

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur anti-apoptotischen Wirkung des
Proteasomaktivators PA28 γ**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dipl.-Biol. Anja Moncsek (geb. Stachowski)

aus Dresden

Datum der Promotion: 8. Dezember 2017

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| 1 Einführung | 3 |
| 1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System | 3 |
| 1.1.1 Proteasomaktivatoren | 4 |
| 1.1.2 Proteasomaktivator PA28 γ | 4 |
| 1.2 Merkmale der Apoptose | 5 |
| 1.2.1 Signaltransduktionswege..... | 5 |
| 2 Zielstellung | 7 |
| 3 Methodik | 8 |
| 3.1 Untersuchung PA28 γ -vermittelter Apoptoseereignisse..... | 8 |
| 3.2 PA28 γ als Serummarker für verschiedene Erkrankungen..... | 9 |
| 3.3 Microbead-basierter Multiplex-Immunoassay | 10 |
| 4 Ergebnisse | 10 |
| 4.1 PA28 γ -vermittelt seine anti-apoptotische Funktion durch Inhibierung von Caspisen | 10 |
| 4.1.1 PA28 γ beeinflusst charakteristische Apoptoseereignisse..... | 10 |
| 4.1.2 PA28 γ verstärkt unter apoptotischen Bedingungen die Akkumulation von Cytochrom c im Mitochondrium..... | 11 |
| 4.1.3 PA28 γ inhibiert die Aktivität von Caspisen..... | 11 |
| 4.1.4 PA28 γ verstärkt die nukleäre Akkumulation von p53..... | 11 |
| 4.1.5 PA28 γ verstärkt die Konjugation von Ubiquitin und stabilisiert p53-S18P..... | 12 |
| 4.2 PA28 γ als Serummarker für verschiedene Erkrankungen..... | 12 |
| 4.2.1 Detektion von PA28 γ in humanen Seren..... | 12 |
| 4.2.2 Detektion von PA28 γ in humanen Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis..... | 13 |
| 4.3 Microbead-basierter Multiplex-Immunoassay ermöglicht Epitopmapping | 13 |
| 5 Diskussion..... | 14 |
| 5.1 PA28 γ inhibiert die Aktivität von Caspisen und verstärkt die nukleäre Akkumulation von p53 | 14 |
| 5.2 Erhöhte PA28 γ -Serumlevel sind nicht krankheitsspezifisch, sie korrelieren aber bei Patienten mit rheumatoider Arthritis mit der Krankheitsaktivität..... | 16 |
| 5.3 Microbead-basierter Multiplex-Immunoassay ermöglicht Epitopmapping | 17 |
| 6 Literaturverzeichnis..... | 17 |
| Eidesstattliche Versicherung..... | 21 |
| Anteilserklärung | 22 |
| Ausgewählte Publikationen..... | 24 |
| Lebenslauf..... | 64 |
| Publikationsliste | 66 |
| Poster und Präsentationen | 67 |
| Danksagung | 68 |

Zusammenfassung

Die bisher identifizierten Zielproteine des nukleären Proteasomaktivators PA28 γ weisen darauf hin, dass dieser an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse wie der Zellproliferation, der DNA-Reparatur und der Tumorentstehung beteiligt ist. Es konnte auch gezeigt werden, dass PA28 γ ein negativer Regulator der Apoptose sein kann, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch wenig untersucht sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss von PA28 γ auf wichtige apoptotische Ereignisse zu untersuchen. Dafür wurden *in vitro*-Experimente mit Zelllinien durchgeführt, bei denen die PA28 γ -Expression durch exogene DNA verstärkt bzw. durch miRNA-vermittelten Knockdown verringert war. Die Ergebnisse bestätigen PA28 γ als einen anti-apoptotischen Regulator und zeigen, dass PA28 γ verschiedene apoptotische Ereignisse beeinflusst. Im Besonderen führt PA28 γ unter apoptotischen Bedingungen zur Akkumulation von Cytochrom c im Mitochondrium, zur Inhibierung der Caspaseaktivität, zur Phosphorylierung von nukleärem p53 und letztendlich zu einer verringerten Apoptose. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten und die daraus resultierenden Hypothesen legen die Grundlage für weitere detaillierte Untersuchungen der anti-apoptotischen Funktion von PA28 γ .

Verschiedene Tumorarten können mit erhöhten PA28 γ -Level assoziiert sein. Aber auch bei systemischen Autoimmunerkrankungen scheint PA28 γ involviert zu sein. Daher sollte ein Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von PA28 γ in humanen Seren entwickelt und anschließend die Relevanz von PA28 γ als diagnostischer und prognostischer Marker bei diesen Erkrankungen untersucht werden. Es konnte in allen getesteten Tumor- bzw. Autoimmunerkrankungen erhöhte PA28 γ -Serumlevel detektiert werden. Der Vergleich von Patienten mit rheumatoider Arthritis, die mit Abatacept behandelt wurden, ergab, dass das PA28 γ -Serumlevel signifikant mit dem Krankheitsaktivitätsindex (DAS28, disease activity score 28) und dem Entzündungsparameter ESR (Erythrozytensedimentationsrate) korreliert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das PA28 γ -Serumlevel in den untersuchten Erkrankungen erhöht, aber nicht krankheitsspezifisch ist. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis kann PA28 γ als neuer zusätzlicher Marker für den Verlauf der Erkrankung bzw. für die Untersuchung des Therapieverlaufs eingesetzt werden, da das PA28 γ -Serumlevel mit den spezifischen Markern für diese Erkrankung korreliert.

Die Kenntnis über die genaue Bindungsstelle eines Autoantikörpers an ein Autoantigen ist für das Verständnis von Autoimmunerkrankungen und zur Entwicklung von Antikörper-basierten Assays bzw. Therapien von großem Nutzen. Daher sollte u.a. mit Hilfe des für den Sandwich-ELISA hergestellten PA28 γ -Hyperimmunserums validiert werden, ob ein Microbead-basierter Multiplex-Immunoassay zum Epitopmapping von Antikörpern eingesetzt werden kann. Dabei wurden Streptavidin-beschichtete, Fluoreszenz- und Größen-codierte Microbeads mit überlappenden, biotinylierten Peptiden des Antigens beladen und mit dem zu testenden Serum inkubiert. Der

Multiplex-Immunoassay identifizierte die gleichen Peptide wie ein entsprechender ELISA. Mit dem erfolgreich validierten Microbead-basierten Multiplex-Immunoassay ist es gelungen ein kostengünstiges und zeitsparendes Verfahren zum Epitopmapping von Antikörpern zu etablieren.

Abstract

Proteasome activator PA28 γ is an important regulator of many cellular processes among them proliferation, DNA damage response and tumor development. Different studies demonstrated that PA28 γ is also involved in apoptosis but the underlying mechanism has not been investigated yet in detail. The aim of the study was to study the impact of PA28 γ on characteristic apoptotic events. Therefore, we employed cell lines with gain of function and miRNA-mediated gene silencing. It has been demonstrated that PA28 γ affects characteristic apoptotic events *in vitro*. In detail, under apoptotic conditions PA28 γ leads to an accumulation of mitochondrial cytochrome c, to an inhibition of caspase activity, to an enhanced phosphorylation of nuclear p53, and consequently to a reduction of apoptosis. The results of this study and the resulting hypothesis provide the basis for further investigations of the anti-apoptotic role of PA28 γ .

Different tumors are associated with enhanced PA28 γ expression. Furthermore, PA28 γ is also involved in systemic autoimmune diseases. Therefore, the aim of this study was to develop a PA28 γ -specific sandwich ELISA for the quantification of PA28 γ in human sera. In addition, it was intended to use this ELISA to investigate the relevance of PA28 γ as a diagnostic and prognostic marker in different tumor and autoimmune diseases. The developed sandwich ELISA was able to detect enhanced levels of PA28 γ in all investigated sera of tumor and autoimmune diseases. Comparison of patients with rheumatoid arthritis, which were treated with abatacept, showed that PA28 γ sera level significantly correlates with the disease activity score 28 (DAS28) and the inflammation parameter ESR (erythrocyte sedimentation rate). The results obtained in this study reveal that PA28 γ is elevated in the sera of patients with tumor or autoimmune diseases but, unfortunately, this is not diseases specific. However, PA28 γ correlates with different markers of rheumatoid arthritis and could be a new additional marker for the investigation of progression and treatment of this disease.

To understand autoimmune diseases and to develop appropriate assays and immune therapies, the knowledge of the antibody binding site is important. The aim of this study was to validate if a microbead-based multiplex immunoassay can be used for epitope mapping of antibodies. Therefore, recombinant synthesized overlapping peptides were coupled via biotin with streptavidin-coated, fluorescence- and size-encoded microbeads and incubated with the sera. The multiplex immunoassay was able to detect the same peptides as a corresponding sandwich ELISA. The results of this study reveal a fast and inexpensive method for epitope mapping of antibodies.

1 Einführung

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Um sich den ständig ändernden Lebensbedingungen anpassen zu können, muss das zelluläre Proteom kontrolliert und adäquat modifiziert werden. Die Regulation dieser Protein-Homöostase wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) gewährleistet. So können notwendige Proteine aktiviert bzw. nicht notwendige oder fehlerhafte Proteine eliminiert werden. Das UPS basiert auf der kovalenten Verknüpfung von Ubiquitin, einem hoch konservierten, 76 Aminosäuren langen Protein, an das Zielprotein. Der Mechanismus der Ubiquitylierung ist ein dreistufiger Prozess, der von E1-, E2- und E3-Enzymen katalysiert wird (1). Diese Ubiquitin-markierten Proteine können daraufhin von Proteasomaktivatoren erkannt und durch das Proteasom degradiert werden. Der Mechanismus der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Proteolyse wurde im Wesentlichen von den drei Wissenschaftlern Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose Anfang der 80er Jahre aufgeklärt. 2004 erhielten sie für ihre wissenschaftliche Leistung den Nobelpreis für Biochemie.

Das Proteasom, eine multikatalytische Protease, ist für die ATP-abhängige Degradation von ca. 80% der zellulären Proteine verantwortlich und somit an der Regulation von nahezu allen elementaren zellulären Prozessen wie z.B. Zellzyklus, Apoptose, Immunantwort, Metabolismus, Transkriptionskontrolle und Signaltransduktion beteiligt (2). Dieser zylinderförmige Proteasekomplex ist aus vier heptameren Ringen aufgebaut, die eine $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Stöchiometrie aufweisen und die vom Archaebakterium bis zum Mammalia hoch konserviert ist (3-5). Die äußeren α -Untereinheiten verschließen mit ihren N-Termini den Zylinder und sind gleichzeitig die Interaktionsflächen für die Proteasomaktivatoren. Die sechs katalytisch aktiven Zentren liegen im Inneren des Proteasoms und werden im eukaryotischen Proteasom von den $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\beta 5$ -Untereinheiten bereitgestellt. Das Mammalia-Proteasom kann, in Abhängigkeit vom Gewebe und vom Zustand der Zelle, in unterschiedlichen Formen auftreten. So können z.B. nach Interferon- γ -Stimulation (IFN γ) die konstitutiv exprimierten Standard- β -Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$) während der *de novo*-Assemblierung des Proteasoms durch die Immuno- β -Untereinheiten i $\beta 1$, i $\beta 2$ und i $\beta 5$ ersetzt werden (6, 7). Das so genannte Immunoproteasom zeichnet sich durch eine erhöhte Chymotrypsin- und Trypsin-ähnliche Aktivität aus, während die Caspase-ähnliche Aktivität reduziert ist (8). Die u.a. vom Immunoproteasom generierten Peptide spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort. Sie weisen aufgrund ihrer Größe und ihrer hydrophoben oder basischen C-Termini eine erhöhte Affinität zu TAP- (transporter associated with antigen presentation) und

MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I-Molekülen auf und können infolgedessen als Antigene auf der Oberfläche von Zellen präsentiert werden (9).

Neben der subzellulären Lokalisation des Proteasoms und der damit verbundenen Substratzugänglichkeit, haben verschiedene Proteasomaktivatoren Einfluss auf die Substraterkennung und Zugänglichkeit des Substrates zu den aktiven Zentren des Proteasoms.

1.1.1 Proteasomaktivatoren

Während Aufbau und Struktur der verschiedenen Proteasomaktivatoren sehr unterschiedlich sein können, ist ein gemeinsames Merkmal dieser Komplexe die Fähigkeit an die α -Untereinheiten des Proteasoms zu binden und dadurch eine konformationelle Veränderung der α -Untereinheiten zu bewirken, so dass der Zugang der Substrate in das Proteasom und damit in die katalytische Kammer ermöglicht wird (10, 11). Des Weiteren werden auch die β -Untereinheiten konformationell beeinflusst, so dass je nach dem welcher Aktivator an das Proteasom bindet unterschiedliche katalytische Aktivitäten verstärkt werden.

1.1.2 Proteasomaktivator PA28 γ

Zur Familie der PA28-Proteine gehört, neben dem heteroheptameren PA28 $\alpha\beta$, auch der homoheptamere Proteasomaktivator PA28 γ , der unter dem Namen Ki-Antigen als Autoantigen bei Patienten mit systemischen Lupus erythematoses bekannt wurde (12-14). Im Unterschied zu PA28 $\alpha\beta$ wird PA28 γ nicht durch IFN γ induziert und ist überwiegend nukleär lokalisiert.

Li *et al.* (2006) haben erstmalig mit dem Steroidrezeptor-Coaktivator SRC-3 gezeigt, dass ein physiologisch relevantes zelluläres Protein durch eine PA28 γ -vermittelte Proteasomaktivierung proteolytisch degradiert werden kann (15). Da die von PA28 γ -vermittelte proteasomale Proteolyse sowohl ATP- als auch Ubiquitin-unabhängig sein kann, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Degradation von SRC-3 nicht durch den konventionellen Entfaltungsprozess vermittelt wird, bei dem der freie N- oder C-Terminus des Proteins fortwährend in das Proteasom transportiert wird, sondern man vermutete, dass interne unstrukturierte Bereiche von SRC-3 durch die Öffnung des PA28 γ -Proteasoms gelangen und endoproteolytisch prozessiert werden. Seit der Entdeckung von SRC-3 konnten weitere Proteine identifiziert werden, die PA28 γ -vermittelt degradiert werden. Dazu gehören u.a. Pituitary tumor transforming 1 (PTTG1)(16), die Ubiquitin-Ligase Smurf1 (17) oder aber virale Proteine wie das Hepatitis C Virus-Kapsidprotein (18, 19).

Die bisher geringe Anzahl bekannter Zielproteine, die zudem hinsichtlich Struktur und biologischer Funktion sehr divergent sind, macht es schwer, Rückschlüsse auf den von PA28 γ -vermittelten proteasomalen Degradationsmechanismus zu ziehen. Man geht aber aufgrund der ATP-Unabhängigkeit davon aus, dass wahrscheinlich Proteine mit unstrukturierten Bereichen

bzw. natürlich vorkommende ungefaltete Proteine durch das PA28 γ -Proteasom endoproteolytisch prozessiert werden (20).

Verschiedene Tumorarten wie zum Beispiel Schilddrüsenkrebs, kolorektale Tumore und Brustkrebs können mit einer erhöhten PA28 γ -Expression assoziiert sein (21-23). Dass PA28 γ ein interessantes Target bei der Behandlung von Tumorerkrankungen sein könnte, zeigen verschiedene Studien, bei denen eine Suppression von PA28 γ zu einer verringerten Proliferation bzw. zu einer erhöhten Apoptose der Tumorzellen führt (24-26). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aktivität des Tumorsuppressor p53 durch PA28 γ beeinflusst werden kann. Zum einen reguliert PA28 γ die subzelluläre Lokalisation von p53 (24) und zum anderen verstärkt PA28 γ die Interaktion von p53 und der E3-Ubiquitin-Ligase MDM2, was zur Ubiquitylierung und zur proteasomalen Degradation von p53 führt (27). Andererseits kann p53 an den Promotor von PA28 γ binden und dessen Transkription aktivieren (28). Es wird angenommen, dass dieser negative Feedback loop zur Aufrechterhaltung der Balance von p53 und PA28 γ dient.

PA28 γ hat aber auch Einfluss auf die Proliferation. Während frühere Daten nur einen indirekten Einfluss zeigen, konnte 2007 erstmalig gezeigt werden, dass das PA28 γ -Proteasom die Zellzyklusinhibitoren p16, p19 und p21 ATP- und Ubiquitin-unabhängig degradiert (29, 30).

1.2 Merkmale der Apoptose

Die Apoptose (vom griechischen Wort *apoptosis*, das Fallen der Blätter) ist ein in eukaryotischen Zellen festgelegtes Selbstmordprogramm. Dadurch wird u.a. gewährleistet, dass entartete und potentiell schädliche Zelle eliminiert werden, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen, wie es z.B. bei der Nekrose der Fall ist. Die Apoptose ist durch spezifische morphologische Veränderungen gekennzeichnet, damit u.a. intakte Zellbestandteile recycelt werden können. Dazu gehört die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran, als Signal für Makrophagen, b) die Kondensation und Fragmentierung der DNA, c) das Abschnüren von Membranvesikeln, den so genannten apoptotischen Körperchen, welche phagozytiert und abgebaut werden können.

1.2.1 Signaltransduktionswege

Der extrinsische bzw. Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg wird durch die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor der TNF-Rezeptor-Superfamilie (z.B. TNF-Rezeptor 1, Fas/CD95) ausgelöst, wodurch es zur Trimersierung dieser so genannten Todesrezeptoren kommt (zusammengefasst in (31)). Die Assemblierung der zytoplasmatischen Todesdomänen (death domain) führt zur Rekrutierung von verschiedenen Adaptermolekülen und zur Bildung von DISC (death inducing signal complex). Zuerst lagern sich Proteine mit eigener Todesdomäne an wie zum Beispiel

TRADD (TNF-Rezeptor assoziiertes Protein). Dieses rekrutiert ein weiteres Protein namens FADD (Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne) an den Rezeptor. FADD besitzt, neben der Todesdomäne, auch eine so genannte Todes-Effektor-Domäne (death effector domain), wie sie auch in der Prodomäne von Procaspsase-8 zu finden ist, und vermittelt so die Assoziation dieser Procaspsase (zusammengefasst in (31)). Aufgrund der trimeren Anordnung kommt es zu einer hohen lokalen Konzentration der Procaspsase-8, was zur autokatalytischen Prozessierung und Aktivierung dieser Initiatorcaspsase führt. Die aktivierte Caspsase-8 kann wiederum die Effektorcaspsasen-3, -6 und -7 aktivieren und/oder durch limitierte Proteolyse des Bcl-2-Homologs Bid auch den mitochondrialen Apoptoseweg induzieren (siehe Abbildung 1).

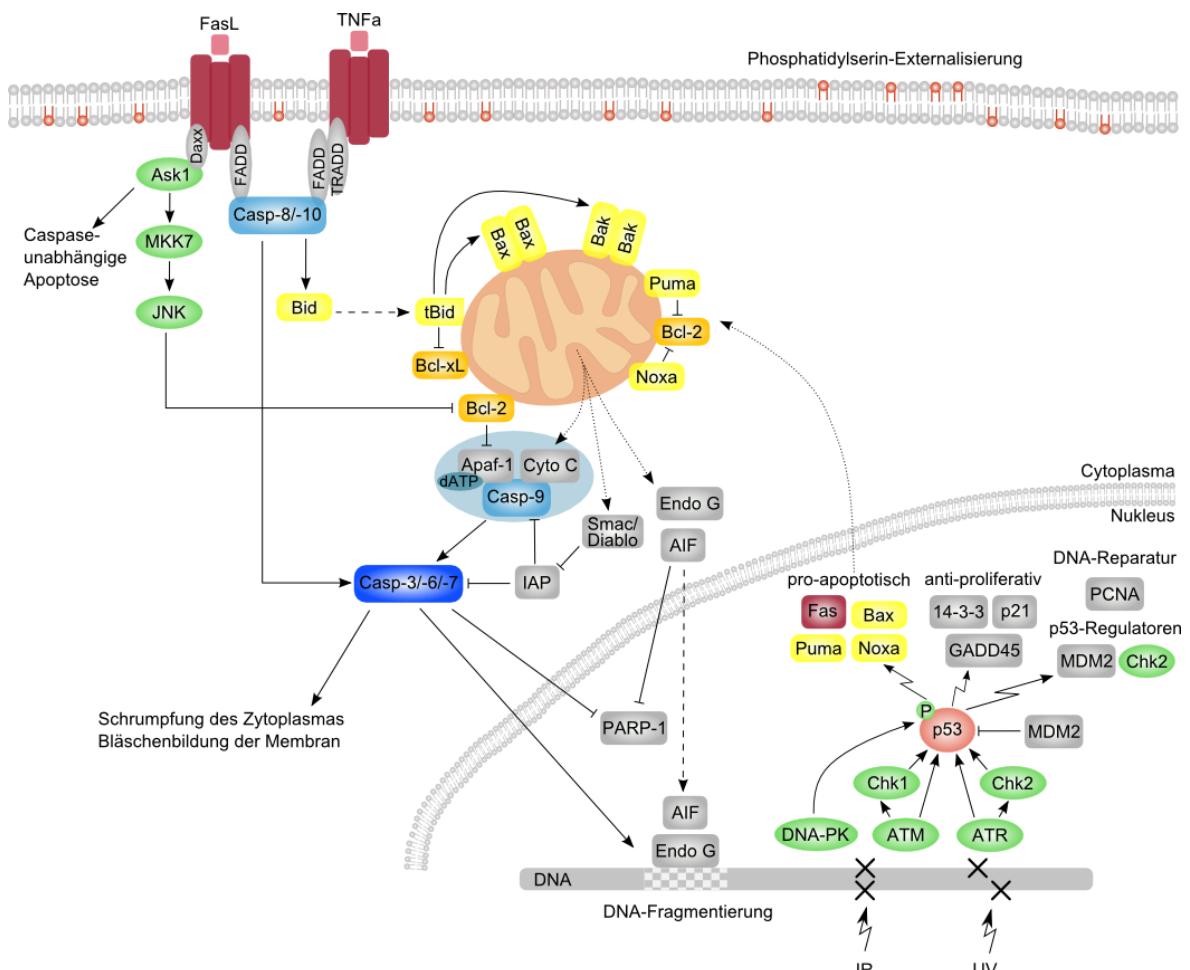


Abbildung 1: Signalwege der Apoptose. Die Apoptose kann prinzipiell in Initiations- und Effektorphase unterteilt werden. Die Initiation der Apoptose kann zum einen über den extrinsischen, Rezeptor-vermittelten Weg z.B. durch extrazelluläre Signale wie TNF oder FasL oder über den intrinsischen Apoptoseweg wie z.B. durch intrazelluläre Signale wie UV-induzierte DNA-Mutationen erfolgen. Ziel beider Wege ist die Aktivierung sogenannter Initiatorcaspsasen, welche wiederum Effektorcaspsasen und damit die zweite Phase der Apoptose, die so genannte Effektorphase, initiieren. Eigene Darstellung.

Durch verschiedene intrazelluläre Signale wie z.B. durch reaktive Sauerstoffspezies und UV-induzierte DNA-Mutationen kann es zur Aktivierung des intrinsischen bzw. mitochondrialen Apoptoseweges kommen. Die Mitglieder der B-cell lymphoma-2-Familie (Bcl-2) können die

Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran regulieren und damit die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren wie z.B. Cytochrom c aus dem Intermembranraum des Mitochondriums beeinflussen. Zur Bcl-2-Familie gehören sowohl pro- als auch anti-apoptotische Proteine, welche alle wenigstens eine (BH-Domäne) besitzen. Durch Interaktion der verschiedenen Familienmitglieder über diese Domäne werden Homo- und Heterodimere gebildet, die je nach Zusammensetzung über die Weiterleitung des pro-apoptotischen Signals entscheiden (zusammengefasst in (32)). Pro-apoptotische Mitglieder wie Bak und Bax können oligomerisieren und Poren in der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) bilden. Dies führt zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom c, Smac/Diablo, AIF und Endonuklease G (33). Cytochrom c bindet im Cytoplasma an die WD40-Domäne des Adaptorproteins Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Die zusätzliche Bindung von ATP an Apaf-1 bewirkt eine Konformationsänderung wodurch es zur Homooligomerisierung und Rekrutierung der Procaspsase-9 über die jeweilige Proteinbindedomäne CARD (caspase recruitment domain) kommt. Dieser über 1MDa große Komplex wird als Apoptosom bezeichnet und führt zur Aktivierung der Caspase-9, die wiederum Effektorcaspasen wie die Caspase-3 aktiviert (zusammengefasst in (34)). Die Aktivierung der Caspasen wird durch die Freisetzung von Smac/Diablo aus den Mitochondrien verstärkt, indem Smac/Diablo die Caspaseinhibierung durch Mitglieder der IAP (inhibitor of apoptosis protein)-Familie blockiert (35, 36). Die Mitglieder der IAP-Familie z.B. XIAP können über die sogenannte BIR (Baculovirus IAP Repeat)-Domäne direkt mit der aktivierte Caspase-9 und den Effektorcaspasen-3 und -7 interagieren (37, 38). D.h. die Hemmung der anti-apoptotischen IAP-Familie z.B. durch Smac/Diablo ermöglicht die Aktivierung des Apoptosoms und der Caspase-3 bzw. -7.

2 Zielstellung

Obwohl der Proteasomaktivator PA28 γ vor mehr als 30 Jahren entdeckt wurde, ist seine genaue Funktion noch immer unklar. Die bisher identifizierten Targets von PA28 γ zeigen, dass dieser nukleäre Proteasomaktivator an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie Zellproliferation, DNA-Reparatur und Tumorentstehung beteiligt ist. Obwohl verschiedene Studien zeigen, dass PA28 γ auch die Apoptose beeinflusst, sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch wenig untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher den Einfluss von PA28 γ auf charakteristische Merkmale der Apoptose zu untersuchen. Da bereits bekannt war, dass PA28 γ einen für den Zellzyklus und die Apoptose wichtigen Transkriptionsfaktor namens p53 sowohl durch Veränderung dessen subzellulärer Lokalisation als auch durch Verstärkung der

MDM2-vermittelten proteasomalen Degradation regulieren kann, sollte auch der Einfluss von PA28 γ auf p53 unter apoptotischen Bedingungen untersucht werden.

Verschiedene Tumorarten sind mit einer erhöhten PA28 γ -Expression assoziiert. Aber auch bei systemischen Autoimmunerkrankungen scheint PA28 γ involviert zu sein. Umso schnell wie möglich mit einer entsprechenden Therapie beginnen zu können, ist eine frühzeitige wie exakte Diagnose der Erkrankung notwendig. Daher sollte ein Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von PA28 γ in Seren entwickelt werden, um die Relevanz von PA28 γ als diagnostischer und prognostischer Marker bei verschiedenen Tumor- und Autoimmunerkrankung zu untersuchen.

Für ein besseres Verständnis von Autoimmunerkrankungen und zur Entwicklung von Antikörper-basierten Assays bzw. Therapien ist die Kenntnis über die genaue Bindungsstelle des Autoantikörpers an das Autoantigen von Bedeutung. Daher sollte mit Hilfe des für den ELISA hergestellten PA28 γ -Hyperimmunserums validiert werden, ob ein Microbead-basierter Multiplex-Immunoassay zum Epitopmapping von Antikörpern eingesetzt werden kann.

3 Methodik

Eine detaillierte Beschreibung aller Versuche kann den Publikationen entnommen werden.

3.1 Untersuchung PA28 γ -vermittelter Apoptoseereignisse

Um die Mechanismen der anti-apoptotischen Wirkung von PA28 γ zu untersuchen, wurden *in vitro*-Experimente mit Zelllinien durchgeführt, bei denen die PA28 γ -Expression durch exogene DNA verstärkt (B8, Fibroblasten-Zelllinie) bzw. durch miRNA-vermittelten Knockdown (HT29, Kolonkarzinom-Zelllinie) verringert war. Die Zellen wurden mit UV-C bzw. Butyrat behandelt und anschließend auf folgende charakteristische Apoptoseereignisse untersucht: 1. Exposition von Phosphatidylserin und DNA-Fragmentierung mittels Durchfluszytometrie, 2. Aktivierung von Caspasen mittels enzymatischen Assays mit fluorogenen Substraten und Western blot und 3. Expression und Lokalisation von Apoptose-relevanten Proteinen mittels subzellulärer Fraktionierung und anschließender Western blot Analyse.

Um den Einfluss von PA28 γ auf den Tumorsuppressor und Transkriptionsaktivator p53 zu untersuchen, wurde die subzelluläre Lokalisation und der Phosphorylierungsstatus von p53 mittels Western blot analysiert. Die p53-vermittelte Transkription Apoptose-relevanter Gene wurde mittels quantitativer real-time PCR untersucht.

Um die PA28 γ -vermittelten Effekte hinsichtlich Stabilisierung und Ubiquitin-abhängiger proteasomaler Degradation von p53 genauer untersuchen zu können, wurden B8-Fibroblasten transient mit myc-getaggetem p53 oder HA-getaggetem Ubiquitin transfiziert. Parallel zur

Apoptoseinduktion mit UV-C wurden diese Fibroblasten mit MG132, einem Proteasom-Inhibitor, und/oder Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, behandelt. Anschließend wurden anti-myc-Immunpräzipitationen durchgeführt.

Alle mit den Immunpräzipitationen zusammenhängenden Experimente wurden zu einem späteren Zeitpunkt in Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe von Prof. Stohwasser (BTU Cottbus-Senftenberg, Fakultät 2, Fachgebiet Biochemie) mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kloetzel (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Biochemie) durchgeführt.

3.2 PA28 γ als Serummarker für verschiedene Erkrankungen

Damit die Relevanz von PA28 γ als diagnostischer und prognostischer Marker bei verschiedenen Tumor- und Autoimmunerkrankungen untersucht werden konnte, wurde ein indirekter PA28 γ -spezifischer Sandwich-ELISA entwickelt. Zur Validierung des Assays wurde rekombinantes, His-getagtes PA28 γ als Eichprotein eingesetzt. Um dies zu ermöglichen, wurde die humane PSME3-cDNA in einen pDEST-Vektor kloniert. Da sich bei der Expression des Proteins in *E. coli* sphärische Einschlusskörperchen (inclusion bodies) bildeten, wussten diese gereinigt und solubilisiert werden.

Die folgenden Experimente zur Etablierung des Sandwich-ELISA wurden von Dipl.-Biol. Melanie Steiner durchgeführt und ausgewertet.

Neben einem kommerziellen PA28 γ -spezifischen Antikörper sollte ein PA28 γ -peptidspezifisches Serum für den ELISA verwendet werden. Dazu wurde ein PA28 γ -spezifisches, polyklonales Hyperimmunserum in einem zweistufigen Prozess affinitätschromatografisch gereinigt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren und die Spezifität des Serums zu erhöhen. Im ersten Schritt wurden PA28 γ -spezifische IgG-Antikörper mittels Protein A-Chromatographie angereichert. Aus diesem Serum wurde im zweiten Schritt mit Hilfe einer PA28 γ -Peptid-beladenen Säule das peptidspezifische Serum gewonnen.

Für den indirekten Sandwich-ELISA wurden Mikrotiterplatten mit einem kommerziellen anti-PA28 γ -Antikörper beschichtet. Anschließend wurden diese Platten mit humanen Seren von Patienten mit Tumoren, rheumatoider Arthritis, Sjögren's Syndrom, adultem Still Syndrom, sowie Seren von Patienten mit verschiedenen Kollagenosen und gesunden Spendern inkubiert. Das in den Seren vorhandene PA28 γ konnte an die auf der Mikrotiterplatten gebundenen PA28 γ -Antikörper binden und im nächsten Schritt von den Antikörpern des peptidspezifischen Serums erkannt werden. Der Nachweis der an das PA28 γ gebundenen Antikörper erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern, die sich gegen die IgG-Antikörper des peptidspezifischen Serums richteten. Durch Zugabe des chromogenen Peroxidase-Substrates Tetramethylbenzidin konnte das

Vorhandensein von PA28 γ in den human Seren visualisiert und mittels Absorptionsplattenreader quantifiziert werden.

3.3 Microbead-basierter Multiplex-Immunoassay

Das Prinzip des Microbead-basierten Multiplex-Immunoassays beruht darauf, dass verschiedene Fluoreszenz- und Größen-codierte Microbeads mit überlappenden Peptiden des Antigens beladen werden. Die rekombinant hergestellten Peptide wurden biotinyliert und konnten daher nicht-kovalent an die Streptavidin-beschichteten Microbeads binden. Die Peptid-beladenen Microbeads wurden mit dem zu testenden Serum inkubiert. Die Bindung der im Serum vorhandenen Antikörper wurde mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern nachgewiesen. Die Auswertung des Epitopmappings erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop und der Imaging Software Videoscan. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schierack (BTU Cottbus-Senftenberg, Fakultät 2, Fachgebiet Multiparameterdiagnostik) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 PA28 γ -vermittelt seine anti-apoptotische Funktion durch Inhibierung von Caspasen

Moncsek, A., Gruner, M., Meyer, H., Lehmann, A., Kloetzel, P.-M. and Stohwasser, R. (2015) Evidence for anti-apoptotic roles of proteasome activator 28 γ via inhibiting caspase activity. *Apoptosis* 20:1211-1228. DOI 10.1007/s10495-015-1149-6

4.1.1 PA28 γ beeinflusst charakteristische Apoptoseereignisse

Um den Einfluss von PA28 γ auf die Apoptose zu untersuchen, wurden sowohl PA28 γ -transfizierte murine Fibroblasten (B8) als auch Vektor-transfizierte B8-Fibroblasten mit UV-C behandelt und hinsichtlich verschiedener Apoptoseereignisse untersucht. Da es bis *dato* keine Vektorkontrollzelllinie gab, wurde diese durch Co-Transfektion der Vektoren pSG5 und pLXSP (Puromycin-Resistenz), entsprechend der bereits vorhandenen Fibroblastenzelllinien, mittels Calciumphosphatpräzipitation hergestellt.

Es zeigte sich, dass Fibroblasten mit exogener PA28 γ -Expression eine geringere Apoptoserate aufwiesen als Fibroblasten, die mit den Kontrollplasmiden transfiziert wurden. Charakteristische Apoptoseereignisse wie die Exposition von Phosphatidylserin, die Fragmentierung der DNA oder die Degradation von PARP waren in den PA28 γ -Transfektanten geringer als in der Kontrollzelllinie (siehe Publikation Moncsek *et al.* (2015) Fig. 1).

4.1.2 PA28 γ verstärkt unter apoptotischen Bedingungen die Akkumulation von Cytochrom c im Mitochondrium

B8-Fibroblasten wurden 16 Stunden nach UV-Behandlung hinsichtlich mitochondrialer Veränderungen untersucht. Während zytosolische und Mitochondrien-assoziierte Bax-Proteinlevel kaum Unterschiede aufwiesen (siehe Publikation Moncsek *et al.* (2015) Fig. 2A), zeigten PA28 γ -Transfektanten vier Stunden nach UV-Behandlung eine Akkumulation von Cytochrom c in den Mitochondrien. Die Kontrollzelllinien hingegen zeigten im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten nach UV-Behandlung ein deutlich geringeres mitochondriales Cytochrom c-Level (siehe Publikation Moncsek *et al.* (2015) Fig. 2B).

Die Untersuchung des Mitochondrien-assoziierten Bcl-2-Familienmitgliedes Bcl-xL zeigte, dass dieser anti-apoptotischer Faktor in den PA28 γ -Transfektanten verstärkt exprimiert wird. Auch acht Stunden nach UV-Behandlung war das Bcl-xL-Proteinlevel in PA28 γ -Transfektanten erhöht. Jedoch 16 Stunden nach UV entsprach das Bcl-xL-Level wieder dem der Kontrollzelllinie (siehe Publikation Moncsek *et al.* (2015) Fig. 2C).

4.1.3 PA28 γ inhibiert die Aktivität von Caspisen

Untersuchungen der B8-Fibroblasten hinsichtlich Caspase-Aktivität zeigten, dass die Caspase-3/7-Aktivierung 16 Stunden nach UV-Behandlung in PA28 γ -Transfektanten im Vergleich zur Kontrollzelllinie signifikant reduziert war (siehe Publikation Moncsek *et al.* (2015) Fig. 4 B und C). Expressionsanalysen zeigten keine signifikanten Unterschiede der Caspase-mRNA, lediglich ein leichter Anstieg der mRNA in den PA28 γ -Transfektanten unabhängig von der UV-Behandlung (siehe Publikation Moncsek *et al.* (2015) Fig. 4A). Die Analyse des Caspase-3/7-Inhibitors Survivin zeigte, dass dessen Proteinlevel in den PA28 γ -Transfektanten im Vergleich zur Kontrollzelllinie unabhängig von der UV-Behandlung reduziert ist (siehe Publikation Moncsek *et al.* (2015) Fig. 2D).

Humane HT29-Kolonkarzinomzellen mit einem miRNA-vermittelten Knockdown von PA28 γ zeigten im Vergleich zu nonsense-miRNA-transfizierten Fibroblasten nach Butyratbehandlung sowohl eine erhöhte Exposition von Phosphatidylserin als auch eine verstärkte Aktivierung der Caspase-3, -7 und -9 (siehe Publikation Moncsek *et al.* (2015) Fig. 3).

4.1.4 PA28 γ verstärkt die nukleäre Akkumulation von p53

B8-Fibroblasten wurden mit UV behandelt und anschließend hinsichtlich p53-Lokalisierung und -Phosphorylierung untersucht. In allen untersuchten B8-Zelllinien konnte 16 Stunden nach UV-Behandlung ein Rückgang des im Zytosol lokalisierten p53 zugunsten von nukleärem p53 detektiert werden. Dabei zeigte sich, dass PA28 γ -Transfektanten mehr p53 im Zellkern

akkumulierten als die Kontrollzelllinie. Noch deutlicher war der Unterschied beim Nachweis der phosphorylierten, transkriptionsaktiven Form von p53. PA28 γ -Transfektanten zeigten 16 Stunden nach UV-Behandlung im Vergleich zur Kontrollzelllinie dreifach (signifikant) erhöhte nukleäre p53-Ser18P-Level (siehe Publikation Moncsek *et al.* (2015) Fig. 5A).

Expressionsanalysen von p53-Zielgenen zeigten, dass die mRNA-Level nach UV-Behandlung zeitabhängig ansteigen. PA28 γ -Transfektanten zeigten im Vergleich zur Kontrollzelllinie eine verstärkte Expression der untersuchten mRNAs (siehe Publikation Moncsek *et al.* (2015) Fig. 5C).

4.1.5 PA28 γ verstärkt die Konjugation von Ubiquitin und stabilisiert p53-S18P

Um die Stabilisierung und Ubiquitin-abhängige Degradation von p53 in B8-Fibroblasten genauer zu untersuchen wurden pulldown-Experimente durchgeführt. Dazu wurden B8-Tranfektanten transient mit p53-myc und/oder HA-Ubiquitin transfiziert und verschiedenen apoptotischen Bedingungen ausgesetzt, zusätzlich wurde entweder die Translation und/oder die proteasomale Degradation inhibiert (siehe Publikation Moncsek *et al.* (2015) Fig. 6).

Immunpräzipitationen von myc-markierten Proteinen zeigten, dass p53-myc durch PA28 γ stabilisiert wird und bestätigen, dass die p53-Phosphorylierung unter apoptotischen Bedingungen erhöht und durch PA28 γ verstärkt wird. Außerdem zeigten Immunpräzipitationen von HA-markierten Proteinen (HA-Ubiquitin), dass die Ubiquitylierung von Proteinen in PA28 γ -Transfektanten im Vergleich zur Kontrollzelllinie verstärkt ist.

4.2 PA28 γ als Serummarker für verschiedene Erkrankungen

Gruner, M., **Moncsek, A.**, Rödiger, S., Kühnhardt, D., Feist, E. and Stohwasser, R. (2014) Increased proteasome activator 28 gamma (PA28 γ) levels are unspecific but correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. BMC Musculoskeletal Disorders 15:414. DOI: 10.1186/1471-2474-15-414

4.2.1 Detektion von PA28 γ in humanen Seren

Mit Hilfe von rekombinanten, His-getagten PA28 γ war es möglich den Sandwich-ELISA zu etablieren und einzelne Parameter wie zum Beispiel die Antikörperkonzentration zu optimieren. Mit dem etablierten Sandwich-ELISA konnte PA28 γ bis zu einer Konzentration von 3ng/ml detektieren werden. PA28 α und PA28 β waren mit diesem ELISA nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe von Seren von 20 gesunden Probanden wurde ein Schwellenwert für die PA28 γ -Konzentration im Serum von 39.8 ng/ml festgelegt. Insgesamt wurden 274 Seren von Patienten mit verschiedenen Tumor- bzw. Autoimmunerkrankungen untersucht. Im Vergleich zu gesunden

Probanden wiesen alle untersuchten Erkrankungen im Mittel eine signifikant erhöhte PA28 γ -Konzentration auf. Während der prozentuale Anteil der Tumorerkrankungen mit detektierbaren PA28 γ -Serumleveln mit 10,7% relativ gering war, konnten bei den Autoimmunerkrankungen bis zu 30% der getesteten Seren als PA28 γ -positiv eingestuft werden. Am höchsten war die Anzahl bei Patienten mit Sjögren's Syndroms (29.4%), gefolgt von Patienten mit rheumatoider Arthritis (26.9%) und Kollagenosen (connective tissue disease) (25.8%). Im Falle von AOSD (adult-onset Still's disease, autoinflammatory disease) zeigten 13.3% der untersuchten Seren erhöhte PA28 γ -Serumlevel. Statistisch zeigten die Seren von Patienten mit Tumorerkrankungen und systemischen Autoimmunerkrankungen (bis auf SLE) signifikant erhöhte PA28 γ -Level im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Publikation Gruner *et al.* (2014) Fig. 2 und Tabelle 2).

4.2.2 Detektion von PA28 γ in humanen Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis

Die follow-up Studie mit Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), die mit dem Immunsuppressiva Abatacept behandelt wurden, zeigte, dass das PA28 γ -Serumlevel nach einem Behandlungszeitraum von 16 Wochen in 61.5% der Seren verringert ist. Jedoch stieg in 75% dieser Fälle die PA28 γ -Konzentration nach weiteren 8 Wochen Abatacept-Behandlung wieder auf das Ausgangsniveau an. Außerdem wurden die PA28 γ -Serumlevel von Abatacept-behandelten RA-Patienten mit diagnostischen Markern für RA verglichen. PA28 γ -Serumlevel zeigten eine signifikante Korrelation mit dem Krankheitsaktivitätsindex (DAS28, disease activity score 28) und dem Entzündungsparameter ESR (Erythrozytensedimentationsrate). Eine Korrelation mit dem Entzündungsparameter CRP (C-reaktiven Protein) konnte nicht gezeigt werden (siehe Publikation Gruner *et al.* (2014) Fig. 3).

4.3 Microbead-basierter Multiplex-Immunoassay ermöglicht Epitopmapping

Schmidt, C., Rödiger, S., Gruner, M., **Moncsek, A.**, Stohwasser, R., Hanack, K., Schierack, P. and Schröder, C. (2016) Multiplexed localization of sequential peptide epitopes by a planar microbead chip. *Analytica Chimica Acta* 908, 150-160. DOI: 10.1016/j.aca.2015.12.030

In diesem Projekt wurde PA28 γ als Modellprotein eingesetzt, um einen schnellen und kostengünstigen Multiplex-Immunoassay zum Epitopmapping von Antikörpern zu validieren. Getestet wurde das für den Sandwich-ELISA hergestellte, polyklonale PA28 γ -Hyperimmunserum. Der Multiplex-Immunoassay konnte eindeutig das gleiche Peptid detektierten wie der PA28 γ -spezifische Sandwich-ELISA (siehe Publikation Schmidt *et al.* (2016) Fig. 2). Um eine genauere Detektion der Bindungsstelle des Hyperimmunserums zu ermöglichen, wurden kürzere, GST-

getaggte Peptide eingesetzt. Zwei der drei getesteten GST-getaggten Peptide wurden vom Microbead-Immunoassay erkannt und vom Sandwich-ELISA bestätigt (siehe Publikation Schmidt *et al.* (2016) Fig. 4).

Ebenso erfolgreich wurde auch ein monoklonales Hyperimmunserum gegen das große Kapsidprotein des Hamster-Polyomavirus getestet (siehe Publikation Schmidt *et al.* (2016) Fig. 5 und 6).

5 Diskussion

5.1 PA28 γ inhibiert die Aktivität von Caspasen und verstärkt die nukleäre Akkumulation von p53

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Proteasomaktivators PA28 γ auf verschiedene Apoptoseereignisse untersucht. PA28 γ konnte als ein anti-apoptotischer Faktor bestätigt werden. PA28 γ verringerte charakteristische Apoptoseereignisse wie die Exposition von Phosphatidylserin, die Degradation von PARP und die Fragmentierung der DNA. Das Weiteren führte PA28 γ unter apoptotischen Bedingungen zur Akkumulation von Cytochrom c im Mitochondrium und zur Inhibierung der Caspaseaktivität. Interessanterweise verstärkte PA28 γ die nukleäre Akkumulation von Ser18-phosphorylierten p53. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass PA28 γ die Apoptose auf verschiedenen Wegen negativ beeinflussen kann.

Regulation der Caspaseaktivität

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass PA28 γ die Caspaseaktivität negativ beeinflusst. Der zugrundeliegende Mechanismus könnte zum einen eine verringerte Aktivierung des Apoptosoms sein. PA28 γ bewirkt nach UV-Behandlung die Akkumulation von Cytochrom c im Mitochondrium. Die Freisetzung von Cytochrom c ins Cytoplasma ist aber zur Bildung des Apoptosoms (Apaf-1, Cytochrom c und Caspase) und damit zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9 notwendig, welche wiederum die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert (zusammengefasst in (34)). Aber auch Bcl-xL könnte für die verringerte Cytochrom c-Freisetzung verantwortlich sein. PA28 γ -Transfektanten zeigten bereits in unbehandelten Fibroblasten ein erhöhtes Proteinlevel des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL. Dies könnte dazu führen, dass die Bildung von MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization) verringert bzw. verzögert ist, da Bcl-xL, eins der dafür verantwortlichen pro-apoptotischen Bcl-2 Mitglieder, namens Bax inhibiert (39). Des Weiteren lassen die in dieser Arbeit gezeigten Daten Rückschlüsse auf einen direkten Einfluss von PA28 γ auf Caspasen. Der zugrundeliegende Mechanismus scheint aber nicht für alle Caspasen gleich zu sein. Da das Proteinlevel der Procaspsase-7 in der PA28 γ -Transfektante und der

Kontrollzelllinie gleich ist, jedoch das Proteinlevel der aktiven Caspase-7 nach UV-Behandlung in der PA28 γ -Transfektante geringer ist, kann man darauf schließen, dass PA28 γ die Aktivierung der Caspase inhibiert oder aber die proteasomale Degradation der aktiven Caspase vermittelt. Hier würden Experimente mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 zur Klärung beitragen. Im Falle der Caspase-3 ist bereits das Proteinlevel der Procaspsase-3 unabhängig von der UV-Behandlung in der PA28 γ -Transfektante geringer als in der Kontrollzelllinie. Dies könnte auf einen Einfluss auf die Translation bzw. PA28 γ -vermittelte proteasomale Degradation der Procaspsase zurückzuführen sein. Ein Einfluss von PA28 γ auf Transkription von Caspisen kann aufgrund der Expressionsanalysen ausgeschlossen werden.

Die geringere Caspase-3/7-Aktivität erklärt auch die verringerte Exposition von Phosphatidylserin an der Zellmembran, da die aktive Caspase-3/7 die Aktivierung der dafür verantwortlichen Phospholipid-Flippase vermittelt (40).

Regulation der p53-Phosphorylierung

Der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53 ist wohl einer der wichtigsten zellulären Regulatoren. Die koordinierte Regulation von p53 wird durch eine Vielzahl von post-translationalen Modifikationen gewährleistet. In den letzten Jahren haben verschiedene Studien gezeigt, dass auch PA28 γ den Tumorsuppressor p53 regulieren kann. Zhang & Zhang zeigten 2008 erstmalig, dass PA28 γ die Ubiquitin- und MDM2-abhängige proteasomale Degradation von p53 vermitteln kann. Spätere Studien zeigten, dass PA28 γ auch den Export von p53 aus dem Zellkern unterstützt, indem er dessen Monoubiquitylierung verstärkt und die p53 Tetramerisierung inhibiert (24).

In dieser Arbeit wurde erstmalig den Einfluss von PA28 γ unter apoptotischen Bedingungen auf die Phosphorylierung von p53 unter Berücksichtigung dessen subzellulärer Lokalisation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass PA28 γ nach UV-Behandlung die Phosphorylierung von p53 am Serin18 verstärkt. Die Phosphorylierung von p53 am Ser15 (humanes Äquivalent zum murinen Ser18) wird u.a. nach UV-induzierten DNA-Schädigungen durch die Stress-aktivierten Kinasen ATM und Chk2 vermittelt (41, 42). Es konnte gezeigt werden, dass dies zur Stabilisierung von p53 führt, da die Bindung der E3-Ligase MDM2 inhibiert wird (43). Auch PA28 γ kann mit diesen Stress-induzierten Kinasen interagieren (44, 45) bzw. sogar von diesen phosphoryliert werden (46). Da PA28 γ auch mit p53 interagiert, könnte PA28 γ , ähnlich wie bei der MDM2-vermittelten Ubiquitylierung von p53, als Adaptermolekül zwischen Stress-induzierten Kinasen und p53 fungieren und somit die Phosphorylierung von p53 verstärken. PA28 γ wird aber nicht nur durch Stress-induzierte Kinasen phosphoryliert, sondern scheint *per se* auch ein wichtiger

Regulator der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung zu sein (45, 46). Vielmehr ist PA28 γ auch unter nicht-apoptotischen Bedingungen an der Aufrechterhaltung der Chromosom-Stabilität beteiligt (47).

Neben der Phosphorylierung ist eine Vielzahl von post-translationalen Modifikationen an der Regulation von p53 beteiligt. Diese können Einfluss auf Proteinlevel, die zelluläre Lokalisation, die Interaktion mit Cofaktoren und letztendlich die p53-vermittelte zelluläre Antwort haben (zusammengefasst in (48)). Inwieweit die durch PA28 γ -vermittelte p53-Phosphorylierung Einfluss auf DNA-Reparatur-Mechanismen bzw. auf die Regulation der Apoptose hat, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Denkbar wäre jedoch, dass p53 in diesem zellulären Kontext die Reparatur der DNA gegenüber der Apoptose begünstigt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten geben einen Überblick über den Einfluss von PA28 γ auf verschiedene charakteristische Apoptoseereignisse und sollen die Grundlage für weiterführende Experimente zur Untersuchung der PA28 γ -vermittelten anti-apoptotischen Regulation sein.

5.2 Erhöhte PA28 γ -Serumlevel sind nicht krankheitsspezifisch, sie korrelieren aber bei Patienten mit rheumatoider Arthritis mit der Krankheitsaktivität

In diesem Projekt wurde ein PA28 γ -spezifischer Sandwich-ELISA (einschließlich Herstellung rekombinanter Proteinen und Peptid-spezifischen Immunserums) entwickelt und validiert. Des Weiteren wurden Seren von Patienten mit verschiedenen Tumor- und Autoimmunerkrankungen auf das Vorhandensein von PA28 γ getestet. Dieser ELISA ermöglicht es bei einigen der untersuchten Erkrankungen zwischen einem gesunden und einem erkrankten Patienten zu unterscheiden. Er kann jedoch nicht zur Differenzierung verschiedener Autoimmunerkrankungen beitragen, da die erhöhten PA28 γ -Serumlevel bei den untersuchten Autoimmunkrankheiten nicht krankheitsspezifisch sind. Da PA28 γ -Serumlevel mit diagnostischen Markern für RA (DAS28, ESR) korrelieren, könnte PA28 γ als ein neuer Marker für den Verlauf der RA bzw. zur Kontrolle des Therapieverlaufes eingesetzt werden.

Warum PA28 γ bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen erhöht ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Allgemein nimmt die Krankheitshäufigkeit von Tumor- und Autoimmunerkrankungen mit steigendem Alter zu. Einige mit dem Altern assoziierte zellulären Veränderungen wie zum Beispiel oxidativer Stress, die Oxidation und damit verbundene Aktivität von Proteinen (49, 50), Akkumulation von DNA-Schäden (51), werden durch PA28 γ beeinflusst (46, 47, 52). Dieser Zusammenhang muss in weiteren Studien genauer untersucht werden.

5.3 Microbead-basierter Multiplex-Immunoassay ermöglicht Epitopmapping

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Hyperimmunseren validiert, ob ein Microbead-basierter Multiplex-Immunoassay zum Epitopmapping eingesetzt werden kann. Dazu wurden biotinylierte und teilweise zusätzlich GST-getaggte, überlappende Peptide des zu untersuchenden Antigens hergestellt. Der Multiplex-Immunoassay konnte eindeutig das gleiche Peptid identifizieren wie ein entsprechender ELISA.

Mit dem erfolgreich validierten Microbead-basierten Multiplex-Immunoassay ist es gelungen ein sowohl kostengünstiges und zeitsparendes als auch Serum-schonendes Verfahren zum Epitopmapping von Antikörpern zu etablieren. Dieser Assay kann zur Entwicklung von Antikörper-basierten Assays und Therapien und zum besseren Verständnis von Autoimmunerkrankungen beitragen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of protein death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2727-2730.
2. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801-847.
3. Puhler G, Weinkauf S, Bachmann L, Muller S, Engel A, Hegerl R, Baumeister W. Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *EMBO J* 1992;11:1607-1616.
4. Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997;386:463-471.
5. Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, Tsukihara T. Structure determination of the constitutive 20S proteasome from bovine liver at 2.75 Å resolution. *J Biochem* 2002;131:171-173.
6. Fröh K, Gossen M, Wang K, Bujard H, Peterson PA, Yang Y. Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J* 1994;13:3236-3244.
7. Stohwasser R, Standera S, Peters I, Kloetzel PM, Groettrup M. Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon-gamma-modulated proteasome subunits. *Eur J Immunol* 1997;27:1182-1187.
8. Gaczynska M, Goldberg AL, Tanaka K, Hendil KB, Rock KL. Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7. *J Biol Chem* 1996;271:17275-17280.
9. Kloetzel PM, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2004;16:76-81.
10. Stohwasser R, Salzmann U, Giesebeck J, Kloetzel PM, Holzhutter HG. Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur J Biochem* 2000;267:6221-6230.
11. Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC, Hill CP. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 2000;408:115-120.

12. 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. Ryumachi 1981;21 Suppl:129-140.
13. Nikaido T, Shimada K, Nishida Y, Lee RS, Pardee AB, Nishizuka Y. Loss in transformed cells of cell cycle regulation of expression of a nuclear protein recognized by SLE patient antisera. Exp Cell Res 1989;182:284-289.
14. Sakamoto M, Takasaki Y, Yamanaka K, Kodama A, Hashimoto H, Hirose S. Purification and characterization of Ki antigen and detection of anti-Ki antibody by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1989;32:1554-1562.
15. Li X, Lonard DM, Jung SY, Malovannaya A, Feng Q, Qin J, Tsai SY, Tsai MJ, 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.
16. Ying H, Furuya F, Zhao L, Araki O, West BL, Hanover JA, Willingham MC, Cheng SY. Aberrant accumulation of PTTG1 induced by a mutated thyroid hormone beta receptor inhibits mitotic progression. J Clin Invest 2006;116:2972-2984.
17. 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.
18. Moriishi K, Okabayashi T, Nakai K, Moriya K, Koike K, Murata S, Chiba T, Tanaka K, Suzuki R, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y. Proteasome activator PA28gamma-dependent nuclear retention and degradation of hepatitis C virus core protein. J Virol 2003;77:10237-10249.
19. 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.
20. Zhou P. REGgamma: a shortcut to destruction. Cell 2006;124:256-257.
21. Okamura T, Taniguchi S, 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.
22. Roessler M, Rollinger W, Mantovani-Endl L, Hagmann ML, Palme S, Berndt P, Engel AM, 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.
23. Wang X, Tu S, Tan J, Tian T, Ran L, Rodier JF, Ren G. REG gamma: a potential marker in breast cancer and effect on cell cycle and proliferation of breast cancer cell. Med Oncol 2011;28:31-41.
24. 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 MJ, Zhang B, Luo H, Li X. REGgamma modulates p53 activity by regulating its cellular localization. J Cell Sci 2010;123:4076-4084.
25. Tian M, Xiaoyi W, Xiaotao L, Guosheng R. Proteasomes reactivator REG gamma enhances oncogenicity of MDA-MB-231 cell line via promoting cell proliferation and inhibiting apoptosis. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2009;55 Suppl:OL1121-1131.

26. Shi Y, Luo X, Li P, Tan J, Wang X, Xiang T, Ren G. miR-7-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells mainly by targeting REGgamma. *Cancer Lett* 2015;358:27-36.
27. Zhang Z, Zhang R. Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation. *EMBO J* 2008;27:852-864.
28. Wan ZX, Yuan DM, Zhuo YM, Yi X, Zhou J, Xu ZX, Zhou JL. The proteasome activator PA28gamma, a negative regulator of p53, is transcriptionally up-regulated by p53. *Int J Mol Sci* 2014;15:2573-2584.
29. 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.
30. 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.
31. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
32. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004;305:626-629.
33. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:231-241.
34. Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 2007;14:56-65.
35. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
36. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-53.
37. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:239-252.
38. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300-304.
39. Billen LP, Kokoski CL, Lovell JF, Leber B, Andrews DW. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol* 2008;6:e147.
40. Segawa K, Kurata S, Yanagihashi Y, Brummelkamp TR, Matsuda F, Nagata S. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science* 2014;344:1164-1168.
41. Buscemi G, Perego P, Carenini N, Nakanishi M, Chessa L, Chen J, Khanna K, Delia D. Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene* 2004;23:7691-7700.
42. Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 2000;287:1824-1827.
43. Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13777-13782.

44. Zannini L, Buscemi G, Fontanella E, Lisanti S, Delia D. REGgamma/PA28gamma proteasome activator interacts with PML and Chk2 and affects PML nuclear bodies number. *Cell Cycle* 2009;8:2399-2407.
45. Levy-Barda A, Lerenthal Y, Davis AJ, Chung YM, Essers J, Shao Z, van Vliet N, Chen DJ, Hu MC, Kanaar R, Ziv Y, Shiloh Y. Involvement of the nuclear proteasome activator PA28gamma in the cellular response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 2011;10:4300-4310.
46. Magni M, Ruscica V, Buscemi G, Kim JE, Nachimuthu BT, Fontanella E, Delia D, Zannini L. Chk2 and REGgamma-dependent DBC1 regulation in DNA damage induced apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2014;42:13150-13160.
47. 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* 2008;7:504-512.
48. Murray-Zmijewski F, Slee EA, Lu X. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:702-712.
49. Oliver CN, Levine RL, Stadtman ER. A role of mixed-function oxidation reactions in the accumulation of altered enzyme forms during aging. *J Am Geriatr Soc* 1987;35:947-956.
50. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* 2006;40:1250-1258.
51. Burhans WC, Weinberger M. DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res* 2007;35:7545-7556.
52. Zhang Y, Liu S, Zuo Q, Wu L, Ji L, Zhai W, Xiao J, Chen J, Li X. Oxidative challenge enhances REGgamma-proteasome-dependent protein degradation. *Free Radic Biol Med* 2015;82:42-49.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anja Moncsek, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur anti-apoptotischen Wirkung des Proteasomaktivators PA28 γ “ 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

Anteilserklärung

1. **Moncsek, A.**, Gruner, M., Meyer, H., Lehmann, A., Kloetzel, P.-M. and Stohwasser, R. (2015) Evidence for anti-apoptotic roles of proteasome activator 28 γ via inhibiting caspase activity. *Apoptosis* 20:1211-1228. DOI 10.1007/s10495-015-1149-6

Impact factor (2016): 3.592

Eigener Anteil: 60%

Anja Moncsek hat einen maßgeblichen Anteil sowohl an der Entstehung als auch an der experimentellen Durchführung des Projektes. Sie hat die Versuche zum Einfluss von PA28 γ auf die verschiedenen Apoptoseereignisse und die inhibierende Wirkung von PA28 γ auf die Aktivität der Caspuren durchgeführt. Zu den bereits existierenden stabil transfizierten Zelllinien, hat sie weitere für die Versuche notwendige stabil transfizierte murine B8-Zelllinien etabliert. Frau Moncsek hat in der Folge erstmalig eine umfassende Untersuchung des Einflusses von PA28 γ auf verschiedene Apoptoseereignisse vorgenommen. Die Zellkultur-Experimente (Apoptoseinduktion mit UV-C und Cycloheximid) und die damit verbundenen Methoden zum Nachweis der Apoptose, d.h. Quantifizierung von apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie (subG1-Phase, Annexin V), fluorometrische Caspase Assays, subzelluläre Fraktionierungen, Western blots für PA28 γ , PARP, Bax, Cytochrom c, Caspase-3, Caspase-7 und p53 sowie quantitative real-time PCR für Caspuren und p53-Targetgene, hat sie etabliert, selbstständig durchgeführt und statistisch ausgewertet.

Die Arbeiten zu den knockdown-Experimenten mit HT29-Zellen hat Frau Moncsek von Anfang an betreut. Dazu gehörte die praktische Schulung der Mitarbeiter sowie Hilfestellung bei der Interpretation und der statistischen Auswertung der Ergebnisse, teilweise wurden von ihr unterstützend Experimente mit HT29-Zellen durchgeführt.

Frau Moncsek hat selbstständig die erste Version des Manuskripts (inklusive der Abbildungen) zu der späteren Publikation verfasst. Nach dem Weggang von Frau Moncsek (ausgelaufene Förderung) waren für die Revision des eingereichten Manuskriptes, noch zusätzliche Experimente notwendig, die sowohl in Berlin als auch in Senftenberg durchgeführt wurden. Frau Moncsek hat in der Folge den weiteren Schreibprozess, die graphische Darstellung von Experimenten wie auch den wissenschaftlichen Diskussionsprozess in allen Phasen der Manuskripterstellung bis zur finalen Einreichung aktiv mit begleitet.

In Bezug auf die finale Publikation mit Erstautorschaft summiert sich deshalb der Anteil von Frau Moncsek auf 60%.

2. Gruner, M., **Moncsek, A.**, Rödiger, S., Kühnhardt, D., Feist, E. and Stohwasser, R. (2014) Increased proteasome activator 28 gamma (PA28 γ) levels are unspecific but correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. BMC Musculoskeletal Disorders 15:414. DOI: 10.1186/1471-2474-15-414

Impact factor (2016): 1.684

Eigener Anteil: 15%

Anja Moncsek hat einen wesentlichen Anteil an der Entstehung und Durchführung des Projektes. Sie war von Beginn an Konzeption und Entwicklung des ELISA beteiligt. Die Etablierung des ELISA erfolgte mit His-getaggten PA28 γ -Proteinen. Frau Moncsek war für die Klonierung, Synthese und u.a. für die Affinitätsreinigung dieser His-getaggten PA28 γ -Proteine verantwortlich. Des Weiteren war sie an der Korrektur des Manuskripts beteiligt.

3. Schmidt, C., Rödiger, S., Gruner, M., **Moncsek, A.**, Stohwasser, R., Hanack, K., Schierack, P. and Schröder, C. (2016) Multiplexed localization of sequential peptide epitopes by a planar microbead chip. Analytica Chimica Acta 908, 150-160. DOI: 10.1016/j.aca.2015.12.030

Impact factor (2016): 4.712

Eigener Anteil: 5%

Anja Moncsek war für die Produktion (Klonierung und Affinitätsreinigung) GST-getaggter PA28 γ -Proteine verantwortlich, die für initiale Experimente des Projektes genutzt wurden. Des Weiteren war sie an Konzeption und Entwicklung des verwendeten PA28 γ -spezifischen Sandwich-ELISA beteiligt. Außerdem war Frau Moncsek an der Korrektur des Manuskripts beteiligt.

Prof. Dr. rer. nat. Peter-Michael Kloetzel

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Ausgewählte Publikationen

Moncsek, A., Gruner, M., Meyer, H., Lehmann, A., Kloetzel, P.-M. and Stohwasser, R. (2015) Evidence for anti-apoptotic roles of proteasome activator 28 γ via inhibiting caspase activity. *Apoptosis* 20:1211-1228.

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

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 (REGy, 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 lysozyme 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 sulfate-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 hyperimmunoserum 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.

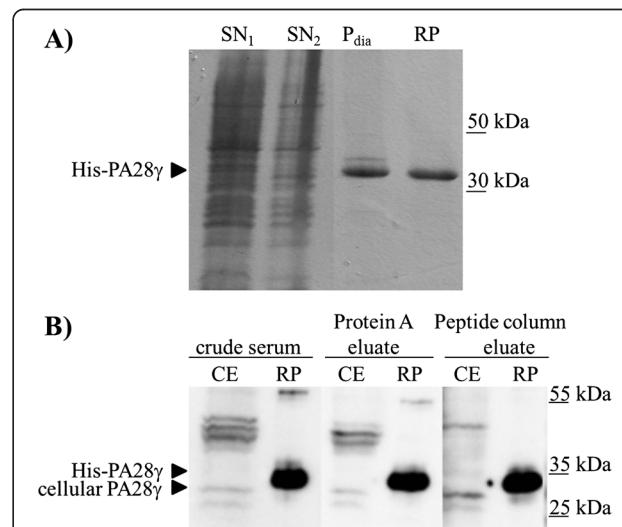


Figure 1 Preparation of recombinant PA28 γ and rabbit polyclonal antibodies to PA28 γ . A) Coomassie stained SDS gel of purified recombinant PA28 γ . Supernatant 1 and 2 (SN₁ and SN₂) contain the soluble *E. coli* proteins after the first two solubilization steps. Pelleted His-PA28 γ precipitate was 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).

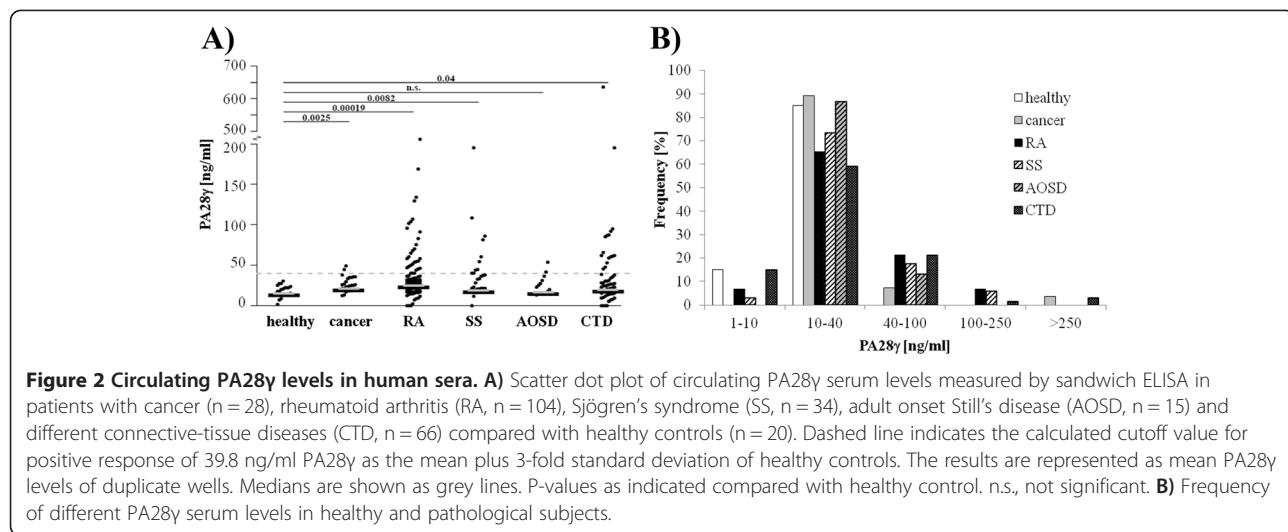
The frequency of different human PA28 γ serum levels is displayed in Figure 2B. Most sera showed a PA28 γ levels between 10 and 40 ng/ml and were therefore below the calculated cutoff. In up to 21% of patients with autoimmune diseases and cancer, increased PA28 γ levels between 40 and 100 ng/ml were 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 |
| day 2 | 8.7 | 14.7 | 7.6 | 4.6 | 13.8 | 7.9 | 4.9 |
| day 3 | 18.1 | 4.9 | 7.0 | 16.5 | 3.9 | 6.5 | 9.1 |
| 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.



Correlation of circulating PA28 γ levels with patients characteristics and disease activity in RA

Of note, PA28 γ serum levels seem to be significantly correlated with age in RA patients ($r = -0.223$; $P = 0.032$). Furthermore, female RA subjects expressed significantly higher levels of PA28 γ ($P < 0.001$) 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 PA28 γ protein levels by sandwich ELISA and anti-PA28 γ 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 PA28 γ is bound to intact 20S proteasome complexes a highly specific polyclonal anti-20S rabbit serum was used instead of the polyclonal anti-PA28 γ detection antibody in the

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

The kinetic of PA28 γ 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 PA28 γ 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 PA28 α and PA28 β are interferon- γ -inducible and involved in antigen presentation, the exact role of PA28 γ is still unclear. Nevertheless, PA28 γ serum levels were compared with disease activity according to DAS28-ESR during

Table 2 Mean PA28 γ level (ng/ml), standard deviations (SD), minimum (min.) and maximum (max.) values from patients with different diseases

| Disease | n | mean | SD | min. | max. | PA28 γ 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: | | | | | | | |
| <i>Polymyositis</i> | 18 | 31.1 | 21.2 | 6.7 | 85.4 | 22.2% (4/18) | *0.033 |
| <i>SLE</i> | 37 | 60.0 | 127.7 | 0.0 | 636.6 | 24.3% (9/37) | 0.432 |
| <i>UCTD</i> | 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 PA28 γ 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.

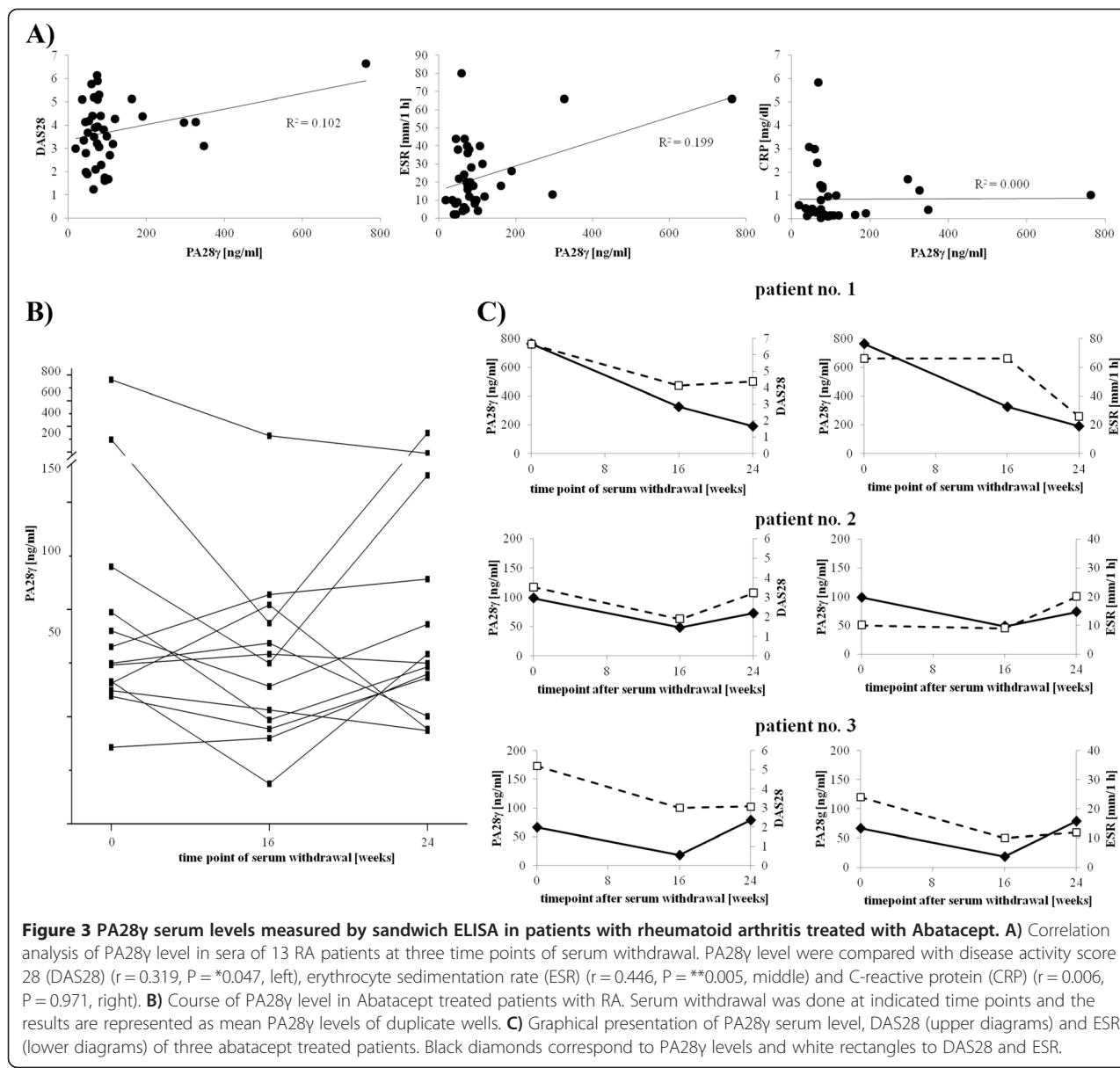


Figure 3 PA28 γ serum levels measured by sandwich ELISA in patients with rheumatoid arthritis treated with Abatacept. **A)** Correlation analysis of PA28 γ level in sera of 13 RA patients at three time points of serum withdrawal. PA28 γ level were compared with disease activity score 28 (DAS28) ($r = 0.319$, $P = *0.047$, left), erythrocyte sedimentation rate (ESR) ($r = 0.446$, $P = **0.005$, middle) and C-reactive protein (CRP) ($r = 0.006$, $P = 0.971$, right). **B)** Course of PA28 γ level in Abatacept treated patients with RA. Serum withdrawal was done at indicated time points and the results are represented as mean PA28 γ levels of duplicate wells. **C)** Graphical presentation of PA28 γ serum level, DAS28 (upper diagrams) and ESR (lower diagrams) of three abatacept treated patients. Black diamonds correspond to PA28 γ levels and white rectangles to DAS28 and ESR.

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 +/- 61.2 ng/ml which is markedly elevated compared with healthy controls (17.5 +/- 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: Methotrexate; 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-plgG: Peptide specific polyclonal rabbit IgG; RT: Room temperature; SCR-3: Steroid receptor co-activator 3; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide 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.
- Stadtmauer 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.
- Sjts EJAM, 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.
- Dahmann 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, Buttgeriet 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 sjögren 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, Jarriel-Encontre I, Piechaczky 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, Dundr 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 REGy 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: REGy 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 PA28 γ 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: REGy 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, Moser RE, Xiao J, O'Malley BW, Li X: REGy 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 28alpha 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, Klotzel 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 (PA28 γ) 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



Schmidt, C., Rödiger, S., Gruner, M., **Moncsek, A.**, Stohwasser, R., Hanack, K., Schierack, P. and Schröder, C. (2016) Multiplexed localization of sequential peptide epitopes by a planar microbead chip. *Analytica Chimica Acta* 908, 150-160.

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

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

Moncsek, A., Al-Suraih, M., Trussoni, C.E., O'Hara, S.P., Splinter, P.L., Zuber, C., Patsenker, E., Valli, P.V., Fingas, C.D., Weber, A., Zhu, Y., Tchkonia, T., Kirkland, J.L., Gores, G.J., Müllhaupt, B., LaRusso, N.F., and Mertens, J.C. (2017) Targeting senescent cholangiocytes and activated fibroblasts with Bcl-xL inhibitors ameliorates fibrosis in *Mdr2^{-/-}* mice. *Hepatology* (Epub ahead of print)

Bachofner, J.A., Valli, P.V., Kröger, A., Bergamin, I., Künzler, P., Baserga, A., Braun, D., Seifert, B., **Moncsek, A.**, Fehr, J., Semela, D., Magenta, L., Müllhaupt, B., Terzioli Beretta-Piccoli, B., and Mertens, J.C. (2016) Direct antiviral agent treatment of chronic hepatitis C results in rapid regression of transient elastography and fibrosis markers fibrosis-4 score and aspartate aminotransferase-platelet ratio index. *Liver International* 37(3): 369-376

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

Moncsek, A., Gruner, M., Meyer, H., Lehmann, A., Kloetzel, P.-M., and Stohwasser, R. (2015) Evidence for anti-apoptotic roles of proteasome activator 28 γ via inhibiting caspase activity. *Apoptosis* 20(9):1211-1228.

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

Poster und Präsentationen

Anja Moncsek, Patrick Splinter, Christy Trussoni, Steven O'Hara, Camille Zuber, Eleonora Patsenker, Piero Valli, Christian Fingas, Achim Weber, Beat Müllhaupt, Nicholas LaRusso, Joachim Mertens: *Targeting senescent cholangiocytes and activated fibroblasts with BH3 mimetic ameliorates fibrosis in Mdr2^{-/-} mice.* International Liver Congress (EASL), Amsterdam, Niederlande; 04/2017, Poster

Anja Moncsek, Achim Weber, Beat Müllhaupt, Christian Fingas, Joachim Mertens: *Survival of apoptosis-primed activated hepatic fibroblasts is Bcl-xL-dependent.* EASL Monothematic Conference: Liver fibrosis: the next goal of targeted therapy?, Porto, Portugal; 06/2016, Poster

Anja Moncsek, Achim Weber, Beat Müllhaupt, Christian Fingas, Joachim Mertens: *Survival of apoptosis-primed activated hepatic fibroblasts is Bcl-xL-dependent.* Jahrestkongress der Schweizerische Gesellschaft für Gastroenterologie, Interlaken, Schweiz; 05/2016, Vortrag

Anja Moncsek, Achim Weber, Beat Müllhaupt, Christian Fingas, Joachim Mertens: *Survival of apoptosis-primed activated hepatic fibroblasts is Bcl-xL-dependent.* International Liver Congress (EASL), Barcelona, Spain; 04/2016, Poster

Anja Moncsek, Achim Weber, Beat Müllhaupt, Joachim Mertens: *Targeting Activated Stromal Fibroblasts in Primary Sclerosing Cholangitis.* The AASLD Liver Meeting, San Francisco, USA; 11/2015, Poster

Anja Moncsek, Melanie Gruner, Ralf Stohwasser: *Anti-apoptotic functions of PA28γ due to regulation of p21 localisation in UV-treated fibroblasts.* Trinational Fall Meeting of the Biochemical Societies - Signal Transduction and Disease, Aachen, Deutschland; 09/2009, Poster

Anja Moncsek, Ralf Stohwasser: *Evidences for PA28γ as an anti-apoptotic regulator in UV-treated fibroblasts.* GBM Fall Meeting, Hamburg, Deutschland; 09/2007, Poster

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Brandenburgische Technische Universität Cottbus - Senftenberg (ehemals Hochschule Lausitz), Standort Senftenberg, Fakultät 2, Fachbereich Biochemie unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. habil. Ralf Stohwasser durchgeführt. Bei Prof. Stohwasser möchte ich mich für die Bereitstellung des Promotionsthemas, seine stetige Diskussionsbereitschaft, die vielen wertvollen Anregungen, teilweise notwendigen Aufmunterungen und sein hohes Maß an Einsatzbereitschaft in der finalen Phase der Publikation bedanken. Wir haben gemeinsam einen langen Weg bestritten, auf dem Prof. Stohwasser unermüdlich für das Erreichen des Ziels gekämpft hat.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. habil. Peter-Michael Kloetzel und dem Institut für Biochemie (Universitätsklinikum Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin) für die anregende akademische Betreuung und unterstützende Bereitstellung experimenteller Infrastruktur und methodischer Erfahrungen bedanken. Insbesondere danke ich Ulrike Kuckelkorn für die praktischen Tipps bei meiner ersten Proteasomreinigung und Andrea Lehmann für die Durchführung der Pulldownexperimente in der finalen Phase der Publikation.

Vielen Dank auch den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Biochemie (BTU Cottbus-Senftenberg) insbesondere Dipl.-Biol. Melanie Gruner für die vielen Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft u. a. bei der praktischen Durchführung von Experimenten sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Einen ganz besonderen Dank auch an Hannes Mayer, der vor allem in der finalen Phase zum Erfolg der Publikation beigetragen hat.

Außerdem möchte ich mich bei Carsten Schmidt (BTU Cottbus-Senftenberg) für die angenehme Zusammenarbeit und die umfangreichen Arbeiten zur Etablierung des Microbead-basierten Multiplex-Immunoassay zum Epitopmapping von Antikörpern und der daraus resultierenden Publikation bedanken.

Ein großes Dankeschön auch an die folgenden Arbeitsgruppen der BTU Senftenberg für die Bereitstellung von Laboren, Mikroskopen, real time PCR-Cycler und sonstiger Materialien: AG Molekulare Zellbiologie - Prof. Jan-Heiner Küpper, AG Zellbiologie - Prof. Ursula Anderer und AG Molekularbiologie - Prof. Dr. Christian Schröder.