

*Aus der Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinischer
Immunologie*
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin
Berlin

DISSERTATION

**„Immunoproteasom und Proteasomaktivator 28 als Marker in
der Diagnostik von Autoimmun- und Tumorerkrankungen“**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Melanie Steiner, geb. Gruner
aus Lichtenstein/Sachsen

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	4
1.1 Das konstitutive und induzierbare Proteasom als Degradations-Maschinerie	4
1.2 Proteasomaktivator 28 gamma (PA28 γ) bei Apoptose und Erkrankung	5
2. Zielstellung	6
3. Material und Methoden	7
3.1 Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von PA28 γ -Serumlevel.....	7
3.2 Mikropartikel-basiertes Epitop-Mapping	8
3.3 Untersuchung Apoptose-relevanter PA28 γ -Effekte	8
4. Ergebnisse	11
4.1 Erhöhte PA28 γ -Serumlevel korrelieren mit der Krankheitsaktivität bei RA.....	11
4.1.1 Erhöhte PA28 γ -Serumlevel sind nicht krankheitsspezifisch.....	11
4.1.2 PA28 γ -Serumlevel korrelieren mit der Krankheitsaktivität bei RA-Patienten	12
4.2 Epitop-Mapping eines PA28 γ -spezifischen Antikörpers mittels Mikropartikel-basiertem Multiplex-Systems	12
4.2.1 Indirekter ELISA und Mikropartikel-Assay dienen gleichermaßen der Epitoperkennung poly- und monoklonaler PA28 γ -Antikörper	13
4.2.2 Rekombinant hergestellte Peptide ermöglichen „Fine-Mapping“	13
4.2.3 Mikrobead-Assay mit rekombinant hergestellten Peptiden eignet sich auch für andere Antigene	13
4.3 Caspase-Inhibierung durch anti-apoptotisches PA28 γ	14
4.3.1 PA28 γ wirkt antiapoptotisch in B8-Mausfibroblasten	14
4.3.2 Knockdown von PA28 γ in HT29 führt zu gesteigerter Apoptoserate.....	15
4.3.3 PA28 γ beeinflusst aktiviertes Tumorsuppressorprotein p53.....	16
4.3.4 PA28 γ und Caspase 3/7 beeinflussen sich gegenseitig	16

5. Diskussion und Schlussfolgerung	17
5.1 PA28 γ -Level sind nicht krankheitsspezifisch aber korrelieren mit der Krankheitsaktivität bei RA	17
5.2 Multiplexformat ermöglicht Epitoperkennung.....	18
5.3 PA28 γ wirkt antiapoptotisch durch Inhibierung der Caspase-Aktivität.....	18
5.4 Fazit und Ausblick	19
6. Literaturverzeichnis	20
Ausgewählte Publikationen	23
I) Gruner <i>et al.</i> , 2014	24
II) Schmidt <i>et al.</i> , 2016	35
III) Moncsek <i>et al.</i> , 2015	47
Anteilerklärung.....	66
Lebenslauf.....	68
Publikationsliste	70
Eidesstattliche Versicherung.....	72
Danksagung	73

Zusammenfassung

Der multikatalytische Proteasomkomplex und das induzierbare Immunoproteasom sind für den Abbau einer Vielzahl zellulärer Proteine zuständig und spielen eine entscheidende Rolle in Zellzyklus, Antigenpräsentation und Apoptose. Aus diesem Grund steigt auch das Interesse an proteasomalen Proteinen und assoziierten Aktivatoren als Marker in der Diagnostik oder bei der Aufklärung grundlegender Biomechanismen. Besonders der Proteasomenaktivator 28 gamma (PA28 γ) wurde bereits mit Autoimmun- und Tumorerkrankungen sowie mit p53-vermittelten Apoptoseprozessen in Verbindung gebracht, wobei sowohl von erhöhten Serumkonzentrationen als auch Autoantikörpern gegen PA28 γ berichtet wurde.

Ziel der Arbeit war es daher, die Relevanz von PA28 γ als Biomarker zu untersuchen, geeignete Tests zur Serumlevel- und Antikörperepitop-Bestimmung zu generieren und grundlegende Einflüsse von PA28 γ auf das Apoptoseverhalten *in vitro* zu untersuchen.

Um PA28 γ -Serumlevel von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen zu bestimmen, wurde ein neuartiger quantitativer Sandwich-ELISA entwickelt. Die Ergebnisse zeigen, dass PA28 γ keinen krankheitsspezifischen Biomarker darstellt, jedoch mit der Krankheitsaktivität bei RA-Patienten korreliert. Somit kandidiert PA28 γ als neuer, vielversprechender Verlaufsmarker in der Behandlung der RA.

Mit einem neuartigen Mikrobead-Assay im Multiplex-Format war es möglich, spezifische Epitope von zu untersuchenden PA28 γ -Antikörpern zu detektieren. Dieser Test kann sowohl in Diagnostik als auch bei der Grundlagenforschung Anwendung finden.

Die Untersuchung der antiapoptotischen Wirkung von PA28 γ erfolgte mit Hilfe PA28 γ -überexprimierender muriner Fibroblasten (B8) sowie HT29-Darmkrebzellen, deren PA28 γ -Level mittels miRNA-Knockdown minimiert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass PA28 γ einen großen Einfluss auf eine Vielzahl von Apoptosemarkern hat. Insbesondere werden, obwohl PA28 γ selbst Substrat der Caspase ist, bei einer Überexpression die Caspaseaktivitäten vermindert und bei einem Knockdown gesteigert, was für eine gegenseitige Beeinflussung spricht. Außerdem führt eine Überexpression von PA28 γ zu einer Akkumulation von transkriptionell aktiven phosphoryliertem p53 im Nukleus.

Die weitreichenden antiapoptotischen Effekte von PA28 γ sowie der Einsatz als Biomarker im Krankheitsverlauf bedürfen weiter führender Untersuchungen. Dies könnte letztendlich zur Aufklärung von Bioprozessen im Krankheitsfall sowie der Therapie von Tumor- und Autoimmunerkrankungen beitragen.

Abstract

The multicatalytic proteasome complex and the inducible immunoproteasome are essential for the degradation of a various number of cellular proteins and play a crucial role in cell cycle, antigen presentation and apoptosis. Thus, the interest on proteasomal proteins and associated activators as a marker in diagnostics or in enlightenment of rudimental bio-mechanisms remains unrefracted. Especially, proteasome activator 28 gamma (PA28 γ) was connected to autoimmune and tumor disorders and also to p53 mediated apoptotic processes, in which high PA28 γ serum levels as well as autoantibodies have been reported.

The aim of this study was to estimate the relevance of PA28 γ as biomarker, to develop useful assays for determination of serum levels and antibody epitope detection and to study rudimental influences of PA28 γ on apoptotic behavior *in vitro*.

To evaluate PA28 γ serum levels in patients with different disorders, a novel quantitative sandwich ELISA was developed. Although the application of this assay for diagnostic purposes of specific diseases remains limited, the correlation with disease activity in patients with RA suggests a prognostic value. Therefore, PA28 γ applies as novel marker for disease activity especially in treatment studies.

The detection of specific epitopes recognized by relevant PA28 γ antibodies was performed by a novel multiplex assay using microbead technology. This assay could be useful in diagnostics as well as basic research.

Anti-apoptotic effects of PA28 γ were investigated by using PA28 γ -overexpressing murine fibroblasts (B8) and PA28 γ -silenced HT29 adenocarcinoma cells. The findings indicated that PA28 γ has a strong influence on different apoptotic hallmarks. Although PA28 γ itself is a substrate of caspases, overexpression of PA28 γ leads to a decrease of caspase activity and *vice versa* knockdown results in an increase. Thus, PA28 γ and effector caspases mutually restrict each other. Furthermore, an overexpression of PA28 γ leads to an accumulation of transcriptional active phosphorylated p53 in the nucleus.

The extensive anti-apoptotic effects of PA28 γ as well as the application as biomarker for disease activity requires further studies. In summary, this could lead to an enlightenment of disease processes and contribute therapeutical targets of autoimmune and tumor disorders.

Abkürzungsverzeichnis

AOSD	Adultes Still Syndrom (adult-onset Still´s disease)
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2 assoziiertes X
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-X _L	B-cell lymphoma-extra large
CHX	Cycloheximid
CRP	C-reaktives Protein
CTD	Kollagenosen (connective-tissue diseases)
DAS28	Disease activity score 28
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESR	Erythrocyte sedimentation rate
HA	Hemagglutinin
IAP	inhibitor of apoptosis protein
IgG	Immunglobulin gamma
INF γ	Interferon gamma
Mart1	Melanoma antigen recognized by T cells 1
MDM2	Murine double minute 2
Myc	C-myc Tag-Petid (EQKLISEEDL)
NaBt	Natriumbutyrat
PA28	Proteasomaktivator 28
PM	Polymyositis
PMMA	Polymethylmetacrylat
RA	Rheumatoide Arthritis
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl-sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SRC-3	Steroid receptor coactivator 3
SS	Sjögren´s Syndrom
UCTD	Undifferenzierten Kollagenosen (undifferentiated connective-tissue disease)
VP1	Viral coat protein 1

1. Einleitung

1.1 Das konstitutive und induzierbare Proteasom als Degradations-Maschinerie

Das Proteasom ist als multikatalytischer Proteinkomplex für den Abbau fehlgefalteter oder unnötiger nukleärer und zytosolischer Proteine essentiell und reguliert so eine Vielzahl zellulärer Funktionen. Der konstitutive und induzierbare Kernkomplex des Proteasoms (20S/i20S) ist aus 28 Untereinheiten aufgebaut, die in zwei äußeren α -Ringen und 2 inneren β -Ringen organisiert sind. Die proteolytische Aktivität ist den β -Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ zuzuschreiben, die Caspase-, Trypsin- oder Chymotrypsin-ähnliche Schnittpräferenzen aufweisen (Ciechanover, 1998; Tanaka et al., 2012). Dieses Schnittverhalten kann durch Induktion mit LPS oder Zytokinen, insbesondere Interferon- γ ($IFN\gamma$), nach entzündlichen Reaktionen modifiziert werden, indem die konstitutiven durch die induzierbaren β -Untereinheiten $i\beta 1$, $i\beta 2$ und $i\beta 5$ ausgetauscht werden (Abb. 1). Die sogenannten Immunoproteasomen (i20S) sind für die Pathogenabwehr und

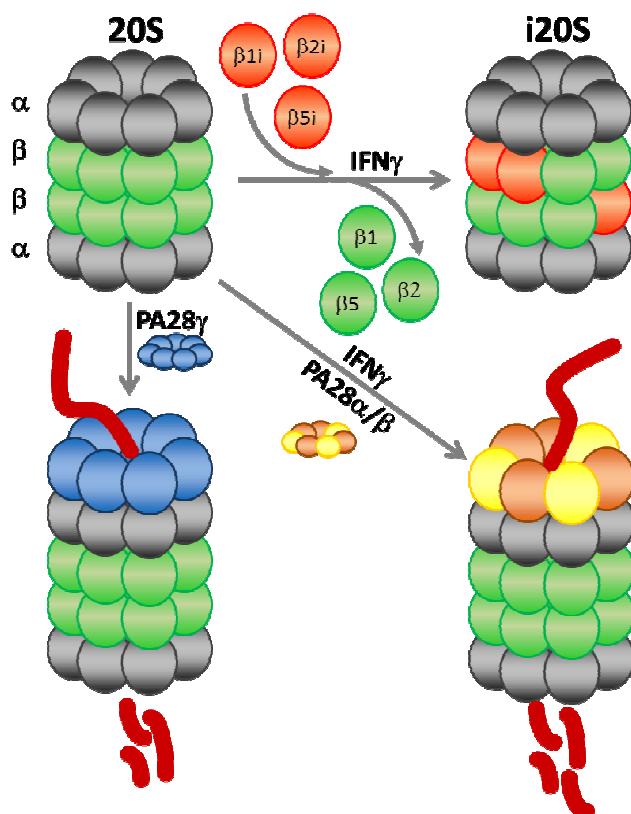


Abb. 1: Aufbau des konstitutiven (20S) und induzierbaren (i20S) Proteasoms und Abbau von Proteinen zu Peptidfragmenten nach Aktivierung mittels $PA28\alpha/\beta$ -Heteroheptamer (induziert durch Interferon- γ ($IFN\gamma$) oder $PA28\gamma$

Antigenpräsentation unerlässlich (Groettrup et al., 1996; Kuckelkorn et al., 1995). Eine modifizierte Expression und Aktivität konstitutiver und induzierbarer Proteasomen kann krankheitsassoziiert sein. Beispielsweise sind die B-Lymphozyten bei Patienten mit Sjögren's Syndrom (SS) $i\beta 1$ -defizient während die anderen β -Untereinheiten auf mRNA-Ebene verstärkt exprimiert werden. Dies führt bei SS zu einer erhöhten Apoptoseresistenz nach der Inhibierung des Proteasoms (Martinez-Gamboa et al., 2013). Zirkulierende konstitutive Proteasomen konnten mit klinischer Relevanz im Krankheitsverlauf und der Prognostik multipler Myelome (Jakob et al., 2007) und in erhöhten Konzentrationen bei systemischen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden (Egerer et al., 2002).

1.2 Proteasomaktivator 28 gamma (PA28 γ) bei Apoptose und Erkrankung

Verschiedene Proteasomaktivatoren sorgen für die Aktivierung des latenten Proteasom-Kernkomplexes. Neben dem ATP-abhängigen PA700 Komplex, der für die Degradation ubiquitinierter Proteine sorgt, gibt es auch die ATP- und Ubiquitin-unabhängige Aktivatorfamilie PA28 (Abb. 1). Dazu gehören die IFN γ -induzierbaren, heteroheptameren PA28 α und PA28 β Untereinheiten sowie das nicht-induzierbare PA28 γ -Homoheptamer (Stadtmueller und Hill, 2011; Tanaka et al., 2012). Während die PA28 α/β Komplexe vorrangig in die Antigenprozessierung und -präsentation über MHC Klasse I involviert sind, ist die genaue Rolle von PA28 γ größtenteils ungeklärt.

PA28 γ wurde erstmals als Ki-Antigen bei Patienten mit systemischen Lupus erythematoses (SLE) beschrieben (Tojo et al., 1981). Es aktiviert die Trypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms nur schwach und spielt eine Rolle bei Zellwachstum und -proliferation. Außerdem zeigte sich in PA28 γ -defizienten embryonalem Mausfibroblasten eine gesteigerte Apoptoserate (Barton et al., 2004). Im Zuge dessen konnten mehrere Interaktionspartner von PA28 γ identifiziert werden, die an der Regulation apoptotischer Prozesse beteiligt sind. So fördert PA28 γ den proteasomalen Abbau von ubiquitiniertem p53 durch eine Verstärkung der Interaktion von p53 mit der E3 Ligase MDM2 (Zhang und Zhang, 2008). Außerdem sind einige Substrate des PA28 γ -20S-Komplexes, wie das Onkogen SRC-3 (steroid receptor coactivator 3) sowie die Zellzyklusinhibitoren und Tumorsuppressorproteine p21, p16 und p14, bei Zellzyklus und Apoptose beteiligt. Auch PA28 γ selbst kann als Substrat von Caspasen während des programmierten Zelltodes fungieren. Darüber hinaus konnten Proteasom-unabhängige Funktionen nachgewiesen werden: PA28 γ spielt eine Rolle bei der Chromosomenstabilität während der Mitose und in der Organisation von Splicing-Regionen innerhalb des Nukleoplasmas, sogenannter „Nuclear Speckles“ (zusammengefasst in Mao et al., 2008).

Diese vielfältigen Funktionen von PA28 γ in Zellzyklus und Apoptose führten zu der Annahme, dass PA28 γ bei der Entstehung von Tumor- und Autoimmunerkrankungen involviert ist. Autoantikörper gegen PA28 γ bei SLE-Patienten und ein klinischer Zusammenhang mit deren Krankheitsverlauf konnten schon früh beschrieben werden (Yamanaka et al., 1992; Cavazzana et al., 2005). Eine Überexpression von PA28 γ konnte u.a. in malignem Gewebe von Patienten mit Mamma-, Kolorektal- und Schilddrüsenkarzinom nachgewiesen werden (Mao et al., 2008). Ein Nachweis erhöhter PA28 γ -Serumlevel erfolgte erstmals bei Darmkrebspatienten (Roessler et al., 2006), was für eine diagnostische Relevanz von PA28 γ als Biomarker spricht.

2. Zielstellung

Da sich die klinische Diagnostik und die Prognose von individuellen Krankheitsverläufen insbesondere bei Tumor- und Autoimmunerkrankungen immer noch schwierig gestaltet, war ein Ziel der Arbeit neue Biomarker zu identifizieren und zu etablieren. Vorarbeiten haben gezeigt, dass 20S Proteasomen in Serum- bzw. Plasmaproben von Patienten mit SS und Multiplen Myelom erhöht sind (Egerer et al., 2002; Jakob et al., 2007) und Autoantikörper gegen 20S-Untereinheiten bei Autoimmunerkrankungen (Feist et al., 1999) bekannte Phänomene sind. Außerdem sprechen vor allem das Vorkommen von PA28 γ -Autoantikörpern bei SLE (Yamanaka et al., 1992) und die Überexpression von PA28 γ in Tumorgewebe (Mao et al., 2008) für eine klinische Relevanz des Proteasomaktivators als Biomarker in der Diagnostik. Mit Hilfe der Entwicklung eines neuen quantitativen Sandwich-ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) zur Bestimmung der PA28 γ -Level in Serumproben von Patienten mit unterschiedlichen malignen oder autoimmunen Erkrankungen sollte PA28 γ als potentieller Biomarker überprüft werden. Außerdem sollte die Relevanz der PA28 γ -Serumlevel im klinischen Verlauf untersucht werden, um zu ermitteln, ob anhand der Konzentrationen Aussagen über Krankheitsaktivität und -prognose getroffen werden können.

Im Zusammenhang mit der Entwicklung des Sandwich-ELISAs war es notwendig unterschiedliche PA28 γ -spezifische Antikörper zu gewinnen. Diese wurden nicht nur für die Tauglichkeit im ELISA getestet, sondern sollten auch in einem neuartigen Mikropartikel-basierten Assay mit immobilisierten PA28 γ -Peptidfragmenten zum Epitop-Mapping eingesetzt werden. Der Mikropartikelassay sollte der Identifizierung antikörperspezifischer Epitope dienen und somit möglicherweise zum Verständnis der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beitragen.

Da eine Rolle von PA28 γ bei Zellzyklus- und Apoptoseprozessen unumstritten ist und ein Einfluss des Aktivators auf die Entstehung verschiedener Erkrankungen, insbesondere Tumor- und Autoimmunerkrankungen, möglich ist, sollten grundlegende Mechanismen von PA28 γ *in vitro* aufgeklärt werden. Dazu sollten in PA28 γ -überexprimierenden B8-Mausfibroblasten sowie in PA28 γ -herunterregulierten HT29 Darmkrebszellen die PA28 γ -vermittelten Effekte während der Apoptose untersucht werden. Ziel war es eine anti-apoptotische Wirkung von PA28 γ nachzuweisen und Rückschlüsse auf den biologischen Wirkungsmechanismus von PA28 γ auf bestimmte Zielproteine zu ziehen.

3. Material und Methoden

3.1 Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von PA28 γ -Serumlevel

Um zirkulierende PA28 γ -Level in humanen Seren zu quantifizieren, war es notwendig, einen indirekten Sandwich-ELISA zu entwickeln. Mikrotiterplatten (Polysorp, Nunc) wurden mit monoklonalem Maus-anti-PA28 γ Antikörper (Santa Cruz) beschichtet und freie Bindungsstellen blockiert. Humane Seren wurden 1:2 verdünnt und zu den Wells pipettiert. Als Kontrollen zur Kalkulation des „Cut off“ dienten 20 Seren gesunder Spender. Außerdem wurden 104 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 34 mit Sjögren's Syndrom (SS), 15 mit adultem Still Syndrom (AOSD) sowie 66 Patienten mit verschiedenen Kollagenosen (CTD) wie Polymyositis (PM, n = 18), systemischen Lupus erythematoses (SLE, n = 37) und undifferenzierter Kollagenose (UCTD, n = 11) auf ihre PA28 γ -Serumlevel untersucht. Um eine Verlaufsstudie über die PA28 γ -Level während der Behandlung von RA-Patienten mit Abatacept zu erstellen, wurden 13 Patienten vor und 16 bzw. 24 Wochen nach Beginn der Behandlung untersucht. Die erhaltenen PA28 γ -Level wurden mit der Krankheitsaktivität (DAS28-ESR, disease activity score 28 – erythrocyte sedimentation rate) und dem C-reaktivem Protein (CRP) Wert verglichen. Alle Patienten wurden an der Charité – Universitätsmedizin Berlin nach schriftlichem Einverständnis eingeschlossen. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité genehmigt (EA1/032/08).

Vom Fänger-Antikörper gebundenes PA28 γ wurde mit einem zweiten PA28 γ -spezifischen Antikörper erfasst. Dieser polyklonale Antikörper wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit einem PA28 γ -spezifischen Peptid generiert und chromatografisch aufgereinigt. Die IgG-Fraktion wurde aus einer Ammoniumsulfat-gefällten und dialysierten Suspension des Hyperimmunserums mittels Protein A-Säulenchromatographie isoliert. Spezifische PA28 γ -IgGs wurden weiterhin über eine Ultra Link-Matrix (Thermo Fisher Scientific), an welche das PA28 γ -Peptid-Immunogen gekoppelt wurde, mit Hilfe der Äkta FPLC (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Reinheit und Wirksamkeit der generierten Antikörper wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot getestet. Die Detektion dieses Antikörpers im ELISA erfolgte durch Zugabe von sekundärem Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Kaninchen IgG Antikörper (Dianova), der eine Umsetzung des Substrates Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich) ermöglichte. Nachdem die Reaktion mit Stop-Lösung (Sigma-Aldrich) inhibiert wurde, erfolgte die Messung der Absorption bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm am ELISA Plattenleser Synergy HT (Biotek).

Um eine Quantifizierung der PA28 γ -Serumlevel zu ermöglichen, war es außerdem notwendig eine Kalibrierung auf jeder ELISA-Platte mitzuführen. Dazu wurde rekombinantes His-getaggetes PA28 γ in *E. coli* exprimiert und über einen Harnstoff-haltigen Reinigungsschritt gewonnen. His-PA28 γ wurde in einer seriellen Verdünnung von 3,125 bis 200 ng/ml eingesetzt und die ermittelten Absorptionen zur Erstellung der Kalibriergeraden genutzt.

3.2 Mikropartikel-basiertes Epitop-Mapping

Mit einem Mikropartikel-basiertem Epitop-Mapping-Verfahren sollte eine zeit- und kostensparende Alternative zu bisherigen Methoden entwickelt werden. Im Kooperationsprojekt wurde Streptavidin an carboxylierten Polymethylmetacrylat (PMMA)-Beads (Polyan GmbH) gekoppelt, woran biotinylierte Peptide oder Proteinfragmente immobilisiert wurden. Diese wurden entweder chemisch synthetisiert (Biosyntan GmbH) oder in *E.coli* AVB101 als GST-Fusionsprotein exprimiert. Die Biotinylierung erfolgte über den AviTagTM und der Zugabe von Biotin zum Medium während der Kultivierung der transformierten Zellen. Nach Lyse der Zellen wurden die Antigen-enthaltenden Proteingemische bzw. die synthetisierten und gelösten Peptide zu den Streptavidin-gecoateten Mikropartikeln gegeben. Eine Untersuchung im Multiplex-Format wurde ermöglicht durch die Unterscheidung definierter Mikropartikelpopulationen in deren Größe und Fluoreszenzmarkierung, wodurch bis zu 18 Epitope gleichzeitig in einem Ansatz untersucht werden konnten. Die unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Populationen wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt und mit dem zu untersuchenden Antikörper inkubiert. Antigen-Antikörper-Konjugate wurden mittels Cy5-gekoppeltem sekundären Antikörper (Dianova) markiert. Nach Überführung in eine Mikrotiterplatte wurden Fluoreszenzaufnahmen der Mikropartikel mit Hilfe der VideoScan-Technologie angefertigt und mittels Software ausgewertet (Rödiger et al., 2011).

Die so erhaltenen Ergebnisse wurden mit ELISA-Daten verglichen, bei deren Generierung biotinylierte Peptide an Streptavidin-gecoatete Wells von Mikrotitelplatten gebunden wurden und die Antikörper-Reaktivität über einen indirekten ELSIA gemessen wurde. Dieser ELISA-Assay wurde von mir entwickelt und validiert.

3.3 Untersuchung Apoptose-relevanter PA28 γ -Effekte

Um den Effekt von PA28 γ auf den programmierten Zelltod zu untersuchen, wurde PA28 γ in der murinen Fibroblasten-Zelllinie B8 mittels eines PA28 γ -cDNA-Vektors (pSG5) überexprimiert und in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT29 mittels PA28 γ -miRNA-codierender

Vektoren (RNAi Expression Vector Kit, Invitrogen) degradiert. Zur Kontrolle dienten Leervektor-transfizierte B8pSG5-Klone bzw. Nonsense-miRNA-codierende Vektoren in HT29 Klonen. Zur Induktion von Apoptose wurden B8-Zellen mittels UV-C (254 nm, 115 J/m²) und HT29 Zellen mittels Natriumbutyrat (5 mM für 24 h) behandelt und die geernteten Zellen untersucht. Alle Versuche an den HT29-Zellen sowie die generierten Ergebnisse wurden von mir durchgeführt, validiert und ausgewertet.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS Canto II, Beckman Coulter) wurde die Zellzahl in der subG1 Phase nach Ethanol-Fixierung der Zellen in ihrem Zellzyklus und Anfärben der DNA mit Propidiumjodid bestimmt. Frühe Apoptose wurde mittels der Annexin V-Färbung (Roche Diagnostics) von exponiertem Peptidylserin auf der Zellmembran und gleichzeitiger Zugabe von Propidiumjodid zur Differenzierung apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt.

Die Messung der Caspase-Aktivität erfolgte nach Aufschluss der Zellen mit Hilfe von Caspase-9- und Caspase-3/7-spezifischen Substraten Ac-LEHD-AMC bzw. Ac-DEVD-AMC (Enzo Life Science) im Mikrotiterplatten-Format. Die Abspaltung und Akkumulation von AMC wurde aller 60 min am Fluoreszenzplattenleser (PerSeptive Biosystems) bei einer Exzitation von 360 nm und einer Emission von 460nm gemessen.

Auf Proteinebene erfolgte die Identifikation PA28 γ - und Apoptose-relevanter Proteine durch Auftrennung definierter Mengen cytosolischer, nukleärer oder totaler Zelllysate mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot, bei dem sowohl laboreigene Hyperimmunsera als auch kommerzielle Antikörper zum Einsatz kamen. Von besonderem Interesse waren neben dem Nachweis der PA28 γ -Überexpression bzw. dem PA28 γ -Knockdown durch Kaninchen-anti-PA28 γ (K58.4) auch verschiedenste Proteine, die in Zellzyklus und Apoptose eine Rolle spielen. Als Ladungskontrolle und zur Normalisierung der Bandenintensitäten diente der Nachweis von Tubulin alpha (Sigma-Aldrich). Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte nach Zugabe von Meerrettichperoxidase-gekoppeltem sekundärem Ziege-anti-Maus oder Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova) und ECL am Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics).

Um den Einfluss von PA28 γ während der Apoptose auch auf RNA-Ebene zu erfassen, wurde RNA mittels TriPure Reagent (Roche Diagnostics) aus B8-Transfektanten extrahiert und in cDNA umgeschrieben. SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) und spezifische Primer wurden eingesetzt, um die cDNA mittels Real-Time PCR am iCycler iQ5 (Biorad) zu amplifizieren. Die mRNA-Level aller Zielgene wurden mit Hilfe des Referenzgens Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert.

Um Stabilisierungs- und Abbauprozesse von p53 besser verstehen zu können, wurden B8-Zellen transient mit pcDNA3.1-p53myc/his und pEGFP-HA-Ub bzw. entsprechenden Kontrollen transfiziert und Apoptose mittels UV-C ausgelöst. Cycloheximid und MG132 dienten der Inhibierung von Translation und des proteasomalen Abbaus ubiquitinielter Proteine. Als Positivkontrolle für Ubiquitinylierung diente das Melanomantigen Mart-1. Immunopräzipitationsversuche wurden mittels μ MACS c-myc Tagged Protein Isolation Kit (Milteny) durchgeführt.

Pulse-chase Experimente und Immunopräzipitation wurden durchgeführt, um Verlauf und Interaktion von PA28 γ nachvollziehen zu können. Dazu wurden PA28 γ -überexprimierende B8-Zellen nach Zugabe von INF γ (Kontrolle ohne INF γ) mit mCi markiert und zur Nachverfolgung in Cys/Met-haltigem Medium kultiviert. Die Immunopräzipitation der gewonnenen Zelllysate erfolgte mit PA28 γ - bzw. PA28 α -spezifischen Hyperimmunseren an Protein A Sepharose.

4. Ergebnisse

4.1 Erhöhte PA28 γ -Serumlevel korrelieren mit der Krankheitsaktivität bei RA

Publikation I: Gruner, M., Moncsek, A., Rödiger, S., Kühnhardt, D., Feist, E., Stohwasser, R., 2014. Increased proteasome activator 26 gamma (PA28 γ) levels are unspecific but correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. BMC Musculoskelet Disord. 28;15:414. (doi: 10.1186/1471-2474-15-414.)

Zur Etablierung eines quantitativen Sandwich-ELISAs zur Bestimmung von PA28 γ -Level in Patientenseren wurde neben einem kommerziellen monoklonalen Fänger-Antikörper, der an die Mikrotiterplatten gekoppelt wurde, ein polyklonaler zweiter Antikörper zur Detektion von gebundenem PA28 γ eingesetzt. Um die Spezifität dieses Antikörpers zu erhöhen, wurden PA28 γ -sequenzspezifische IgGs aus dem Kaninchenhyperimmunserum über mehrere chromatografische Schritte aufgereinigt (Abbildung 1 in I). Mit Hilfe der Antikörper und des rekombinant gewonnen His-PA28 γ konnte eine Sensitivität des entwickelten Sandwich-ELISAs von bis zu 3 ng/ml erreicht werden. Nach Validierung des ELISAs und Sicherstellung der Spezifität gegenüber PA28 γ , konnte der entwickelte Assay zur Quantifizierung von PA28 γ -Serumlevel in Patientenproben heran gezogen werden.

4.1.1 Erhöhte PA28 γ -Serumlevel sind nicht krankheitsspezifisch

Ein Ziel der Arbeit bestand darin, zu zeigen, ob erhöhte PA28 γ -Konzentrationen krankheitsspezifisch sind. Um eine „Cut-off“ für erhöhte PA28 γ -Serumlevel festzulegen, wurden die Seren von 20 gesunden Blutspendern untersucht. Der mittlere PA28 γ -Gehalt lag bei 17,5 +/- 7,4 ng/ml, wodurch sich ein „Cut-off“ von 39,8 ng/ml ergab. Seren, die diesen Schwellenwert überschritten, wurden als PA28 γ -positiv deklariert. Um eine möglichst weite Spanne verschiedener Erkrankungen abzudecken, wurden neben Tumorpatienten auch Patienten mit diversen Autoimmunerkrankungen wie RA, SS, AOSD, SLE, PM und UCTD untersucht.

Die PA28 γ -Serumlevel waren bei allen 247 Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden im Mittel signifikant erhöht. Insgesamt zeigten 24,7% der Patienten Werte über dem „Cut-off“. Wurden die einzelnen Patientengruppen betrachtet, so zeigte sich, dass v.a. die Werte von SS-Patienten zu 29,4% über denen der Gesunden lagen. Auch die anderen Patientengruppen zeigten zum Teil erhöhte PA28 γ -Level: Bei RA bis zu 26,9%, bei AOSD 13,3%, bei anderen Kollagenosen (SLE, PM, UCTD) 25,8% und bei verschiedenen Tumorerkrankungen immerhin noch 10,7% der Fälle. Zusammengefasst waren die PA28 γ -

Serumlevel bei allen Patientengruppen, ausgenommen der AOSD- und SLE-Kohorte, signifikant erhöht im Vergleich zu den gesunden Probanden (Abbildung 2 und Tabelle 2 in I).

4.1.2 PA28 γ -Serumlevel korrelieren mit der Krankheitsaktivität bei RA-Patienten

Um die Korrelation zirkulierender PA28 γ -Serumlevel mit bekannten Krankheitsparametern zu ermitteln, wurden RA-Patienten vor und nach Behandlung mit dem Biologicum Abatacept untersucht.

Im ersten Abschnitt 16 Wochen nach Behandlungsstart kam es in 61,5% der Fälle (8/13) zu einer Abnahme der PA28 γ -Level. Jedoch erreichten sechs dieser acht Patienten 24 Wochen nach Beginn der Abatacept-Gabe annähernd wieder ihre Ausgangswerte (Abbildung 3B in I). Außerdem wurden PA28 γ -Serumlevel der behandelten 13 RA-Patienten mit bekannten relevanten RA-Markern verglichen. Eine signifikant positive Korrelation konnte insbesondere mit einem etablierten Score für Krankheitsaktivität (DAS28-ESR, disease activity score 28 - erythrocyte sedimentation rate). Die Korrelation der PA28 γ -Serumlevel mit dem C-reaktivem Protein (CRP) war jedoch nicht signifikant (Abbildung 3A in I).

4.2 Epitop-Mapping eines PA28 γ -spezifischen Antikörpers mittels Mikropartikel-basiertem Multiplex-Systems

Publikation II: Schmidt, C., Rödiger, S., Gruner, M., Moncsek, A., Stohwasser, R., Hanack, K., Schierack, P., Schröder, C., 2016. Multiplexed localization of sequential peptide epitopes by a planar microbead chip. *Anal Chim Acta.* 18;908:150-60. (doi: 10.1016/j.aca.2015.12.030.)

Die Identifikation von spezifischen Epitopen bestimmter Antikörper spielt vor allem beim Verständnis der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und bei der Entwicklung Antikörper-basierter Therapien eine entscheidende Rolle. Bisher eingesetzte Methoden sind oftmals zeit- und kostenaufwendig und erlauben kein „high throughput“-Screening. Aus diesem Grund wurde eine Mikropartikel-basierte Multiplex-Methode entwickelt, die mit Hilfe von Streptavidin-gekoppelten Mikrobeads eine Präsentation von bis zu 18 biotinylierten Antigenpeptiden gleichzeitig erlaubt. Um die Kosten dieses Assays so gering wie möglich zu halten, wurde im weiteren Verlauf auf teure, synthetisch hergestellte Peptide verzichtet und diese rekombinant in *E. coli* produziert und gleichzeitig *in vivo* biotinyliert.

4.2.1 Indirekter ELISA und Mikropartikel-Assay dienen gleichermaßen der Epitoperkennung poly- und monoklonaler PA28 γ -Antikörper

Zur Verifizierung des neu entwickelten Mikropartikel-Assays wurden die erhaltenen Ergebnisse mit denen eines von mir bereits etablierten indirekten ELISAs verglichen. Ein polyklonales Kaninchenserum, welches durch Immunisierung mit einem PA28 γ -Peptid (14-KVDSFRERITSEAED-27) gewonnen wurde, wurde für den Vergleich der zwei Methoden herangezogen. Verschiedene, überlappende synthetische PA28 γ -Peptide wurden an Streptavidin-beschichtete Mikrotiter-Platten bzw. Mikropartikel gebunden und die Hyperimmunseren zum Epitop-Mapping hinzu gegeben. In beiden Assays zeigt sich, dass die Kaninchenserum mit einem 14-mer langen Peptid namens Sto13 (16-DSFRERITSEAEDL-29) reagierten, während keine Reaktion mit dem angrenzenden Peptid Sto12 (1-MASLLKVDQEVKLVDSF-18) oder anderen Sequenzen zu verzeichnen war (Abbildung 2 in II).

Ein weiterer, kommerziell erworbener monoklonaler PA28 γ -Antikörper, der durch Immunisierung einer Maus mit den PA28 γ -spezifischen Aminosäuren 45 bis 147 generiert wurde, zeigte im Mikrobead-Assay eine starke Reaktivität mit dem Peptid Sto18 (79-LDGPTYKKRRLDECEAF-96), so dass das spezifische Epitop des Antikörpers weiter eingegrenzt werden konnte (Abbildung 4E in II).

4.2.2 Rekombinant hergestellte Peptide ermöglichen „Fine-Mapping“

Das zuvor mittels ELISA und Mikropartikel-Assay identifizierte PA28 γ -Antigenpeptid Sto13 der Kaninchen-Hyperimmunseren wurde zur genaueren Epitop-Ermittlung in 3 kürzere Fragmente zerlegt (Sto13-AB, Sto13-BC und Sto13-CD) und rekombinant in *E.coli* exprimiert, *in vivo* GST-getaggt und biotinyliert. Die so erhaltenen Antigene sowie weitere nicht-relevante PA28 γ -Peptide wurden an die Streptavidin-gekoppelten Mikropartikel gebunden und das polyklonale Serum hinzugegeben. Die Ergebnisse zeigten, dass vor allem die C- und N-terminale, jedoch nicht die zentrale Region des Sto13-Peptids als Epitop fungiert, was auch mittels ELISA bestätigt werden konnte (Abbildung in II).

4.2.3 Mikrobead-Assay mit rekombinant hergestellten Peptiden eignet sich auch für andere Antigene

Das Hamster-Polyomavirusprotein VP1 (viral coat protein 1), welches zur Generierung monoklonaler Antikörper eingesetzt wird, wurde als weiteres Protein neben PA38 γ verwendet, um den Mikrobead-Assay zu verifizieren. Zunächst wurde über ein grobes Mapping des 388

Aminosäuren langen Proteins der zentrale Bereich als Epitop eines kommerziellen monoklonalen Anti-VP1-Antikörpers ermittelt, wobei es keine Rolle spielte, ob die Fragmente am C- oder N-Terminus *in vivo* biotinyliert wurden (Abbildung in II). Dieses immunogene Fragment wurde in weitere 8 überlappende Subfragmente zerlegt, die erneut rekombinant exprimiert und *in vivo* biotinyliert wurden. Mittels dieses Feinmappings konnte Fragment 2 ζ und im speziellen die Sequenz GRYPIEIW als Epitop des monoklonalen Antikörpers identifiziert werden (Abbildung in II).

4.3 Caspase-Inhibierung durch anti-apoptisches PA28 γ

Publikation III: Moncsek, A., Gruner, M., Meyer, H., Lehmann, A., Kloetzel, PM., Stohwasser, R., 2015. Evidence for anti-apoptotic roles of proteasome activator 28 γ via inhibiting caspase activity. *Apoptosis*. 20(9), 1211-28. (doi: 10.1007/s10495-015-1149-6.)

Da die Rolle des Proteasomaktivators 28 gamma bei apoptotischen Prozessen längst nicht abschließend geklärt ist, sollten antiapoptotische Effekte in PA28 γ -überexprimierenden B8-Mausfibroblasten und proapoptotische Effekte in humanen HT29 Zellen mit Silencing des PSME3-Gens untersucht werden. Dabei interessierten vor allem Zielproteine und regulatorische Mechanismen, die mit den beschriebenen Methoden aufgeklärt werden sollten.

4.3.1 PA28 γ wirkt antiapoptotisch in B8-Mausfibroblasten

Die drei- bis sechsfache Überexpression von PA28 γ in murinen Fibroblastenzellen führt zu einem Rückgang der spontanen Apoptoserate um 50%, was durch die Messung von exponiertem Phosphatidylserin mittels Annexin V im FACS gemessen werden konnte. Auch nach Apoptoseinduktion durch UV-C erreichen die PA28 γ -überexprimierenden Zellen nicht den gleichen Level früh-apoptotischer Zellen wie die Vektorkontrollen (Abbildung 1 in III).

Die Messung der DNA-Fragmentierung (subG1 Phase), einem spät-apoptotischen Effekt, zeigte ebenfalls eine bis zu 50% geringere Rate vier bis acht Stunden nach UV-C-Induktion bei PA28 γ -Überexpression (Abbildung 1E in III).

Es konnte gezeigt werden, dass PA28 γ einen Einfluss auf die Stabilisierung von PARP (Poly(ADP-ribose)polymerase), einem Protein zur Erkennung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, hat. Während der Apoptose wird PARP durch Caspase-3/7 in inaktive Fragmente gespalten. Nach UV-C-Induktion war die Spaltung des aktiven PARPs in PA28 γ -überexprimierenden Zellen signifikant reduziert und der PARP-Gehalt war sowohl in Apoptose-

induzierten als auch nichtinduzierten Zellen erhöht im Vergleich zu den Vektorkontrollen (Abbildung 1D in III).

Um mögliche Zielproteine von PA28 γ zu identifizieren, wurden weitere Apoptose-relevante Proteine mittels Western Blot untersucht. Leicht erhöhte Bax-Level bei PA28 γ -Überexpression hatten keinen Einfluss auf eine Bax-Einlagerung in die äußere Mitochondrienmembran verglichen mit der Vektorkontrolle. Cytochrom C wird besonders nach UV-C in den Mitochondrien von B8-PA28 γ akkumuliert, während es in den Vektorkontrollen ins Cytosol freigesetzt zu werden scheint. Grund dafür kann die geringere Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-X_L in den Vektorkontrollen sein, welches die Bax-vermittelte Mitochondrienmembran-Permeabilisierung inhibiert. Survivin, ein Protein der IAP-Familie (inhibitors of apoptosis), welches Caspase-3/7 inhibiert, wird in PA28 γ -überexprimierenden Zellen deutlich weniger exprimiert und verschwindet nach Apoptoseinduktion mittels UV-C und/oder Cycloheximid (CHX) nahezu vollständig, was für einen beschleunigten, PA28 γ -vermittelten proteasomalen Abbau spricht (Abbildung 2 in III).

Sowohl Caspase-3 als auch -7 werden nach UV-C-Induktion in PA28 γ -überexprimierenden Zellen weniger exprimiert als in den Vektorkontrollen, obwohl sich die Level an Procaspasen kaum unterscheiden. Auf mRNA-Ebene konnte mittels Realtime-PCR ebenfalls keine signifikante Unterscheidung festgestellt werden. Die Caspase-3/7-Aktivität war jedoch um bis zu 50% reduziert nach UV-C bei Überexpression von PA28 γ (Abbildung 4 in III).

4.3.2 Knockdown von PA28 γ in HT29 führt zu gesteigerter Apoptoserate

Um den Effekt von PA28 γ auf die Apoptose auch an einem anderen Zellmodell nachzuweisen, wurde im Rahmen meiner Arbeit die PA28 γ -Konzentration mittels miRNA in humanen Kolonkarzinomzellen HT29 um bis zu 90% vermindert. Mittels FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass sich signifikant mehr Zellen in der frühen Apoptose nach Induktion mit Natriumbutyrat (NaBt) befinden, wenn die Konzentration von PA28 γ auf 10% der Vektorkontrollen vermindert wurde. Sowohl die Proteinlevel von Initiatorcaspase-9 als auch Effektorcaspase-3 waren nach dem PA28 γ -Knockdown und NaBt deutlich erhöht, was sich auch bei den von mir durchgeführten Messungen der Caspase-Aktivitäten widerspiegelte (Abbildung 3 in III).

4.3.3 PA28 γ beeinflusst aktiviertes Tumorsuppressorprotein p53

Nach UV-C-Induktion kommt es sowohl bei B8-Vektorkontrollen als auch PA28 γ -überexprimierenden Zellen zu einer Verminderung des cytosolischen p53 Proteins und zu einer Akkumulation einer phosphorylierten Form im Zellkern. Bereits zwei Stunden nach dem Apoptose-Trigger erhöht sich vor allem der nukleare Gehalt an stabilisiertem p53^{Ser18P}, überraschender Weise in B8-PA28 γ deutlicher als in den Kontrollen. Um zu untersuchen, ob proapoptotisches p53^{Ser18P} auch transkriptionell aktiv ist, wurden p53-regulierte apoptose-relevante Gene per Realtime PCR untersucht. Eine tendenziell verstärkte Expression nach UV-C konnte beim Zellzyklusinhibitor p21, der BAX- und PARP1-mRNA sowie der Ubiquitin-E3-Ligase MDM2 in PA28 γ -überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 5 in III). Bei Immunoprecipitationsversuchen mit anti-myc und Lysaten aus p53-myc- und HA-Ubiquitin-transfizierten B8-Klonen stellte sich heraus, dass eine PA28 γ -Überexpression zur Stabilisierung von p53^{Ser18P} und verstärkter Ubiquitylierung führt. P53-myc konnte nur in B8-Zellen mit erhöhtem PA28 γ -Level detektiert werden. Auch phosphoryliertes p53 konnte verstärkt in B8-PA28 γ präzipitiert werden, wenn die Zellen UV-C ausgesetzt wurden. Eine deutliche Ubiquitylierung war nur in Mart1-transfizierten Zellen und dabei besonders beim B8-PA28 γ -Klon festzustellen, was für einen Einfluss von PA28 γ auf den Abbau ubiquitylierter Proteine spricht (Abbildung 6 in III).

4.3.4 PA28 γ und Caspase 3/7 beeinflussen sich gegenseitig

Da eine Fragmentierung von PA28 γ durch Effektorcaspasen beschrieben wurde (Araya et al., 2002), sollte via CHX-chase-Experimente dem Abbau von PA28 γ auf den Grund gegangen werden. Bei basaler Expression von PA28 γ in B8-Zellen kann das 25 kDa große PA28 γ -Schnittfragment sowohl unter normalen Bedingungen als auch verstärkt nach Apoptose-Induktion mit UV-C bzw. UV-C/CHX detektiert werden. Dahingegen ist das Fragment bei Überexpression von PA28 γ auch nach Induktion von Apoptose nicht sichtbar (Abbildung 7A in III).

Frühere Experimente zeigten auch, dass PA28 γ eine Halbwertszeit von 24 h besitzt (Abbildung 7B in III). Wird Apoptose induziert, reduziert sich die Halbwertszeit von PA28 γ , was Rückschlüsse zulässt, dass Caspasen die Halbwertszeit von PA28 γ unter apoptotischen Bedingungen beschränkt, wohingegen PA28 γ die Caspase-Aktivität auf verschiedenen molekularen Ebenen beeinflusst.

5. Diskussion und Schlussfolgerung

5.1 PA28 γ -Level sind nicht krankheitsspezifisch aber korrelieren mit der Krankheitsaktivität bei RA

In einer Vielzahl von Veröffentlichungen wurde PA28 γ nicht nur als Marker für bestimmte Tumorarten (Li et al., 2012; Roessler et al., 2006; Wang et al., 2011), sondern auch als Autoantigen in Seren von Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen identifiziert (Cavazzana et al., 2005; Yamanaka et al., 1992). Diese Tatsachen lassen schlussfolgern, dass die Bestimmung des PA28 γ -Serumlevels als diagnostisches Tool bei der Erkennung und Verlaufsbestimmung verschiedener Erkrankungen dienen könnte.

Mit dem eigens entwickelt und verifizierten PA28 γ -Sandwich-ELISA war es möglich, den PA28 γ -Level in humanen Seren zu erfassen. Die in dieser Studie gewonnen Ergebnisse zeigen, dass in nahezu allen untersuchten Patientengruppen signifikant erhöhte PA28 γ -Serumlevel zu messen waren. Zwar wurden bei AOSD- und SLE-Patienten keine erhöhten Werte festgestellt, jedoch waren die PA28 γ -Level bei Tumor-, SS-, PM- und UCTD-Patienten sowie besonders bei RA-Patienten deutlich erhöht gegenüber der gesunden Kohorte. Damit war es unmöglich, allein mit Hilfe der PA28 γ -Werte eine Unterscheidung der Erkrankungen zu treffen, jedoch konnte sehr wohl zwischen krank und gesund unterschieden werden.

Da besonders die RA-Patienten mit hohen PA28 γ -Level hervor stachen, wurden Sera von Patienten mit aktiver RA vor und nach Behandlung mit dem T-Zell-gerichteten Biologikum Abatacept untersucht. Obwohl PA28 γ im Gegensatz zu PA28 α/β keine Rolle bei der Immunantwort spielt (Mao et al., 2008; Sijts und Kloetzel, 2011), konnte eine Korrelation der PA28 γ -Serumlevel mit dem DAS28 ESR, welches als etablierter Score für die RA-Krankheitsaktivität dient, beobachtet werden. Des Weiteren wiesen jüngere RA-Patienten höhere PA28 γ -Werte auf. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass PA28 γ Expression mit Caseinkinase 1-Abbau, p53-Akkumulation und verfrühtem Altern in Verbindung stehen kann (Li et al., 2013). Die Resultate aus in unserer Studie sollten deshalb in weiteren Forschungsarbeiten bestätigt werden.

Die gewonnen Ergebnisse zeigen, dass PA28 γ -Serumlevel zwar nicht zur Unterscheidung verschiedener Erkrankungen, jedoch als Biomarker für den Verlauf der RA-Erkrankung herangezogen werden kann.

5.2 Multiplexformat ermöglicht Epitoperkennung

Mit dem entwickelten Mikrobead-Assay war es möglich, ein neuartiges Epitopmapping im Multiplexformat schnell und kostengünstig durchzuführen. GST-getaggte Peptide wurden rekombinant hergestellt, *in vivo* biotinyliert und an Streptavidin-beschichtete Mikrobeads gekoppelt. Der Vergleich mit chemisch synthetisierten Peptiden zeigt zwar verminderte Fluoreszenzintensitäten, was aber auf eine geringere Beladung der Beads mit Peptid-Antigen zurückgeführt werden kann. Dies kommt unter Umständen durch die Kopplung an den 25 kDa-großen GST-Tag sowie die Beladung mit nicht-relevanten, biotinylierten *E. coli*-Proteinen.

Die für die eingesetzten PA28 γ - und VP1-Antikörper relevanten Epitope konnten sowohl im herkömmlichen ELISA als auch im Mikrobead-Assay eindeutig identifiziert werden. Mit dem entwickelten Assay war es möglich die Vorteile des zeitsparenden Mutliplex-Formates mit der kostengünstigen Methode der rekombinanten Peptidherstellung zu kombinieren, was in vielfältigen weiteren Fragestellungen zum Tragen kommen kann.

5.3 PA28 γ wirkt antiapoptotisch durch Inhibierung der Caspase-Aktivität

Die Ergebnisse zeigten, dass PA28 γ als antiapoptotischer Regulator in Zellen fungiert, indem es direkt oder indirekt Einfluss auf die Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 und die Aktivierung von Caspasen nimmt.

Obwohl bekannt ist, dass die Konzentration an Procaspasen die Aktivität und Apoptosesensitivität beeinflusst (Parrish et al., 2013), konnte bei PA28 γ -überexprimierenden Zellen weder auf mRNA noch auf Proteinebene ein signifikanter Unterschied am Procaspase-Level festgestellt werden. Dennoch konnte in PA28 γ -überexprimierenden B8-Zellen ein Rückgang aktiver Caspase mittels Western Blot und Caspase-Aktivitätsassay sowie *vice versa* für PA28 γ -degradierte HT29-Zellen festgestellt werden. Der Einfluss von PA28 γ auf die Caspase-Aktivität könnte vielmehr auf eine IAP-vermittelte Ubiquitinylierung und Degradation der Caspaseproteine zurückzuführen sein. Dafür sprechen auch Studien, die zeigten, dass PA28 γ mit verschiedenen E3-Enzymen interagiert, was beispielsweise zu einer Aktivierung von Mdm2 führt (Zhang und Zhang, 2008).

Zhang und Zhang (2008) zeigten zwar, dass PA28 γ den Mdm2-vermittelten Abbau von p53 verstärkt, was aber vom zellulären Kontext abhängig zu sein scheint (Haupt et al., 1996). PA28 γ -überexprimierende B8-Zellen weisen nach UV-C-Induktion eine Verringerung des cytosolischen p53-Levels sowie einen Anstieg nukleärer p53-Level und transkriptionsaktiver p53^{Ser18P}-Level auf. Da auch in NaBt-induzierten HT29-Zellen, die eine R273H-mutierte Form von p53

aufweisen (Rodrigues et al., 1990), der antiapoptotische Effekt von PA28 γ gezeigt werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass PA28 γ nicht allein über Mdm2 einen Einfluss auf p53 hat. Dafür spricht auch, dass NaBt-Induktion einen p53-unabhängigen Apoptoseweg auslöst (Hague et al., 1993). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die p53-R248Q-Mutante zu einer Steigerung der PA28 γ -Level bei Cervixtumoren führt indem sie direkt an einen PA28 γ -Promotor bindet. Dadurch wird Proliferation, Migration und invasives Verhalten der Krebszellen verstärkt (Wang et al., 2015). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass PA28 γ und p53 auf vielfältige Weise direkt oder indirekt Einfluss aufeinander nehmen.

Wie genau PA28 γ den Tumorsuppressor p53 reguliert, bedarf weiterer Studien, außer Frage steht jedoch, dass erhöhte Level von PA28 γ bei verschiedenen Tumoren detektiert werden konnten (Roessler et al., 2006; Wang et al., 2011). Neben dem Einfluss von PA28 γ auf p53 sollten zukünftig auch Mechanismen der Caspase-Kaskade unter Einwirkung von PA28 γ aufgeklärt werden. Dies würde in vielfältiger Weise zur Aufklärung der Tumorbiologie und Entwicklung neuer Ansätze für die Tumorthherapie beitragen.

5.4 Fazit und Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit konnte die klinische Relevanz des Proteasomaktivators 28 gamma bei Autoimmun- und Tumorerkrankungen tiefgehend beleuchtet werden. Zwar eignet sich PA28 γ nicht zur Unterscheidung verschiedener Erkrankungen, kann aber zur Bestimmung des Verlaufs und der Krankheitsaktivität am Beispiel der rheumatoiden Arthritis herangezogen werden. Der dafür entwickelte Sandwich-ELISA-Assay ermöglicht eine einfache und schnelle Variante der Bestimmung der PA28 γ -Serumlevel und kann in weiteren erforderlichen Studien zur Validierung verwendet werden. Da auch PA28 γ -Autoantikörper bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen beschrieben wurden (Cavazzana et al., 2005; Yamanaka et al., 1992), kann es zur Aufklärung der Krankheitsentstehung von bedeutender Rolle sein, relevante Epitope zu identifizieren. Der neuartige Mikrobead-Assay ermöglicht mit kostengünstig hergestellten rekombinanten Peptiden ein schnelles Screening im Multiplex-Format, welcher sowohl in Grundlagenforschung als auch Diagnostik zum Einsatz kommen könnte. Mit Hilfe von Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass PA28 γ durch Inhibierung der Caspase-Aktivität und Beeinflussung der p53-Stabilität einen antiapoptotischen Effekt sowohl in murinen Fibroblasten als auch human Darmkrebszellen aufweist. Eine genaue Aufklärung der zu Grunde liegenden Mechanismen bedarf weiterer Studien, die letztendlich einen Beitrag zum Verständnis der Tumorbiologie und zur Tumorthherapie leisten könnten.

6. Literaturverzeichnis

- Araya, R., Takahashi, R., Nomura, Y., 2002. Yeast two-hybrid screening using constitutive-active caspase-7 as bait in the identification of PA28gamma as an effector caspase substrate. *Cell Death Differ.* 9, 322–328.
- Barton, L.F., Runnels, H.A., Schell, T.D., Cho, Y., Gibbons, R., Tevethia, S.S., Deepe, G.S., Monaco, J.J., 2004. Immune defects in 28-kDa proteasome activator gamma-deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 3948–3954.
- Cavazzana, I., Franceschini, F., Vassalini, C., Danieli, E., Quinzanini, M., Airò, P., Cattaneo, R., 2005. Clinical and serological features of 35 patients with anti-Ki autoantibodies. *Lupus* 14, 837–841.
- Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17, 7151–7160.
- Egerer, K., Kuckelkorn, U., Rudolph, P.E., Rückert, J.C., Dörner, T., Burmester, G.-R., Kloetzel, P.-M., Feist, E., 2002. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J. Rheumatol.* 29, 2045–2052.
- Feist, E., Kuckelkorn, U., Dörner, T., Dönitz, H., Scheffler, S., Hiepe, F., Kloetzel, P.M., Burmester, G.R., 1999. Autoantibodies in primary Sjögren's syndrome are directed against proteasomal subunits of the alpha and beta type. *Arthritis Rheum.* 42, 697–702.
- Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R., Kloetzel, P.M., 1996. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur. J. Immunol.* 26, 863–869.
- Hague, A., Manning, A.M., Hanlon, K.A., Huschtscha, L.I., Hart, D., Paraskeva, C., 1993. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int. J. Cancer* 55, 498–505.
- Haupt, Y., Barak, Y., Oren, M., 1996. Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *EMBO J.* 15, 1596–1606.

- Jakob, C., Egerer, K., Liebisch, P., Türkmen, S., Zavrski, I., Kuckelkorn, U., Heider, U., Kaiser, M., Fleissner, C., Sterz, J., Kleeberg, L., Feist, E., Burmester, G.-R., Kloetzel, P.-M., Sezer, O., 2007. Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma. *Blood* 109, 2100–2105.
- Kuckelkorn, U., Frenzels, S., Kraft, R., Kostka, S., Groettrup, M., Kloetzel, P.M., 1995. Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* 25, 2605–2611.
- Li, L., Zhao, D., Wei, H., Yao, L., Dang, Y., Amjad, A., Xu, J., Liu, J., Guo, L., Li, D., Li, Z., Zuo, D., Zhang, Y., Liu, J., Huang, S., Jia, C., Wang, L., Wang, Y., Xie, Y., Luo, J., Zhang, B., Luo, H., Donehower, L.A., Moses, R.E., Xiao, J., O'Malley, B.W., Li, X., 2013. REG γ deficiency promotes premature aging via the casein kinase 1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11005–11010.
- Li, L.-P., Cheng, W.-B., Li, H., Li, W., Yang, H., Wen, D.-H., Tang, Y.-D., 2012. Expression of proteasome activator REG γ in human laryngeal carcinoma and associations with tumor suppressor proteins. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 13, 2699–2703.
- Mao, I., Liu, J., Li, X., Luo, H., 2008. REGgamma, a proteasome activator and beyond? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 3971–3980.
- Martinez-Gamboa, L., Lesemann, K., Kuckelkorn, U., Scheffler, S., Ghannam, K., Hahne, M., Gaber-Elsner, T., Egerer, K., Naumann, L., Buttgereit, F., Dörner, T., Kloetzel, P.M., Burmester, G.R., Faustman, D.L., Feist, E., 2013. Gene expression of catalytic proteasome subunits and resistance toward proteasome inhibition of B lymphocytes from patients with primary sjogren syndrome. *J. Rheumatol.* 40, 663–673.
- Parrish, A.B., Freel, C.D., Kornbluth, S., 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Rödiger, S., Ruhland, M., Schmidt, C., Schröder, C., Grossmann, K., Böhm, A., Nitschke, J., Berger, I., Schimke, I., Schierack, P., 2011. Fluorescence dye adsorption assay to quantify carboxyl groups on the surface of poly(methyl methacrylate) microbeads. *Anal. Chem.* 83, 3379–3385.

- Rodrigues, N.R., Rowan, A., Smith, M.E., Kerr, I.B., Bodmer, W.F., Gannon, J.V., Lane, D.P., 1990. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7555–7559.
- Roessler, M., Rollinger, W., Mantovani-Endl, L., Hagmann, M.-L., Palme, S., Berndt, P., Engel, A.M., Pfeffer, M., Karl, J., Bodenmüller, H., Rüschoff, J., Henkel, T., Rohr, G., Rossol, S., Rösch, W., Langen, H., Zolg, W., Tacke, M., 2006. Identification of PSME3 as a novel serum tumor marker for colorectal cancer by combining two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with a strictly mass spectrometry-based approach for data analysis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 5, 2092–2101.
- Sijts, E.J. a. M., Kloetzel, P.M., 2011. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 1491–1502.
- Stadtmueller, B.M., Hill, C.P., 2011. Proteasome activators. *Mol. Cell* 41, 8–19.
- Tanaka, K., Mizushima, T., Saeki, Y., 2012. The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. *Biol. Chem.* 393, 217–234.
- Tojo, T., Kaburaki, J., Hayakawa, M., Okamoto, T., Tomii, M., Homma, M., 1981. Precipitating antibody to a soluble nuclear antigen “Ki” with specificity for systemic lupus erythematosus. *Ryūmachi Rheum.* 21 Suppl, 129–140.
- Wang, H., Bao, W., Jiang, F., Che, Q., Chen, Z., Wang, F., Tong, H., Dai, C., He, X., Liao, Y., Liu, B., Sun, J., Wan, X., 2015. Mutant p53 (p53-R248Q) functions as an oncogene in promoting endometrial cancer by up-regulating REGγ. *Cancer Lett.* 360, 269–279.
- Wang, X., Tu, S., Tan, J., Tian, T., Ran, L., Rodier, J.-F., Ren, G., 2011. REG gamma: a potential marker in breast cancer and effect on cell cycle and proliferation of breast cancer cell. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 28, 31–41.
- Yamanaka, K., Takasaki, Y., Nishida, Y., Shimada, K., Shibata, M., Hashimoto, H., 1992. Detection and quantification of anti-Ki antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant Ki antigen. *Arthritis Rheum.* 35, 667–671.
- Zhang, Z., Zhang, R., 2008. Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation. *EMBO J.* 27, 852–864.

Ausgewählte Publikationen

Mein Beitrag an wissenschaftlichen Arbeiten zur kumulativen Dissertation wurde unter der Betreuung von PD Dr. med. Eugen Feist (Charité) in seiner und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. habil. Ralf Stohwasser (BTU Cottbus-Senftenberg, früher Hochschule Lausitz (FH)) zwischen 2011 und 2013 durchgeführt. Die Zusammenstellung und Veröffentlichung der Publikationen dauerte bis 2016 an. Die angegebenen Impact-Faktoren entsprechen den Werten zum Zeitpunkt der Veröffentlichung.

Publikation I

Gruner, M., Moncsek, A., Rödiger, S., Kühnhardt, D., Feist, E., Stohwasser, R., 2014. Increased proteasome activator 26 gamma (PA28 γ) levels are unspecific but correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *BioMed Central musculoskeletal disorders*. 28;15:414.

doi: 10.1186/1471-2474-15-414.

Impact-Faktor (2014): 1,717

Eigener Anteil: 70%

Publikation II:

Schmidt, C., Rödiger, S., **Gruner, M.**, Moncsek, A., Stohwasser, R., Hanack, K., Schierack, P, Schröder, C., 2016. Multiplexed localization of sequential peptide epitopes by a planar microbead chip. *Analytica chimica acta*. 18;908:150-60.

doi: 10.1016/j.aca.2015.12.030.

Impact-Faktor (2016): 4,712

Eigener Anteil: 10%

Publikation III:

Moncsek, A., **Gruner, M.**, Meyer, H., Lehmann, A., Kloetzel, PM., Stohwasser, R., 2015. Evidence for anti-apoptotic roles of proteasome activator 28 γ via inhibiting caspase activity. *Apoptosis*. 20(9), 1211-28.

doi: 10.1007/s10495-015-1149-6.

Impact-Faktor (2015): 3,592

Eigener Anteil: 25%

D) Gruner et al., 2014

Gruner, M., Moncsek, A., Rödiger, S., Kühnhardt, D., Feist, E., Stohwasser, R., 2014. Increased proteasome activator 26 gamma (PA28 γ) levels are unspecific but correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *BioMed Central musculoskeletal disorders*. 28;15:414.

doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2474-15-414>

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Increased proteasome activator 28 gamma (PA28 γ) levels are unspecific but correlate with disease activity in rheumatoid arthritis

Melanie Gruner^{1,2}, Anja Moncsek^{1,3}, Stefan Rödiger¹, Dagmar Kühnhardt⁴, Eugen Feist^{2*} and Ralf Stohwasser¹

Abstract

Background: PA28 γ (also known as Ki, REG gamma, PMSE3), a member of the ubiquitin-and ATP-independent proteasome activator family 11S, has been proved to show proteasome-dependent and -independent effects on several proteins including tumor suppressor p53, cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and steroid receptor co-activator 3 (SCR-3). Interestingly, PA28 γ is overexpressed in pathological tissue of various cancers affecting e. g. breast, bowel and thyroids. Furthermore, anti-PA28 γ autoantibodies have been linked to several autoimmune disorders. The aim of this study was to develop and evaluate a novel and sensitive PA28 γ sandwich ELISA for the quantification of PA28 γ serum levels in patients with cancer and autoimmune diseases for diagnostic and prognostic purposes.

Methods: PA28 γ -specific polyclonal antibodies and recombinant His-tagged PA28 γ were purified and used to develop a sandwich ELISA for the detection of circulating PA28 γ . With this new assay, PA28 γ serum levels of patients with various cancers, rheumatoid arthritis (RA), Sjögren's syndrome (SS), adult-onset Still's disease (AOSD) and different connective-tissue diseases (CTD) were compared with healthy control subjects. Anti-PA28 γ autoantibodies were additionally confirmed using a newly developed microbead assay.

Results: The developed PA28 γ sandwich ELISA showed a high specificity with a detection limit of 3 ng/ml. A significant up-regulation of circulating PA28 γ was detected in the sera of patients with cancer, RA, SS and CTD. A significant correlation was observed dependent on age as well as anti-PA28 γ autoantibody levels with circulating PA28 γ protein levels. Furthermore, PA28 γ serum levels showed a correlation with disease activity in patients with RA under treatment with the T-cell directed biological compound abatacept according to disease activity score 28 (DAS28) and erythrocyte sedimentation rate (ESR).

Conclusion: The application of PA28 γ as a novel biomarker for diagnostic purposes of a specific disease is limited, since elevated levels were observed in different disorders. However, the correlation with disease activity in patients with RA suggests a prognostic value, which needs to be addressed by further studies. Therefore our results show that PA28 γ is a useful marker which should be included in studies related to novel treatments, e.g. abatacept.

Keywords: Proteasome activator PA28 γ , 20S proteasome, Sandwich ELISA, Microbeads, Autoimmune disorders, Rheumatoid arthritis, Abatacept, Cancer

* Correspondence: eugen.feist@charite.de

²Department of Rheumatology and Clinical Immunology and Autoinflammatory Reference Centre at Charité, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, D-10117 Berlin, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

Background

The proteasome is a multicatalytic protein complex that is essential for the degradation of cytosolic and nuclear proteins. It regulates a number of cellular functions including cell cycle, transcription and antigen processing [1-3]. The barrel-like 20S core particle contains 28 subunits that are arranged in two outer heptameric α -rings and two inner heptameric β -rings which contain the three proteolytic active sites - β 1, β 2 and β 5 exhibit caspase-like, trypsin-like and chymotrypsin-like cleavage preference, respectively [4]. Protein cleavage is highly regulated through controlled substrate entry. Thereby, an activation of latent 20S proteasome by activators is necessary for protein degradation. Whereas polyubiquitinated proteins are degraded through the ATP-dependent 26S proteasome formed by the 20S core and the 19S proteasomal activator (PA700), the 11S regulators (PA28 α , PA28 β and PA28 γ) act in an ubiquitin- and ATP-independent manner [2].

The interferon- γ -inducible PA28 α and PA28 β subunits form heteroheptamers mainly found in the cytosol and are involved in the production of MHC class I ligands [5]. The so called immunoproteasome including the interferon- γ -inducible β 1i, β 2i and β 5i catalytic subunits is known to generate peptides that are more likely to bind to MHC class I molecules. Thus, immunoproteasomes are more relevant for antigen processing and efficient pathogen combat [3]. Furthermore, proteasomes are reported to be involved in disease prevention due to their complex role in apoptosis and cell cycle. Degradation of pro-apoptotic proteins such as tumor suppressor p53 and cell cycle regulator p21 as well as cleavage of proteins like I κ B that leads to the activation of the anti-apoptotic transcription factor NF- κ B, reflects the major importance of this enzyme complex [6]. A modified expression and/or activity of constitutive and inducible proteasomes have been reported in several malignant diseases and autoimmune disorders. In Sjögren's syndrome catalytic subunits are up regulated at the mRNA level while the β 1i subunit is deficient in B lymphocytes leading to increased apoptosis resistance after proteasome inhibition [7,8]. Moreover, circulating proteasomes were measured in serum or plasma samples using ELISA technique demonstrating elevated levels in patients with systemic autoimmune diseases [9] and suggesting a role as an independent prognostic factor in multiple myeloma [10].

Furthermore, the proteasome activator PA28 γ (REG γ , Ki, PSME3) that is not interferon- γ -inducible and whose homoheptamers are mainly found in the nucleus was previously regarded to be an activator for the degradation of short peptides [11]. However, former studies reported that PA28 γ stimulates also the proteasomal degradation of larger proteins like steroid receptor coactivator-3 (SRC-3/AIB1) [12], cyclin-dependent kinase inhibitor p21 [13,14], Hepatitis C virus core protein [15], ubiquitin ligase

Smad ubiquitination regulatory factor 1 (Smurf1) [16] and insulin transcription activator MAFA [17]. In addition proteasome-independent functions of PA28 γ were shown. The activator plays a key role in chromosomal stability during mitosis [18], in the organization of nuclear speckles [19] and during the interaction with nuclear localization protein p30 of Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1) to increase viral spread [20,21]. Beside these important roles in multiple biological pathways including cell growth and cell cycle regulation, PA28 γ is also a mediator of apoptosis. Mdm2-dependent p53 degradation is enhanced by PA28 γ acting as a co-activator [22] and p53 activity is regulated through its cellular localization mediated by PA28 γ [23]. Due to these functions it seems to be very likely that PA28 γ is involved in carcinogenesis. Many studies revealed that PA28 γ is overexpressed in different tumor tissues and serum samples of patients with diverse cancers affecting colon [24,25], breast [26], larynx [27], lung [28], liver [29] and thyroids [30]. Thus, PA28 γ interferes with cell cycle, proliferation and invasion in poorly differentiated thyroid carcinoma cells [31]. Interestingly, PA28 γ was first identified as the Ki-antigen target of autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) [32]. Several subsequent investigators confirmed the detection of PA28 γ as an autoantigen in patients with SLE and correlated this antibody response to clinical and serological features including disease activity [33,34]. These studies demonstrate that there is an urgent need for a rapid and simple robust routine diagnostic test to quantify the serum levels of PA28 γ . However, most studies so far have been performed from tissue which is laborious and not quantitative and therefore not applicable for progression monitoring.

The aim of the present study was to develop and to evaluate a quantitative PA28 γ sandwich ELISA to clarify its significance for diagnosis and prognosis of different diseases. We suggest that this assay with PA28 γ as putative predictive marker is an excellent tool to investigate the complex of diseases (autoimmune and cancer) which are potentially related to alterations in levels of PA28 γ . Our first results indicate that PA28 γ levels can be reliably measured in serum samples from patients with various diseases like cancer, rheumatoid arthritis (RA) and other autoimmune as well as autoinflammatory disorders. Moreover, PA28 γ serum levels seem to correlate with disease activity in RA patients treated with T-cell inhibitor abatacept.

Methods

Chemicals and reagents

All chemicals and reagents used were obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) or Biochrom (Berlin, Germany) unless otherwise stated.

Patients

All sera were obtained at the Charité University Hospital Berlin, Germany after informed consent. Following patient groups were investigated: 28 patients with various tumors (cancer), 104 patients with rheumatoid arthritis (RA), 34 patients with Sjögren's syndrome (SS), 15 patients with adult-onset Still's disease (AOSD), 66 patients with different connective-tissue diseases including polymyositis (PM, $n = 18$), systemic lupus erythematosus (SLE, $n = 37$) and undifferentiated connective-tissue disease (UCTD, $n = 11$) and 20 healthy subjects. Cancer group includes patients with advanced metastatic tumors: 20 subjects with breast cancer, 4 subjects with colon carcinoma, 1 subject with parotis gland cancer, 1 subject with sarcoma, 1 subject with a neuroendocrine tumor and 1 subject with carcinoma of unknown primary. With the exception of 2 cases all cancer patients were under treatment with chemotherapy with or without immuno or hormone therapy.

To study follow-up samples in correlation to disease activity according to DAS28-ESR (disease activity score 28 - erythrocyte sedimentation rate) and CRP (C-reactive protein), 13 RA patients under abatacept were included and sera were obtained before initiation of treatment as well as at week 16 and 24. All RA patients failed respond to methotrexat (MTX) treatment and received abatacept as first-line biologic in combination with MTX.

The study was approved by the local ethic committee at the Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Recombinant antigen production

To obtain protein for standard curve development for sandwich ELISA human PA28 γ cDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into pDest17 expression vector following Gateway® Recombinant Cloning Technology (Life Technologies, Darmstadt, Germany). The construct was transformed into *E. coli* BL21(DE3)pLysS and after induction of expression with 2 mM IPTG for 2 h at 30°C bacteria were harvested. Solubilization of precipitated His-tagged PA28 γ was performed following a modified method of Ahmed et al. [35]. Frozen pellets were thawed and lysed with lysis buffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, complete protease inhibitor). After addition of 300 μ g/ml lysozym and 1 mg/ml sodium deoxycholate the suspension was incubated for 30 min on ice and further 15 min at RT after addition of approximately 10 U/ml DNase I and 10 mM MgCl₂. Insoluble components were pelleted during centrifugation at 17,000 \times g for 15 min at 4°C and washed with lysis buffer containing 0.5% Triton-X100 for 10 min at RT. After further centrifugation the pellet was dissolved in lysis buffer containing 8 M Urea for a minimum of 2 h at RT. The soluble protein fraction was dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 and insoluble impurities were removed by centrifugation (17,000 \times g,

15 min). Protein amount was calculated using Pierce BCA Protein Assay Kit and purity was controlled by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfat-polyacrylamid gel electrophoresis).

Antibodies

The mouse monoclonal antibody raised against amino acids 45–147 of PA28 γ of mouse origin was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). Secondary Horse radish peroxidase conjugated goat-anti-rabbit IgG and Cy5-conjugated goat-anti-human IgG were purchased from Dianova (Hamburg, Germany).

For production of polyclonal antiserum directed against PA28 γ rabbits were immunized by multiple intradermal injections of a PA28 γ specific KLH-coupled peptide representing amino acids 14–28 with citrullinated arginine in amino acid position 6 and 8 (Biogenes, Berlin, Germany). The collected serum (K3946) was precipitated with 40% ammonium sulfate, centrifuged 30 min at 15,000 \times g and resuspended pellet was dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer pH 8.0. Clarified (centrifugation at 15,000 \times g, 30 min) extract was purified by Protein A affinity column previously equilibrated in the same buffer on Äkta FPLC system (GE Healthcare, Munich, Germany). IgG complexes were eluted with 100 mM Glycin/HCl pH 3.0 and pH was shifted to 8.0 with NaOH. To avoid precipitation an end concentration of 100 mM NaCl was adjusted and pooled IgG fraction was dialyzed against PBS buffer pH 7.4. To get peptide specific antibodies the extract was further purified with an Ultra Link (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) column containing immobilized PA28 γ specific amino acid sequence 14–28 in non-citrullinated form. The chromatography was performed using PBS pH 7.4 as running buffer and 100 mM Glycin/HCl pH 3.0 as elution buffer. The pH of the eluted peptide specific polyclonal rabbit IgG (rb-pIgG) was shifted to pH 8.0 with NaOH and an end concentration of 100 mM NaCl before dialysis against PBS pH 7.4. After clarifying by centrifugation (17,000 \times g, 15 min) and protein concentration estimation by photospectrometrical measurement the pooled fractions were adjusted to 0.02% NaN₃ and stored in Aliquots at -20°C with an end concentration of 500 μ g/ml.

Immunoblotting

For immunoblotting, 30 μ g total cell extract of a human carcinoma cell line HT29 (ATCC® HTB-38™) or 1 μ g purified recombinant His-PA28 γ were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Remaining binding sites were blocked with 5% nonfat dry milk in PBS buffer pH 7.4 containing 0.1% Tween-20 (PBST) for 1 h. Membranes were incubated with crude rabbit hyperimmunserum raised against PA28 γ -peptide (1:5,000), eluted fraction of protein A purification step (1:2,500) or rb-pIgG (1:2,500) in PBST for 1 h. Then

secondary goat-anti-rabbit IgG antibody coupled with horseradish peroxidase (1:10,000) was added for 1 h. Antibody binding was visualized using ECL solution and released chemiluminescence was detected by using Lumi-Imager F1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Sandwich ELISA for quantification of PA28 γ in human sera

To quantify the PA28 γ amount in human sera an indirect sandwich ELISA was developed. Nunc Polysorp microtiter plates were coated with 100 μ l of mouse monoclonal capture antibody diluted 1:500 in 100 mM sodium carbonate buffer pH 9.6 overnight at 4°C. Unbound material was removed with PBST buffer (PBS containing 0.1% Tween 20) and free binding sites were blocked with 300 μ l 1 \times Roti Block solution (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for 1 h at RT. After one further washing step 100 μ l of serum samples diluted 1:2 in PBST were added for 1 h following three washing steps. Wells were incubated with 100 μ l detection antibody rb-pIgG (1:250 in PBST) or PBST as negative control for 1 h before washing three times. After addition of 100 μ l of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody diluted 1:5,000 and incubation for 1 h, the microtiter plate was washed extensively with PBST buffer (three times). HRP activity was determined by adding 100 μ l tetramethylbenzidine substrate solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) following a 30 min incubation in the dark. Reaction was stopped with 100 μ l sulfuric acid stop solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and absorbance was measured at 450 nm with a correction wavelength of 620 nm using the ELISA plate reader Synergy HT (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany).

Recombinant His-PA28 γ in appropriate dilutions (3.125 to 200 ng/ml) was used for calibration and the PA28 γ contents of human sera were calculated by subtracting negative control. The cutoff value was defined as the mean value plus 3-fold standard deviation obtained from 20 healthy controls.

Reproducibility of sandwich ELISA was determined by intra- and inter-assay precision studies and calculated as the mean coefficient of variation (CV). Therefore three sandwich assays with varying His-PA28 γ concentrations ranging from 0 to 200 ng/ml were performed on distinct plates at one day and reproduced on 3 different days.

Microbead assay for determination of PA28 γ autoantibody level

Carboxylated poly(methyl methacrylate) microbeads (PolyAn GmbH, Berlin, Germany) were coupled with recombinant His-PA28 γ following MES buffer method [36]. The microbeads were immobilized on microtiter plates and incubated with human sera diluted 1:100. After addition of Cy5-conjugated secondary antibody

the mean fluorescence intensity (MFI) of the microbeads was analyzed using VideoScan technology [37].

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistic Version 21.0.0.0 and PKWard [38] using non-parametrical Mann-Whitney U test to compare PA28 γ levels in patient groups. The relationship between two variables was calculated using Pearson's correlation analysis. *P* values less than 0.05 were considered to be statistically significant (*) and less than 0.01 were considered to be highly significant (**).

Results

Preparation of recombinant PA28 γ and rabbit polyclonal antibodies to PA28 γ

To develop a PA28 γ sandwich ELISA for evaluating PA28 γ content in sera of patients with different diseases a standard protein for quantification was necessary. Therefore we expressed recombinant His-tagged PA28 γ in *E. coli* BL21 and precipitated protein was extracted via a purification procedure containing a urea solubilization step. Figure 1A shows the different fractions during purification and the clear soluble His-PA28 γ protein that was used to generate the ELISA standard.

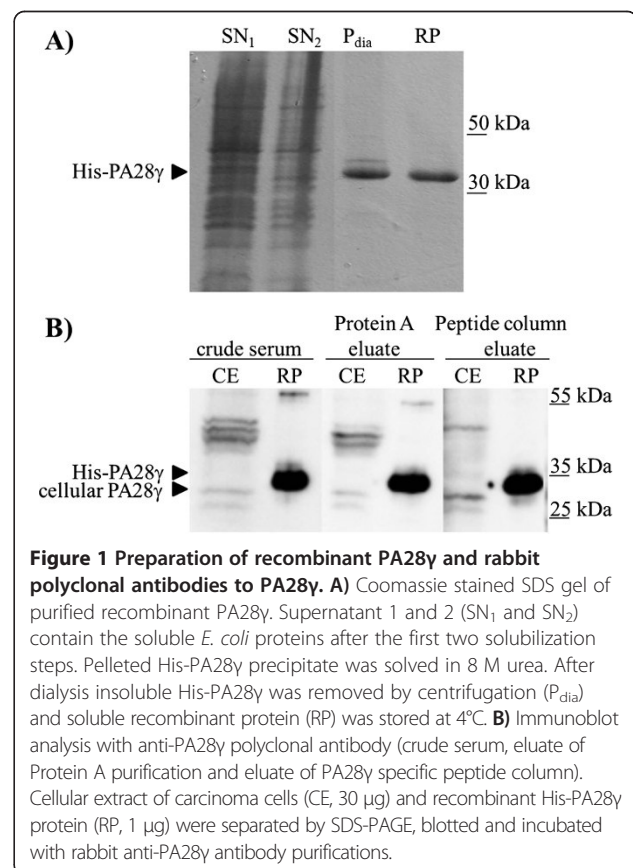


Figure 1 Preparation of recombinant PA28 γ and rabbit polyclonal antibodies to PA28 γ . **A)** Coomassie stained SDS gel of purified recombinant PA28 γ . Supernatant 1 and 2 (SN₁ and SN₂) contain the soluble *E. coli* proteins after the first two solubilization steps. Pelleted His-PA28 γ precipitate was solved in 8 M urea. After dialysis insoluble His-PA28 γ was removed by centrifugation (P_{dia}) and soluble recombinant protein (RP) was stored at 4°C. **B)** Immunoblot analysis with anti-PA28 γ polyclonal antibody (crude serum, eluate of Protein A purification and eluate of PA28 γ specific peptide column). Cellular extract of carcinoma cells (CE, 30 μ g) and recombinant His-PA28 γ protein (RP, 1 μ g) were separated by SDS-PAGE, blotted and incubated with rabbit anti-PA28 γ antibody purifications.

The immunization of a rabbit with the citrullinated PA28 γ -specific peptide revealed one polyclonal hyperimmuniserum that formerly was thought to detect citrullinated antigens. Immunoblotting with recombinant un-citrullinated His-PA28 γ protein and cell lysates from human colon carcinoma cell line HT29 showed specific interaction of the serum with PA28 γ . To reduce background reactivity the serum was affinity purified using a protein A column. PA28 γ -specific IgG antibodies were enriched using an Ultra Link column containing the immobilized un-citrullinated peptide immunogen. The specificity of the purified PA28 γ antibodies was monitored by western blot analysis (Figure 1B). A 28 kDa band corresponding to cellular PA28 γ was detected by the rabbit antiserum in the cellular extract of the carcinoma cells, but there were also other bands corresponding to unspecific absorption or modified PA28 γ variants. The background reactivity was reduced by purification of polyclonal serum via protein A and the peptide affinity purification steps. All antibody fractions that were collected during the antibody purification steps showed strong immunoreaction with recombinant His-PA28 γ protein. Around 300 μ g of highly purified peptide specific polyclonal rabbit PA28 γ antibody (rb-pIgG) could be obtained per ml of rabbit hyperimmuniserum.

Sandwich ELISA validation

To validate the reproducibility of the sandwich ELISA the standard protein His-PA28 γ was used in varying concentrations ranging from 0 to 200 ng/ml. For intra-assay precision 3 microtiter plates coated with commercial monoclonal PA28 γ antibody were incubated with the His-PA28 γ solutions and antigen was quantified by using rb-pIgG in combination with a horseradish conjugated secondary anti-rabbit IgG antibody. The mean coefficient of variation (CV) ranged from 0.4% to 31.2% at day 1, from 4.6% to 14.7% at day 2 and from 3.9% to 18.1% at day 3 (Table 1). Accordingly, the inter-assay CVs are represented by 10.9% to 18.1%. The lower limit of PA28 γ detection of the sandwich ELISA was found to be 3.125 ng/ml and

the assay showed no reactivity with 11S family members PA28 α or PA28 β (data not shown).

Circulating PA28 γ levels in human serum samples

To determine the levels of circulating PA28 γ in sera of patients with different diseases including cancer and autoimmune as well as autoinflammatory disorders a sandwich ELISA using two different PA28 γ -specific antibodies was implemented. The cutoff was calculated to be 39.8 ng PA28 γ per ml of serum based on the measurement of twenty healthy donors. Summarized, 247 PA28 γ serum levels from patients with various autoimmune or malignant diseases were measured and revealed significantly elevated results (median = 25.4 ng/ml, $P = 0.001$) compared with healthy controls (median = 18.1 ng/ml, data not shown). In detail, in patients with Sjögren's syndrome (SS), a connective tissue disease affecting exocrine glands, 29.4% (10/34) were found to have significantly increased PA28 γ levels. Moreover, patients with other autoimmune diseases showed also increased PA28 γ levels, in rheumatoid arthritis (RA) 26.9% (28/104), in different connective-tissue diseases (CTD) 25.8% (17/66) and in AOSD (adult-onset Still's disease) 13.3% (2/15). Of note, increased circulating PA28 γ were only detected in 10.7% (3/28) of patients with different types of cancer (Figure 2A).

The frequency of different human PA28 γ serum levels is displayed in Figure 2B. Most sera showed a PA28 γ levels between 10 and 40 ng/ml and were therefore below the calculated cutoff. In up to 21% of patients with autoimmune diseases and cancer, increased PA28 γ levels between 40 and 100 ng/ml were measured. Of note, the highest PA28 γ concentrations over 100 ng/ml were observed in patients with SS, RA, CTD and cancer, with a maximum level of 637 ng/ml.

The PA28 γ levels of cancer patients (median = 246 ng/ml; $P = 0.003$), RA patients (median = 27.8 ng/ml; $P = 0.0002$) and SS patients (median = 21.7 ng/ml; $P = 0.008$) were significantly higher compared with the healthy control group (median = 18.1 mg/ml). All cancer patients termed as PA28 γ positive were diagnosed to advanced metastatic breast cancer. In contrast, patients with AOSD, an autoinflammatory disorder, showed no difference with respect to PA28 γ levels compared to healthy controls (median = 19.7 ng/ml; $P = 0.142$). Patients with connective-tissue diseases (CTD) showed significantly increased PA28 γ levels compared with healthy controls (median = 23.0 ng/ml; $P = 0.040$). In detail, the SLE patient cohort expressed elevated PA28 γ protein levels in 9 of 37 cases but the levels were in total not significantly increased compared with healthy controls (median = 18.2 ng/ml; $P = 0.432$). With respect to PA28 γ serum levels patients with polymyositis (median = 24.5 ng/ml; $P = 0.033$) and UCTD (median = 30.9 ng/ml; $P = 0.001$) differ in a significant way from healthy controls, respectively (Table 2).

Table 1 Intra- and inter-assay precisions of PA28 γ sandwich ELISA

	His-PA28 γ [ng/ml]							
	0	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
Intra-assay CV [%], n = 3								
day 1	0.4	10.4	16.7	31.2	19.9	9.3	16.8	10.4
day 2	8.7	14.7	7.6	4.6	13.8	7.9	4.9	5.2
day 3	18.1	4.9	7.0	16.5	3.9	6.5	9.1	10.9
Inter-assay CV [%], n = 3								
day 1-3	10.9	10.9	10.9	18.1	15.8	11.9	14.6	13.1

Precisions were calculated as the mean coefficient of variation (CV) of different PA28 γ antigen concentrations measured with Sandwich ELISA in 3 independent experiments from duplicate wells at 3 days.

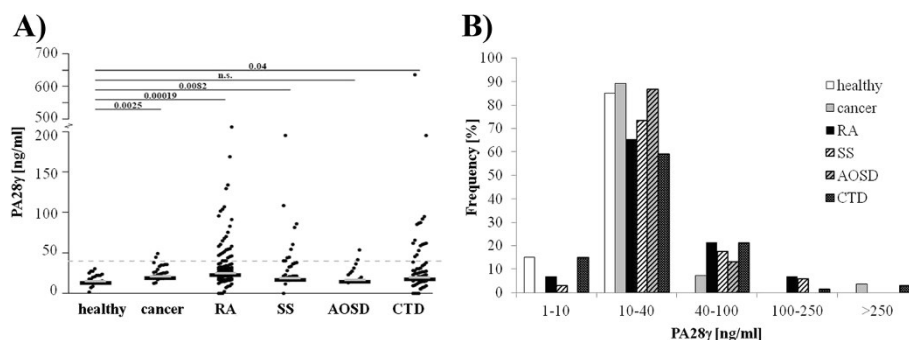


Figure 2 Circulating PA28γ levels in human sera. A) Scatter dot plot of circulating PA28γ serum levels measured by sandwich ELISA in patients with cancer (n = 28), rheumatoid arthritis (RA, n = 104), Sjögren’s syndrome (SS, n = 34), adult onset Still’s disease (AOSD, n = 15) and different connective-tissue diseases (CTD, n = 66) compared with healthy controls (n = 20). Dashed line indicates the calculated cutoff value for positive response of 39.8 ng/ml PA28γ as the mean plus 3-fold standard deviation of healthy controls. The results are represented as mean PA28γ levels of duplicate wells. Medians are shown as grey lines. P-values as indicated compared with healthy control. n.s., not significant. **B)** Frequency of different PA28γ serum levels in healthy and pathological subjects.

Correlation of circulating PA28γ levels with patients characteristics and disease activity in RA

Of note, PA28γ serum levels seems to be significant negative correlated with age in RA patients ($r = -0.223$; $P = 0.032$). Furthermore, female RA subjects expressed significantly higher levels of PA28γ ($P < 0.001$) compared with healthy controls, whereas male RA patients differed only marginally ($P = 0.047$). Overall, the difference between male and female RA patients was not significant ($P = 0.170$, data not shown).

The parallel measurement of PA28γ protein levels by sandwich ELISA and anti-PA28γ autoantibody titers by microbead assay in twelve patients with RA revealed a positive correlation ($r = 0.648$; $P = 0.023$) (data not shown).

To clarify whether circulating PA28γ is bound to intact 20S proteasome complexes a highly specific polyclonal anti-20S rabbit serum was used instead of the polyclonal anti-PA28γ detection antibody in the

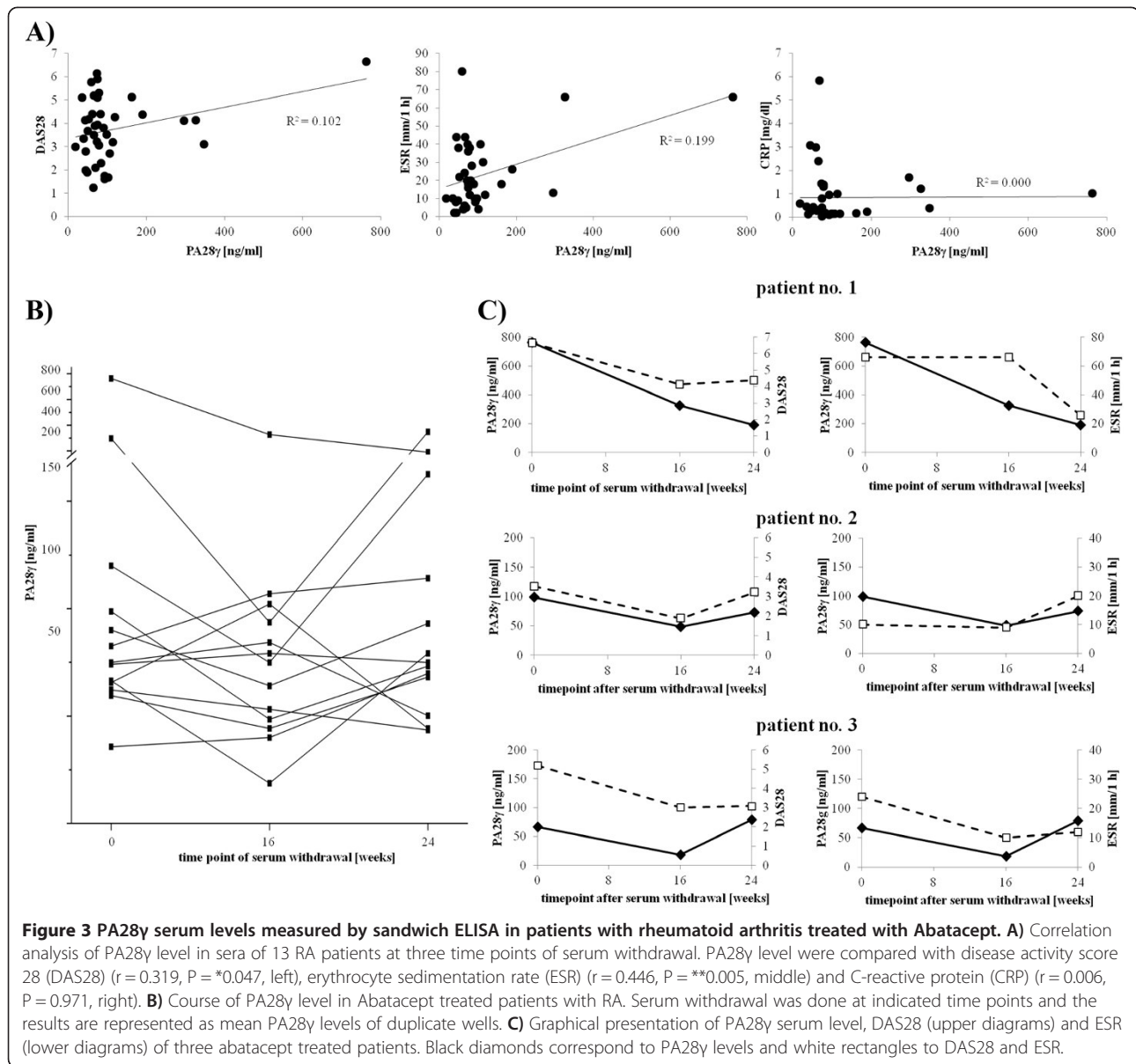
sandwich assay. Since no measurable signals were obtained, co-capturing could be excluded (data not shown).

The kinetic of PA28γ serum levels was analyzed in follow-up samples of thirteen RA patients before and under treatment with abatacept after 16 and 24 weeks, respectively (Figure 3). In 61.5% (8/13) of cases the PA28γ levels decreased in the first decade. However, the levels recovered in six of these eight patients after 24 weeks similar to the levels prior to treatment (Figure 3B). Abatacept is a fusion protein composed of the Fc region of IgG1 and the CTLA-4 extracellular domain. This biological compound inhibits the activation of T-cells and thus, has immunosuppressive effects. While proteasome activator family members PA28α and PA28β are interferon-γ-inducible and involved in antigen presentation, the exact role of PA28γ is still unclear. Nevertheless, PA28γ serum levels were compared with disease activity according to DAS28-ESR during

Table 2 Mean PA28γ level (ng/ml), standard deviations (SD), minimum (min.) and maximum (max.) values from patients with different diseases

Disease	n	mean	SD	min.	max.	PA28γ positive	P value
Healthy	20	17.5	7.4	1.4	29.6	0.0% (0/20)	
Cancer	28	39.6	72.7	11.9	407.8	10.7% (3/28)	**0.003
RA	104	37.6	33.5	0.0	205.8	26.9% (28/104)	**0.0002
SS	34	37.1	36.1	0.0	195.2	29.4% (10/34)	**0.008
AOSD	15	23.8	11.9	12.4	52.9	13.3% (2/15)	0.142
CTD:							
Polymyositis	18	31.1	21.2	6.7	85.4	22.2% (4/18)	*0.033
SLE	37	60.0	127.7	0.0	636.6	24.3% (9/37)	0.432
UCTD	11	35.9	15.4	18.4	61.7	36.4% (4/11)	**0.001
total CTD	66	48.1	96.8	0.0	636.6	25.8% (17/66)	*0.040

Data over the calculated cutoff are defined as PA28γ positive. P values represent significance (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$) compared with healthy control group. AOSD; adult-onset Still’s disease, CTD; different connective-tissue diseases, RA; rheumatoid arthritis SLE; systemic lupus erythematosus, SS; Sjögren’s syndrome, UCTD; undifferentiated connective-tissue disease.



abatacept treatment. Of note, a significant correlation with disease activity ($r = 0.319$, $P = 0.047$) and ESR ($r = 0.446$, $P = 0.005$), but not with CRP levels under abatacept treatment was confirmed (Figure 3A). In fact, PA28 γ levels increased with disease activity and ESR values. Instructive cases over a follow-up period of 6 month are shown in Figure 3C.

Discussion

In the present study, an indirect sandwich ELISA for the quantification of the proteasome activator 28 γ was established. A mono-specific PA28 γ antibody recognizing C- and N-terminal regions of the peptide immunogen was purified from polyclonal rabbit serum via a PA28 γ peptide

column. Recombinant His-PA28 γ was expressed in *E. coli*, purified and used as calibration protein. Optimal antibody compositions and dilutions were improved to develop an ELISA method with a sensitivity of 3 ng/ml. To our best knowledge, we describe for the first time elevated PA28 γ levels both in sera from patients with different autoimmune and malignant disorders. We showed that the levels differed significantly from the healthy controls. The specificity of the test was confirmed by using recombinant PA28 α and PA28 β proteins as antigens, which have up to 40% homology with PA28 γ [39], but were not detected by the assay.

Several studies suggested PA28 γ as a novel biomarker in cancer diseases. Roessler *et al.* [24] detected PA28 γ in

the circulation and demonstrated high levels of PA28 γ in serum samples from patients with colorectal cancer for the first time. They measured PA28 γ levels with an immunoassay analogical to a sandwich ELISA, but through time consuming preincubation of serum with biotinylated and digoxigenylated antibodies. Also Chen *et al.* [25] detected an overexpression of PA28 γ in tissue of patients with colorectal cancer. Wang *et al.* [26] indicated an overexpression of PA28 γ in breast cancer and demonstrated a relation of expression with cancer status and metastasis. Kondo *et al.* [29] mentioned an increase of nuclear PA28 γ with the progression of liver disease from hepatitis C virus related chronic hepatitis to liver cirrhosis. These findings suggest PA28 γ as target for prevention and/or treatment of hepatocellular carcinoma. Li *et al.* [27] suggested that PA28 γ overexpression in laryngeal cancer can promote proliferation and accelerate growth of cancer cells. He *et al.* [28] validated an overexpression of PA28 γ in cancer tissue not only on protein level but also on gene level with significant correlation with cancer related genes suggesting a role of PA28 γ in tumor development. These facts leads us to assume that PA28 γ itself is not only overexpressed in cancer cells but is also detectable in the serum of patients with malignant diseases. In this context, the developed PA28 γ sandwich ELISA should clarify if elevated PA28 γ levels represent a useful biomarker to distinguish between different disorders or correlates with disease activity.

As a result, our data provided evidence that in healthy subjects the PA28 γ serum level is low and ranges from 1.4 to 29.6 ng/ml. In general, a concentration of 10 to 40 ng/ml PA28 γ was typical for the majority of all tested patient groups, while increased levels of PA28 γ were observed in only certain patients. In fact, nearly all investigated patient groups exhibit significant elevated levels of PA28 γ , specifically cancer, SS, PM and UCTD subjects. However, the highest PA28 γ levels were observed among patients with rheumatoid arthritis. Of note, AOSD and SLE patients showed no significant elevated PA28 γ serum levels compared to healthy controls. Taken together the results indicate that serum levels of PA28 γ alone are not useful for differentiation between malignant or systemic autoimmune disorders tested in this study. A qualification of PA28 γ serum levels as biomarker to distinguish between different cancers could not be excluded due to low random numbers. However, we were able to demonstrate a difference between healthy and ill subjects. In disease case the PA28 γ serum levels showed an average of 39.7 \pm 61.2 ng/ml which is markedly elevated compared with healthy controls (17.5 \pm 7.4 ng/ml). We claim that levels above 39.8 ng/ml can be used as qualitative marker to group patients.

Further, the high frequency of PA28 γ elevation in patients with RA was remarkable and was further analyzed in follow-up experiments with active RA before and after initiation of the T-cell directed therapy with abatacept. While PA28 α and PA28 β are known to be induced by interferon- γ and play a central role in antigen presentation, PA28 γ appears not to be majorly involved in immune defense. Surprisingly, a correlation of PA28 γ serum levels with DAS28 and ESR were shown. Thus, further studies in larger cohorts of RA patients are of interest to clarify the importance of PA28 γ as a new disease activity biomarker. Another interesting observation is the correlation of PA28 γ levels with age in RA patients with lower levels in elderly subjects. Recent studies demonstrated that the PA28 γ -proteasome system is involved in regulation of aging thru degradation of casein kinase 1 (CK1), which negatively regulates Mdm2. PA28 γ depletion in mice lead to p53 accumulation and induced premature aging [40]. The underlying biology of decreasing PA28 γ levels in aging RA patients remains unknown and requires further investigations.

In addition to the correlation analyses with well-known biomarkers, PA28 γ serum levels were compared with anti-PA28 γ autoantibody levels. These autoantibodies were detected in several autoimmune disorders including SLE and SS [41]. Our results indicate a significant connection between PA28 γ protein levels and anti-PA28 γ autoantibody levels even in RA sera. Circulating PA28 γ might exert a pro-inflammatory reaction leading B-cells to the production of misdirected autoantibodies.

It remains unknown, how PA28 γ is released into the circulation and whether this is related to increased apoptotic and necrotic cell turnover in patients with cancer and autoimmune disorders. Interestingly, circulating proteins, in particular circulating 20S proteasomes, were also described in various malignant and autoimmune disorders [9,42,43]. In this context, a release of cellular 20S proteasome into the serum could lead to the simultaneously passing of bound activator PA28 γ . However, our first results revealed no interaction of serological PA28 γ and 20S proteasome arguing for an independent release of 20S proteasome and PA28 γ but needs further investigations.

Conclusion

In summary, our findings confirmed that high amounts of PA28 γ serum levels are detectable in certain diseases including cancer and autoimmune disorders. The useful potential of PA28 γ as novel diagnostic biomarker is limited, due to low specificity. However, the shown correlation with disease activity in RA patients is of further interest. It should be addressed in future studies, whether PA28 γ is of prognostic value with relation to pathogenesis in RA.

Abbreviations

AOSD: Adult-onset Still's disease; ATP: Adenosine triphosphate; BCA: Bicinchoninic acid; CK1: Casein kinase 1; CRP: C-reactive protein; CTD: Connective-tissue disease; CV: Coefficient of variation; DAS28: Disease activity score 28; ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; HRP: Horseradish peroxidase; Mdm2: Mouse double minute 2 homolog; MHC: Major histocompatibility complex; mRNA: Messenger ribonucleic acid; PA28 γ : Proteasome activator 28 gamma; MTX: Methotrexat; NF- κ B: Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; PBS: Phosphate buffered saline; PBST: Phosphate buffered saline plus Tween-20; PCR: Polymerase chain reaction; PM: Polymyositis; RA: Rheumatoid arthritis; rb-pIgG: Peptide specific polyclonal rabbit IgG; RT: Room temperature; SCR-3: Steroid receptor co-activator 3; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfat-polyacrylamid gel electrophoresis; SLE: Systemic lupus erythematosus; SS: Sjögren's syndrome; UCTD: Undifferentiated connective-tissue disease.

Competing interests

EF received honoraria and grant support from BMS. All other authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MG contributed to the conception and design of the study, performed experiments and statistical analysis and wrote the manuscript. AM was involved in experimental bases. SR was involved in statistical analysis and data interpretation. DK picked out patients and provided cancer patient samples. EF contributed to the conception and supervision of the study, provided sera and helped to draft the manuscript. RS contributed to the conception and supervision of the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Attomol GmbH (Lipten, Germany) for providing microbeads and VideoScan technology as well as Dr. Thomas Häupl, his team and Silvia Pade (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany) for entrusting healthy control sera. Thanks to Lorena Martinez-Gamboa and Khetam Ghannam for help in the laboratory.

This work was partially supported by Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie/ Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand (BMWT/ZIM; project number KF2088001M08) and the BMBF (Federal Ministry of Education and Research, Germany, InnoProfile-Transfer 03IP611X).

Author details

¹Faculty of Natural Sciences, Brandenburg Technical University Cottbus - Senftenberg, Großenhainer Str. 57, D-01968 Senftenberg, Germany.

²Department of Rheumatology and Clinical Immunology and Autoinflammatory Reference Centre at Charité, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, D-10117 Berlin, Germany. ³Department of Biochemistry, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, D-10117 Berlin, Germany.

⁴Department of Hematology and Oncology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, D-10117 Berlin, Germany.

Received: 8 September 2014 Accepted: 28 November 2014

Published: 8 December 2014

References

- Ciechanover A: **The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life.** *EMBO J* 1998, **17**:7151–7160.
- Stadtmueller BM, Hill CP: **Proteasome activators.** *Mol Cell* 2011, **41**:8–19.
- Tanaka K, Mizushima T, Saeki Y: **The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles.** *Biol Chem* 2012, **393**:217–234.
- Finley D: **Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome.** *Annu Rev Biochem* 2009, **78**:477–513.
- Sijts EJM, Kloetzel PM: **The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses.** *Cell Mol Life Sci* 2011, **68**:1491–1502.
- Dahlmann B: **Role of proteasomes in disease.** *BMC Biochem* 2007, **8**(Suppl 1):S3.
- Krause S, Kuckelkorn U, Dörner T, Burmester G-R, Feist E, Kloetzel P-M: **Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjögren's syndrome but not in other autoimmune disorders.** *Ann Rheum Dis* 2006, **65**:1021–1027.
- Martinez-Gamboa L, Lesemann K, Kuckelkorn U, Scheffler S, Ghannam K, Hahne M, Gaber-Elsner T, Egerer K, Naumann L, Buttgerit F, Dörner T, Kloetzel PM, Burmester GR, Faustman DL, Feist E: **Gene expression of catalytic proteasome subunits and resistance toward proteasome inhibition of B lymphocytes from patients with primary sjogren syndrome.** *J Rheumatol* 2013, **40**:663–673.
- Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Rückert JC, Dörner T, Burmester G-R, Kloetzel P-M, Feist E: **Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases.** *J Rheumatol* 2002, **29**:2045–2052.
- Jakob C, Egerer K, Liebisch P, Türkmen S, Zavrski I, Kuckelkorn U, Heider U, Kaiser M, Fleissner C, Sterz J, Kleeberg L, Feist E, Burmester G-R, Kloetzel P-M, Sezer O: **Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma.** *Blood* 2007, **109**:2100–2105.
- Mao I, Liu J, Li X, Luo H: **REGgamma, a proteasome activator and beyond?** *Cell Mol Life Sci* 2008, **65**:3971–3980.
- Li X, Lonard DM, Jung SY, Malovannaya A, Feng Q, Qin J, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW: **The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome.** *Cell* 2006, **124**:381–392.
- Chen X, Barton LF, Chi Y, Clurman BE, Roberts JM: **Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome.** *Mol Cell* 2007, **26**:843–852.
- Li X, Amazit L, Long W, Lonard DM, Monaco JJ, O'Malley BW: **Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway.** *Mol Cell* 2007, **26**:831–842.
- Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T: **Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: a ubiquitin-dependent mechanism and a ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent mechanism.** *J Virol* 2009, **83**:2389–2392.
- Nie J, Wu M, Wang J, Xing G, He F, Zhang L: **REGgamma proteasome mediates degradation of the ubiquitin ligase Smurf1.** *FEBS Lett* 2010, **584**:3021–3027.
- Kanai K, Aramata S, Katakami S, Yasuda K, Kataoka K: **Proteasome activator PA28 γ stimulates degradation of GSK3-phosphorylated insulin transcription activator MAFA.** *J Mol Endocrinol* 2011, **47**:119–127.
- Zannini L, Lecis D, Buscemi G, Carlessi L, Gasparini P, Fontanella E, Lisanti S, Barton L, Delia D: **REGgamma proteasome activator is involved in the maintenance of chromosomal stability.** *Cell Cycle Georget Tex* 2008, **7**:504–512.
- Baldin V, Militello M, Thomas Y, Doucet C, Fic W, Boireau S, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M, Bertrand E, Tazi J, Coux O: **A novel role for PA28gamma-proteasome in nuclear speckle organization and SR protein trafficking.** *Mol Biol Cell* 2008, **19**:1706–1716.
- Anupam R, Datta A, Kesic M, Green-Church K, Shkriabai N, Kvaratskhelia M, Lairmore MD: **Human T-lymphotropic virus type 1 p30 interacts with REGgamma and modulates ATM (ataxia telangiectasia mutated) to promote cell survival.** *J Biol Chem* 2011, **286**:7661–7668.
- Ko NL, Taylor JM, Bellon M, Bai XT, Shevtsov SP, Dunder M, Nicot C: **PA28 γ is a novel corepressor of HTLV-1 replication and controls viral latency.** *Blood* 2013, **121**:791–800.
- Zhang Z, Zhang R: **Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation.** *EMBO J* 2008, **27**:852–864.
- Liu J, Yu G, Zhao Y, Zhao D, Wang Y, Wang L, Liu J, Li L, Zeng Y, Dang Y, Wang C, Gao G, Long W, Lonard DM, Qiao S, Tsai M-J, Zhang B, Luo H, Li X: **REGgamma modulates p53 activity by regulating its cellular localization.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 23):4076–4084.
- Roessler M, Rollinger W, Mantovani-Endl L, Hagmann M-L, Palme S, Berndt P, Engel AM, Pfeffer M, Karl J, Bodenmüller H, Rüschoff J, Henkel T, Rohr G, Rossol S, Rösch W, Langen H, Zolg W, Tacke M: **Identification of PSME3 as a novel serum tumor marker for colorectal cancer by combining two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with a strictly mass spectrometry-based approach for data analysis.** *Mol Cell Proteomics* 2006, **5**:2092–2101.
- Chen D, Yang X, Huang L, Chi P: **The expression and clinical significance of PA28 γ in colorectal cancer.** *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res* 2013, **61**:1192–1196.
- Wang X, Tu S, Tan J, Tian T, Ran L, Rodier J-F, Ren G: **REG gamma: a potential marker in breast cancer and effect on cell cycle and proliferation of breast cancer cell.** *Med Oncol Northwood Lond Engl* 2011, **28**:31–41.

27. Li L-P, Cheng W-B, Li H, Li W, Yang H, Wen D-H, Tang Y-D: **Expression of proteasome activator REGγ in human laryngeal carcinoma and associations with tumor suppressor proteins.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2012, **13**:2699–2703.
28. He J, Cui L, Zeng Y, Wang G, Zhou P, Yang Y, Ji L, Zhao Y, Chen J, Wang Z, Shi T, Zhang P, Chen R, Li X: **REGγ is associated with multiple oncogenic pathways in human cancers.** *BMC Cancer* 2012, **12**:75.
29. Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, Matsuura Y, Doki Y, Mori M, Nagano H: **Upregulation of nuclear PA28γ expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma.** *Exp Ther Med* 2012, **3**:379–385.
30. Okamura T, Taniguchi S-I, Ohkura T, Yoshida A, Shimizu H, Sakai M, Maeta H, Fukui H, Ueta Y, Hisatome I, Shigemasa C: **Abnormally high expression of proteasome activator-gamma in thyroid neoplasm.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**:1374–1383.
31. Zhang M, Gan L, Ren GS: **REGγ is a strong candidate for the regulation of cell cycle, proliferation and the invasion by poorly differentiated thyroid carcinoma cells.** *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica AI* 2012, **45**:459–465.
32. Tojo T, Kaburaki J, Hayakawa M, Okamoto T, Tomii M, Homma M: **Precipitating antibody to a soluble nuclear antigen “Ki” with specificity for systemic lupus erythematosus.** *Ryūmachi Rheum* 1981, **21**(Suppl):129–140.
33. Yamanaka K, Takasaki Y, Nishida Y, Shimada K, Shibata M, Hashimoto H: **Detection and quantification of anti-Ki antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant Ki antigen.** *Arthritis Rheum* 1992, **35**:667–671.
34. Cavazzana I, Franceschini F, Vassalini C, Danieli E, Quinzanini M, Airò P, Cattaneo R: **Clinical and serological features of 35 patients with anti-Ki autoantibodies.** *Lupus* 2005, **14**:837–841.
35. Ahmed H: *Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization.* Boca Raton: CRC Press; 2004.
36. Rödiger S, Ruhland M, Schmidt C, Schröder C, Grossmann K, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Schimke I, Schierack P: **Fluorescence dye adsorption assay to quantify carboxyl groups on the surface of poly(methyl methacrylate) microbeads.** *Anal Chem* 2011, **83**:3379–3385.
37. Rödiger S, Schierack P, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Frömmel U, Schmidt C, Ruhland M, Schimke I, Roggenbuck D, Lehmann W, Schröder C: **A highly versatile microscope imaging technology platform for the multiplex real-time detection of biomolecules and autoimmune antibodies.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2012, **133**:35–74.
38. Rödiger S, Friedrichsmeier T, Kapat P, Michalke M: **RKWARD: a comprehensive graphical user interface and integrated development environment for statistical analysis with R.** *J Stat Softw* 2012, **49**:1–34.
39. Kohda K, Ishibashi T, Shimbara N, Tanaka K, Matsuda Y, Kasahara M: **Characterization of the mouse PA28 activator complex gene family: complete organizations of the three member genes and a physical map of the approximately 150-kb region containing the alpha- and beta-subunit genes.** *J Immunol Baltim Md 1950* 1998, **160**:4923–4935.
40. Li L, Zhao D, Wei H, Yao L, Dang Y, Amjad A, Xu J, Liu J, Guo L, Li D, Li Z, Zuo D, Zhang Y, Liu J, Huang S, Jia C, Wang L, Wang Y, Xie Y, Luo J, Zhang B, Luo H, Donehower LA, Moses RE, Xiao J, O'Malley BW, Li X: **REGγ deficiency promotes premature aging via the casein kinase 1 pathway.** *Proc Natl Acad Sci* 2013, **110**:11005–10.
41. Matsushita M, Matsudaira R, Ikeda K, Nawata M, Tamura N, Takasaki Y: **Anti-proteasome activator 28α is a novel anti-cytoplasmic antibody in patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome.** *Mod Rheumatol Jpn Rheum Assoc* 2009, **19**:622–628.
42. Feist E, Kuckelkorn U, Dörner T, Dönitz H, Scheffler S, Hiepe F, Kloetzel PM, Burmester GR: **Autoantibodies in primary Sjögren's syndrome are directed against proteasomal subunits of the alpha and beta type.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:697–702.
43. Henry L, Lavabre-Bertrand T, Vercambre L, Ramos J, Carillo S, Guiraud I, Pouderoux P, Bismuth M, Valats J-C, Demattei C, Duny Y, Chaze I, Funakoshi N, Bureau JP, Daurès J-P, Blanc P: **Plasma proteasome level is a reliable early marker of malignant transformation of liver cirrhosis.** *Gut* 2009, **58**:833–838.

doi:10.1186/1471-2474-15-414

Cite this article as: Gruner et al.: Increased proteasome activator 28 gamma (PA28γ) levels are unspecific but correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2014 **15**:414.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



II) Schmidt et al., 2016

Schmidt, C., Rödiger, S., **Gruner, M.**, Moncsek, A., Stohwasser, R., Hanack, K., Schierack, P, Schröder, C., 2016. Multiplexed localization of sequential peptide epitopes by a planar microbead chip. *Analytica chimica acta*. 18;908:150-60.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.030>

Die Seiten 36 bis 46 sind im Druckexemplar enthalten oder Online abrufbar.

III) Moncsek et al., 2015

Moncsek, A., **Gruner, M.**, Meyer, H., Lehmann, A., Kloetzel, PM., Stohwasser, R., 2015. Evidence for anti-apoptotic roles of proteasome activator 28 γ via inhibiting caspase activity. *Apoptosis*. 20(9), 1211-28.

doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-015-1149-6>

Die Seiten 48 bis 65 sind im Druckexemplar enthalten oder Online abrufbar.

Anteilerklärung

Melanie Steiner hatte folgenden Anteil an den ausgewählten Publikationen:

Publikation I:

Gruner, M., Moncsek, A., Rödiger, S., Kühnhardt, D., Feist, E., Stohwasser, R., 2014. Increased proteasome activator 26 gamma (PA28 γ) levels are unspecific but correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *BioMed Central musculoskeletal disorders*. 28;15:414.
doi: 10.1186/1471-2474-15-414.

Impact-Faktor (2014): 1,717

Eigener Anteil: 70%

Beitrag im Einzelnen: Entwicklung und Validierung des Assays, Auswahl der Antikörper, Durchführung der Antikörperaufreinigungen und Experimente, Durchführung der Datenanalyse, Erstellung von Abbildungen und Tabellen, Verfassen des Manuskripts, Einreichung des Manuskripts und Beantwortung der Reviewer-Fragen

Publikation II:

Schmidt, C., Rödiger, S., **Gruner, M.**, Moncsek, A., Stohwasser, R., Hanack, K., Schierack, P, Schröder, C., 2016. Multiplexed localization of sequential peptide epitopes by a planar microbead chip. *Analytica chimica acta*. 18;908:150-60.
doi: 10.1016/j.aca.2015.12.030.

Impact-Faktor (2016): 4,712

Eigener Anteil: 10%

Beitrag im Einzelnen: Auswahl der PA28 γ -Antikörper, Entwicklung und Validierung des indirekten PA28 γ -ELISAs, Korrektur des Manuskripts

Publikation III:

Moncsek, A., **Gruner, M.**, Meyer, H., Lehmann, A., Kloetzel, PM., Stohwasser, R., 2015. Evidence for anti-apoptotic roles of proteasome activator 28 γ via inhibiting caspase activity. *Apoptosis*. 20(9), 1211-28.
doi: 10.1007/s10495-015-1149-6.

Impact-Faktor (2015): 3,592

Eigener Anteil: 25%

Beitrag im Einzelnen: Design und Entwicklung der HT29-Klone, Durchführung und Auswertung sämtlicher Experimente mit HT29-Klonen, Erstellung einiger Abbildungen und Diagramme inklusive statistischer Auswertung, teilweise Betreuung und Durchführung von Arbeiten an B8-Klonen, Korrektur des Manuskripts

Datum und Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Paper

M. Gruner, A. Moncsek, S. Rödiger, D. Kühnhardt, E. Feist und R. Stohwasser. „Increased proteasome activator 28 gamma (PA28 γ) levels are unspecific but correlate with disease activity in rheumatoid arthritis.” BMC Musculoskeletal Disorders. 2014 Dec 8;15:414.

A. Moncsek, **M. Gruner**, H. Meyer, A. Lehmann, PM. Kloetzel und R. Stohwasser. „Evidence for anti-apoptotic roles of proteasome activator 28 γ via inhibiting caspase activity.” Apoptosis. 2015 Sep;20(9):1211-28.

C. Schmidt, S. Rödiger, **M. Gruner**, A. Moncsek, R. Stohwasser, K. Hanack, P. Schierack und C. Schröder. „Multiplex localization of sequential peptide epitopes by use of a planar microbead chip.“ Analytical chimica Acta. 2016 Feb 18;908:150-60.

Poster/Präsentationen

M. Gruner, S. Rödiger, W. Lehmann, D. Roggenbuck, E. Feist und R. Stohwasser. „Development of a multiparametric microbead based immunoassay to detect autoantibodies against proteasome associated proteins in human sera.” 7th Senftenberger Innovationsforum Multiparameteranalytik, April 18-19, 2013, Senftenberg, Germany

Posterpreis (2. Platz)

M. Gruner, A. Moncsek, S. Rödiger, D. Kühnhardt, E. Feist und R. Stohwasser. „Quantification of Proteasome Activator 28 gamma (PA28 γ) serum levels to distinguish between different human diseases.” 8th Senftenberger Innovationsforum Multiparameteranalytik/Autoimmundiagnostik, May 7-8, 2014, Senftenberg, Germany

M. N. Mokhtar, **M. Gruner** und W. Zimmermann. „Optimization of biocatalytic synthesis of large-ring cyclodextrins.” Tagung der VAAM/GBM, March 9-11, 2008, Frankfurt, Germany

A. Moncsek, **M. Gruner** und R. Stohwasser. „Anti-apoptotic functions of PA28 γ due to regulation of p21 localisation in UV-treated Fibroblasts.” International Symposium Signal Transduction and Disease, September 27-30, 2009, Aachen, Germany

R. Reimann, S. Rödiger, **M. Gruner**, A. Böhm, J. Nitschke, L. Hein, N. Kirchhof, O. Pulz und I. Petrick. „Proof-of-Concept for a Quantification of Algal Subpopulations using FACS and the VideoScan System.” 7th Senftenberger Innovationsforum Multiparameteranalytik, April 18-19, 2013, Senftenberg, Germany

C. Schmidt, A. Krause, S.Rödiger, **M. Gruner**, R. Stohwasser, P. Schierack und C. Schröder. An low cost epitope mapping procedure using a multiplex detection system based on microparticles. 7th Senftenberger Innovationsforum Multiparameteranalytik, April 18-19, 2013, Senftenberg, Germany

S. Rödiger, A. Böhm, J. Nitschke, L. Stavitskaya, **M. Gruner**, A.V. Kundzer, M.V. Volkova, I. Generalov, C. Schmidt, C. Schröder, D. Roggenbuck und P. Schierack. “Development of a Method for Multiplex Real-Time Analysis of Enzymatic Activity on a Microbead-Chip.” 11th Dresden Symposium on Autoantibodies: Infection, Tumors and Autoimmunity, September 1-4, 2013, Dresden, Germany

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Melanie Steiner (geb. Gruner), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Immunoproteasom und Proteasomaktivator 28 als Marker in der Diagnostik von Autoimmun- und Tumorerkrankungen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. Eugen Feist für die Überlassung des Promotionsthemas, die kontinuierliche und intensive Betreuung meiner Doktorarbeit seitens der Charité Berlin und die Bereitstellung von Anregungen und Materialien sowie die lehrreichen Arbeitsaufenthalte in seinen Laboren. PD Dr. Feist stand in allen Belangen mit Rat und Tat zur Seite, unterstütze mich in schwierigen Situationen sowie bei der Einreichung meines Manuskripts und trug so entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit bei.

Im gleichen Maße bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Stohwasser, der mir durch die Anstellung als Wissenschaftliche Mitarbeiterin seitens der BTU Cottbus-Senftenberg den Weg für meine Promotion ebnete und maßgeblich zu meinem Werdegang beigetragen hat. Ohne seine zahlreichen Ideen, lehrreichen Diskussionen und kreativen Anregungen wäre ein Gelingen der Arbeit niemals möglich gewesen. Mein Dank gilt auch der Bereitstellung der Labore, Materialien und finanzieller Mittel (Projekte gefördert vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie/Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand, Projektnummer KF2088001M08 und Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kultur/Brandenburg, Projektnummern 3508-12/21 und 2404-39/58). Auch für das Überlassen der Betreuung von Praktika und Studienarbeiten sowie der Förderung meinerseits und das entgegengebrachte Vertrauen in allen Belangen durch ihn, bedanke ich mich herzlichst.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Anja Moncsek, die mir nicht nur eine lehrreiche und inspirierende Kollegin sondern auch eine gute Freundin geworden ist und die maßgeblich an der Erstellung des Apoptosis-Papers beteiligt war und zum Gelingen der Apoptoseversuche beigetragen hat.

Bei Herrn Dr. Carsten Schmidt bedanke ich mich für die maßgebliche, ausdauernde und hervorragende Arbeit am Microbead-Paper sowie für die daraus resultierende erfolgreiche und kollegiale Kooperation.

Besonders hervorheben möchte ich auch Herrn Dr. Stefan Rödiger, der mich vor allem in allen statistischen Belangen tatkräftig unterstützte und der immer für kreative Diskussionen, neue Denkansätze und „chaotische“ Manuskripte ein offenes Ohr und Auge hatte.

Bei Frau Dr. Dagmar Kühnhardt bedanke ich mich für die Auswahl der Tumorpatienten sowie die Sammlung und Überlassung der Tumorpatientenseren und bei Herrn Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel für die Zusammenarbeit und Unterstützung bei den B8-Zellversuchen, die teilweise auch in seinen Laboren durchgeführt wurden.

Mein Dank gilt auch Frau Dominique Voigt, die ich während ihrer Bachelorarbeit zum Thema „Entwicklung eines ELISA-Prototypen zum Nachweis von spezifischen Autoantikörpern gegen den Proteasomaktivator PA28 γ in Autoimmunseren“ betreuen durfte und die wertvolle Grundlagenarbeit für die Entstehung des Schmidt *et al.*- und Gruner *et al.*-Papers leistete.

Für die tatkräftige Unterstützung sowie die Durchführung und Auswertung weiterer Experimente für die „revised version“ des Moncsek *et al.*-Manuskriptes bedanke ich mich außerdem bei Hannes Meyer und Andrea Lehmann.

Für die kollegiale und produktive Zusammenarbeit im Labor sowie die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Verbrauchsmitteln bedanke ich mich bei Julia Engelmann, Lorena Martinez-Gamboa, Dr. Khetam Ghannam, Prof. Dr. Peter Schierack, Prof. Dr. Christian Schröder, Prof. Dr. Dirk Roggenbuck, Prof. Dr. Ursula Anderer, Prof. Dr. Jan-Heiner Küpper, Prof. Dr. Klaus-Peter Stahmann, Susanne Nieland, Alexander Böhm, Jörg Nitschke, Natalie Herzog und allen anderen, die mich auf meinem Weg begleitet haben.

Nicht zuletzt bedanke ich mich herzlich bei meinem Mann Frank und meinem kleinen Sohn Henry, meiner Familie und meinen Freunden, die mir immer den Rücken freigehalten haben während all der Jahre, mich motivierten und auch für eine notwendige zeitweilige Ablenkung sorgten.