

BestMasters

Cecilia Vallet

Analyse des tumorrelevanten Proteins Survivin

Molekulare Charakterisierung
der Dimerisierung



Springer Spektrum

BestMasters

Mit „BestMasters“ zeichnet Springer die besten Masterarbeiten aus, die an renommierten Hochschulen in Deutschland, Österreich und der Schweiz entstanden sind. Die mit Höchstnote ausgezeichneten Arbeiten wurden durch Gutachter zur Veröffentlichung empfohlen und behandeln aktuelle Themen aus unterschiedlichen Fachgebieten der Naturwissenschaften, Psychologie, Technik und Wirtschaftswissenschaften.

Die Reihe wendet sich an Praktiker und Wissenschaftler gleichermaßen und soll insbesondere auch Nachwuchswissenschaftlern Orientierung geben.

Cecilia Vallet

Analyse des tumorrelevanten Proteins Survivin

Molekulare Charakterisierung
der Dimerisierung

Mit einem Geleitwort von Prof. Dr. Shirley Knauer

 Springer Spektrum

Cecilia Vallet
Essen, Deutschland

BestMasters

ISBN 978-3-658-08540-7

ISBN 978-3-658-08541-4 (eBook)

DOI 10.1007/978-3-658-08541-4

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer Spektrum

© Springer Fachmedien Wiesbaden 2015

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen.

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Springer Fachmedien Wiesbaden ist Teil der Fachverlagsgruppe Springer Science+Business Media (www.springer.com)

Geleitwort

Grundlage für eine langfristige Verbesserung des Behandlungserfolgs von Krebs ist ein molekulares Verständnis der Mechanismen, welche zur Krankheitsentstehung und Progression beitragen. In diesem Zusammenhang spielt vor allem der Prozess des programmierten Zelltods, der Apoptose eine wichtige Rolle. Neben den pro-apoptotischen Caspasen spielen in diesem stringent regulierten Prozess die anti-apoptotischen Mitglieder der hochkonservierten IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*)-Familie eine wichtige Rolle. Dem IAP Survivin wird eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung sowie der Therapieresistenz zugeschrieben. Abgesehen von seiner Funktion als Apoptose-Inhibitor ist Survivin als Regulator der Zellteilung für eine korrekte Verteilung der Chromosomen verantwortlich, indem es als Teil des *Chromosomal Passenger Complex* (CPC) für dessen Anlagerung an die Zentromere sorgt. Für Survivin's duale Funktion ist ein intrinsisches nukleäres Exportsignal (NES) und dessen Interaktion mit dem Exportrezeptor Crm1 essentiell. Darüber hinaus liegt Survivin in Lösung als Dimer vor, allerdings sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sowie die biologische Funktion der Dimerisierung noch unverstanden.

So hat Frau Vallet zunächst die Auswirkungen einer Acetylierung an Lysin 129 auf die Dimerisierung anhand verschiedener Acetylierungs-Mutanten analysiert. Es gelang ihr, sehr zügig die rekombinante Expression der entsprechenden Proteine zu optimieren und so die verschiedenen Survivin-Varianten in ausreichender Menge und Qualität für die nachgeschalteten (struktur)biochemischen Analysen zu reinigen. Mittels Gelfiltrationsanalysen konnte Frau Vallet zeigen, dass entgegen bestehender Hypothesen eine Acetylierung an Position 129 keinen Einfluss auf das Dimerisierungs-Verhalten des Proteins zu haben scheint. Da das nukleäre Exportsignal (NES) von Survivin teilweise mit der Dimerisierungs-Stelle überlappt, wurden in die Analysen zusätzlich zwei unterschiedliche Export-defiziente Survivin-Mutanten, L96AL98A und F93PL96AL98A, miteinbezogen. So zeigte sich, dass diese Mutationen neben der Interaktion mit Crm1 auch die Homodimerisierung des rekombinanten Proteins verhindern, was allerdings in vorhergehenden zellbasierten Analysen nicht der Fall war. Da mittels CD-

spektroskopischer Analysen eine Mutations-induzierte Konformationsänderung des Proteins ausgeschlossen werden konnte, sollte dieses Phänomen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Auch bezüglich ihrer Studien zum Survivin-Antagonisten S12, dessen Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, zeigte sich entgegen vorheriger Vermutungen, dass dieser Hemmstoff die Dimerisierung des rekombinanten Proteins nicht zu verhindern vermag. Zusätzlich gelang es Frau Vallet, die Methode des *Sensitized Emission* FRET-Assays zu etablieren, welcher ihr nun ermöglicht, im Rahmen ihrer Dissertation in unserer Arbeitsgruppe die Auswirkungen und die pathobiologische Bedeutung der Survivin-Dimerisierung in weiterführenden Experimenten *in vivo* zu untersuchen.

Darüberhinaus verfügen die Ergebnisse dieser Masterarbeit auch über ein hohes translationales Potenzial, da das Dimerisierungsverhalten von Survivin einen neuartigen wie vielversprechenden Angriffspunkt in der Krebstherapie darstellt. So bleibt der Arbeit von Cecilia Vallet zu wünschen, dass sie eine breite und fachlich interessierte Leserschaft findet.

Prof. Dr. Shirley Knauer

Institutsprofil

Das Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB) ist eine interdisziplinäre, zentrale Einrichtung der Universität Duisburg-Essen und vernetzt die Naturwissenschaften am Campus mit der anwendungsorientierten medizinischen Forschung am Universitätsklinikum Essen. Es wurde Anfang 2003 im Zuge der Fusion der Universitäten Duisburg und Essen mit dem Auftrag gegründet, die biomedizinische Forschung und Lehre an der Universität Duisburg-Essen zu stärken. Als interdisziplinäre Schnittstelle verbindet es die Medizin mit den naturwissenschaftlichen Fächern Biologie und Chemie. Das ZMB repräsentiert deshalb eine thematische und organisatorische Struktur für die Aktivitäten von derzeit über 60 Arbeitsgruppen in Essen.

Das ZMB betreibt eine an medizinischen Fragen orientierte Grundlagenforschung in den Bereichen Onkologie, Immunologie, Nanobiomedizin, Infektion und Transplantation. Um ein sehr genaues Verständnis pathologischer Prozesse zu erreichen besteht zusätzlich die Notwendigkeit, die Biochemie, Genetik, Entwicklungsbiologie, Molekular- und Zellbiologie unterschiedlichster Lebewesen im Detail zu untersuchen. Die durch diese interdisziplinären Ansätze gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, Volkskrankheiten zu verstehen, zu diagnostizieren und behandeln zu können.

Das ZMB unterstützt als einer der nur vier Profilschwerpunkte die internationale Sichtbarkeit der Universität und spielt eine Schlüsselrolle für die Qualität von Forschung und Ausbildung am Standort. Im Zuge der Entwicklung in ein modernes, forschungs- und drittmittelstarkes Zentrum wurden in den letzten Jahren viele fachlich aufeinander abgestimmte Professuren neu geschaffen und kompetent besetzt, so dass das ZMB nun ein weitreichendes Spektrum moderner biomedizinischer Forschungsthemen abdeckt. Als weitere wichtige Säule des Strategiekonzeptes fungieren leistungsstarke Technologie-Plattformen wie die *NMR Spectroscopy* und *Analytics Core Facility* Essen (ACE) sowie die beiden *Imaging Center* Essen (IMCES) und Campus Essen (ICCE). Gleichzeitig wurden zwei vollkommen neu konzipierte Studiengänge, Medizinische Biologie und Biologie im Bachelor und Master, äußerst erfolgreich etabliert. Das Zentrum kann

seit seiner Gründung hohe Steigerungsraten im Drittmiteleincome wie auch in der Publikationsaktivität verbuchen, und ist an mehreren prestigeträchtigen Konsortialprojekten wie Sonderforschungsbereichen (SFBs) und Graduiertenkollegs der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG beteiligt.

Vorwort

Survivin ist in nahezu allen malignen Tumorerkrankungen überexprimiert und mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlungstherapie assoziiert. Eine Überexpression von Survivin wird mit einem schnelleren Fortschreiten der Erkrankung und einer geringeren Überlebensrate in Verbindung gebracht. Durch seine Rolle als Zellzyklus-Regulator und Apoptose-Inhibitor ist Survivin an zwei entscheidenden Prozessen der Onkogenese beteiligt. Zur Ausübung beider Funktionen bedarf es der Interaktion seines intrinsischen nukleären Exportsignals (NES) mit dem Kernexportrezeptor Crm1. Darüber hinaus liegt Survivin in Lösung als Dimer vor, wobei es sich bei der Homodimerisierung von Survivin und der Interaktion des Survivin-Monomers mit Crm1 um konkurrierende Prozesse zu handeln scheint. Jedoch ist bisher nicht genau verstanden, wie ein Wechsel zwischen der monomeren und der dimeren Form des Proteins reguliert ist und welche Bedeutung die Dimerisierung von Survivin für seine Funktionen in der Zelle hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Regulation der Dimerisierung von Survivin genauer untersucht. Hierzu wurden zum einen die Auswirkungen einer bereits beschriebenen Acetylierung an Lysin 129 anhand verschiedener Acetylierungs-Mutanten analysiert. Es wurde gezeigt, dass diese Acetylierung an Position 129 keinen Einfluss auf das Dimerisierungs-Verhalten des Proteins zu haben scheint. Des Weiteren wurde der Einfluss von Mutationen im NES von Survivin, welches mit der Dimerisierungs-Stelle des Proteins überlappt, anhand der NES-Mutanten L96AL98A und F93PL96AL98A untersucht. Durch die Analyse der Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Mutationen im NES von Survivin neben der Interaktion mit Crm1 auch die Homodimerisierung des rekombinanten Proteins inhibieren. Zudem wurde in dieser Arbeit der Survivin-Antagonist S12, dessen Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, im Hinblick auf seinen Einfluss auf die Dimerisierung von Survivin untersucht. Es wurde gezeigt, dass dieser Hemmstoff keinen Einfluss auf die Dimerisierung des Proteins zu haben scheint. Zusätzlich wurde die Methode des *Sensitized Emission FRET*-Assays etabliert, um die Untersuchung einer Survivin-Dimerisierung *in vivo* zu ermöglichen.

Cecilia Vallet

Inhaltsverzeichnis

Geleitwort	V
Institutsprofil	VII
Vorwort	IX
Inhaltsverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XV
Abbildungsverzeichnis	XIX
Tabellenverzeichnis	XXI
Symbole für die proteinogenen Aminosäuren	XXIII
1 Einleitung	1
1.1 Krebs	1
1.2 Apoptose	3
1.3 Zellzyklus	6
1.4 Kerntransport	8
1.5 Survivin	10
1.6 Zielsetzung	14
2 Material	15
2.1 Geräte	15
2.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.3 Chemikalien	18
2.4 Puffer und Lösungen	19
2.5 Antibiotika	22
2.6 Bakterienstämme	22
2.7 Zelllinien	22
2.8 Nährmedien und Medienzusätze	23
2.9 Plasmide	24
2.10 Primer	26
2.11 Enzyme	27
2.12 Antikörper	27
2.13 Größenstandards	28
2.14 Kits	28
2.15 Software	29
3 Methoden	30

3.1	Molekularbiologische Methoden	30
3.1.1	Polymerasekettenreaktion	30
3.1.2	Splice Overlap Extension PCR (SOE-PCR)	31
3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	31
3.1.4	Reinigung von PCR-Produkten	32
3.1.5	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	32
3.1.6	Restriktionsverdau	32
3.1.7	Ligation	32
3.1.8	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	33
3.1.9	Sequenzanalyse	33
3.2	Mikrobiologische Methoden	33
3.2.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	33
3.2.2	Langfristige Lagerung transformierter <i>E. coli</i> Bakterien	34
3.2.3	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> Bakterien	34
3.2.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> Bakterien	34
3.3	Proteinbiochemische Methoden	35
3.3.1	Reinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen	35
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
3.3.3	SDS-Gelelektrophorese	38
3.3.4	Coomassie-Färbung	39
3.3.5	Western Blotting	40
3.3.6	Gelfiltration	41
3.3.7	CD-Spektroskopie	42
3.4	Zellbiologische Methoden	42
3.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	42
3.4.2	Zellpassage	43
3.4.3	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	43
3.4.4	Herstellung von Zelllysaten	44
3.5	Fluoreszenzmikroskopische Methoden	44
3.5.1	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	44
3.5.2	Föster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Auswirkungen der Acetylierung an Lysin 129 auf die Dimerisierung von Survivin	47

4.1.1	Testexpression der Acetylierungs-Mutanten in <i>E. coli</i> SoluBL21 Bakterien.....	48
4.1.2	Herstellung der Acetylierungs-Mutanten in <i>E. coli</i> SoluBL21 Bakterien.....	50
4.1.3	Analyse der Acetylierungs-Mutanten mittels Gelfiltration.....	53
4.2	Einfluss des nukleären Exportsignals (NES) auf die Dimerisierung von Survivin	58
4.2.1	Herstellung der NES-Mutanten in <i>E. coli</i> SoluBL21 Bakterien	59
4.2.2	Analyse der NES-Mutanten mittels Gelfiltration	62
4.2.3	CD-spektroskopische Analyse der NES-Mutanten	66
4.3	Effekt des Survivin-Antagonisten S12 auf die Dimerisierung von Survivin	68
4.4	Etablierung eines FRET-Assays zur Analyse der Dimerisierung von Survivin <i>in vivo</i>	71
4.4.1	Analyse der Expression der FRET-Konstrukte im eukaryotischen System	73
4.4.2	Testtransfektion der FRET-Konstrukte	75
4.4.3	<i>Sensitized Emission</i> FRET-Assay	77
5	Diskussion	80
5.1	Auswirkungen der Acetylierung an Lysin 129 auf die Dimerisierung von Survivin	80
5.2	Einfluss des nukleären Exportsignals (NES) auf die Dimerisierung von Survivin	84
5.3	Effekt des Survivin-Antagonisten S12 auf die Dimerisierung von Survivin	87
5.4	Etablierung eines FRET-Assays zur Analyse der Dimerisierung von Survivin <i>in vivo</i>	89
5.5	Ausblick.....	94
6	Literaturverzeichnis.....	95