemotherapeutischen Behandlungen mit beispielsweise Temozolomid sensibilisiert. Sollten sich hier neue Erkenntnisse ergeben, könnte BAG-1 zukünftig therapieprognostische Bedeutung gewinnen.

BAG-1 siRNA Transfektion beschleunigt das Wachstum von GBM-Zellen, insbesondere unter Serumentzug. Die Bedeutung dieser Wachstumskinetik und deren genauer Wirkmechanismus müssen noch abschließend geklärt werden. Zellen mit geringer proliferativer Aktivität überleben längere Zeitabschnitte unter ungünstigen Wachstumsbedingungen, und Tumorbereiche mit schlechter Energiebereitstellung sind typisch für GBM (Roth et al. 2000). Der Einfluss von BAG-1 könnte demnach in GBM einen Überlebensvorteil für den Gesamttumor bedeuten. Diese Hypothese gilt es in einem In-vivo-Versuch zu verifizieren. Bei dem einzigen In- vivo-Versuch zu BAG-1 in GBM wurden BAG-1 überexprimierende GBM-Zellen in

Mäusegehirne inokuliert (Roth et al. 2000). Als zeitgemäßere Methode bietet sich eine Inokulation von durch mit RNA-Interferenz veränderten und stabil transfizierten GBM-Zellen an. Ein solcher Versuch erlaubt Aussagen über den Einfluss von BAG-1 auf die Mikroumgebung des Tumors und wichtige Vorgänge wie Migration oder Vaskularisation.

Vieles deutet darauf hin, dass BAG-1 in GBM eine pro-apoptotische Funktion übernimmt. Erkenntnisse aus Vorarbeiten zu anderen Tumorentitäten lassen sich nur schwer übertragen, da in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Hauptinteraktionspartner Einfluss auf Zellfunktionen nehmen (Cutress et al. 2002). Erst die genaue Kenntnis der beeinflussten Zellvorgänge erlaubt Überlegungen zum möglichen therapeutischen Nutzen der BAG-1-Funktion in GBM.

In den wenigen Vorarbeiten zu BAG-1 in GBM konnte keine Korrelation zwischen BAG-1-Expression in der Immunhistochemie und klinischen Daten nachgewiesen werden (Batistatou et al. 2006; Roth et al. 2000). Die Analysen schließen nur geringe Patientenzahlen ein und verwenden unterschiedliche immunhistochemische Techniken, was in der Literatur auch im Zusammenhang anderer untersuchter Tumorentitäten kritisiert wird (Cutress et al. 2002). BAG-1-Isoformen können ihre subzelluläre Verteilung ändern, und es erscheint sinnvoll, zukünftig mit hochspezifischen Antikörpern gezielt einzelne Isoformen zu quantifizieren. Erst die Auswertung solcher Ergebnisse lässt eine Aussage zur prognostischen Bedeutung von BAG-1 zu.

Die Evaluation der Proteindegradationswege und deren Bedeutung in GBM steht noch ganz am Anfang. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von BAG-1 auf die Makroautophagie beschrieben. Es bedarf im Sinne der Vollständigkeit auch einer Untersuchung der Mikroautophagie und CMA. Letzterer Mechanismus könnte durch die Interaktionen von BAG-1 mit Chaperonen wie Hsp70 interessant sein.

BAG-1 hat in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Umsetzung proteasomaler Substrate. Die Ubiquitinierung als zweiter wesentlicher Vorgang in der Proteindegradation durch das UPS sollte für GBM ebenfalls untersucht werden. Es

ist aus anderen Tumorentitäten bekannt, dass BAG-1 auf die E3-Ligasen CHIP und Siah-1 wirkt (Demand et al. 2001).

5. ZUSAMMENFASSUNG

GBM zählt zu den bösartigsten und epidemiologisch häufigsten hirneigenen Tumoren des erwachsenen Menschen. Für Entstehung und Wachstum von GBM werden verschiedene molekulare Veränderungen verantwortlich gemacht. BAG-1 gehört zu einer Gruppe von Co-Chaperonen, welche über die Interaktion mit zugehörigen Chaperonen die Strukturentwicklung fehlgefalteter Proteine unterstützt. Darüber hinaus ist für BAG-1 eine Vielzahl weiterer Interaktionspartner und Wirkungen beschrieben worden. Bei malignen Erkrankungen konnten je nach Entität gegenteilige Effekte auf wichtige Zellfunktionen beobachten werden. Zum Einfluss von BAG-1 auf GBM ist wenig bekannt.

Durch Transfektion mit siRNA wurde das Expressionsniveau von BAG-1 in GBM-Zelllinien reduziert und sein Einfluss auf Proliferation und Zelltod unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit liegt in der Betrachtung von Mechanismen der Proteindegradation.

BAG-1 reduziert die Proliferationsrate von GBM-Zelllinien, insbesondere unter Serumentzug. Vermutlich ist dies auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber apoptotischen Reizen zurückzuführen. Die Zellzyklusverteilung wird durch Transfektion mit BAG-1 siRNA nicht signifikant beeinflusst. Die Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung bleibt ebenfalls unverändert. Mechanismen der Proteindegradation spielen in GBM keine eindeutige Rolle. Transfektion mit BAG-1 siRNA erhöht den makroautophagischen Flux signifikant, wobei sich die Degradation proteasomaler Substrate unverändert zeigt.

BAG-1 wurde lange als anti-apoptotisches Protein verstanden. In der vorliegenden Arbeit hingegen wirkt sich BAG-1 verlangsamernd auf die Tumorgenese von GBM aus. Möglicherweise steht die durch BAG-1 reduzierte Makroautophagie in diesem Zusammenhang. Aus Arbeiten zu malignen Erkrankungen ist eine große Zahl an Interaktionspartnern bekannt, deren Bedeutung immer im Kontext der individuellen Erkrankung zu sehen ist. Für GBM gilt es, die genauen molekularen Ursachen der

beobachteten Wachstumsphänotypie zu evaluieren. Nur so kann BAG-1 zukünftig für diagnostische und therapeutische Anwendungen relevant werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Arias E, Cuervo AM (2011): Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol* 23, 184-189.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006): Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-760.

Bardelli A, Longati P, Albero D, Goruppi S, Schneider C, Ponzetto C, Comoglio PM (1996): HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *Embo J* 15, 6205-6212.

Batistatou A, Kyzas PA, Goussia A, Arkoumani E, Voulgaris S, Polyzoidis K, Agnantis NJ, Stefanou D (2006): Estrogen receptor beta (ERbeta) protein expression correlates with BAG-1 and prognosis in brain glial tumours. *Journal of Neuro-Oncology* 77, 17-23.

Cato AC, Mink S (2001): BAG-1 family of cochaperones in the modulation of nuclear receptor action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78, 379-388.

Chen J, Xiong J, Liu H, Chernenko G, Tang SC (2002): Distinct BAG-1 isoforms have different anti-apoptotic functions in BAG-1-transfected C33A human cervical carcinoma cell line. *Oncogene* 21, 7050-7059.

Clemo NK, Collard TJ, Southern SL, Edwards KD, Moorghen M, Packham G, Hague A, Paraskeva C, Williams AC (2008): BAG-1 is up-regulated in colorectal tumour progression and promotes colorectal tumour cell survival through increased NF-kappaB activity. *Carcinogenesis* 29, 849-857.

Clevenger CV, Thickman K, Ngo W, Chang WP, Takayama S, Reed JC (1997): Role of Bag-1 in the survival and proliferation of the cytokine-dependent lymphocyte lines, Ba/F3 and Nb2. *Mol Endocrinol* 11, 608-618.

Cutress RI, Townsend PA, Brimmell M, Bateman AC, Hague A, Packham G (2002): BAG-1 expression and function in human cancer. *Br J Cancer* 87, 834-839.

Dean M, Fojo T, Bates S (2005): Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5, 275-284.

DeAngelis LM (2001): Brain tumors. *N Engl J Med* 344, 114-123.

Demand J, Alberti S, Patterson C, Hohfeld J (2001): Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol* 11, 1569-1577.

DGN (2012). S2k Leitlinie Gliome (AWMF). Hrsg.: Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie.

Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C *et al.* (1998): PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 16, 2259-2264.

Eskelinen EL (2005): Doctor Jekyll and Mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1468-1472.

Froesch BA, Takayama S, Reed JC (1998): BAG-1L protein enhances androgen receptor function. *J Biol Chem* 273, 11660-11666.

Fuller GN, Bigner SH (1992): Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat Res* 276, 299-306.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004): Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64, 7011-7021.

Gamerding M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C (2009): Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *Embo J* 28, 889-901.

Gotz R, Wiese S, Takayama S, Camarero GC, Rossoll W, Schweizer U, Troppmair J, Jablonka S, Holtmann B, Reed JC *et al.* (2005): Bag1 is essential for differentiation and survival of hematopoietic and neuronal cells. *Nat Neurosci* 8, 1169-1178.

Gozuacik D, Kimchi A (2004): Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891-2906.

Gurusamy N, Lekli I, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK (2009a): BAG-1 induces autophagy for cardiac cell survival. *Autophagy* 5, 120-121.

Gurusamy N, Lekli I, Gorbunov NV, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK (2009b): Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. *J Cell Mol Med* 13, 373-387.

Han YH, Moon HJ, You BR, Park WH (2009): The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol Rep* 22, 215-221.

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L *et al.* (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997-1003.

Heinrich A, Balszuweit F, Thiermann H, Kehe K (2009): Rapid simultaneous determination of apoptosis, necrosis, and viability in sulfur mustard exposed HaCaT cell cultures. *Toxicol Lett* 191, 260-267.

Hohfeld J (1998): Regulation of the heat shock conjugate Hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights. *Biol Chem* 379, 269-274.

Huang DC, O'Reilly LA, Strasser A, Cory S (1997): The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *Embo J* 16, 4628-4638.

Kantelhardt SR, Caarls W, de Vries AH, Hagen GM, Jovin TM, Schulz-Schaeffer W, Rohde V, Giese A, Arndt-Jovin DJ (2010): Specific visualization of glioma cells in living low-grade tumor tissue. *PLoS One* 5, e11323.

Kermer P, Krajewska M, Zapata JM, Takayama S, Mai J, Krajewski S, Reed JC (2002): Bag1 is a regulator and marker of neuronal differentiation. *Cell Death Differ* 9, 405-413.

Kermer P, Digicaylioglu MH, Kaul M, Zapata JM, Krajewska M, Stenner-Liewen F, Takayama S, Krajewski S, Lipton SA, Reed JC (2003): BAG1 over-expression in brain protects against stroke. *Brain Pathol* 13, 495-506.

Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL (1999): Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell* 4, 395-402.

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA *et al.* (2012): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544.

Knowlton K, Mancini M, Creason S, Morales C, Hockenbery D, Anderson BO (1998): Bcl-2 slows in vitro breast cancer growth despite its antiapoptotic effect. *J Surg Res* 76, 22-26.

Kriegenburg F, Jakopiec V, Poulsen EG, Nielsen SV, Roguev A, Krogan N, Gordon C, Fleig U, Hartmann-Petersen R (2014): A chaperone-assisted degradation pathway targets kinetochore proteins to ensure genome stability. *PLoS Genet* 10, e1004140.

Leng XF, Chen MW, Xian L, Dai L, Ma GY, Li MH (2012): Combined analysis of mRNA expression of ERCC1, BAG-1, BRCA1, RRM1 and TUBB3 to predict prognosis in patients with non-small cell lung cancer who received adjuvant chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 31, 25.

Liman J, Faida L, Dohm CP, Reed JC, Bahr M, Kermer P (2008): Subcellular distribution affects BAG1 function. *Brain Res* 1198, 21-26.

Liu H, Liang Y, Li Y, Wang J, Wu H, Wang Y, Tang SC, Chen J, Zhou Q (2010): Gene silencing of BAG-1 modulates apoptotic genes and sensitizes lung cancer cell lines to cisplatin-induced apoptosis. *Cancer Biol Ther* 9, 832-840.

Liu R, Takayama S, Zheng Y, Froesch B, Chen GQ, Zhang X, Reed JC, Zhang XK (1998): Interaction of BAG-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem* 273, 16985-16992.

Louis DN (1994): The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 11-21.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.

Luders J, Demand J, Hohfeld J (2000a): The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem* 275, 4613-4617.

Luders J, Demand J, Papp O, Hohfeld J (2000b): Distinct isoforms of the cofactor BAG-1 differentially affect Hsc70 chaperone function. *J Biol Chem* 275, 14817-14823.

Matsuzawa S, Takayama S, Froesch BA, Zapata JM, Reed JC (1998): p53-inducible human homologue of *Drosophila* seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. *Embo J* 17, 2736-2747.

Meijer AJ, Codogno P (2004): Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2445-2462.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008): Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.

Ni W, Chen B, Zhou G, Lu C, Xiao M, Guan C, Zhang Y, He S, Shen A, Ni R (2013): Dysregulation of BAG-1 in hepatocellular carcinoma predicts patient outcome and mediates increased resistance to doxorubicin-induced apoptosis via NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem* 114, 2120-2130.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991): A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-279.

Nio Y, Dong M, Iguchi C, Yamasawa K, Toga T, Itakura M, Tamura K (2001): Expression of Bcl-2 and p53 protein in resectable invasive ductal carcinoma of the pancreas: effects on clinical outcome and efficacy of adjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol* 76, 188-196.

Niyaz Y, Zeiner M, Gehring U (2001): Transcriptional activation by the human Hsp70-associating protein Hap50. *J Cell Sci* 114, 1839-1845.

Nollen EA, Kabakov AE, Brunsting JF, Kanon B, Hohfeld J, Kampinga HH (2001): Modulation of in vivo HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1. *J Biol Chem* 276, 4677-4682.

Ponten J, Macintyre EH (1968): Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 74, 465-486.

Preston-Martin S (1996): Epidemiology of primary CNS neoplasms. *Neurol Clin* 14, 273-290.

Rorke S, Murphy S, Khalifa M, Chernenko G, Tang SC (2001): Prognostic significance of BAG-1 expression in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 95, 317-322.

Roth W, Grimm C, Rieger L, Strik H, Takayama S, Krajewski S, Meyermann R, Dichgans J, Reed JC, Weller M (2000): Bag-1 and Bcl-2 gene transfer in malignant glioma: modulation of cell cycle regulation and apoptosis. *Brain Pathol* 10, 223-234.

Schneikert J, Hubner S, Martin E, Cato AC (1999): A nuclear action of the eukaryotic cochaperone RAP46 in downregulation of glucocorticoid receptor activity. *J Cell Biol* 146, 929-940.

Sharp A, Crabb SJ, Townsend PA, Cutress RI, Brimmell M, Wang XH, Packham G (2004): BAG-1 in carcinogenesis. *Expert Rev Mol Med* 6, 1-15.

Shindoh M, Adachi M, Higashino F, Yasuda M, Hida K, Nishioka T, Ono M, Takayama S, Reed JC, Imai K *et al.* (2000): BAG-1 expression correlates highly with the malignant potential in early lesions (T1 and T2) of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 36, 444-449.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004): Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.

Song J, Takeda M, Morimoto RI (2001): Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol* 3, 276-282.

Sourisseau T, Desbois C, Debure L, Bowtell DD, Cato AC, Schneikert J, Moyse E, Michel D (2001): Alteration of the stability of Bag-1 protein in the control of olfactory neuronal apoptosis. *J Cell Sci* 114, 1409-1416.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U *et al.* (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-996.

Takahashi N, Sasaki R, Takahashi J, Takayama S, Reed JC, Andoh T (2001): BAG-1M, an isoform of Bcl-2-interacting protein BAG-1, enhances gene expression driven by CMV promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 807-814.

Takayama S, Reed JC (2001): Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat Cell Biol* 3, E237-241.

Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC (1995): Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80, 279-284.

Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z, Morimoto RI, Reed JC (1997): BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *Embo J* 16, 4887-4896.

Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, Kitada S, Zapata JM, Kochel K, Knee D, Scudiero D, Tudor G, Miller GJ *et al.* (1998): Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res* 58, 3116-3131.

Takayama S, Xie Z, Reed JC (1999): An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem* 274, 781-786.

Townsend PA, Cutress RI, Sharp A, Brimmell M, Packham G (2003): BAG-1 prevents stress-induced long-term growth inhibition in breast cancer cells via a chaperone-dependent pathway. *Cancer Res* 63, 4150-4157.

Turner BC, Krajewski S, Krajewska M, Takayama S, Gumbs AA, Carter D, Rebbeck TR, Haffty BG, Reed JC (2001): BAG-1: a novel biomarker predicting long-term survival in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 19, 992-1000.

van der Zee JA, Ten Hagen TL, Hop WC, van Dekken H, Dicheva BM, Seynhaeve AL, Koning GA, Eggermont AM, van Eijck CH (2013): Bcl-2 associated anthanogen-1 (Bag-1) expression and prognostic value in pancreatic head and periampullary cancer. *Eur J Cancer* 49, 323-328.

Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, Guerin CJ, Brunk UT, Declercq W, Vandenabeele P (2010): Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ* 17, 922-930.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP *et al.* (2010): Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98-110.

Wagenknecht B, Hermisson M, Eitel K, Weller M (1999): Proteasome inhibitors induce p53/p21-independent apoptosis in human glioma cells. *Cell Physiol Biochem* 9, 117-125.

Wang XH, O'Connor D, Brimmell M, Packham G (2009): The BAG-1 cochaperone is a negative regulator of p73-dependent transcription. *Br J Cancer* 100, 1347-1357.

Witcher M, Yang X, Pater A, Tang SC (2001): BAG-1 p50 isoform interacts with the vitamin D receptor and its cellular overexpression inhibits the vitamin D pathway. *Exp Cell Res* 265, 167-173.

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ *et al.* (2009): IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360, 765-773.

Yang X, Chernenko G, Hao Y, Ding Z, Pater MM, Pater A, Tang SC (1998): Human BAG-1/RAP46 protein is generated as four isoforms by alternative translation initiation and overexpressed in cancer cells. *Oncogene* 17, 981-989.

Yang X, Hao Y, Ding Z, Pater A (2000): BAG-1 promotes apoptosis induced by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in human cervical carcinoma cells. *Exp Cell Res* 256, 491-499.

Yawata A, Adachi M, Okuda H, Naishiro Y, Takamura T, Hareyama M, Takayama S, Reed JC, Imai K (1998): Prolonged cell survival enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells. *Oncogene* 16, 2681-2686.

Yoshino K, Motoyama S, Koyota S, Shibuya K, Usami S, Maruyama K, Saito H, Minamiya Y, Sugiyama T, Ogawa J (2011): IGFBP3 and BAG1 enhance radiation-induced apoptosis in squamous esophageal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 1070-1075.

Yu L, Lenardo MJ, Baehrecke EH (2004): Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle* 3, 1124-1126.

Zeiner M, Niyaz Y, Gehring U (1999): The hsp70-associating protein Hap46 binds to DNA and stimulates transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10194-10199.

DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Mathias Bähr, der als Direktor der Neurologischen Klinik und des Neurobiologischen Labors die Erstellung der vorliegenden Arbeit erst möglich gemacht hat.

Herrn Prof. Dr. Pawel Kermer für seine Unterstützung und schützende Hand als Doktorvater.

Herrn Dr. Christoph Dohm für die herausragende Betreuung und Beratung in der Erstellung dieser Arbeit. Nicht zuletzt durch seine freundschaftliche Zuwendung konnten schwierige Phasen der Laborarbeit gut überstanden werden.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Liman (ehemals Arbeitsgruppe Kermer). Hier insbesondere den technischen Assistentinnen Beate Veith und Sandra Gerke für die geduldige methodische Anleitung und Hilfe.

Weiteren Mitarbeitern der Laborgemeinschaft von Herrn Prof. M. Bähr wie Dr. Katrin Eckermann, Dr. Anja Büchner und Prof. Dr. Uwe Michel für die vielen hilfreichen Anregungen bei methodischen Problemen.

Dr. Margret Rave-Fränk und ihren technischen Assistentinnen der Abteilung für Radioonkologie für die Hilfe bei der experimentellen Bestrahlung.

Martin Demant und weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wulf aus der Abteilung für Hämatologie und medizinische Onkologie für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie.

Vielen Dank Ihnen und Euch allen!

LEBENS LAUF

Am 05. Mai 1986 wurde ich als erster Sohn der Lehrerin Christa Maria Müther und des Diplom-Ingenieurs Ulrich Antonius Müther in Haltern am See geboren. Mein Bruder Markus Müther wurde am 30. März 1988 geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Haltern am See von 1992 bis 1996 wechselte ich auf das Joseph-König-Gymnasium in Haltern am See, welches ich im Sommer 2005 nach dem Erwerb der allgemeinen Hochschulreife verließ. Zur Erfüllung der Zivildienstpflicht war ich bis zum darauf folgenden Sommer 2006 als Rettungssanitäter für das Deutsche Rote Kreuz im Rettungsdienst der Stadt Recklinghausen tätig.

Nach dem Beginn einer Ausbildung zum Rettungsassistenten habe ich im April 2007 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen aufgenommen. Die Ausbildung zum Rettungsassistenten konnte studienbegleitend abgeschlossen werden.

Im September 2010 habe ich meine Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe Kermer (heute Arbeitsgruppe Liman) begonnen. Während meiner gesamten Studienzeit habe ich mich als Studierendenvertreter und Tutor in der medizinischen Lehre engagiert. Zum Wintersemester 2011/2012 erfolgte ein durch das ERASMUS-Programm geförderter Studienaufenthalt an der Medizinischen Universität Wien. Famulaturen und wesentliche Teile des Praktischen Jahres habe ich im englischsprachigen Ausland absolviert. Nach Abschluss des zweiten Teils der ärztlichen Prüfung im November 2013 wurde ich im Dezember 2013 approbiert.

Im August 2014 habe ich eine Stelle als Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Münster angetreten.