

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin I

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor

**Entwicklung eines polyklonalen Antiserums gegen „DRA“, einem an
der NaCl-Resorption beteiligten Anionenaustauscher**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen**

**vorgelegt von
Elena Schönleber
aus Santa Cruz / Bolivien**

**TÜBINGEN
2004**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gregor

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungen.....	11
Einleitung	15
1 DRA, down-regulated in adenoma	17
1.1 Entdeckung.....	17
1.2 Epidemiologie der DRA-Genmutation	18
1.3 Down-regulated in adenoma (DRA) und kongenitale Chlorid-Diarrhoe (CLD) ..	18
1.3.1 DRA als apikaler Sulfat-, Oxalat- und Chlorid-Transporter	19
1.3.2 DRA als apikaler $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher.....	20
1.3.3 Strukturelle Homologie zwischen DRA und anderen Transportern	20
1.4 Lokalisation der DRA-Expression auf Organebene.....	21
1.5 Mögliche Regulationsmechanismen von DRA auf molekularer Ebene	22
1.6 Vermutete Struktur von DRA	22
1.7 Molekulare Mechanismen der NaCl-Resorption im Intestinum	23

2	Ziel dieser Arbeit.....	25
	Material und Methoden.....	27
3	Proteinexpression in E.coli	29
3.1	Herstellung der Medien für die Bakterienkultur	29
3.2	Kultivierung und Konservierung der E.coli-Stämme	30
3.3	Isolierung der Plasmid-DNA aus E.coli-Stämmen	31
3.3.1	Mini-Präparation zur Plasmid-DNA-Gewinnung	31
3.3.2	Midi-Präparation zur Plasmidgewinnung.....	33
3.3.3	Verdau der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	36
3.4	Gelelektrophorese zur Auftrennung der DNA-Fragmente.....	37
3.4.1	Gießen des Gels.....	39
3.4.2	Gel-Lauf und Dokumentation des Ergebnisses.....	40
3.5	Reinigung der DNA aus präparativen Agarose-Gelen: GeneClean II Kit.....	41
3.6	Ligation der DNA-Fragmente mit T ₄ -DNA-Ligase.....	43
3.7	Transformation von E.coli	44
3.7.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation	44
3.7.2	Eigentliche Transformation und Abschätzen des Klonierungserfolges	45
3.8	IPTG-induzierte Proteinsynthese in E.coli.....	46
3.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	47
3.10	„TOPO TA Cloning Reagents“ und „One Shot Reagents“	48
3.11	Weitere Expressionsvektoren.....	49
3.12	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot.....	49
3.12.1	Aufbau der Aparatur und Herstellung des SDS-PAGE-Gels.....	50
3.12.2	Vorbereitung der aufzutragenden Proteine	52
3.12.3	Färbemethode: Coomassie-Färbung.....	53
3.12.4	Western-Blots.....	54
3.12.5	Immundetektion der transferierten Proteine.....	55
3.12.6	Wiederholter Gebrauch von Western-Blot Membranen	58
3.13	Proteinbestimmungsmethode: Methode nach Lowry.....	59
3.14	DNA-Bestimmungsmethode.....	60
3.15	Zellkultur.....	62
3.15.1	Transfektion	62
3.15.2	Selektion.....	64
3.15.3	Trypsinisierung/ Passage.....	65
3.15.4	Subkultivierung und klonale Zelllinie.....	65
3.15.5	Zelllyse.....	66

3.15.6 Lagerung von Zellen im Stickstoffbehälter.....	68
3.16 Semiquantitative Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ..	69
3.16.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	71

Ergebnisse 75

4 Expression und Reinigung des zytoplasmatischen Endes von DRA als rekombinantes Protein in E.coli (prokaryote Expression).....	77
4.1 Expression von His-S-Tag-Fusionsprotein in E.coli BL21 DE3	78
4.2 Purifikation des HS-C-DRA mittels Nickel-Resin Reinigung.....	80
4.3 Immunisierung von zwei Kaninchen	85
4.4 Klonierung von C-DRA short in pET 16b	85
4.4.1 PCR-Amplifikation von C-DRA short für die Klonierung in pET16b	86
4.4.2 Klonierung von C-DRA-short (PCR-Produkt) in pCR 2.1 TOPO.....	87
4.4.3 Subklonierung von C-DRA-short in pET16b.....	90
4.5 Klonierung von HS-C-DRA in pcDNA3.1	92
5 Transfektion von DRA in HEK 293 Zellen (eukaryote Expression).....	97
5.1 Transfektion von HEK 293 Zellen mit HS-C-DRA, sowie mit DRA-wild type, DRA-myc-His und LacZ- myc-His.....	97
5.1.1 Etablierung G 418-resistenter Zelllinien	98
6 Testung des Antiserums auf Sensitivität und Spezifität.....	99
6.1 Allgemeines	99
6.1.1 Testung des Antiserums an rekombinant in Bakterien hergestelltem Protein (HS-C-DRA und H-C-DRA).....	99
6.1.2 Testung des Antiserums an Lysaten transfizierter Zellen	101
6.1.3 Testung des anti-DRA-Antiserums an full length DRA-transfizierten HEK 293 Zellen (HEK 293/DRA-wt und HEK 293/DRA-myc-His).....	104
6.2 Kontrolle für die Etablierung klonaler Zelllinien: HEK 293/LacZ-myc-His.....	105
6.3 Reinigung des anti-DRA-Antiserums	106
6.3.1 Pilotversuch.....	106
6.3.2 Reinigung an einer Affinitätsäule.....	108
6.4 Semiquantitative RT-PCR aller Transfektionsansätze.....	110

Diskussion und Zusammenfassung 115

7 Diskussion	117
7.1 Expression und Reinigung des DRA-Immunogens	118

7.1.1	Das pET-Expressionssystem	121
7.1.2	Reinigung von HS-C-DRA	123
7.1.3	Immunisierung der Kaninchen	124
7.1.4	Testung des ungereinigten Antiserums auf Spezifität und Sensitivität unter Verwendung des rekombinant exprimierten Immunogens	124
7.1.5	Transfektion von DRA in eine humane Zelllinie (HEK 293 Zellen)	124
7.1.6	Etablierung von klonalen Zelllinien	129
7.1.7	Entwicklung und Reinigung des polyklonalen anti-DRA-Antiserums ...	131
7.1.8	Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis und zur Quantifizierung der transfizierten DRA-Konstrukte	133
8	Zusammenfassung	135
	Literaturverzeichnis	137
	Danksagung	143
	Lebenslauf	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur des DRA-Proteins auf molekularer Ebene (Byeon et al., 1996).	23
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ionentransportmechanismen in Darmzellen (nach Roßmann, 1999).	24
Abbildung 3: Modell der Vektoren pET 16b (5711 bp) und pET 30c (5422 bp).	46
Abbildung 4: Modell des pcDNA 3.1+	49
Abbildung 5: Modell des „Sandwich“ im Western-Blot.	55
Abbildung 6: Immundetektion des Proteins von Interesse.	58
Abbildung 7: Das Konstrukt pET 30c/C-DRA short	78
Abbildung 8: Induktion von HS-C-DRA short in E.coli BL21 DE3: Jeweils Zustand vor und nach Induktion (Coomassie-gefärbtes Gel).	79
Abbildung 9: Modell der Bindung zwischen dem Nickel-Agarose-„bead“ und dem getaggtten zytoplasmatischen DRA.	80
Abbildung 10: Expression und Reinigung des rekombinanten Immunogens.	83
Abbildung 11: PCR-Modifikation der „Enden“ von C-DRA , um Klonierung in pET 16b zu ermöglichen.	86
Abbildung 12: Nachweis des Amplifikationserfolges mit der NdeI- (erste Reihe) und der XhoI-Schnittstelle (zweite Reihe).	87
Abbildung 13: Modell der Topoisomerasenfunktion an „sticky ends“ der pCR 2.1 TOPO Vektoren (Invitrogen).	88

Abbildung 14: Nachweis des Transformationserfolges von E.coli (one shot) Kolonie 1-6 mit pCR2.1/C-DRA (invertiertes Bild).	90
Abbildung 15: Nachweis des Transformationserfolges von pET16b/C-DRA in E.coli NM522.	92
Abbildung 16: Quantifizierungsgel des mit EcoRV und XhoI geschnittenen Vektor pcDNA3.1 (rechte Spur) und des „geblunteten“ und mit XhoI geschnittenen Inserts HS-C-DRA Inserts (mittlere Spur).....	94
Abbildung 17: Produkte der Mini-Präparationen von pcDNA3.1+/HS-C-DRA.	95
Abbildung 18: H-C-DRA und HS-C-DRA in Western-Blot und Coomassie-Blau-Färbung. Während die Sensitivität im Ersteren zu beobachten ist, läßt sich die Spezifität im Letzteren feststellen.	101
Abbildung 19: Kontrolle des Transfektionserfolges von HEK 293 Zellen mit HS-C-DRA mittels Western-Blot.	102
Abbildung 20: Klonale Zelllinie von HS-C-DRA.....	104
Abbildung 21: Nachweis von Lac-Z-myc-His mittels anti-mac-Antikörper an einer nicht-klonalen und mehreren klonalen Zelllinien von HEK/Lacz-MH (Passage 41+4).....	106
Abbildung 22: Affinitätsreinigung des Antiserums	108
Abbildung 23: PCR als Nachweis des Transfektionserfolges.....	110
Abbildung 24: Amplifikationskurve von HEK/HS-C-DRA cl.3 aus 4 µg Gesamt-RNA.	111
Abbildung 25: Amplifikationskurve von HEK/DRA-wt aus 4 µg Gesamt-RNA.....	111
Abbildung 26: Amplifikationskurve von HEK/DRA-MH aus 4 µg Gesamt-RNA.	112
Abbildung 27: Amplifikationskurve von Caco 2 aus 4 µg Gesamt-RNA.....	112
Abbildung 28: Amplifikationskurve von HEK 293 (negative Kontrolle) aus 4 µg Gesamt-RNA.	112
Abbildung 29: Relative Expressionsniveaus unterschiedlicher DRA-Konstrukte anhand einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse.	113
Abbildung 30: Zytoplasmatischer c-Terminus als Antigen determinante.....	120
Abbildung 31: Modell des T ₇ -Promotors und des IPTG-Expressionssystems (Novagen).	122
Abbildung 32: Schematische Darstellung eines durch Lipofectin induzierten Gentransfers.....	126
Abbildung 33: Phasen der Transfektion.	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Reaktion für einen Restriktionsverdau.....	37
Tabelle 2: Auflösung von Standard-Agarose-Gelen (Ausuebel et al., 1987).....	39
Tabelle 3: Auflösung von NuSieve GTG Agarose-Gelen (FCM BioProducts, 1997)...	39
Tabelle 4: Beispiel einer Ligationsreaktion.....	44
Tabelle 5: Zusammensetzung einer typischen PCR.....	47
Tabelle 6: Phasen einer Polymerasen Kettenreaktion.....	48
Tabelle 7: Aufbereitung von SDS-PAGE-Gel für 10 ml Gel-Volumen.....	51
Tabelle 8: Auswahl der Prozentzahl von Acrylamid/Bisacrylamid je nach Polypeptide- Größe.....	51
Tabelle 9: Komponenten einer Standard-PCR-Reaktion.....	72
Tabelle 10: Phasen des Standard-Programms des „Thermo-Cyclers“.....	73
Tabelle 11: Schematische Darstellung der Purifikation des zytoplasmatischen DRA mittels Nickel-Resin-Reinigung, der schrittweise entstandenen Fraktionen sowie der dafür verwendeten Puffer.....	84
Tabelle 12: Phasen der PCR-Amplifikation von C-DRA short für die Klonierung in pET 16b.....	87
Tabelle 13: Bindung von C-DRA an pET 16b und die dafür notwendige Zusammensetzung.....	91
Tabelle 14: Ligation von pcDNA3.1 mit HS-C-DRA.....	94
Tabelle 15: Nachweis der Antigen-Antikörper Reaktion bei Inkubation der verschiedenen DRA-Konstrukte sowie von LacZ-MH mit den jeweiligen	

Antikörpern. (+): nachweisbare Ag-Ak-Reaktion, (-): nicht nachweisbare Ag-Ak-Reaktion..... 130

Abkürzungen

A	Adenin
a.i.	nach der Induktion
a.p.	nach der Reinigung
AE	Anionenaustauscher
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
c-DRA	c-terminales DRA
cDNA	Komplementäre DNA
CF	Zystische Fibrose
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane regulator“
CLD	Kongenitale Chlorid-Diarrhoe
CMV	Cytomegalie Virus
cRNA	Komplementäre RNA

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleinsäuretriphosphat
DOPE	Dioleylphosphatidylethanolamin
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleilyoxy)propyl]-N,N,N-trimethyl-ammoniumchlorid
DRA	„down-regulated in adenoma“
DRA-wt	DRA-Wildtyp
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTD	Dystrophische Dysplasie
DTT	Dithiothreitol
DTDST	DTD Sulfattransporter
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylenediaminetetraacetatsäure
E3KARP	„NHE3 kinase A regulatory protein“
ETKF	Glutamat-Threonin-Lysin-Phenylalanin
FCS	Fetales Rinderserum
G	Guanin
GnHCl	Guanidiumhydrochlorid
H-c-DRA	Hexahistidin-c-DRA
HEK	Humane Embryonenniere
HS-c-DRA	Hexahistidinsulfat-c-DRA
IPTG	Isopropyl- β -D-Thio-Galaktopyranosid
Kac	Kaliumacetat
kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	„messenger“-RNA
NHE	Na ⁺ /H ⁺ Austauscher
NBCe	elektrogene Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ -Ko-Transporter
NBCn	elektroneutrale Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ -Ko-Transporter
NBC1	Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ -Ko-Transporter 1
NDCBE	elektroneutrale Na ⁺ -gesteuerte Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -Austauscher
NTA	Nitrilotriacetatsäure
ODI	Integrierte optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gel
pBS	pBS-Vektor
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pcDNA	pcDNA-Vektor
pCR	pCR-Vektor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	„PSD95, disk large, Z01“
PEG	Polyethylenglycol
pET	pET-Vektor
pfu-DNA	„Pyrococcus furiosus“-DNA
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelstrang-DNA
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetatsäure EDTA

Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
TCA	Trichloroacetatsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,'N,'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxyethyl-aminomethan
V317del	„deletion of a valine at codon 317“
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktopyranosid
V317del	„deletion of a valine at codon 317“
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktopyranosid

Einleitung

1 DRA, down-regulated in adenoma

1.1 Entdeckung

Im Jahre 1993 wurde die genetische Information für ein neues Protein mit der Benennung „**down-regulated in adenoma**“, kurz „**DRA**“, vorgestellt (Schweinfest et al., 1993). Die Expression dieses Membran-Proteins schien damals bei Kolonadenomen und Adenokarzinomen heruntergeregelt zu sein, weswegen dieses Protein, das hauptsächlich im Gastrointestinal-Trakt vorkommt, seinen Namen erhielt. Weitere Untersuchungen bestätigten die überwiegende Expression von DRA in hochdifferenzierten Kolonepithelzellen und eine im Gegensatz dazu sehr niedrige Expression undifferenzierten Zellen (Byeon et al., 1996, Antalis et al., 1998). Die genetische Information von DRA befindet sich auf Chromosom 7 im Gebiet 7q22-q31.1 (Taguchi et al., 1994). Dieses Chromosom wird mit der kolorektalen Tumorgenese assoziiert. Anhand dieser Daten wurde das DRA-Gen für einige Zeit als ein Tumor-Supressor postuliert (Byeon et al., 1996). Zur selben Zeit wurde in einigen finnischen Studien über die kongenitale Chlorid-Diarrhoe ein bestimmtes Gen auf Chromosom 7 als ursächlich für diese Krankheit identifiziert (Kere et al., 1993, Höglund et al., 1995, 1996a). Diese

kongenitale Chlorid-Diarrhoe, CLD, ist eine in Finnland endemische Erbkrankheit, die auf einen fehlenden Anionenaustausch im Darm zurückgeführt wird (Höglund et al., 1996b) . Nachfolgende Untersuchungen bestätigten, dass das Chlorid-Diarrhoe-
verursachende Gen und das DRA-Gen identisch sind (Höglund et al., 1996b, Moseley et al., 1999).

1.2 Epidemiologie der DRA-Genmutation

Die Länder mit der höchsten Anzahl an DRA-Genmutationen bzw. an kongenitaler Chlorid-Diarrhoe sind Finnland (Norio et al., 1971, 1973, Holmberg et al., 1977, 1986), Polen, Saudi-Arabien und Kuwait (Tomaszewski et al., 1987, Lubani et al., 1989). Dabei wurde die höchste Inzidenz für die kongenitale Chlorid-Diarrhoe mit 1:5000 Neugeborenen in den arabischen Ländern gefunden, in Kuwait lag die Rate sogar bei 1:3200 Neugeborenen (Badawi et al., 1998). Eine direkte Sequenzierung der Gene von finnischen und polnischen Patienten mit der kongenitalen Chlorid-Diarrhoe zeigten drei verschiedene Mutationen, die dem DRA- bzw. CLD-Gen zugeordnet werden konnten. Die häufigste Form der Mutation bei finnischen Patienten ist die V317del. Andere Mutationen sind C307W und Compoundmutationen (Höglund et al., 1998).

Außer in Europa und im arabischen Raum tritt die kongenitale Chlorid-Diarrhoe sporadisch auch in den USA, in Kanada, Argentinien und in vielen Ländern Asiens und in Australien auf (Etani et al, 1998).

1.3 Down-regulated in adenoma (DRA) und kongenitale Chlorid-Diarrhoe (CLD)

Die kongenitale Chlorid-Diarrhoe ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die auf einem massiven Verlust von Chlorid im Stuhl beruht. Dieser Chlorid-Verlust wird durch eine verminderte Netto-Chlorid-Absorption und Alkali-Sekretion im proximalen Dick- und distalen Dünndarm verursacht. Die Klinik der kongenitalen Chlorid-Diarrhoe

sieht folgendermaßen aus: Polyhydramnion, Frühgeburt, distendiertes Abdomen der Neugeborenen. Auf metabolischer Ebene treten Hypochlorämie, Hyponatriämie gefolgt von Hypokaliämie, Hyperbilirubinämie und metabolischer Alkalose auf. Die Serumnatriumwerte normalisieren sich nach der neonatalen Periode. Zusätzlich findet sich eine hohe Chloridkonzentration im Stuhlgang, sowie eine niedrige Bikarbonatkonzentration und ein niedriger pH-Wert. Der Harn ist in der Regel chloridfrei. Die meisten unbehandelten Patienten sterben innerhalb der ersten Lebensmonate. Jedoch können Kinder, die rechtzeitig mit Elektrolyt- und Wassersubstitution behandelt werden, eine fast normale Lebensqualität erreichen (Holmberg, 1986).

1.3.1 DRA als apikaler Sulfat-, Oxalat- und Chlorid-Transporter

Das aus 764 Aminosäuren bestehende DRA-Genprodukt wurde als ein an Enterozyten apikal-lokalisiertes, transmembranäres Glykoprotein nachgewiesen, welches Sulfat, Oxalat und Chlorid transportiert (Silberg et al., 1995, Byeon et al., 1996, 1998) und das einen Einfluß auf den parallel angeordneten Na^+/H^+ -Austausch ausübt. In verschiedenen Arbeiten wurde DRA in *Xenopus* Oozyten und Sf9-Insektenzellen exprimiert (Silberg et al., 1995, Byeon et al., 1998). Dies hatte zur Folge, dass das DRA in den Oozyten und in den Sf9-Zellen die oben genannten Ionen transportierte. Im Gegensatz dazu waren diese Transporteigenschaften bei Mutationen des DRA-Gens von Patienten mit angeborener Chlorid-Diarrhoe nicht vorhanden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigten, dass DRA ein Chlorid-, Oxalat- und eventuell Sulfat-Transporter ist und dass Mutationen im DRA-Gen die kongenitale Chlorid-Diarrhoe hervorrufen. Weitere Untersuchungen belegten, dass der durch Anionenaustausch vermittelte Chlorid-Transport in Vesikeln am Ileum nicht durch Sulfat inhibiert wird, was als Hinweis dafür gewertet wurde, dass dieser Anionenaustauscher kein Sulfat transportiert. Es wurden ebenfalls Sulfat/Oxalat-Austauscher in denselben Vesikeln (Knickelbein und Dobbins, 1990) beschrieben, die keine Präferenz von Bikarbonat über Oxalat zeigen und die nicht durch Chlorid inhibiert werden (Schron et al., 1985a, 1985b). Dies legt nahe, dass es im

distalen Ileum einen weiteren apikal-lokalisierten Sulfat-transportierenden Anionenaustauscher gibt.

1.3.2 DRA als apikaler $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher

Durch die Identifizierung von DRA als das Gen, welches für die kongenitale Chlorid-Diarrhoe verantwortlich ist, wurde das DRA-Genprodukt als der apikale $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher am Darm postuliert. Die Rolle von DRA im $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch wurde in vitro in stabil transfizierten HEK 293 Zellen mit Maus-DRA bestätigt (Melvin et al., 1999). Bei dieser Untersuchung führte ein umgekehrter Cl^- -Gradient in einer Lösung mit HCO_3^- zu einer schnellen intrazellulären Alkalinisierung. Dies bewies die Anwesenheit von $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschern in den HEK 293 Zellen. Der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transport war Na^+ -unabhängig und gegenüber den Veränderungen des Membranpotentials nicht sensibel.

DRA hat sich in verschiedenen anderen Zelllinien außer HEK 293 Zellen nicht heterolog exprimieren lassen (HeLa, CaSki, DLD-1, SW480, SW837, HT-29, HCT-15 und MCF-7). Ursächlich hierfür ist offenbar ein wachstumshemmender Effekt des DRA-Genproduktes, der sich durch das in HEK 293 Zellen exprimierte virale Protein E1A antagonisieren läßt (Chapman 2002).

1.3.3 Strukturelle Homologie zwischen DRA und anderen Transportern

Es besteht eine kurzstreckige hohe Homologie zwischen dem DRA-Gen und dem DTDST-Gen („diastrophic dysplasia sulfate transporter“), das einen Sulfat-Transport vermittelt. Dementsprechend ist auch die Expression beider Gene sehr ähnlich. Experimente an Oozytensystemen von Fröschen bewiesen diese Homologie. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass die DTDST-Expression im Kolon zum Teil mit der Expression von DRA ko-lokalisiert war (Silberg et al., 1995). Trotzdem erweisen sich die Expressionsdefekte von DRA, z.B. im Falle von Patienten mit kongenitaler Chlorid-Diarrhoe durch die Expression von DTDST als nicht

kompensierbar. DRA hat sich als ein Mitglied einer wachsenden Genfamilie (SLC26) erwiesen (Lohi et al., 2002, 2003).

DRA hat keine Homologie zur Genfamilie der „klassischen“ Anionenaustauscher (SLC4), zu denen auch der Anionenaustauscher (Band-3) der Erythrozyten gehört, der den sogenannten Hamburger-Shift im Rahmen des CO₂-Transportes aus den peripheren Geweben zur Lunge vermittelt. Dies ist insofern von historischem Interesse, da verschiedene Arbeitsgruppe über Jahre hinweg versucht haben durch Homologie-Klonierung den bis zur Entdeckung von DRA unbekanntem apikalen intestinalen Anionenaustauscher zu klonieren.

1.4 Lokalisation der DRA-Expression auf Organebene

DRA wurde in vivo in intestinalen Epithelzellen von Mäusen, Kaninchen und Menschen untersucht. Das DRA-Protein befindet sich auf zellulärer Ebene auf der apikalen Seite des Duodenum-, Ileum- sowie des Kolonepithels (Silberg et al., 1995, Jacob et al., 2002). Die Expression läßt sich teilweise auch auf der basolateralen Seite des Kolonepithels nachweisen (Silberg et al., 1995). Am Duodenum und Kolon, den Darmabschnitten mit der stärksten DRA-Expression, gab es bis jetzt keine detaillierten funktionellen Untersuchungen. Weitere Orte der Expression von DRA, jedoch in sehr viel geringerem Maße als im Gastrointestinaltrakt, sind in Mäusen die Niere und die Prostata (Silberg et al., 1995, Haila et al., 2000).

DRA wird auch in humanen Hodenvesikeln und ekkrinen Schweißdrüsen exprimiert (Haila et al., 2000). Diese Organe zeigen jedoch keine Funktionsstörung bei Patienten mit kongenitaler Chlorid-Diarrhoe. Bei ischämischer Kolitis und im entzündeten Darmepithel ist die Expression von DRA ähnlich wie bei normalem intestinalem Gewebe jedoch tiefer in den Krypten und reduziert.

Immunhistochemische und physiologische Untersuchungen von intaduktalen Pankreaszellen bei CF-Mäusen wiesen eine hohe DRA-Expression auf der apikalen Seite der genannten Zellen nach. Nur bei einem kleinen Anteil der Zellen war die Expression im Gegenteil reduziert (Greeley et al., 2001).

1.5 Mögliche Regulationsmechanismen von DRA auf molekularer Ebene

Die intestinale elektroneutrale Resorption von NaCl erfolgt mittels Na⁺/H⁺- und Cl⁻/HCO₃⁻-Austausch auf der apikalen Seite der Enterozyten (Knickerbein et al., 1983, 1988). Die dafür zuständigen Transporter sind NHE3 (Na/H exchanger, Isoform 3) und das DRA-Genprodukt oder ein weiterer vom DRA-Genprodukt beeinflusster Transporter. Es wurde postuliert, dass durch die Bindung von DRA und NHE3 an der zweiten PDZ-Domäne von E3KARP eine molekulare Interaktion zur Regulation der NaCl-Resorption erfolgt (Lamprecht et al., 2002).

1.6 Vermutete Struktur von DRA

Das DRA-Gen exprimiert auf zellulärer Ebene ein Transmembranprotein, das aus 764 Aminosäuren besteht. Diese sind teilweise N-glykosiliert und besitzen insgesamt eine Größe von 84,5 kDa (Schweinfest et al., 1993, Byeon et al., 1996). Das C-terminale Ende von DRA stellt eine wichtige Bindungsstelle bei der Interaktion zwischen DRA und anderen Proteinen wie E3KARP und NHERF dar (Lamprecht et al., 2002). Die letzten vier Aminosäuren am genannten Ende sind ETKF (Glutamat-Threonin-Lysin-Phenylalanin) und stellen ein PDZ-Interaktionsmotiv dar. Die vermutete Struktur des DRA-Genproduktes auf molekularer Ebene ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

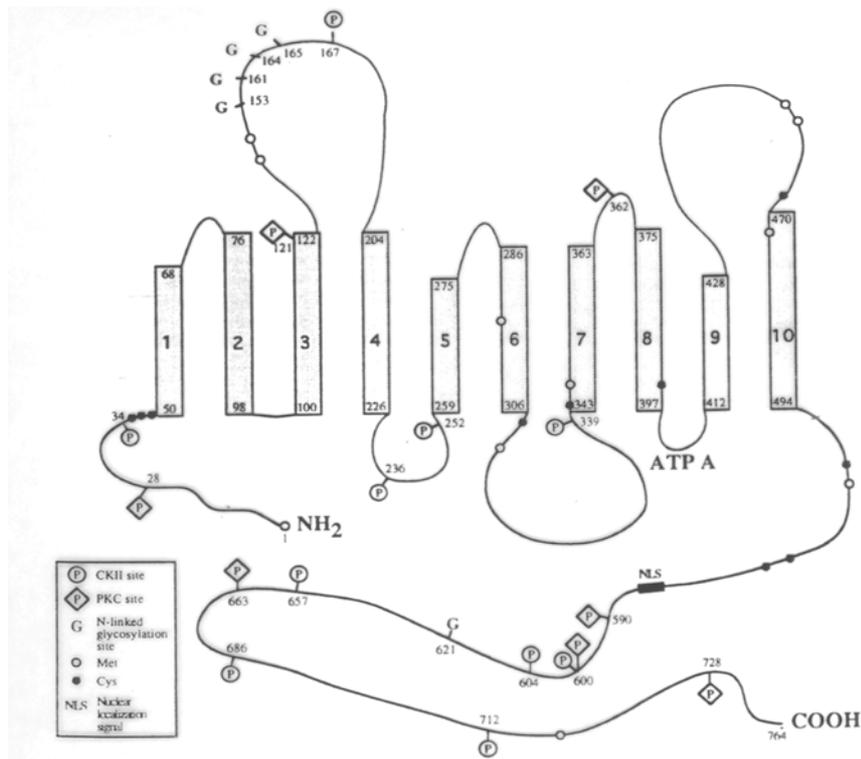


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur des DRA-Proteins auf molekularer Ebene (Byeon et al., 1996).

1.7 Molekulare Mechanismen der NaCl-Resorption im Intestinum

Die elektroneutrale Resorption von Natriumchlorid, NaCl, erfolgt in den apikalen Membranen des Dün- und des Dickdarmes über zwei Transportvorgänge:

Na^+/H^+ -Austausch (Natrium-Proton-Exchanger Isoform 3, NHE3)

$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch

Im menschlichen Ileum und Kolon erfolgt die NaCl-Resorption über einen parallel angeordneten Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch an der apikalen Seite des Darmepithels (Turnberg, 1970, Knickelbein et al., 1983, 1985, 1988, Melvin et al., 1999). Daneben wird Na^+ durch mehrere andere apikal-lokalisierte Mechanismen absorbiert, wobei in

allen Fällen die Na^+/K^+ -ATPase an der basolateralen Epithelmembran die primär treibende Kraft ist. Sie hält die Na^+ -Konzentration in der Zelle niedrig.

In Abbildung 2 sind die bekannten Ionen-transportierenden Systeme (Austauscher, Ko-Transporter und Kanäle) in den Enterozyten schematisch dargestellt. Verschiedene Versuche zeigten, dass ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - bzw. ein Cl^-/OH^- -Austausch sowohl apikal als auch basal zu finden ist. Es wird vermutet, dass sie eine Rolle im Zellvolumen und/oder im intrazellulären pH-Haushalt spielen (Lamprecht et al., 1993, Rajendran und Binder, 1993, 1999).

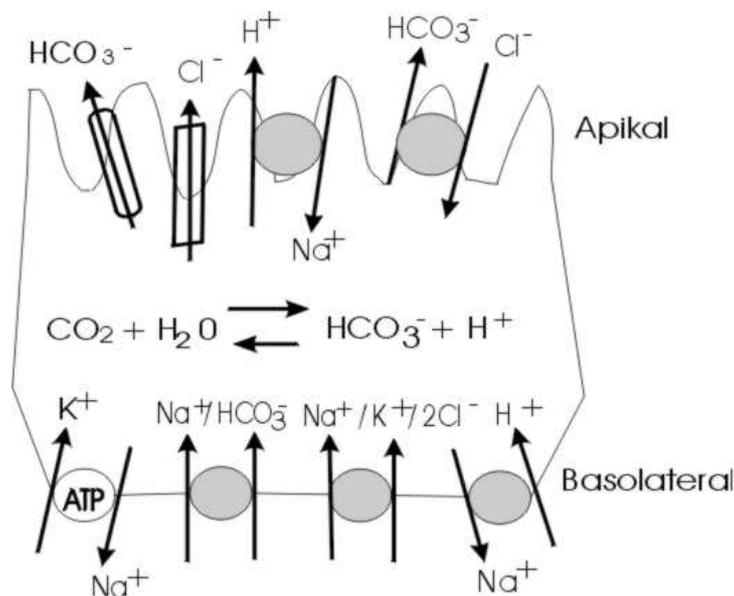


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ionen-transportmechanismen in Darmzellen (nach Roßmann, 1999).

2 Ziel dieser Arbeit

Die Identifikation von DRA als einem an der NaCl-Resorption beteiligten Anionenaustauscher (Melvin et al., 1999), und die Untermauerung der parallelen Anordnung zwischen Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch (Knickelbein et al., 1983, 1985, 1988) waren wichtige Schritte im Verständnis der NaCl-Resorption im menschlichen Gastrointestinal-Trakt. Ebenso wichtig war die Aufklärung der Rolle von DRA in der Pathogenese der kongenitalen Chlorid-Diarrhoe (Kere et al., 1993, 1999, Höglund et al., 1996a, 1996b). Der Zusammenhang zwischen Mutationen im DRA-Gen und der folglich auftretenden Diarrhoe wurde beschrieben (Höglund et al., 1996a, 1996b, 2001, Etani et al., 1998, Moseley et al., 1999). Untersuchungen bestätigten, dass das Chlorid-Diarrhoe verursachende Gen und das DRA-Gen identisch sind (Höglund et al., 1996b, Moseley et al., 1999).

Die physiologisch-biochemische Charakterisierung von DRA stellt einen unabdingbaren Schritt im Verständnis der Rolle dieses Proteins im menschlichen Organismus dar. vergangene Experimente trugen mit relevanten Informationen zum Verständnis dieses Proteins bei (Schweinfest et al., 1993, Silberg et al., 1995, Byeon et al., 1996, 1998, Melvin et al., 1999, Jacob et al., 2002, Lamprecht et al., 2002). Jedoch sind zahlreiche Fragen wie z.B. die möglichen Regulationsmechanismen der Expression, die Interaktion

mit anderen Proteinen auf zellulärer Ebene, die Lokalisation auf subzellulärer Ebene und mögliche Speziesunterschiede noch offen.

Für die weitere Charakterisierung von DRA ist daher die Entwicklung von „molekularen Werkzeugen“ notwendig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein polyklonales Antiserum gegen DRA zu entwickeln, mit dem DRA in einem heterologen Expressionssystem und auch in physiologischen Systemen (endogen DRA-exprimierende Zelllinien, Biopsien, Resektaten) detektiert und möglichst auch isoliert werden kann. Insofern stellen ein Antiserum und eine heterolog DRA exprimierende Zelllinie molekulare Werkzeuge zur Charakterisierung von DRA dar.

Die für dieses Ziel durchzuführende Vorgänge werden zusammengefasst in:

- A:** Entwicklung eines Antikörpers, der das DRA-Genprodukt spezifisch als Antigen erkennt.
- B:** Transfektion/Expression einer humanen Zelllinie mit DRA.
- C:** Nachweis der DRA-Expression mit dem dafür zu entwickelnden Antikörper.

Das für diese Zielsetzung geordnete Arbeitsprotokoll ist im einzelnen:

1. Der erste Schritt besteht aus der rekombinanten Expression von DRA in E.coli.
2. Dafür muß in großen Mengen (mindestens 1 mg) Antigen hergestellt werden.
3. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgt mittels gereinigter Antigen.
4. Etablierung einer klonalen humanen Zelllinie mit DRA. Hierfür eignet sich die Transfektion von DRA in HEK 293-Zellen.
5. Der Erfolg dieser Transfektion bzw. eukaryotischen Proteinexpression wird in Western-Blots überprüft. Für die Antigen-Antikörper-Reaktion in Western-Blots wird das anti-DRA-Antiserum (aus Kaninchen) benötigt.

Material und Methoden

3 Proteinexpression in E.coli

3.1 Herstellung der Medien für die Bakterienkultur

Die Medien und Medienzusätze für das Arbeiten mit Bakterien wurden direkt nach ihrer Herstellung autoklaviert bzw. sterilfiltriert (Sambrook et al., 1989). Die Lagerung erfolgte bei 4° C.

Materialien:

LB-Flüssigkeitsmedium: 10 g/l Tryptone (Difco Biotec), 5 g/l Yeast extract (Difco Biotec), 5 g/l NaCl, pH 7,0.

LB-Platte: 10 g/l Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0. Ist der genannte pH-Wert eingestellt, werden 15 g/l Bacto agar für ca. 40 Platten (Difco Biotec) hinzugefügt.

SOC-Medium: 2% Tryptone, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose.

Methode:

Herstellung des Kulturmediums (1 Liter):

Alle oben genannten Komponenten für das LB-Flüssigkeitsmedium wurden zusammen in 0,75 l ddH₂O gelöst und dann die Lösung mit 5M NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

Bei LB-Platten wurde Agar-Agar hinzugefügt.

Die Lösung wurde mit ddH₂O auf 1 Liter aufgefüllt und die Flüssigmedien in Glasflaschen gegossen und für 30 min autoklaviert.

Bei LB-Platten: Das Medium wurde mit Agar-Agar autoklaviert.

Bei Bedarf wurden Antibiotika dazu geben: 100 µg Ampicillin/ml Medium oder 25 µg Kanamycin/ml Medium.

Die sterilen Platten wurden mit dem LB-Medium erst gegossen, nachdem es sich auf ca. 30-50° C abgekühlt hatte. Beim Gießen durften sich keine Luftblasen im Medium bilden.

Herstellung der Ampicillin-Stammlösung (Serva Heidelberg):

Die Lösung von 100 mg Ampicillin/ml ddH₂O wurde sterilfiltriert und bei -20° C gelagert. Die Zugabe der Ampicillin-Stammlösung in das LB-Medium erfolgte im Verhältnis 1:1000.

Herstellung der Kanamycin-Stammlösung (Serva Heidelberg):

Die Lösung von 25 mg Kanamycin/ml ddH₂O wurde sterilfiltriert und bei -20° C gelagert. Die Zugabe der Kanamycin-Stammlösung in das LB-Medium erfolgte im Verhältnis 1:1000.

3.2 Kultivierung und Konservierung der E.coli-Stämme

Materialien:

Organismen: E.coli NM522, E.coli BL21 DE3, E.coli XL1-Blue.

Kulturmedium: LB-Flüssigkeitsmedium (siehe Abschnitt 3.1).

Methode:

Die Kultur der E.coli-Stämme erfolgte bei 37° C in LB-Medium. Die verschiedenen Stämme trugen Antibiotika-Resistenzstellen. Durch Zusatz von Antibiotika in den LB-Medien erfolgte eine positive Selektion der gewünschten Stämme. Zur dauerhaften Konservierung der Bakterienstämme wurde 600 µl einer stationären Übernachtskultur mit 200µl 40% Glycerin versetzt und bei -80° C aufbewahrt.

3.3 Isolierung der Plasmid-DNA aus E.coli-Stämmen

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels Lyse unter Verwendung der Puffer aus dem Plasmid Midi Kit (Qiagen).

3.3.1 Mini-Präparation zur Plasmid-DNA-Gewinnung

Materialien:

Organismen: E.coli-Stämme (siehe Abschnitt 3.2).

LB-Flüssigkeitsmedium, 250 µl Phenol-Lösung, 250 µl Chloroform, 750 µl kaltes 100% Ethanol, 300 µl kaltes 70% Ethanol.

Plasmid Mini Kit (Qiagen)

100 µl Quiagen Puffer P1 (TE-Puffer mit RNase A): 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0.

100 µl Quiagen Puffer P2 (NaOH/SDS-Lösung): 200 mM NaOH, 1% SDS.

100 µl Quiagen Puffer P3 (Kaliumacetat/Essigsäure-Lösung): 3 M Kac, pH 5,5. Der Puffer wurde bei 4° C gelagert.

Methode:

Die Mini-Präparation (alkalische Lysis) ermöglichte die Isolierung von reiner Plasmid-DNA aus den E.coli-Kulturen. Da Phenol eine starke chemische Reizung der Haut

und der Schleimhäute hervorruft, wurden Laborbrillen zum Schutz der Augen getragen, die Arbeiten erfolgte unter dem Abzug.

Die Bakterienkolonien wurden jeweils in 2 ml LB-Medium inokuliert und als Antibiotika Ampicillin 100 µg/ml bzw. Kanamycin 25 µg/ml hinzugefügt. Dann wurden die Bakterien über Nacht und unter Schütteln, 250 rpm, bei 37° C kultiviert.

Das Medium wurde in ein Eppendorf-Reagenzgefäß überführt, für 30 sec zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Bakterien entweder bei -20° C eingefroren oder weiterverarbeitet werden.

Es wurden 100 µl Quiagen Puffer P1 hinzugefügt und bei Raumtemperatur gevortext. Das bakterielle Pellet mußte vollständig resuspendiert werden.

100 µl Quiagen Puffer P2 wurden hinzugefügt, ebenfalls bei Raumtemperatur leicht geschüttelt und anschließend für 5 min inkubiert.

100 µl Quiagen Puffer P3 wurden hinzugefügt und anschließend leicht geschüttelt und bei 4° C für 5 min inkubiert.

Das Lysat wurde bei 4° C mit voller Geschwindigkeit für 3-5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Dabei durfte der Überstand nicht mit dem Pellet kontaminiert werden. Der Überstand bzw. das Lysat hatten ein Volumen von je 250 bis 300 µl.

250 µl Phenol und 250 µl Chloroform wurden dem Lysat hinzugefügt, das Lysat für 30 sec geschüttelt und dann bei 4° C mit voller Geschwindigkeit für 2-3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Das Volumen des Überstands betrug 200 bis 250 µl. Die untere Phenol-Chloroform-Phase durfte dabei nicht mit überführt werden.

Es wurde das dreifache Volumen kalten 100% Ethanol zum Lysat hinzugegeben. Dann wurde das Lysat geschüttelt und bei -70° C für 20 min gelagert. Zu diesem Zeitpunkt konnte das Lysat alternativ auch über Nacht bei -70° C gelagert werden.

Das Ethanol-Lysat-Präzipitat wurde bei 4° C mit voller Geschwindigkeit für 20 min zentrifugiert und der Überstand entfernt.

300 µl sehr kaltes 70% Ethanol wurde dem Lysat zugegeben und leicht geschüttelt. Das Ethanol-Plasmid-DNA-Gemisch wurde bei 4° C mit voller Geschwindigkeit für 1-2 min zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt.

Das Pellet wurde unter Vakuum für 5-10 min getrocknet und erwarb während des Trocknens eine transparente bis weiße Farbe. Das Pellet wurde schließlich in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

Die DNA wurde bei -20° C gelagert. Die DNA konnte im weiteren verdaut werden.

Zur Kontrolle, ob die gewonnene Plasmid-DNA das gewünschte „Insert“ enthielt, wurden je 10 µl der Präparation mit geeigneten Restriktionsenzymen z.B. NdeI-, XhoI-Restriktionsendonukleasen geschnitten und in einem Agarose/TAE-Gel getrennt.

3.3.2 Midi-Präparation zur Plasmidgewinnung

Materialien:

Organismen: E.coli-Stämme (siehe Abschnitt 3.2).

LB-Flüssigkeitsmedium, 3,4 ml Isopropanol, 500 µl kaltes 100% Ethanol, 500 µl kaltes 70% Ethanol.

Bestandteile des „Quiagen Plasmid Midi Kits“:

P1-Puffer, Resuspendierungspuffer, pH 8,0: 100 µg/ml Rnase A, 50 mM Tris/ HCl, 10 mM EDTA. Der Puffer wurde nach Zugabe von RNase A bei 4° C gelagert.

P2-Puffer, Lyse-Puffer: 200 mM NaOH, 1% SDS.

P3-Puffer, Neutralisierungspuffer, pH 5,5: 3,0 M Kaliumacetat. Der Puffer wurde bei 4° C gelagert.

Puffer QBT, Äquilibrierungspuffer, pH 7,0: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, 0,15% Triton X-100.

Puffer QC, Waschpuffer, pH 7,0: 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol.

Puffer QF, Elutionspuffer, pH 8,5: 1,25 M NaCl, 50 mM Tris/ HCl, 15% Ethanol.

Quiagen Säule 100, DNA-Bindungskapazität von 100 µg. Die genaue Zusammensetzung der Säule wird vom Hersteller nicht angegeben: Die Säule enthält Silica-Gel, dessen 100 µm Partikel an ihrer Oberfläche modifiziert sind. Die Bindung der DNA erfolgt über Anionen-Austausch-Gruppen an der Oberfläche des Materials. Bei einem pH von 8,5 und einer NaCl-Konzentration von mindestens 1,25 M wird ausschließlich Plasmid-DNA eluiert, Proteine, RNA, Nukleotide und Oligonukleotide bleiben an das Säulenmaterial gebunden.

Methode:

Diese Präparation diente dazu, über 100 µg saubere Plasmid-DNA zu gewinnen. Als Ausgangsmaterial diente eine Übernachtskultur (50-100 ml LB-Medium) des gewünschten E.coli-Stammes.

Die E.coli wurden am nächsten Tag bei 4° C mit 4000 rpm für 10 min zentrifugiert und die LB-Medien entfernt.

Alkalische Lyse:

P1: Das Bakterien-Pellet wurde in 4 ml P1-Puffer resuspendiert.

P2: Dieser Puffer enthielt NaOH. Es wurde dasselbe Volumen wie bei dem P1-Puffer hinzugegeben.

Die Suspension wurde sehr vorsichtig durch Wenden des Gefäßes gemischt.

Die letzten zwei Arbeitsschritten dienten dazu, Bakterien-Plasmiden zu lysieren und Plasmid-DNA zu gewinnen. Durch das vorsichtige Wenden des Gefäßes wurde die Freisetzung der genomischen DNA vermieden.

Die Bakterien wurden genau 5 min bei Raumtemperatur lysiert.

Neutralisation:

P3: Durch Zugabe von 4 ml des kalten Puffers P3 erfolgte die Neutralisation.

Die Suspension wurde wieder sehr vorsichtig durch Wenden des Gefäßes gemischt.

Dann wurde sie für 20 min in Eis inkubiert. Diese Phase ist nicht mehr kritisch, aufgrund der Neutralisation fand keine Lyse mehr statt. Die Suspension wurde bei 4° C mit voller Geschwindigkeit (15400 rpm) für 30 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt jetzt die freigesetzte Plasmid-DNA.

Säulenreinigung der Plasmid-DNA:

Die Quiagen-Säule 100 wurde mit 4 ml Puffer QBT äquibriert. Erst nachdem die Säule wieder leer war, wurde die Suspension mit Plasmid-DNA aufgetragen. Es durfte kein Pellet mit aufgetragen werden, da das Pellet die Filtration des Überstandes blockierte.

Im Filter war jetzt die Plasmid-DNA aufgefangen. Nachdem der Filter keine freie Flüssigkeit mehr enthielt, wurden 10 ml QC-Puffer hinzugefügt.

Der Filtervorgang wurde mit 10 ml QC-Puffer wiederholt, und die Plasmid-DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert.

Isopropanol-Fällung:

3,5 ml Isopropanol wurden zum Eluat hinzugefügt, das Eluat bei 4° C mit 15000 rpm für 30 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das kleine Pellet enthielt die Plasmid-DNA.

Das Pellet wurde in 500 µl kaltem 100%-Ethanol vorsichtig abgeklopft, das Gemisch aus Pellet und Ethanol wurde zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Das Pellet wurde mit 500 µl kaltem 70%-Ethanol gewaschen, das Röhrchen vorsichtig abgeklopft, das Gemisch zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dann wurde das Pellet für 10 min unter Vakuum getrocknet. Dieses Pellet, z.B. pCR 2.1/C-DRA - Plasmid-DNA, wurde in 50 µl ddH₂O aufgenommen und anschließend bei -20° C gelagert.

3.3.2.1 Sterilisierung des Midi-Präparationsproduktes

Die Sterilisierung des Midi-Präparationsproduktes für die Transfektion der eukaryoten Zellen erfolgte nach dem Prinzip der Ethanol-Präzipitation. Im Unterschied hierzu erfolgte der Vorgang aber unter Zellkultur-Bedingungen. Die Proben wurden unter dem „Laminar Flow“ in der Luft getrocknet. Dabei führt das Verdampfen des Ethanols zu Desinfektion bzw. Sterilisation.

Materialien:

DNA, 3 M Natrium-Acetat, 100% Ethanol, 70% Ethanol, ddH₂O

Methode:

- 1.Tag: Die DNA-Präparationsmenge wurde mit folgender Formel festgelegt: „OD₂₆₀ von 1 entspricht 50 µg/ml“. Dann wurde die DNA in einem sterilen Eppendorf-Gefäß mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und 10 µl 3 M Natrium-Acetat sowie 280 µl 100% Ethanol hinzugefügt. Die Komponenten wurden vorsichtig durchmischt und über Nacht bei -70° bis -80° C inkubiert.
- 2.Tag: Am Morgen wurde die Probe bei Raumtemperatur mit 10000 rpm für 25 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend kurz mit 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett entfernt und dann am späten Nachmittag die Tube mit offenem Deckel unter dem „Laminar Flow“ in der Luft getrocknet.
- 3.Tag: Die DNA wurde erneut bis zur Endkonzentration von 1 µg/µl resuspendiert und dann bei -20° C gelagert.

3.3.3 Verdau der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II schneiden doppelsträngige DNA spezifisch an palindromischen Sequenzen, die für das jeweilige Restriktionsenzym charakteristisch sind. Je nach Enzym variieren die Pufferzusammensetzung und Temperatur, bei der die Reaktion optimal, bezüglich Spezifität und Geschwindigkeit, abläuft. Sie erzeugen dabei entweder 3'- oder 5'-überhängende Enden einzelsträngiger DNA, „sticky ends“, oder glatte Enden, „blunt ends“.

Klonierungsvektoren: Ein Vektor ist ein Träger-DNA-Molekül, das für den Transport und die Replikation der zu klonierenden DNA sorgt.

Eigenschaften von Klonierungsvektoren: Der Vektor nimmt Passagier-DNA, sogenanntes „Insert“, auf. Er repliziert als eigenständiges Replikon vielfach in der Zelle.

Materialien:

Verwendete Plasmidvektoren: pET 16b, pET 30c, pCR 2.1, pcDNA und pBS.

Restriktionsenzym, Reaktionspuffer, ddH₂O.

Methode:

Für den Restriktionsverdau wurde die in Tabelle 1 angegebene Reaktion angesetzt. Die Reaktion erfolgte für 2 h bei 37° C. Anschließend wurden die DNA-Fragmente auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und ggf. aus diesem Gel gereinigt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Reaktion für einen Restriktionsverdau.

DNA aus Mini oder Midi-Präparation	10 µl
Restriktionsenzym 1	1 µl
Restriktionsenzym 2	1 µl
Für beide Enzyme geeigneter Puffer	2 µl
ddH ₂ O	6 µl

3.4 Gelelektrophorese zur Auftrennung der DNA-Fragmente

DNA läßt sich durch Elektrophorese trennen. Bei diesem analytischen Verfahren werden die Moleküle unter Ausnützung eines äußeren elektrischen Feldes getrennt, in dem sie aufgrund ihrer Netto-Ladung wandern. Sehr leistungsfähige Elektrophorese-Verfahren benutzen als Träger Agarose- und Polyacrylamid-Gele, PAGE. Standard-Agarose-Gele zwischen 0,5% und 1,8% trennen DNA-Fragmente zwischen 0,3 und 30 kb. Als Laufpuffer kann sowohl 1× TBE wie 1× TAE verwendet werden, wobei TAE-Puffer für präparative Gele geeignet ist, während mit TBE-Puffer schärfere Banden und hochauflösende Gele erzielt werden. Präparative Gele sind Gele, bei denen die Vektoren und/oder Inserts aus dem Gel ausgeschnitten und weiterverarbeitet werden.

Materialien:

Verwendete Agarosen: DNA Typing Grade Agarose (Gibco), Small DNA Agarose (Biozym), 10 mg/ml Ethidiumbromid-Stammlösung (Sigma).

50× TAE-Puffer: 242 g Tris-Base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0.

Alle Komponente wurden mit ddH₂O auf 1 Liter aufgefüllt.

Zur Verwendung wurde der Puffer 1:50 mit ddH₂O verdünnt.

10× TBE-Puffer: 108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 4 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0.

1× Gelladepuffer: 0,4% (w/v) Bromphenolblau (Sigma), 0,4% (w/v) Xylen-Cyanol FF (Sigma), 20% Ficoll 400 (Pharmacia Biotech).

DNA Molecular Weight Marker VI, VII, 250 ng/μl (Boehringer Mannheim).

Marker für TAE- oder TBE-Gele: 1 μl Marker, 2,5 μl Ladepuffer, 20 μl ddH₂O.

Methode:

In den Tabellen 2 und 3 sind die Mengenangaben zur Auflösung der Standard-Agarose-Gele (Ausubel et al., 1987) und NuSieve GTG Agarose-Gele (FCM BioProducts, 1997) in Abhängigkeit der DNA-Größe aufgelistet. Je nach erwünschter Auflösung des Gels für ein lineares Fragment wird die entsprechende Konzentration der Standard-Agarose bzw. der NuSieve GTG Agarose gewählt. Als Molekulargewichtsstandard wurden die DNA Molecular Weight Marker III, VI, VII, 250 ng/μl (Boehringer Mannheim) verwendet: 2 μl Marker wurden mit 1,5 μl Gelladepuffer versetzt, mit 1× TAE oder 1× TBE auf 15 μl aufgefüllt und vollständig auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 2: Auflösung von Standard-Agarose-Gelen (Ausuebel et al., 1987).

Standard-Agarose (%)	Auflösung des Gels für lineare Fragmente (kb)
0,5	30 bis 1
0,7	12 bis 0,8
1,0	10 bis 0,5
1,2	7 bis 0,4
1,5	3 bis 0,2

Tabelle 3: Auflösung von NuSieve GTG Agarose-Gelen (FCM BioProducts, 1997).

NuSieve GTG Agarosen (%)		Auflösung des Gels für lineare Fragmente (bp)
1× TAE-Puffer	1× TBE-Puffer	
2,5	2,0	500 bis 1000
3,0	2,5	150 bis 700
3,5	3,0	100 bis 450
4,0	3,5	70 bis 300
4,5	4,0	10 bis 100
5,0	4,5	8 bis 50

3.4.1 Gießen des Gels

Das Volumen der herzustellenden Agarose-Lösung wurde der Größe des jeweiligen Gelträgers angepasst.

Materialien: Beispiel am 1,2% Agarose-Gel für 50 ml:

0,6 g Agarose für 0,4 bis 7 kb DNA, 50 ml TBE-Puffer, ddH₂O.

Ethidiumbromid-Stammlösung.

Methode:

Die genannten Komponenten wurden ohne die Ethidiumbromid-Stammlösung zusammengemischt, mit den 50 ml TBE aufgegossen und im Mikrowellenherd so lange erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Das verdampfte ddH₂O wurde ersetzt.

2,5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung wurden dazugegeben und die Lösung bis auf 60-70° C abgekühlt.

Die Lösung wurde in den Gelträger gegossen, der Kamm danach sofort eingesetzt und das Gel mindestens für 30 min abgekühlt.

Die Kammer wurde mit dem 1× TBE- oder TAE-Puffer bei Gel mit TAE-Puffer zu 70% gefüllt.

0,5 µg/ml Ethidiumbromid wurden dem Puffer zugegeben.

Das feste Gel wurde in die Kammer mit dem TBE- oder TAE-Puffer bei Gel mit TAE-Puffer eingesetzt.

Probenvorbereitung: Die Proben wurden so mit Gelladepuffer versetzt, dass dieser 1:10 verdünnt vorlag. Die Proben und der wie beschrieben vorbereitete Molekulargewichtsstandard wurden in die Taschen des Gels gefüllt.

3.4.2 Gel-Lauf und Dokumentation des Ergebnisses

Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung, 70-100 V für 60-90 min, bei einer Stromstärke von maximal 350 mA, Power Pac 300, Bio-Rad. Während des Laufs interkalierten die Ethidiumbromid-Moleküle in die DNA-Helix. Die Fluoreszenz der gefärbten DNA wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm angeregt (UV-Leuchttisch Bachofer), wobei die UV-Bestrahlung der DNA so kurz wie möglich gehalten werden sollte, um Strangbrüche zu vermeiden. Zur Fotodokumentation (Pharmacia Biotech Image Master) konnte die Elektrophorese jederzeit unterbrochen werden. Mit Hilfe dieses Image Masters VDS Systems wurden die Banden digitalisiert und das Bild über einen Thermosublimationsdrucker ausgegeben.

3.5 Reinigung der DNA aus präparativen Agarose-Gelen: Geneclean II Kit

Das Geneclean II Kit dient zur Isolierung der DNA-Fragmente aus präparativen Agarose-Gelen. Es beruht auf der Fähigkeit von Silicagel, DNA in Anwesenheit hoher Konzentration chaotroper Salze und einem pH-Wert von ca. 7,5 zu adsorbieren. Die notwendige vorangehende Solubilisierung des Gel-Stücks erfolgt dabei ebenfalls mit Hilfe des chaotropen Salzes, das die Wasserstoffbrücken zwischen den Agarose-Teilchen zerstört. Die DNA wird durch Absenken der Salzkonzentration und Erhöhung der Temperatur von den Silika-Partikeln eluiert.

Kurzfassung der Methode: **Binden → Waschen → Eluieren**

Materialien:

Folgende Materialien waren Bestandteil des Geneclean II Kit (Bio 101 Inc.) zur Reinigung von DNA-Fragmenten größer als 500 bp:

6 M Natriumjodid-Lösung, NaI.

TBE-Modifier: Mischung aus hochkonzentrierten Salzen.

NEW Waschlösung: Die NEW Waschlösung enthielt Tris-HCl und Tris-Base, so dass der pH-Wert zwischen 7,0 und 8,5 lag.

Glasmilch: Silica-Matrix, gelöst in ddH₂O, Bindungskapazität von 1 bis 2 µg DNA pro µl Glasmilch.

Methode:

Vorbereitung der NEW Waschlösung: 14 ml NEW Konzentrat wurden mit 280 ml ddH₂O vermischt. Dann wurden 310 ml absolutes Ethanol hinzugefügt, die Lösung wurde gut gemischt und bei -20° C gelagert.

Die DNA wurde in Agarose-Gel getrennt. Das Agarose-Gel enthielt TAE- oder TBE-Laufpuffer, wobei TAE aufgrund seiner präparativen Eigenschaften vorzuziehen ist.

Die gewünschte Bande wurde auf einem UV-Leuchttisch ausgeschnitten. Die UV-Bestrahlung der DNA wurde dabei so kurz wie möglich gehalten.

Das Gel wurde gewogen und das dreifache Gel-Volumen an NaI-Lösung hinzugegeben.

Dann wurde das Gemisch so lange bei 55° C inkubiert, bis sich das Gel-Stück vollständig auflöst hatte. Die Silika-Matrix wurde vollständig resuspendiert.

Zu Lösungen, die 5 µg oder weniger DNA enthielten, wurden 5 µl Glasmilch zugegeben. Für jedes weitere µg DNA wurde die zugegebene Menge um 2 µl erhöht. Bei stark verdünnten DNA-Lösungen wurde mehr Glasmilch als oben angegeben eingesetzt.

Die Bindung der DNA an die Silika-Matrix im Eis benötigte zwischen 5 und 10 min. Es war darauf zu achten, dass die Glasmilch zwischendurch immer wieder aufgeschüttelt wurde, um einen möglichst kontinuierlichen Kontakt zwischen der zu bindenden DNA und den Partikeln zu gewährleisten.

Die Glasmilch wurde in einer Tischzentrifuge 2 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und zunächst aufgehoben.

Das Pellet bestehend aus der Glasmilch und der DNA wurde in 10× bis 50× Glasmilch-Volumen NEW Waschlösung vorsichtig (um Strangbrüche bei langen DNA-Moleküle zu vermeiden) resuspendiert und erneut zentrifugiert.

Der Wasch- und der Zentrifugationsvorgang wurden 2× wiederholt.

Das Pellet wurde unter Vakuum für 2 min getrocknet, um Ethanol-Reste aus der NEW Waschlösung zu entfernen.

Die Silika-Milch wurde in 1 bis 2 Glasmilch-Volumen ddH₂O aufgenommen und bei 45-55° C für 5 min inkubiert. Dadurch wurde die Elution der DNA von der Glasmilch erzielt. Wasser verdrängte die DNA von seiner Bindungsstelle an Glasmilch.

Das Gemisch wurde vorsichtig in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet enthielt die Glasmilch ohne DNA, der Überstand bestand aus DNA, z.B. Inserts, Vektoren.

Die Reinigung durch die Gelelektrophorese wurde kontrolliert und anschließend die Banden mittels des Image Master VDS Systems digitalisiert. Die Bilder wurden über einen Thermosublimationsdrucker ausgegeben.

3.6 Ligation der DNA-Fragmente mit T₄-DNA-Ligase

Das "Verschweißen" von Vektor- und Insert-DNA erfolgte durch T₄-DNA-Ligase

T₄-DNA-Ligase ligiert kohäsive oder stumpfe DNA-Enden.

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten Plasmiden sind folgende Faktoren zu beachten:

Die Konzentration der eingesetzten Plasmid-DNA: eine niedrige Konzentration von Plasmid-DNA führt zu einem intramolekularen Ringschluß, während eine hohe Konzentration die Bildung intermolekularer Reaktionen bewirkt.

Das Verhältnis von Plasmid-DNA zur einzufügenden Fragment-DNA: Für eine erfolgreiche Verknüpfung von Plasmid- und Fragment-DNA soll das Verhältnis der Anzahl der Moleküle Plasmid:Fragment-DNA mindestens 1:2 betragen.

Je nachdem, wie das Plasmid und das einzufügende Fragment vorliegen, müssen verschiedene Strategien angewandt werden: besitzt das einzufügende Fragment identische kohäsive Enden, muß das Plasmid nur mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut werden. Hat es dagegen unterschiedliche kohäsive Enden, muß das Plasmid mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut werden, damit kompatible Enden für das Einfügen des Fragments vorliegen.

Methode:

Für die DNA-Ligation wurde die in Tabelle 4 angegebene Reaktion angesetzt, wobei die T₄-Ligase als Letztes hinzupipettiert wurde. Dann wurde die Rapid-DNA-Ligation (Boehringer) Probe gemischt, kurz zentrifugiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert.

Um die Effektivität der Klonierung (d.h. Ligation des Inserts) im Vergleich zum Hintergrund (d.h. Religation des Vektors ohne Insert) zu überprüfen, wurde als Negativ-Kontrolle ein Konstrukt ohne Insert vorbereitet. Das eigentliche Reaktionsprodukt wurde „real“ und die negative Kontrolle „mock“ genannt.

Tabelle 4: Beispiel einer Ligationsreaktion

	mock	real
Vektor	2 µl	2 µl
Insert	--	1 µl
DNA-Verdünnungspuffer (5x)	2 µl	2 µl
ddH ₂ O	6 µl	5 µl
DNA-Ligationspuffer (2x)	10 µl	10 µl
T ₄ -Ligase	1 µl	1 µl

Ein Teil des Ligationansatzes konnte sofort in E.coli transformiert und der Rest bei -20° C gelagert werden.

3.7 Transformation von E.coli

3.7.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

Mit der Transformation werden Bakterien wie E.coli dazu induziert, ein fremdes Plasmid bzw. einen fremden Vektor mit oder ohne zusätzlichem Konstrukt aufzunehmen. Dank dieser Transformation besitzt das Bakterium die Information zur neuen DNA- und ggf. RNA-Proteinexpression. E.coli nehmen keine fremde DNA spontan auf, weswegen sie zuvor kompetent gemacht werden. Die Transformation erfolgt mittels Plasmid-Vektoren.

Materialien:

Bakterien: E.coli NM522, E.coli BL21 DE3

Mittels Mini-Präparationsvorgang isolierte DNA

Methode:

Die E.coli wurden über Nacht in Reagenzgläsern mit 2-5 ml LB-Medium bei 37° C kultiviert.

Am nächsten Tag wurden die E.coli aus den Reagenzglas im Verhältnis 1:100 in einem neuen LB-Medium inokuliert: 100 µl in 10 ml Medium bzw. 200 µl in 20 ml Medium.

Bei 37° C wurden die Bakterien in einem Inkubator für 1-2 h bei 200 rpm geschüttelt. Das Bakterienwachstum wurde mittels photometrischer Messungen bei OD₆₀₀ Lichtabsorption überwacht. Sobald sich die Bakterien in der frühen log-Phase befanden (OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4) wurde die Kultur bei 4° C mit 1000 rpm für 5-10 min zentrifugiert und das LB-Medium entfernt.

Die Bakterien wurden in einem halben Volumen 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und für 40 min in Eis inkubiert. Anschließend wurden sie bei 4° C mit 1000 rpm für 5-10 min zentrifugiert.

Die E.coli wurden wieder im kalten 0,1 M CaCl₂ im Verhältnis 1:10 resuspendiert. Dies entsprach 1-2 ml 0,1 M CaCl₂.

Die Bakterien wurden erneut für mindestens 30 min in Eis inkubiert. Die Effizienz der Transformation steigerte sich mit steigender Inkubationszeit, die Bakterien wurden innerhalb der ersten 24 h stetig kompetenter. Nach etwa 24 h fiel die Effizienz wieder ab.

3.7.2 Eigentliche Transformation und Abschätzen des Klonierungserfolges

Methode:

100 µl der kompetenten Bakterien wurden mit 1-10 µl transformierender DNA aus der Ligationsreaktion gemischt, z.B.vom Konstrukt pET 16b/C-DRA. Die Mischung aus DNA und kompetenten Bakterien wurde für 1-1,5 h in Eis inkubiert.

„Heat shock“ bei 42° C im Wasserbad für 1 min.

1 ml SOC oder LB-Medium wurde der Mischung hinzugefügt und bei 37° C für 1 h geschüttelt. Dann wurden die transformierten Bakterien auf LB-Platten verteilt, welche bereits das richtige Antibiotikum enthielten.

Transformationsnachweis: Ein Antibiotika-Resistenz-Gen auf dem Plasmid ermöglichte dem E.coli ein Wachstum auf einem Antibiotika-haltigen Medium.

3.8 IPTG-induzierte Proteinsynthese in E.coli

Das zytoplasmatische DRA cDNA wurde in den prokaryotischen Expressionsvektoren pET 16b und pET 30c kloniert. Abbildung 3 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Modelle beider Vektoren.

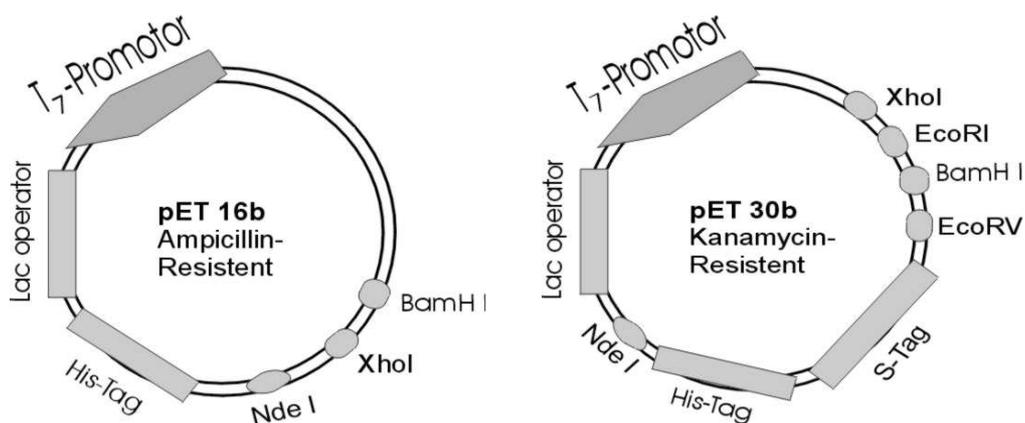


Abbildung 3: Modell der Vektoren pET 16b (5711 bp) und pET 30c (5422 bp).

Verwendete Konstrukte: pET 16b/C-DRA (short) und pET 30c/C-DRA (short) in E.coli BL21 DE3.

Materialien:

Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranoside, IPTG (Life Technologies).

Ampicillin/ Kanamycin.

Methode:

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in 500 ml LB-Medium bei 37° C mit 225 rpm, mit einem Zusatz von 0,5 ml Ampicillin oder 0,5 ml Kanamycin bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7. Durch die Zugabe von 0,7 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert. Diese erfolgte in 4 Stunden bei 37° C mit 225 rpm. Die induzierten Bakterien wurden bei 1500 rpm für 3 min abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Weiterbearbeitung oder Lagerung bei -20° C.

3.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde unter Verwendung typischer Protokolle durchgeführt. Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung einer typischen PCR:

Tabelle 5: Zusammensetzung einer typischen PCR

Template	1 µl
Forward-Primer	2 µl
Reverse-Primer	2 µl
10 x PCR-Puffer	5 µl
dNTP	1 µl
H ₂ O	38 µl
DNA-Polymerase (pfu)	1 µl

Die PCR erfolgte in der Regel über 30 Zyklen mit 1 min Annealing und 1 min Denaturierung. Tabelle 6 fasst die Parameter einer PCR an einem Beispiel zusammen. Annealing-Temperatur, Extensionszeit und Zyklenzahl wurden jeweils optimiert.

Tabelle 6: Phasen einer Polymerasen Kettenreaktion

Phase	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
1. Initiale Denaturierung	2 min	94° C	1
2. Denaturierung	1 min	94° C	25
3. „Annealing“	1 min	55° C	25
4. Extension	7 min	72° C	25
5. Finale Extension	7 min	72° C	1

Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarose-Gel auf die erwartete Größe überprüft und dann in den Klonierungsvektor pCR2.1 TA TOPO kloniert (siehe Abschnitt 3.10).

3.10 „TOPO TA Cloning Reagents“ und „One Shot Reagents“

Der pCR 2.1 TOPO Vektor kodiert das LacZ-Gen. Die Klonierungsstelle für das einzubringende PCR-Produkt liegt im LacZ-Gen. Bei erfolgreich kloniertem Insert ist das LacZ-Gen nicht mehr funktionell und kann daher nicht mehr die Blaufärbung des Substrates X-Gal bewirken. Auf diese Weise lassen sich erfolgreich klonierte/transformierte Inserts vom Hintergrund unterscheiden.

Im pCR 2.1 TOPO Vektor katalysiert die Topoisomerase die Ligation zwischen dem Vektor und dem PCR-Produkt, diese Reaktion ist wesentlich effektiver und schneller als die klassische T₄-Ligase.

Für die Klonierung von PCR-Produkten in den pCR 2.1 TOPO Vektor wurde exakt den Empfehlungen des Hersteller gefolgt.

3.11 Weitere Expressionsvektoren

pcDNA3.1+-Vektoren wurden in den eukaryoten Zelllinien, HEK 293, für konstitutive Expression verwendet (siehe Abbildung 4).

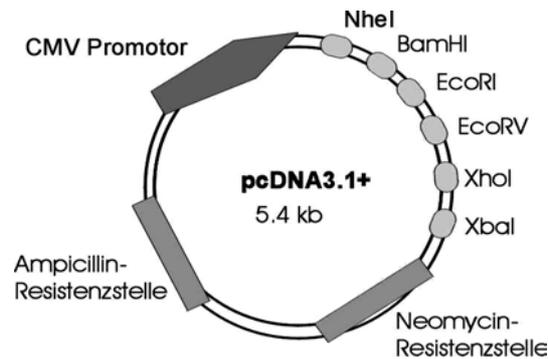


Abbildung 4: Modell des pcDNA 3.1+

3.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot

Für die Trennung und Detektion von Proteinen wurde die SDS-PAGE verwendet. Diese Gele können entweder in einem Westernblot weiterverarbeitet oder direkt mit Coomassie Brillant Blau in einem Methanol/Essigsäure-Gemisch gefärbt und fixiert werden. Bei gründlichem Entfärben kann in einer Bande bis zu 50-100 ng Protein detektiert werden (nach der Methode von Laemmli, 1970; Sambrook et al., 1989). Das PAGE-Gel erlaubt nicht nur die Abschätzung der Purifikation und der Kontamination, sondern auch ein ungefähres Abschätzen der Proteinmengen in ihrem Verhältnis zueinander. GnHCl-haltige Fraktionen müssen vor ihrer Auftragung aufs Gel mit Trichloressigsäure präzipitiert werden, da GnHCl ausfällt, wenn es in Kontakt mit dem SDS im PAGE-Gel kommt.

3.12.1 Aufbau der Aparatur und Herstellung des SDS-PAGE-Gels

Materialien für das Gel:

Acrylamid-Stammlösung (Roth), TEMED (Serva), Tris-HCl (Merck), SDS (Serva), Isopropanol, Ammoniumpersulfat, ddH₂O.

Ammoniumpersulfat: Die Lösung wurde nach der Herstellung in Aliquots bei -20° C gelagert. Bei 4° C war sie nur wenige Stunden haltbar.

Materialien für den Laufpuffer:

25 mM Tris Base, 250 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3.

Methode:

Zwei Glasplatten, 10 cm × 10 cm, wurden mit Wasser und Ethanol gereinigt und getrocknet. Die ebenfalls zu reinigenden „Spacer“, 1,5 mm, wurden zwischen den beiden Glasplatten geklemmt.

In einem Kolben für das Trenngel (7-12%) je nach Größe der zu trennenden Proteine wurden Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 0.1% SDS und H₂O gemischt (siehe Tabellen 7 und 8). Es war auf die richtige Reihenfolge der vorzubereitenden Komponenten zu achten.

Nach Zugabe von APS und TEMED wurde das Gemisch vorsichtig geschüttelt und zwischen den Glasplatten bis etwa 1,5 cm unterhalb des oberen Glasrandes gegossen. Sobald das TEMED zugefügt wurde, begann die Polymerisation.

Tabelle 7: Aufbereitung von SDS-PAGE-Gel für 10 ml Gel-Volumen.

Trenngel			7 %	8 %	8,5%	10 %	12 %
1.	Acrylamid/Bisacrylamid 30%	ml	2,3	2,7	2,8	3,3	4,0
2.	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	ml	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
3.	10% SDS	µl	100	100	100	100	100
4.	10% APS	µl	80	80	80	80	80
5.	TEMED	µl	10	10	10	10	10
6.	ddH ₂ O	ml	5,2	4,8	4,7	4,2	3,5

Sammelgel			
1.	Acrylamid/Bisacrylamid 30%	ml	0,85
2.	1 M Tris-HCl pH 6,8	ml	0,625
3.	10% SDS	µl	50
4.	10% APS	µl	50
5.	TEMED	µl	5
6.	ddH ₂ O	ml	3,4

Tabelle 8: Auswahl der Prozentzahl von Acrylamid/Bisacrylamid je nach Polypeptide-Größe.

Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Auflösung des Gels für Polypeptide (kDa)
5,0	57 bis 212
7,5	36 bis 94
10	16 bis 68
15	12 bis 43

Das Gel wurde mit Isopropanol überschichtet und für 30 min bis zur Polymerisation stehengelassen. Durch das Isopropanol wurde verhindert, dass die obersten Schichten in Kontakt mit der Luft geraten, komplett polymerisieren und so eine harte Grenze zum Sammelgel („stacking gel“) bilden.

Für die Entfernung des Isopropanols wurde die Geloberfläche mit Filterpapier leicht absaugt.

Das nach gleicher Art wie das Trenngel vorbereitete Sammelgel (5%) wurde auf das Trenngel gegossen.

In das noch flüssige Gel wurde ein Kamm gesteckt. Es war darauf zu achten, dass beim Giessen des Gels keine Luftblasen entstanden. Die gegebenenfalls gefangenen Luftblasen wurden mittels einer Spritze entfernt. Die Taschen des Gels wurden mit dem Laufpuffer gewaschen.

Nach weiteren 30 min war das Sammelgel ebenfalls polymerisiert. Das Gel wurde nach Entfernen von Kamm in der Elektrophorese-Apparatur befestigt.

In die obere und untere Kammer wurde Laufpuffer gegeben.

3.12.2 Vorbereitung der aufzutragenden Proteine

Materialien:

Aufzutragende Proteine.

„Sample Buffer“: 1 M Tris-HCl pH 6,8 2 ml, 10% SDS 4 ml, β -Mercaptoethanol 0,8 ml, Glycerin: 2 ml, Bromphenolblau: ca. 15 mg. Die genannten Komponenten wurden mit ddH₂O auf 10 ml aufgefüllt.

Marker: Amersham Rainbow Marker.

Methode:

Die aufzutragenden Proteine wurden mit dem „Sample-Buffer“ im Verhältnis 1:1 auf Eis gemischt, die im Sample-Buffer aufgenommenen Proteine für 3 min gekocht, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen.

Die nicht benutzten Gel-Taschen wurden mit einem 1:1-Gemisch aus Lyse-Puffer und Sample-Buffer gefüllt, um einen Konzentrationsgradienten innerhalb des Gels zu vermeiden.

Der Sample-Buffer enthielt sowohl β -Mercaptoethanol zur Denaturierung der Proteine als auch Bromphenolblau zur Kontrolle, wie weit die Proteine im Gel bereits gelaufen sind. Als Längenstandard wurde der Rainbow-Marker (Amersham Life Science), eine Mischung verschiedener Proteine bekannter Größe, die mit Farbstoffen gekoppelt sind, verwendet.

Das Gel wurde bei 140 V solange gefahren, bis die Front des Sample-Buffers den unteren Gelrand erreicht hatte (ca. 1 h).

3.12.3 Färbemethode: Coomassie-Färbung

Die Polypeptide wurden in einer SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie Brillant Blau in einem Methanol/Essigsäure-Gemisch gleichzeitig gefärbt und fixiert. Bei gründlichem Entfärben konnte in einer Bande bis zu 0,1 μg Protein detektiert werden (Sambrook et al., 1989).

Materialien:

Färbelösung: 0,05% Coomassie Brillant Blau R250 (Sigma), 50% Methanol, 10% Essigsäure, 40% ddH₂O. Nach dem Zusammenfügen aller Komponente wurde die Färbelösung filtriert.

Entfärbelösung: 50% Methanol, 10% Essigsäure, 40% ddH₂O.

Methode:

Das SDS-PAGE-Gel wurde unter Schütteln für 30 min bis 4 h in Färbelösung eingelegt.

Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung für 2-15 h geschüttelt, bis blaue Banden auf dem transparenten Hintergrund sichtbar wurden.

Das Gel wurde unter Vakuum bei 85° C für 30-60 min getrocknet. Im trockenen Zustand diente es als Dokumentation des Ergebnisses.

3.12.4 Western-Blots

Der Western-Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Um die über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten Proteine bzw. Aminosäuresequenzen mit einem Antikörper nachzuweisen, müssen die Proteine zunächst aus dem Gel auf eine geeignete Membran überführt werden. Als Träger eignen sich vor allem proteinbindende PVDF- und Nitrozellulosemembranen. Beim Western-Blot werden Gel und Membran Sandwich-artig von Filterpapieren eingerahmt. Diese Papiere dienen als Ionen-Reservoir bei der Elektrophorese und werden zwischen die Elektroden gelegt (siehe Abbildung 5). Dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran laufen und dort gebunden werden. Methanol im Puffer dient dazu, das SDS aus dem Protein- Detergens-Komplex zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene erste Antikörper wird durch einen zweiten Antikörper, der entweder radioaktiv markiert oder an ein Enzym gekoppelt ist, detektiert.

Nitrozellulose-Membran ist für die meisten Anwendungen gut geeignet. Sie ist aber empfindlich gegenüber mechanischen Einflüssen.

Nylonmembran besitzt höhere Stabilität und Proteinbindungskapazität. Aufgrund ihres hohen Hintergrundsignals wird sie aber kaum benutzt.

PVDF-Membran weist eine hohe mechanische und chemische Stabilität, sowie eine hohe Proteinbindungskapazität auf, besitzt eine gute Detektion von Glykoproteinen und kann mehrmals wiederverwendet werden. Der Nachteil der PVDF-Membran liegt darin, dass die Proteinbanden an den Stellen hoher Konzentration auf der Membran eine zentrale Aufhellung zeigen. Dieser Effekt tritt bei Nitrozellulose-Membranen weniger auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde Nitrocellulose verwendet.

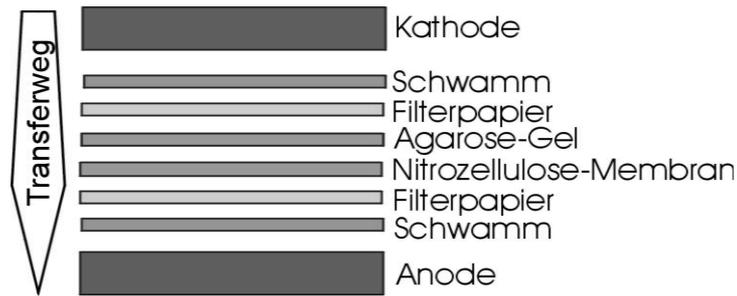


Abbildung 5: Modell des „Sandwich“ im Western-Blot.

Materialien:

Laufpuffer, pH 8,3: 25 mM Tris Base, 250 mM Glycin, 0,1% SDS.

Transferpuffer: 3,03 g Tris, 14,4 g Glycin, 350 µl 10% SDS, 100 ml Methanol, ad 1 l ddH₂O.

Methode:

15 min vor dem Äquilibrieren der jeweiligen Membran im Transferpuffer wurde die Nitrozellulose-Membran in ddH₂O angefeuchtet (Amersham, 1995).

Nach kurzer Äquilibrierung des PAGE-Gels in Transfer-Puffer wurde der in Abbildung 5 dargestellte sogenannte Sandwich zusammengesetzt.

Für den eigentlichen Transfer-Vorgang wurde das Gel entweder leicht gekühlt über Nacht bei 30 V oder bei 4° C für 2-4 h bei 100 V gefahren.

Zur Kontrolle des Transfer-Erfolges wurde das Gel wieder mit Färbe- und Entfärbelösung inkubiert (siehe Abschnitt 3.12.3). Korrekt ist, wenn keine oder nur minimal gefärbte Banden vorhanden sind.

3.12.5 Immundetektion der transferierten Proteine

Materialien:

Nitrozellulose-Membran mit transferierten Proteinen.

Primäre Antikörper:

Anti-Myc-Antikörper: Verdünnung 1:5000.

Anti-Lacz-Antikörper: Verdünnung 1:3000.

Anti-S-Antikörper: Verdünnung 1:5000.

Anti-C-DRA Antikörper: Verdünnung 1:3000.

Sekundäre Antikörper:

Anti-Mouse-IgG-Antikörper: Verdünnung 1:30000.

Anti-Rabbit-IgG-Antikörper: Verdünnung 1:5000.

TBS, pH 8,0: 150 mM NaCl, 10 mM Tris.

TBST, pH 7,5: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20.

Block-Lösung: 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS.

Detektions-Reagenz 1, Detektions-Reagenz 2 (NEN) und Hyperfilm ECL als Film des ECL-Systems (Amersham Life Science). Die Zusammensetzung der zum ECL-System gehörenden Reagenzien wurde vom Hersteller nicht angegeben.

Methode:

Die Nitrozellulosemembran wurde kurz in TBST gewaschen und anschließend für 1 hr bei Raumtemperatur in Block-Lösung inkubiert, sie verhindert die unspezifische Bindung des zur Detektion verwendeten Antikörpers.

Nach dem Blocken wurde die Nitrocellulose-Membran aus der Block-Lösung in die Lösung mit dem primären Antikörper (Verdünnung von 1:500 bis 1:5000 abhängig von der Qualität des Antiserums) überführt und bei 4° C über Nacht inkubiert.

Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBST gewaschen.

Um die Bindung des primären Antikörpers an ein auf der Membran gebundenes Protein nachweisen zu können, wurde ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, der gegen die Spezies, in der der primäre Antikörper gerichtet wurde, gerichtet ist. An den sekundären Antikörper war ein Enzym, in diesem Fall Meerrettich-Peroxidase (HRP), gekoppelt. HRP und H₂O₂ katalysierten die Oxidation von Luminol, zyklisches Diacylhydracid, das oxidiert in einem angeregten Zustand vorlag. Das

angeregte Luminol geht unter Lichtemission bei 428 nm in seinen Grundzustand über. Die Chemilumineszenz erreicht nach 5-20 min ihr Maximum und fällt dann innerhalb von 60 min langsam ab. Zum Zeitpunkt der maximalen Lichtemission wurden die Banden durch Auflegen eines gegenüber blauen Licht sensitiven Autoradiographie-Films detektiert (Amersham, 1995).

Mit dem sekundären Antikörper, der gegen das Immunglobulin G der jeweiligen Spezies gerichtet war, in der der primäre Antikörper erzeugt worden ist, wurde die Membran in 6 ml TBS plus Milch für eine Stunde inkubiert.

Nach drei weiteren Waschvorgängen mit TBST wurde die Membran auf einem Filterpapier getrocknet und mit der Proteinseite nach oben auf einer Plastikfolie gelegt. Die Detektions-Lösung mit einer Pipette auf der Membran derart verteilt, dass die Oberflächenspannung die Flüssigkeit auf der Membran-Oberfläche hielt.

Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde die Detektions-Lösung abgegossen und mit Hilfe eines Filterpapiers möglichst gründlich abgesaugt.

Die Membran wurde in eine aufgeschnittene Plastiktasche gelegt, alle Falten und Luftblasen wurden entfernt. Die Membran in der Folie wurde mit der Proteinseite nach oben in die Röntgenkassette (Kodak) eingelegt.

In der Dunkelkammer wurde ein Film in die Kassette gelegt, die Kassette geschlossen und der Film für 1 sec bis 5 min exponiert. Anschließend wurde der Film, ohne ihn gegen die Membran zu verschieben, aus der Kassette genommen und entwickelt.

Anhand der Intensität der Banden nach der ersten Exposition wurde die weitere Expositionszeit so abgeschätzt, dass ein optimales Ergebnis erreicht wurde.

Abbildung 6 zeigt alle Schritte der Immundetektion. An dem Protein von Interesse, DRA, binden sich die Primären Antikörper, die ihrerseits von den Sekundären Antikörpern detektiert werden. An den zweiten Antikörpern reagiert das HRP. Die Reaktion äußert sich als Lichtemission. Je nach Intensität dieses Lichtes lässt sich die Quantität der Antigene abschätzen.

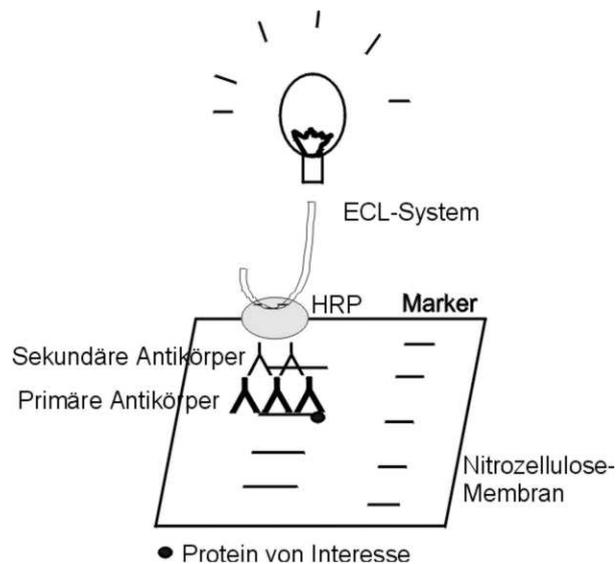


Abbildung 6: Immundetektion des Proteins von Interesse.

3.12.6 Wiederholter Gebrauch von Western-Blot Membranen

Nach einer ECL-Detektion können sowohl Nitrozellulose- als auch PVDF-Membrane erneut mit einem Antikörper inkubiert werden, wobei der Proteinverlust nach der hierfür nötigen Waschprozedur bei Nitrozellulose-Membranen höher ist als der bei PVDF-Membranen. Häufig kann die Membran sogar mehrfach wiederverwendet werden.

Materialien:

„Stripping Buffer“ (Amersham, 1995): 100 mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7.

Wasch-Lösung: 0,02% (w/v) Triton X-100 in TBS.

Methode:

Die Membran wurde für 30 min mit dem Stripping Buffer behandelt.

Die Stringenz der Waschbedingungen konnte sowohl durch eine Variation der 2-Mercaptoethanol-Konzentration im Stripping Buffer als auch durch Variation der Inkubationstemperatur verändert werden.

Die Membran wurde 2 mal für je 10 min in der Wasch-Lösung geschüttelt, bevor ein erneutes Blocken stattfand.

3.13 Proteinbestimmungsmethode: Methode nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry ist eine einfache und zuverlässige Methode zur Konzentrationsbestimmung löslicher sowie unlöslicher Proteine (Lowry et al., 1951). In dieser Technik reagieren die Proteine mit einer alkalischen Lösung aus Kupfersulfat und Natriumtartrat. Die Proteine gehen zunächst mit einem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz eine dem Biuret-Komplex ähnliche Verbindung ein. In einem nachfolgenden Reaktionsschritt erfolgt die Reduktion des Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenzes (Folin-Reagenz) durch die mit den Cu^{2+} komplexierten Proteinen. Der Kupfer-Protein Komplex bewirkt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat, die in Form von Heteropolyphosphorsäuren vorliegen. Es entstehen Mischoxide zwischen jeweils IV- und VI- wertigem Molybdän als Molybdänblaureaktion bzw. Wolfram. Die Reduktion des Folin-Reagenzes erfolgt, nachdem das Cu^{2+} im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu^+ reduziert worden ist. Die aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Tryptophan reduzieren darüber hinaus das Folin-Reagenz direkt ohne vorherige Komplexierung mit dem alkalischen Cu^{2+} -Reagenz. Bei der Reduktion erfährt das Folin-Reagenz einen Farbumschlag von gelb nach blau. Die resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt. Dazu wird zuerst die Extinktion des bei der Reaktion mit dem Folin-Reagenz entstehenden blauen Farbstoffs für mehrere Proben mit einem bekannten Proteingehalt als Standardkurve und anhand des eingesetzten Probenvolumens ermittelt. Der Proteingehalt und die Proteinkonzentration der zu messenden Proben wurden anhand der Standardkurve ermittelt

Die Proteinbestimmung nach Lowry wird durch Tris, Ammoniumsulfat, EDTA, Saccharose, Citrat und Phenole verfälscht. Liegen solche Substanzen in den Proteinlösungen vor, müssen die Proteine mit Trichloressigsäure ausgefällt und anschließend in einem wässrigen Lösungsmittel, das diese störenden Substanzen nicht enthält, gelöst werden.

Materialien:

In 2.4.1.1. verwendete Reagenzien.

CTC-Reagenz: 0,1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 % Na/K-Tartrat, 10 % Na_2CO_3 .

5 %-SDS.

0,8 N NaOH.

Folin-Ciocalteu-Reagenz.

Proteinstandard: 1,0 mg/ml bovines Serumalbumin (BSA). Aus den Stammlösungen wurden die beiden Reaktionslösungen A und B frisch hergestellt:

Lösung A: 1 Teil CTC-Reagenz, 2 Teile 5 % SDS, 1 Teil 0,8 N NaOH.

Diese Lösung wurde nach dem Ansetzen trübe, was sich durch vorsichtiges Erwärmen beseitigen ließ.

Lösung B: 1 Teil Folin-Ciocalteu-Reagenz, 5 Teile H_2O .

Von allen zu untersuchenden Proben wurden jeweils zwei Ansätze gemessen.

Methode:

Für die Standardkurve wurden von der Proteinstammlösung (1 mg/ml BSA) Proben von 0 μg (nur H_2O), 10 μg , 20 μg , 40 μg und 80 μg hergestellt.

Die Ansätze bestehend aus 80 μl Proteinlösung und 1 ml Lösung A wurde zunächst für 10 min vorinkubiert, dann wurde 0,5 ml Lösung B hinzugegeben und für weitere 20 min inkubiert.

Die Extinktion des gebildeten blauen Farbstoffs wurde bei 750 nm im Spektralphotometer gemessen.

3.14 DNA-Bestimmungsmethode

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA wird die Absorption der heterozyklischen, aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen im Bereich von 260 nm ausgenutzt (Sambrook et al., 1989). Hierbei ist zu beachten, dass Doppelstrang-DNA, RNA und

Oligonukleotide infolge des unterschiedlichen Ausmaßes der Basenstapelung verschiedene Extinktionskoeffizienten besitzen. Eine Extinction von „1“ entspricht bei der Doppelstrang-DNA einer Konzentration von 50 µg/ml (Ausubel et al., 1987), bei der Einstrang-DNA und bei RNA ca. 40 µg/ml, bei Oligonukleotiden ca. 20 µg/ml. Zur Bestimmung sehr kleiner Nukleinsäure-Mengen ist die Methode nicht geeignet. Die Meßlösung muß zur Konzentrationsbestimmung im Einkanal-UV-Spektrometer (Beckman DU-640) mindestens 1 µg/ml enthalten.

Materialien:

dsDNA

Methode:

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem programmierbaren UV-VIS Spektrophotometer (Beckman DU-640) in einer Vierfach-Mikroküvette aus Quarzglas (Beckman).

Leerwertbestimmung und Küvettenabgleich:

Je 1,5 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung wurden mit ddH₂O auf 150 µl (entspricht Verdünnungsfaktor 1:100) aufgefüllt und in die Kammern 2-4 der Küvette überführt. In der ersten Kammer verblieb eine Wasserprobe als Referenz. Die DNA-Extinktionsmessung erfolgte bei 260 nm und 280 nm in allen vier Kammern. Das Verhältnis „Extinction 260“ zu „Extinction 280“ wurde zusätzlich ermittelt und als Maß für die Reinheit der DNA-Probe verwendet. Dabei wurden Werte zwischen 1,8 und 2,0 angestrebt.

Die tatsächliche Nukleinsäure-Konzentration in der Ausgangsprobe wurde folgendermaßen berechnet:

$$[\text{dsDNA}] = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor 1:100.}$$

3.15 Zellkultur

Verwendete Medien und Puffer in der Zellkultur:

Zellkulturmedium ohne G 418: Glutamax, 0,5 l (Merck), 50 ml steriles FCS, 2,5 ml steriles Penicillin/Streptomycin.

Zellkulturmedium mit G 418: Glutamax, 0,5 l (Merck), 50 ml steriles FCS, 2,5 ml steriles Penicillin/Streptomycin, 250 mg steriles G 418.

Herstellung der Medien:

Medium ohne G 418: 50 ml steriles FCS und 2,5 ml Penicillin/Streptomycin wurden dem Glutamax unter sterilen Bedingungen zugegeben.

Medium mit G 418: Als erstes erfolgte eine Sterilisierung des G 418: 250 mg unsteriles G 418 wurden in einem Falcon Röhrchen in 10-20 ml Medium gelöst. Die unsterile Lösung wurde mit einer Spritze durch einen 0,2 µm Sterilisierungs-Filter direkt dem Medium hinzugefügt.

Gearbeitet wurde nur unter dem „Laminar Flow“. Alle autoklavierbare Gegenstände wurden vor ihrer Benutzung sterilisiert. Ansonsten wurden sterile Einweg-Utensilien verwendet. Vor Benutzung einer Glaspipette wurde ihre Spitze für ein paar Sekunden in die Flamme eines Bunsenbrenners gehalten. Die Arbeitsfläche vom Laminar Flow wurde vor und nach jedem Benutzen mit 70 % Ethanol gereinigt.

Alle Medien wurden unter hygienischen Bedingungen bei 4° C gelagert.

3.15.1 Transfektion

Materialien der Transfektion:

Lipofectin (Life Technologies): 1:1 Liposomen-Formulierung in sterilem Wasser aus dem polykationischen Lipid N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid, DOTMA, und dem neutralen Lipid Dioleoylphosphatidylethanolamin, DOPE.

OPTI-MEM (Life Technologies).

DMEM + 10% FCS.

DNA.

Methode:

1. Tag: Die zu transfizierenden Zellen wurden mit den Kulturmedien in Petri-Schalen verteilt. Die Zelldichte betrug dabei am Tag der Transfektion zwischen 20-40%.
2. Tag: Die Transfektion wurde nur nach einer vorherigen Inspektion des Zustandes der Zellen durchgeführt. Wenn die Zellen nicht zahlreich genug waren, wurde die Transfektion um einen Tag verschoben.

Am Tag der Transfektion wurde das Zellmedium 2-6 h vor der Transfektion gewechselt.

Folgende Komponenten wurden vorbereitet und in sterile 15 ml Tuben verteilt:

Lösung A: 10-20 µg DNA-Konstrukt in 250 µl in Serum-freien OPTI-MEM I Medium.

Lösung B: 30 µl Lipofectin Reagent, je Ansatz in 250 µl Serum-freien OPTI-MEM I Medium.

Die Lösungen A und B wurden vorsichtig miteinander vermischt und bei Raumtemperatur für 30-40 min inkubiert. Dabei trübte sich das Gemisch teilweise leicht.

Parallel dazu wurden die Zellen 1-2 mal mit 5 ml Serum-freiem OPTI-MEM-Medium gewaschen.

Für jede Transfektion wurden je 5 ml Serum-freies OPTI-MEM-Medium in jede Tube mit Lösung A+B pipettiert.

Die Zellen wurden über Nacht bei 37° C in einem CO₂-Brutschrank inkubiert.

- 3.-4. Tag: Das Wachsen der Zellen wurde beobachtet. Die konfluente Platte wurde trypsiniert und verteilt: 5%, 10% und 20% der trypsinierten Zellen wurden auf je eine 10 cm Petri-Schale passagiert, der Rest in eine Flasche pipettiert. Die Zellen wurden von nun an bei Bedarf mit einem G 418-haltigen Kulturmedium versorgt.

Wenn die Zellen ein Drittel des gesamten Bodens belegt hatten, wurden sie auf Proteinexpression getestet.

3.15.2 Selektion

Mittels Selektionsdruck werden alle Zellen, die keine G 418-Resistenz aufweisen, abgetötet. Durch die Transfektion der Zellen mit einer neuen genetischen Information, die gleichzeitig auch Resistenz gegen G 418 verleiht, ist es möglich, ausschließlich transfizierte Zellen zu kultivieren.

Material:

G 418 (Gibco BRL): G 418 ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum und interferiert mit der Funktion von 80S-Ribosomen. Dadurch wird die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen blockiert.

Methode:

Selektion durch G 418, das eukaryote Zellen tötet. Durch die Transfektion der Zellen mit Vektoren, die ein G 418-Resistenzgen besaßen, waren diese transfizierten Zellen resistent gegenüber G 418 und deswegen vermehrten sich nur die transfizierten Zellen in dem G 418-haltigen Medium.

Die Testung der Wirkungsschwelle des Antibiotikums auf die einzelnen Zellreihen erfolgte mittels einer „killing curve“.

„Killing curve“: Um eine stabile Zelltransfektion zu generieren, gibt es eine Konzentrationsgrenze für das Antibiotikum, oberhalb derer das Wachstum der transfizierten Zellen nicht beeinträchtigt wird, aber gleichzeitig die nicht-transfizierten Zellen abtötet werden. Diese Schwelle wurde für jede Zelllinie stufenweise mit zunehmender Konzentration des G 418 abgeleitet. Für HEK-Zellen wurde 500 µg/ml G 418 verwendet.

3.15.3 Trypsinisierung/ Passage

Um die Zellen aus Kulturflaschen oder Petri-Schalen zu gewinnen, werden die Zellen trypsiniert.

Materialien:

Trypsin (Gibco BRL).

Methode:

Das Kulturmedium wurde abgenommen.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin für 30 sec überschichtet.

Danach wurde das Trypsin abgesaugt und die Zellen durch Klopfen der Flaschen vom Boden gelöst.

Die Zellen wurden in das Kulturmedium resuspendiert.

Es wurde frisches Medium vorgelegt und eine entsprechende Zellmenge eingesät.

3.15.4 Subkultivierung und klonale Zelllinie

Bei starker Konfluenz der Zellkulturen werden diese Zellen unter Absonderung eines Teiles der Zellen subkultiviert. Für die Etablierung klonaler Zelllinien wird die Suspension so verdünnt, dass einzelne Zellen expandieren können. Die genannten Zellen berühren sich auf der Platte nicht. So können sie „einzeln“ passagiert werden.

Material und Methode der Subkultivierung:

Das Zellkulturmedium wurde mit einer Pipette entfernt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen.

Die Zellen wurden trypsiniert.

Ein Teil der Zellen wurde in 7-20 ml eines neuen Kulturmediums resuspendiert. Der Rest der Zellen wurde entweder in ein weiteres Kulturmedium resuspendiert oder verworfen.

Materialien zur Etablierung von klonalen Zelllinien:

Zellkulturmedium ohne G 418 (Merck), Zellkulturmedium mit G 418 (Merck), PBS-Puffer (Dulbecco), Trypsine (Gibco BRL), RIPA-Lyse-Puffer, 12-well-Platten.

Methode:

Konfluente Platten wurden trypsinisiert und auf mehrere Petri-Schalen mit unterschiedlicher Dichte verteilt.

In den folgenden Tagen wurde das Wachsen der Zellen mit dem Mikroskop beobachtet.

Die Kolonien, die aus wenigen Zellen bestanden, wurden auf der Außenseite des Plattenbodens mit einem Ring markiert.

Das Kulturmedium wurde entfernt.

Einzelne Kolonien auf der Platte wurden mit einer 10 µl-Pipette und 5 µl Trypsin trypsinisiert. Jede Kolonie wurde sofort in einem „well“ von 12-well-Platten kultiviert.

Das Wachstum der aus wenigen Zellen hervorgegangenen Kolonien erfolgte langsam.

Nach dem Wachstum der Kolonien wurden diese in einzelnen Flaschen mit Kulturmedien expandiert.

Nach 2-3 Passagen wurden die einzelnen Klonen individuell lysiert und auf Proteinexpression getestet.

3.15.5 Zellyse

Die Lyse der Zellen impliziert die Benutzung von Detergenzien zur Zerstörung von Zellmembranen. Es ist wichtig, die proteolytische Aktivität während und nach der Lyse zu minimieren. Dies kann ein Problem darstellen, sobald die Zellen lysiert sind, da bei der Lyse proteolytische Enzyme aus Lysosomen freigesetzt werden.

Die Lyse wurde im Kühlraum durchgeführt. Zur Unterdrückung proteolytischer Aktivität wurden Protease-Inhibitoren und ein kalter Puffer verwendet.

Materialien:

Lyse-Puffer 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5.

Dem Lyse-Puffer wurde verschiedene Detergenzien zugesetzt.

1% Triton X100.

1% NP40.

RIPA-Puffer: Zusammensetzung: 1% Natrium-Desoxycholat, 1% NP40, 0,1% SDS.

Protease-Inhibitoren: 0,1 M PMSF 1:1000, Aprotinin 1:1000, Phenanthrolidin 1:1000.

PBS-Puffer (Dulbecco).

Lagerung der Protease-Inhibitoren:

10 mg Aprotinin wurden in 2 ml ddH₂O gelöst. Bei der Benutzung wurde das gelöste Aprotinin mit einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

198 mg Phenanthrolidin wurden in 10 ml 100% Ethanol aufbewahrt. Bei der Benutzung erfolgte eine Verdünnung von 1:1000.

0,1 M PMSF wurden ebenfalls in 100% Ethanol aufbewahrt. Bei der Benutzung erfolgte eine Verdünnung von 1:1000.

Methode:

Lyse in Flaschen:

Das Kulturmedium wurde mit einer Pipette aus den Flaschen entfernt.

Die Zellen wurden mit 3-5 ml PBS, gewaschen. Das Pipettieren durfte dabei nicht direkt auf die Zellen erfolgen, da sonst ein Verlust der Zellen durch Ausschwemmung drohte.

Die Flaschen wurden vorsichtig geschüttelt, damit möglichst alle Zellen gewaschen wurden, und das PBS dann entfernt.

0,5 ml neues PBS wurden dazu gegeben.

Die Zellen wurden mit einem Kratzer vom Boden entfernt und in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Das Eppendorf-Gefäß wurde in Eis aufbewahrt.

Die Zellen wurden bei 4° C mit 1000 rpm für 30 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt.

Die Zellen wurden mit 200-800 µl Lyse-Puffer lysiert: Mit einer Insulin-Spritze wurden die Zellen hoch und runter gespritzt. Erst mit diesem Vorgang war die Lyse gewährleistet.

Die Zellen wurden bei 4° C mit 15000 rpm für 20 min zentrifugiert, um lösliches von nicht-löslichem Material zu trennen.

Der Überstand enthielt die gewünschten Proteine.

3.15.6 Lagerung von Zellen im Stickstoffbehälter

Materialien:

Trypsine (Gibco BRL), PBS-Puffer (Dulbecco), DMSO (Roth), FCS (Dulbecco), Zellkulturmedien (Merck) und bei Bedarf G 418.

Methode:

Die einzufrierenden Zellen durften nicht stark konfluent sein.

Zellkulturmedien wurden entfernt und die Zellen wurden vorsichtig mit 5 ml PBS bei 37° C gewaschen. Anschließend wurde das PBS entfernt.

Die Zellen wurden für 30 sec mit 1 ml Trypsin trypsinisiert.

Die Flasche wurde angeklopft, damit sich die Zellen vom Boden ablösen.

10 ml Medium mit 20% FCS wurde in die Flaschen gegeben.

Die Zellen wurden unter dem Mikroskop schnell beobachtet. Es war wünschenswert, dass die Zellen einzeln im Medium schwammen.

1 ml DMSO wurde tröpfchenweise dazu gegeben.

Inhalt der Flaschen wurde in Einfrierröhrchen verteilt.

Die Zellen wurden langsam eingefroren.

3.16 Semiquantitative Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR dient den Nachweis von mRNA. Diese mRNA wird durch reverse Transkription in cDNA, „complementary DNA“, umgeschrieben. RT-PCR zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität aus, die höher ist als in Northern Blot. Die Semiquantitative RT-PCR dient zur Analyse der Genexpression.

Kurzer Überblick zur RT-PCR:

Zunächst wird RNA aus Zellen isoliert und als Matrize zur Synthese komplementärer DNA, „cDNA“, durch reverse Transkription benutzt. Die so entstandene cDNA dient anschließend in der PCR als Probe. Die Primer werden so ausgewählt, daß eine bestimmte cDNA-Region amplifiziert wird. Eine thermostabile Polymerase, in der Regel Taq-Polymerase oder rekombinante Derivate, katalysiert nach dem Denaturierungsschritt und dem Hybridisieren der Primer an die cDNA-Matrize, „Annealing“, die Verlängerung der Primer, „Extension“. Durch die zyklische Anwendung von Denaturieren, „Annealing“ und „Extension“ gelingt die Amplifikation des gewünschten cDNA-Fragments.

Materialien:

Primer: Für die PCR-Amplifikation mußten Starthilfen bzw. Primer genau komplementär zur DNA-Vorlage sein. Es wurde darauf geachtet, dass eine Dimer-Bildung der beiden Primer und die Sekundärstruktur-Bildung innerhalb eines Primers durch Selbstkomplementarität unwahrscheinlich war. Die Primer-Synthese erfolgte durch Gibco BRL.

Polymerase: Für die RT-PCR wurden pfu-DNA-Polymerase und Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim) verwendet.

Die Taq-DNA-Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym ursprünglich aus *Thermophilus aquaticus*, heutzutage gentechnisch hergestellt. Die optimale Temperatur für diese Polymerase liegt bei 70-80° C. Bei dieser Temperatur

synthetisiert sie DNA mit einer Geschwindigkeit von 35-100 Nukleotiden pro Sekunde.

Desoxynukleosidtriphosphate: Die hochreine Formen, dNTPs, wurden für die PCR als Mischung aller vier dNTP-Moleküle (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) angewendet (Boehringer Mannheim).

Puffer: Für die PCR wurde ein 10-fach-konzentriertes Gemisch (Gibco BRL) verwendet.

DNA-Matrize bzw. Template.

Als Substrat für die PCR eignete sich sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA oder RNA. Für den Versuch wurde Gesamt-RNA verwendet.

Methode:

Folgende Komponenten wurden auf Eis in ein steriles 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, gemischt und durch kurzes Zentrifugieren gesammelt:

Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer, 500 µg/ml (Boehringer Mannheim): 1 µl Gesamt-RNA: 0,5-5 µg.

Die Komponenten wurden mit sterilem ddH₂O auf 12 µl aufgefüllt.

Ein zusätzlicher Ansatz enthielt zwar alle RT-Reagenzien, aber keine Gesamt-RNA bzw. Leer-Transkript, um später in der PCR die Komponenten der RT-Reaktion auf Kontamination überprüfen zu können.

Die Ansätze wurden bei 70° C 10 min denaturiert, 2 min auf Eis abgekühlt und durch kurzes Zentrifugieren gesammelt.

Anschließend wurden den Ansätzen auf Eis folgende Komponente hinzugefügt: 4 µl 5× First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix.

Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde gemischt und durch kurzes Zentrifugieren gesammelt.

Die RT-Ansätze wurden 2 min auf 37 ° C vorgewärmt.

1 µl reverse Transkriptase (Super Script II, Life Technologies) wurde hinzugefügt und die Komponente wurden gemischt.

Die reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 42 ° C.

Die cDNA Probe konnte nun sofort in die PCR eingesetzt oder bei -20 ° C gelagert werden.

3.16.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Materialien:

Super Script II RNase H⁻, M-MLV reverse Transkriptase, 200 u/μl (Gibco BRL), Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer, 500 μg/ml (Boehringer Mannheim), 5× First Strand Buffer, 250 mM Tris/ HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1 M DTT, 10 mM dNTP-Mix: 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Boehringer Mannheim), Taq-Polymerase, 5 U/μl (Qiagen), PCR-Puffer, 10× (Qiagen): 15 mM MgCl₂, pH 8,7; Q-Lösung, 5× (Qiagen): Betain, keine genaue Angabe der Zusammensetzung, 25 mM MgCl₂ (Qiagen), steriles ddH₂O, DMSO (Sigma), Formamid (Life Technologies), Glycerol (Sigma), Polyethylenglycol 6000 (PEG) (Pharmacia Biotech), Tween 20 (Fluka).

Aufgrund des exponentiellen Charakters der PCR mußten selbst kleinste Verunreinigungen von Reagenzien und Materialien mit PCR-Produkt vermieden werden. Das Hantieren des PCR-Ansatzes fand räumlich getrennt von dem Ort statt, an dem das PCR-Produkt analysiert wurde. Alle für die PCR bestimmten Reagenzien wurden in Aliquots gelagert. Mit PCR-Produkt verunreinigte Reagenzien wurden ausgetauscht, verunreinigte Gegenstände wurden mit kurzzeitigem UV-Licht bestrahlt oder mit 1 M HCl behandelt.

Methode:

Für eine Standard-PCR-Reaktion wurden die in Tabelle 9 angegebenen Komponenten in einem auf Eis vorgekühlten dünnwandigen 0,2 ml-Reaktionsgefäß in der angegebenen Reihenfolge gemischt.

Tabelle 9: Komponenten einer Standard-PCR-Reaktion.

	Komponenten	Volumen/ Reaktion	Endmenge im Ansatz
PCR Mix	10×PCR-Puffer (Quiagen)	10 µl	1x
	25 mM MgCl ₂	6 µl	1,5 mM
	10 mM dNTP-Mix	2 µl	200 µM
	10 µM „Forward“-Primer	2 µl	200 pmol
	10 µM „Reverse“-Primer	2 µl	20 pmol
	steriles ddH ₂ O	83,5-x µl	-
cDNA	Rev. transkribierte Ges.- RNA	x µl	0,5-2 µg/ 100 µl
Enzym	Taq DNA Polymerase	0,5 µl	2 u/ 100µl

Der PCR-Mix wurde für alle Reaktionen, die unter den gleichen Bedingungen ablaufen sollten, gemeinsam in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt, gemischt und anschließend auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt. Tabelle 9 zeigt die einzelnen Zusammensetzungen einer PCR-Reaktion.

Bei jeder PCR wurden außer den eigentlichen Probe-Reaktionen auch Negativ-Kontrollen angesetzt:

Um die PCR-Reagenzien auf Kontamination zu überprüfen, wurde die cDNA-Probe durch H₂O ersetzt.

Um die RT-Reagenzien auf Kontamination zu überprüfen, wurde die cDNA-Probe durch „Leer-Transkript“ ersetzt.

Um die in der RT-Reaktion eingesetzte RNA auf Verunreinigung mit DNA zu überprüfen, wurde die cDNA-Probe durch nicht revers transkribierte RNA ersetzt.

Sofort nach der Zugabe der Taq-Polymerase wurden die Proben in den „Thermocycler“ gesetzt. Da der Deckel des Geräts beheizt war, und so ein Verdunsten der Proben nicht drohte, war das Überschichten der Proben mit Mineralöl nicht

notwendig. Ein Standard-Programm für den „Thermo-Cycler“ ist in Tabelle 10 dargestellt.

Für jedes Primer-Paar mußte die optimale „Annealing“-Temperatur ermittelt werden. Sofort nach der Zugabe der Taq-Polymerase wurden die Proben in den „Thermo-Cycler“ überführt.

Nach Beendigung des PCR-Programms konnten die Proben über Nacht bei 4° C oder für längere Zeit bei -20 ° C gelagert werden.

Tabelle 10: Phasen des Standard-Programms des „Thermo-Cyclers“

Denaturieren der cDNA Matrize zu Beginn:	5 min	94° C
3-Schritt-PCR:		
Denaturieren	1 min	94° C
„Annealing“	1 min	56° C
„Extension“	1,5 min	72° C
Zahl der Zyklen	20 bis 42	
Verlängerung der entstandenen PCR-Produkte an Ende	10 min	72° C

Ergebnisse

4 Expression und Reinigung des zytoplasmatischen Endes von DRA als rekombinantes Protein in E.coli (prokaryote Expression)

Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen polyklonalen Antikörper gegen DRA herzustellen. Als Antigen sollte der zytoplasmatisch gelegene C-Terminus des Proteins dienen. Dieser beginnt einer Computeranalyse zufolge bei Aminosäure 505. Daher war bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit dieser Teil der cDNA von DRA mittels PCR amplifiziert worden, wobei Restriktionsschnittstellen in die Primer inkorporiert worden waren (am 5'Ende eine NdeI und am 3'Ende eine Xho-Schnittstelle), um die nachfolgende Klonierung in den Expressionsvektor pET16b zu ermöglichen.

Von diesem Produkt hatte sich jedoch kein rekombinantes Protein exprimieren lassen, so dass nun eine alternative Strategie zu entwickeln war. Es war daher, ebenfalls noch vor Beginn der vorliegenden Arbeit, ein kürzerer Teil des DRA-C-Terminus, beginnend bei bp1881, entsprechend Aminosäure 566 in pET30c kloniert worden. Hierfür war die bei bp1881 gelegene EcoRI-Schnittstelle verwendet worden.

Abbildung 7 zeigt das Konstrukt pET 30c/C-DRA short mit dem N-terminalen His- und S-Tag sowie den Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI, über die das C-DRA-short –Insert kloniert worden war.

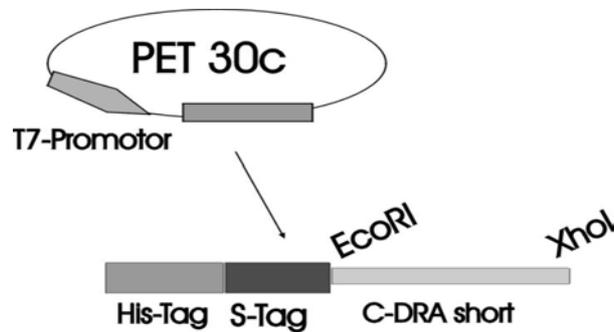


Abbildung 7: Das Konstrukt pET 30c/C-DRA short

4.1 Expression von His-S-Tag-Fusionsprotein in E.coli BL21 DE3

Der C-Terminus von DRA wurde als His-S-Tag-Fusionsprotein (Konstrukt pET30/C-DRA short) in E.coli BL21 DE3 mittels Induktion durch IPTG exprimiert. Abbildung 8 zeigt, dass dieses etwas kürzere Konstrukt nach IPTG-Induktion in E.coli BL21 DE3 stark exprimiert wird.

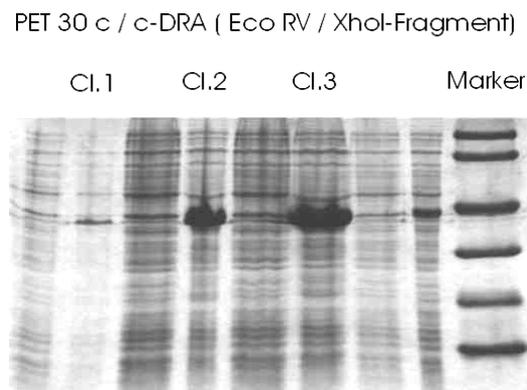


Abbildung 8: Induktion von HS-C-DRA short in E.coli BL21 DE3: Jeweils Zustand vor und nach Induktion (Coomassie-gefärbtes Gel).

Im folgenden wurden verschiedene Versuche unternommen, dieses Protein in Lösung zu bringen. Dazu wurde das Bakterien-Pellet unter Verwendung verschiedener Puffer gelöst, die entstehende Suspension anschließend zentrifugiert (4°C 15000 rpm 15 min) und der Überstand erneut auf ein Coomassie-gefärbtes Gel aufgetragen, um zu klären, ob HS-C-DRA short nun im Überstand nachzuweisen war. Im einzelnen wurden folgende Lyse-Verfahren und Lyse-Puffer getestet:

250 mM NaCl bei 4°C

500 M NaCl bei 4°C

500 M NaCl + 1% NP40 bei 4°C

6 M Harnstoff bei 4°C

6 M GnHCl bei 37° und Schüttel-Inkubation für 30 min.

Es zeigte sich, dass das HS-C-DRA Konstrukt lediglich in 6 M GnHCl in Lösung ging. Selbst die als denaturierend geltende „Lyse“ in 6 M Harnstoff vermochte das Konstrukt nicht in Lösung zu bringen. Dieser Befund ist typisch für die Aggregation des induzierten Konstruktes in Einschlusskörperchen.

Nach der Lyse erfolgte die Purifikation der Proteine mittels Nickel-Resin Reinigung.

4.2 Purifikation des HS-C-DRA mittels Nickel-Resin

Reinigung

Der Expressionsvektor pET 30c exprimiert einen N-terminalen Hexahistidin-Tag am klonierten Fusionsprotein. Dieser Tag besitzt eine hohe Affinität zu Nickel, welche die Purifikation des Fusionsproteins an Nickel-Agarose erlaubt (siehe Abbildung 9). Dieses Reinigungsverfahren hat den großen Vorteil, dass es auch unter denaturierenden Bedingungen funktioniert. Dies war notwendig, weil das rekombinante Protein HS-C-DRA, wie oben dargelegt, in Einschlusskörperchen („inclusion bodies“) aggregierte und diese Aggregation nur durch Denaturierung aufzuschließen war.

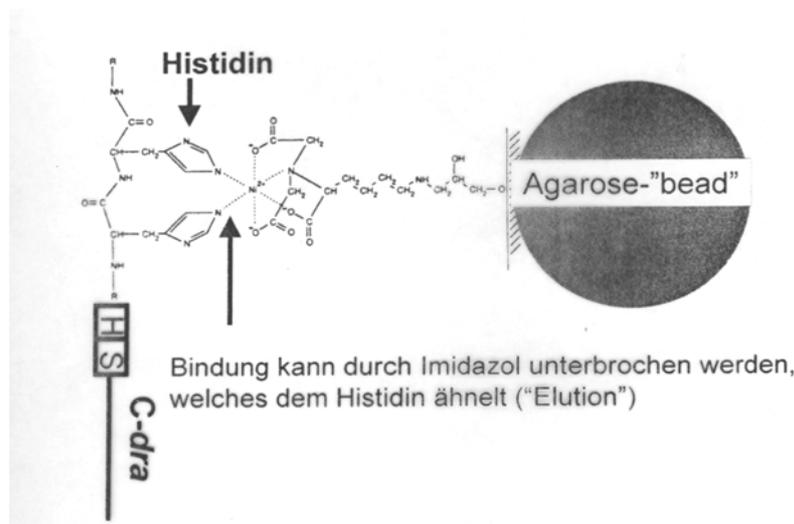


Abbildung 9: Modell der Bindung zwischen dem Nickel-Agarose-, „bead“ und dem getaggten zytoplasmatischen DRA.

Entgegen der Angaben des Herstellers der Nickel-Agarose (Quiagen) bindet das Histidin-Fusionsprotein in Anwesenheit von 6 M GnHCl nicht effektiv an die Nickel-Agarose. Erst nach einer Verdünnung auf 2 M GnHCl lässt sich eine gute Bindung erreichen. Durch Aufschluß unter denaturierenden Bedingungen und durch wiederholtes Waschen in 2 M GnHCl ließ sich zwar eine reine Fraktion gewinnen; das auf diese Weise gewonnene Protein präzipitierte jedoch, wenn es im Rahmen des finalen Pufferaustausches konzentriert wurde. Nach der Lyse der Bakterien mit 6 M GnHCl und

der Bindung des rekombinanten Proteins an die Nickel-Agarose in 2 M GnHCl erfolgte daher eine langsame Renaturierung des Proteins an der Nickel-Agarose in folgender Weise (Abbildung 10 zeigt die im Rahmen der Reinigung entnommenen Kontrollen):

Nach der Lyse der Bakterien mit 6 M GnHCl wurde das Lysat, „after induction“ (a.i.) bei 15000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet getrennt; danach befand sich HS-C-DRA short als lösliches Protein im Überstand. Sowohl vom Überstand als auch vom Pellet wurden Proben als Kontrolle entnommen. Diese Proben entsprachen 1:1000 vom Volumen des dazu gehörigen Überstands oder Pellets. Der Überstand (Ü1) wurde von 6 M auf 2 M GnHCl verdünnt. Bei 10 ml Lösung wurde Ü1 durch Zugabe von 20 ml Puffer bestehend aus 0 M GnHCl, 100 mM NaH₂PO₄ und 10 mM Tris, pH 8,0 verdünnt. 1/1000 des Volumens vom Ü1 wurde als Kontrolle aufgehoben. Der Ü1 wurde mit ca. 1 ml gewaschener Nickel-Agarose bei 4° C für 30 min inkubiert. Die Probe wurde bei 4° C mit 1000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Überstand (Ü2) wurde entfernt. 1/1000 des Volumens vom Überstand (Ü2) wurde als Kontrolle aufgehoben. Im folgenden wurde die Nickel-Agarose 4 mal mit je 10 ml kaltem Waschpuffer mit abnehmender GnHCl-Konzentration gewaschen; und zwar 1 M GnHCl, 0,5 M GnHCl, 0,25 M GnHCl, 0,125 M GnHCl. Dabei wurde ebenfalls jeweils 1/1000 des Volumens der Überstände des Waschvorganges als Kontrolle aufgehoben. Abschließend erfolgte die Elution des an der Nickel-Agarose verbliebenen HS-C-DRA mittels 1 M Imidazol. Imidazol ähnelt dem Histidin und verdrängt so kompetitiv die Hexahistidin-Tags von ihren Bindungsstellen am Nickel. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 1 ml Elutionpuffer zum Pellet bestehend aus HS-C-DRA und Nickel-Resin. Der Elutionspuffer wurde mit dem Pellet bei 4° C für 15-20 min inkubiert und die Probe anschließend bei 4° C mit 1000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde als „after purification 1“ (a.p.1) bezeichnet und enthielt den Großteil des gereinigten Proteins. 1/1000 des Volumens von a.p.1 wurde auf das Kontroll-Gel aufgetragen. Der Rest stand für die eigentliche Anwendung, die Immunisierung zur Verfügung. Erneut wurde 1 ml des Elutionpuffers zum Pellet hinzugegeben. Die Probe wurde für 15-20 min inkubiert und bei 4° C mit 1000 rpm

für 1 min zentrifugiert. Der neue Überstand, als „after purification 2“ (a.p.2) bezeichnet, wurde ebenfalls asserviert und wiederum 1/1000 des Volumens als Kontrolle aufgehoben.

Zusammenfassend erfolgte nach der IPTG-Induktion des Promotors des Expressionssystems die Lyse der Bakterien. Die Trennung der spezifischen von den unspezifischen Proteinen war durch die selektive Bindung von DRA über den His-Tag an die Nickel-Agarose möglich. Abschließend fand die Elution mittels Imidazol statt.

Abbildung 10 zeigt ein Coomassie-gefärbtes 12%-iges PAGE-Gel mit je einem Tausendstel der verschiedenen Fraktionen der Purifikation. Die bei ca 32 kDa laufende dicke Bande entspricht dem induzierten HS-C-DRA Konstrukt. Die zweite Spur zeigt das durch 6M GuHCl in Lösung gebrachte Material und beweist den Aufschluss von HS-C-DRA aus den Einschlusskörperchen. Die folgenden Spuren zeigen die Überstände der verschiedenen Wasch- und Renaturierungsschritte. Es zeigt sich, dass im Rahmen des Waschens jeweils etwas HS-C-DRA von der Nickel-Agarose gelöst und so für die Reinigung verloren geht. Die beiden Spuren mit dem eluierten Material (a.p.1 und a.p.2) zeigen, dass HS-C-DRA schließlich als fast kontaminationsfreie Fraktion vorliegt. Die letzte Spur zeigt Material, das nach der Elution mit 1 M Imidazol noch durch eine weitere „Elution“ mit heißem Laemmli-Sample-Buffer von den Beads gelöst werden konnte. Es befindet sich also offensichtlich auch nach 2-maliger Elution mit 1M Imidazol noch HS-C-DRA an der Nickel-Agarose. Es wurden keine weiteren Anstrengungen unternommen, dieses Material zu gewinnen.

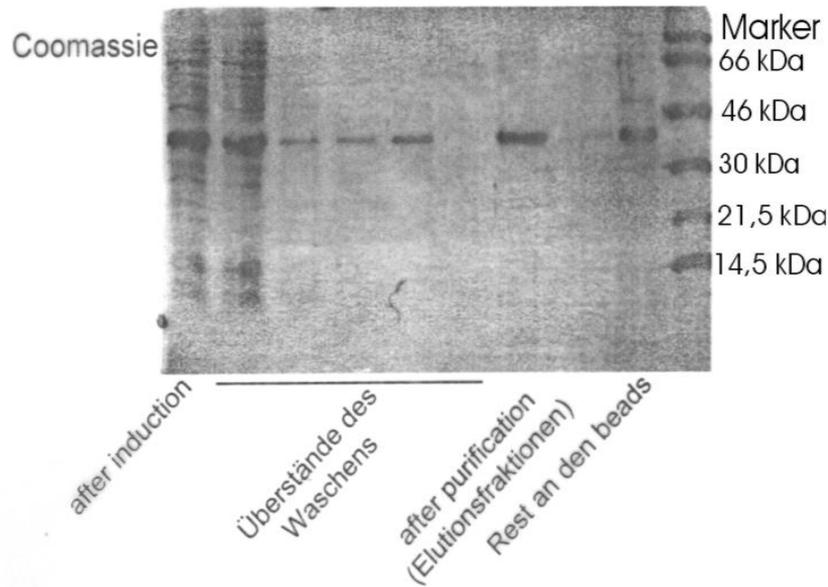


Abbildung 10: Expression und Reinigung des rekombinanten Immunogens.

Zusammenfassend gelang die Expression und Purifikation des zytoplasmatischen C-Terminus von DRA als His-S-Fusionsprotein auf diese Weise mit hoher Ausbeute ($> 1 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ Medium, Protein-Messung nach der Lowry-Methode, Abschnitt 3.13) und hoher Reinheit ($> 99\%$), so dass es für die Immunisierung der Kaninchen geeignet schien. Vorher musste jedoch noch der Elutions-Puffer gegen einen für die Kaninchen verträglichen Puffer ausgetauscht werden. Hierfür wurden die a.p.1- und a.p.2-Fractionen gepoolt, mit dem Austauschpuffer (120 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1% SDS pH 7,5) gemischt und das Material mittels eines Mikrofilters mit einem „molecular cut off“ von 10.000 kDa konzentriert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, wodurch der Anteil des Elutionspuffers auf $<10\%$, entsprechend einer Imidazolkonzentration von kleiner 100 mM, gesenkt wurde. Das 0.1% SDS im Austauschpuffer erwies sich dabei als notwendig, um zu verhindern, dass das HS-C-DRA Material während des Pufferaustausches präzipitiert. Dieses Material wurde schließlich als Immunogen für zwei Kaninchen verwendet. Tabelle 11 fasst noch einmal den Ablauf der Reinigung des Immunogens und die Zusammensetzung der verwendeten Puffer zusammen.

Tabelle 11: Schematische Darstellung der Purifikation des zytoplasmatischen DRA mittels Nickel-Resin-Reinigung, der schrittweise entstandenen Fraktionen sowie der dafür verwendeten Puffer

Schritte	Fraktion	Puffer
Lyse	„after induction“	6 M GnHCl 10 mM Tris pH8,0
Bindung an Nickel-Resin		2 M GnHCl 10 mM Tris pH8,0
Mehrfaches Waschen des Resins und Renaturierung	Überstände des Waschens	2 M bis 0,125 M GnHCl 10 mM Tris pH8,0
Elution mit Imidazol	„after purification“	1 M Imidazol 250 mM NaCl 50 mM Tris pH 8,0
Pufferaustausch		120 mM NaCl 10 mM Tris 0,1% SDS

4.3 Immunisierung von zwei Kaninchen

Die Immunisierung von zwei Kaninchen wurde von der Biogenes GmbH in Berlin durchgeführt. Die Tiere wurden initial mit 250 µg HS-C-DRA injiziert und anschließend in 2-4 Wochen-Abständen insgesamt 3x mit je 100 µg HS-C-DRA geboostert. Dadurch wurden ein Präimmunserum, zwei Testseren und zwei Produktionsseren gewonnen.

4.4 Klonierung von C-DRA short in pET 16b

Während der Immunisierungszeit der Kaninchen wurde klar, dass das Antiserum möglicherweise nicht oder nur in geringem Maße den C-DRA-Teil des His-S-C-DRA Fusionsproteins, sondern stattdessen vielleicht überwiegend den S-Tag erkennen würde. Der His-Tag gilt als nicht oder nur wenig immunogen. Daher wurde als Kontrolle das C-DRA-short-Konstrukt in pET 16b kloniert. Dieser Vektor exprimiert ein His-Tag Fusionsprotein ohne einen zusätzlichen S-Tag.

Da pET 16b keine EcoRI-Schnittstelle in seiner multiplen „cloning site“ besitzt, mußte zunächst das C-DRA-short-Konstrukt mittels PCR unter Einbau einer BamHI für eine mögliche Klonierung in pET30c und einer NdeI-Schnittstelle für die Klonierung in pET16b in den sense und einer XhoI-Schnittstelle in den antisense Primer amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 TOPO kloniert und von dort in den Expressionsvektor pET16b subkloniert.

Die PCR-Modifikation der Enden von C-DRA wurde vorgenommen, um ihre Klonierung in pET 16b zu ermöglichen. Der Vektor wurde dabei mittels Restriktionsendonukleasen an NdeI und XhoI-Schnittstellen verdaut. Abbildung 11 zeigt diesen Ansatz schematisch.

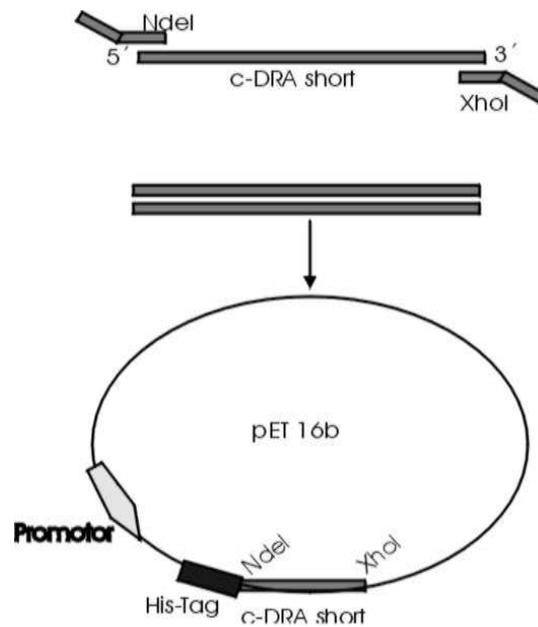


Abbildung 11: PCR-Modifikation der „Enden“ von C-DRA , um Klonierung in pET 16b zu ermöglichen.

4.4.1 PCR-Amplifikation von C-DRA short für die Klonierung in pET16b

Ausgangsmaterial des Versuches war das schon zu Beginn der vorliegenden Arbeit vorhandene Konstrukt pBS-KS/C-DRA (long).

Die Amplifikation erfolgte mit dem „sense-Primer“ **PPRIM CATATG *GGATCC* CGAATTCTACGCAAGCGCAAC**, der eine NdeI- und eine BamHI-Schnittstellen trägt (fett und fett-kursiv hervorgehoben), und mit dem „antisense-Primer“ **MPRIM *CTCGAG* TCATTATTAGAATTTTGTTC**AACTGGCACC, der eine XhoI-Schnittstelle beinhaltet (fett hervorgehoben). Um das Risiko einer Mutation im Rahmen der PCR zu minimieren, wurde die proof-reading DNA-Polymerase pfu verwendet.

Pfu-DNA-Polymerase wird aus dem äußerst thermophilen marinen Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*, pfu, isoliert. Sie wird heutzutage auch gentechnisch hergestellt. Sie besitzt sowohl eine 5'→3'-DNA-Polymeraseaktivität als auch eine

3'→5'-Exonuklease-Proofreading-Aktivität. Die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität steigert die Präzision der DNA-Synthese, da sie am 3'-Ende falsch angeheftete und gepaarte Nukleotide entfernt, und an deren Stelle das richtige Nukleotid einsetzt (pfu-DNA-Polymerase, Stratagene).

Die PCR wurde wie in Abschnitt 3.16.1 dargestellt durchgeführt; es wurden die in Tabelle 12 angegebenen PCR-Bedingungen gewählt.

Tabelle 12: Phasen der PCR-Amplifikation von C-DRA short für die Klonierung in pET 16b

Phase	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
1. Denaturierung	1 min	94° C	30
2. „Annealing“	1 min	55° C	30
3. Extension	1,5 min	72° C	30

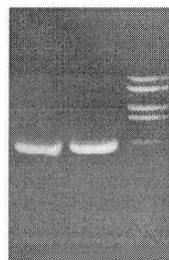


Abbildung 12: Nachweis des Amplifikationserfolges mit der NdeI- (erste Reihe) und der XhoI-Schnittstelle (zweite Reihe).

4.4.2 Klonierung von C-DRA-short (PCR-Produkt) in pCR 2.1

TOPO

Das PCR-Produkt C-DRA short wurde mittels TOPO TA Cloning in den pCR 2.1 TOPO Vektor kloniert. Der pCR 2.1 TOPO-Vektor enthält ein überhängendes T. Das mit pfu amplifizierte C-DRA PCR-Produkt hat dagegen „blunt ends“. Die Ligation

zwischen Vektor und C-DRA war aufgrund dieser Enden unmöglich. Eine Modifikation des „blunt end“ war aufgrund eines zusätzlichen Überhangs an 3'Ende vom PCR-Produkt mit Adenosinen möglich. Dieser Vorgang wurde durch Taq-Polymerase katalysiert (siehe Abbildung 13). Hierfür wurde das PCR-Produkt mit Phenol und Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und anschließend in H₂O aufgenommen. Die Adeninaddition erfolgte dann mittels Extension der PCR bei 72°C für 10 min.

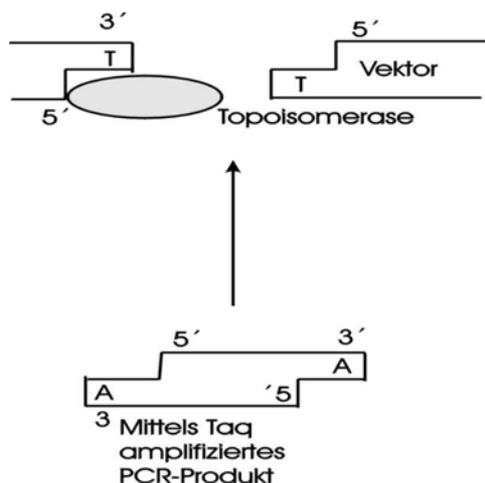


Abbildung 13: Modell der Topoisomerasenfunktion an „sticky ends“ der pCR 2.1 TOPO Vektoren (Invitrogen).

Die Klonierung des amplifizierten PCR-Produktes und der Transformation erfolgte wie in Abschnitt 3.16.1 beschrieben.

Ausgangsmaterial waren 2 µl C-DRA-short cDNA (modifiziertes PCR-Produkt) und 1 µl PCR 2.1 Topo Vector. Mit ddH₂O wurde auf ein finales Volumen von 5 µl aufgefüllt.

pCR 2.1 TOPO / DRA cDNA wurde vorsichtig geschüttelt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationszeit durfte nicht länger als 5 min betragen, da sonst die Transformationseffizienz abfallen würde.

Es wurden 0,5 M β-Mercaptoethanol hinzugefügt.

Es wurden 2 µl TOPO Cloning Reaktionsprodukt in 50 µl „One Shot“ kompetente Zellen transformiert. Es wurde vorsichtig gemischt und im Eis für 30 min inkubiert.

Der Komplex wurde für 30 sec im Wasserbad bei 42° C, ohne dabei zu schütteln, inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis gestellt.

Es wurden 250 µl des raumtemperierten SOC-Mediums hinzugefügt.

Das Gefäß wurde in horizontaler Stellung für 30 min bei 37° C und 225 rpm geschüttelt.

Der Komplex aus pCR 2.1 TOPO / DRA cDNA wurde im SOC-Medium auf LB-Platten mit X-Gal und Kanamycin verteilt und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Transformationserfolg der Kolonien kontrolliert.

Weißer Kolonien entsprachen transformierten Kolonien. Blaue Kolonien waren nicht-transformierte Kolonien.

Anschließend erfolgte die Mini-Präparation von sechs weißen Kolonien und zuletzt der Verdau vom Plasmid-DNA mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und XhoI (siehe Abschnitt 3.3.1 und 3.3.3).

Folgende Komponente wurden zusammenpipettiert: 4 µl pCR 2.1 TOPO / DRA cDNA, 1 µl Restriktionsenzym NdeI, 1 µl Restriktionsenzym XhoI, 2 µl H-Puffer und 12 µl ddH₂O. Der Verdau erfolgte für 3 h bei 37° C.

In Abbildung 14 ist das Ergebnis des Restriktionsverdau auf dem 1,2% Agarose-Gel mit TAE-Puffer gezeigt. Die E.coli Kolonie Nr. 2 wurde erfolgreich mit pCR 2.1/ C-DRA short transformiert. Das Insert lag bei 650 bp und der Vektor bei 3,9 kb.

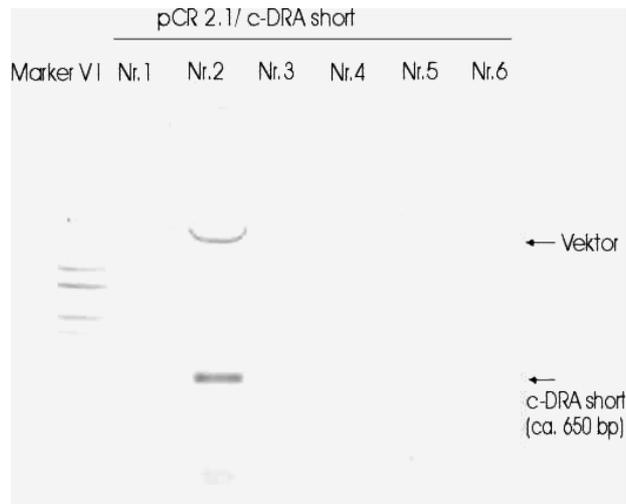


Abbildung 14: Nachweis des Transformationserfolges von *E.coli* (one shot) Kolonie 1-6 mit pCR2.1/C-DRA (invertiertes Bild).

4.4.3 Subklonierung von C-DRA-short in pET16b

Das Insert aus Abbildung 14 wurde ausgeschnitten, gereinigt und mittels T₄-Ligase an den mit NdeI und XhoI geschnittenen Vektor pET 16b ligiert. Das pET 16b/C-DRA Konstrukt wurde in kompetente *E.coli* NM522 transformiert. Um die Effektivität der Bindung zu überprüfen, wurde eine negative Kontrolle bzw. Konstrukt ohne Insert vorbereitet.

In Tabelle 13 sind die Zusammensetzungen für „Mock“- und für „Real“-Konstrukte aufgelistet.

Tabelle 13: Bindung von C-DRA an pET 16b und die dafür notwendige Zusammensetzung.

	mock	real
Vektor pET 16b, geschnitten mit NdeI und XhoI	4 µl	4 µl
Insert C-DRA , geschnitten mit NdeI und XhoI	--	1 µl
DNA-Verdünnungspuffer (5×) ddH ₂ O	2 µl	2 µl
H ₂ O	4 µl	3 µl
T ₄ -DNA-Ligationspuffer (2×)	10 µl	10 µl
T ₄ -Ligase	1 µl	1 µl

Der Erfolg der Klonierung konnte durch Vergleich der Zahl der Kolonien auf den „real“ Platten (erfolgreiche Klonierung) und den „mock“ Platten (Hintergrund) abgeschätzt werden. In diesem Experiment fanden sich mehr Kolonien auf den „real“ Platten.

Es erfolgte eine Mini-Präparation von vier Kolonien zur Plasmid-DNA-Gewinnung. Das Verdauen der Mini-Präparationsprodukte erfolgte erneut mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und XhoI.

In Abbildung 15 ist das Ergebnis des Restriktionsverdaus der Kolonien dargestellt. Alle vier Kolonien enthielten das richtige Insert. Das pET 16b/C-DRA in E.coli NM522 Kolonie Nr. 3 wurde für die Umklonierung in BL21 DE3 verwendet.

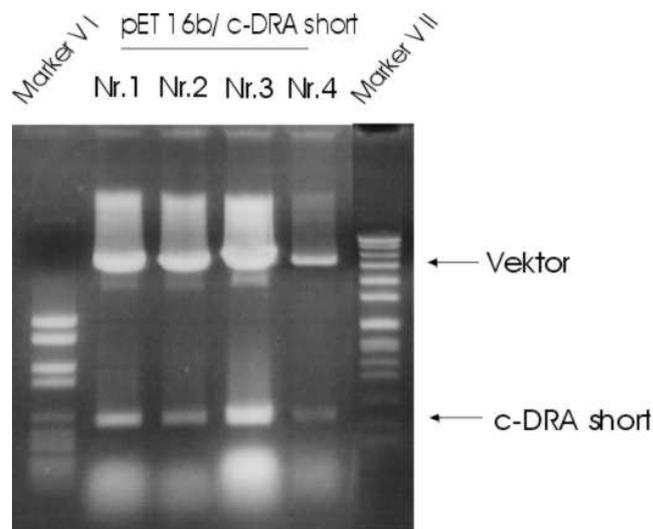


Abbildung 15: Nachweis des Transformationserfolges von pET16b/C-DRA in *E.coli* NM522.

4.5 Klonierung von HS-C-DRA in pcDNA3.1

Ziel dieses Ansatzes war es, C-DRA short plus den His- und S-Tag aus dem pET30c-Vektor in den eukaryoten Expressionsvektor pcDNA3.1 zu klonieren, um so ein in eukaryoten Zellen zu exprimierendes Kostrukt zu schaffen, an dem das generierte Antiserum getestet werden konnte.

Vor dem His-Tag lagen im pET30-Vektor eine XbaI- und eine NdeI-Restriktionsschnittstelle. Am Ende des C-DRA-short-Inserts kam nur die XhoI-Schnittstelle für die geplante Umklonierung in Frage. Im zur Verfügung stehenden pcDNA3.1+ Vektor lagen XbaI und XhoI jedoch genau umgekehrt zum Promotor, so dass das HS-C-DRA short Insert unter Verwendung von XbaI und XhoI falsch herum kloniert würde. Es wurde daher das nach dem XbaI-Verdau entstandene „sticky end“ zunächst unter Verwendung von pfu zu einem „blunt-end“ aufgefüllt und das Insert dann durch Verdau mit XhoI gewonnen. Nach Reinigung des Inserts wurde es „blunt-end/sticky-end“ in den mit EcoRV (gibt blunt Ends) und XhoI verdauten Vektor kloniert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die DNA jeweils mit

Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol/Natriumacetat präzipitiert, um die Reagenzien der vorangegangenen Reaktion zu entfernen.

Im einzelnen wurden folgende Reaktionen durchgeführt:

1. XbaI-Verdau:

pET30c/ C-DRA (short) [0.4 µg/µl]: 26 µl, XbaI: 1 µl, Boehringer-Puffer H: 3 µl, Präzipitation für 2 h und bei 70°. Anschließend wird die Probe abzentrifugiert.

2. Phenol/Chloroform-Extraktion:

100µl H₂O, 100 µl Phenol, 100 µl Chloroform. Die Komponente wurden geschüttelt, zentrifugiert, und die obere Phase abgenommen.

3. Ethanol-Präzipitation:

110 µl obere Phase der Extraktion, 11 µl Natriumacetat, 300 µl eiskaltes 100% Ethanol, Präzipitation für 2 h und bei 70°. Anschließend wird sie abzentrifugiert.

4. Auffüllen der XbaI-sticky ends:

pET30c/ C-DRA (short) [XbaI-geschnitten] 43 µl, 10 mM dNTP 1 µl, 10x pfu-Puffer 5 µl, pfu 1 µl, 5 min bei 72° in der PCR-Maschine.

5. Phenol/Chloroform-Extraktion:

70µl H₂O, 100 µl Phenol, 100 µl Chloroform. Die Komponente wurden geschüttelt, zentrifugiert, und die obere Phase abgenommen.

6. Ethanol-Präzipitation:

100 µl obere Phase der Extraktion, 10 µl Natriumacetat, 300 µl eiskaltes 100% Ethanol. Präzipitation für 2 h und bei 70°C. Anschließend wird sie abzentrifugiert.

7. XhoI-Verdau:

pET30c/ C-DRA (short) [XbaI > blunt] 50 µl, XhoI 2 µl, Boehringer-Puffer H 5,2 µl. Der Verdau erfolgte für 2 h und bei 37°C.

8. Vektor-Verdau mit EcoRV und XhoI:

pcDNA3.1 (0,8 µg/µl) 4 µl, EcoRV 1 µl, XhoI 1 µl, Boehringer-Puffer B 2 µl, 12 µl H₂O. Der Verdau erfolgte für 2 h und bei 37°C.

Abbildung 16 zeigt das Ergebnis dieses komplizierten Vorgehens, nämlich das modifizierte Insert und den geschnittenen Vektor.

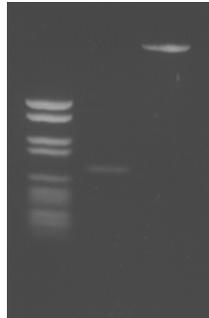


Abbildung 16: Quantifizierungsgel des mit EcoRV und XhoI geschnittenen Vektor pcDNA3.1 (rechte Spur) und des „geblunteten“ und mit XhoI geschnittenen Inserts HS-C-DRA Inserts (mittlere Spur)

Die Ligation erfolgte in der in Tabelle 14 dargestellten Weise:

Tabelle 14: Ligation von pcDNA3.1 mit HS-C-DRA

	Mock	Real
pcDNA3.1+ (EcoRV/XhoI)	1	1
HS-C-DRA (blunt/XhoI)	-	7
5x Puffer	2	2
H ₂ O	7	-
2x Puffer	10	10
T4-Ligase	1	1

Nach Transformation in kompetente NM522 und Kultur auf Ampicillin-Platten fanden sich wesentlich mehr Kolonien auf den Real- als auf den Mock-Platten.

Es wurden Minipräparationen von vier Kolonien gewonnen und mit BamHI und XhoI, bzw. durch Ausschneiden den C-DRA short Inserts ohne den His- und S-Tag, verdaut.

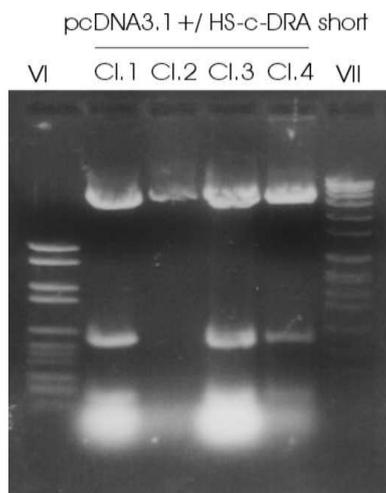


Abbildung 17: Produkte der Mini-Präparationen von pcDNA3.1+/HS-C-DRA.

In den Kolonien Nr. 1, 3 und 4 (siehe Abbildung 17) läßt sich pcDNA 3.1+/HS-C-DRA nachweisen.

Aus pcDNA 3.1+/HS-C-DRA Kolonie 4 wurde eine Midi-Präparation hergestellt (siehe Abschnitt 3.3.2), die im folgenden für die Transfektion von HEK 293 Zellen verwendet wurde.

5 Transfektion von DRA in HEK 293 Zellen (eukaryote Expression)

5.1 Transfektion von HEK 293 Zellen mit HS-C-DRA, sowie mit DRA-wild type, DRA-myc-His und LacZ- myc-His

HEK 293 Zellen wurden mit folgenden Konstrukten transfiziert:

- pcDNA3.1/HS-C-DRA
- pcDNA3.1/DRA-wild type
- pcDNA3.1/DRA-myc-His
- pcDNA3.1/LacZ-myc-His

Ziel war es ursprünglich, „full length“ DRA als ungetagtes Konstrukt zu exprimieren und hieran das generierte Antiserum zu testen (siehe hierzu Abschnitt 7.1). Als Kontrolle hierfür sollte full length DRA als C-terminales myc-His getagtes Konstrukt dienen, welches mit einem anti-myc Antikörper detektiert werden sollte. Als Kontrolle

hierfür diente wiederum LacZ-myc-His, welches mit demselben anti-myc Antikörper zu detektieren sein sollte.

Da nicht klar war, ob full length DRA (als wild type oder mit einem C-terminalen myc-His-Tag) überhaupt in HEK-Zellen zu exprimieren ist, wurde zusätzlich das als Immunogen verwendete HS-C-DRA-Konstrukt transfiziert.

Alle Konstrukte lagen in pcDNA3.1 vor, so dass Vektor-bedingte Unterschiede in der Expression ausgeschlossen werden konnten.

- Die Konstrukte pcDNA3.1/DRA-wild type und pcDNA3.1/DRA-myc-His wurden unabhängig von der vorliegenden Arbeit von Herrn Dr. Lamprecht kloniert und lagen als sterile Midi-Präparationen vor.

Die Transfektion aller Konstrukte in die HEK 293 Zellen wurde mittels Lipofectin durchgeführt (siehe Abschnitt 7.1.5). Die Selektion der transfizierten von den nicht-transfizierten Zellen erfolgte mittels G 418 (vergleiche Abschnitt 3.15.2).

5.1.1 Etablierung G 418-resistenter Zelllinien

Das HS-C-DRA Konstrukt wurde im eukaryoten Expressionsvektor pcDNA 3.1 mittels Lipofectin in HEK 293 Zellen transfiziert. Durch G 418-Selektion wurde eine stabile Transfektion bewirkt. Einerseits wurde eine nicht-klonale G 418-resistente Zelllinie erzeugt, andererseits wurden klonale Zelllinien etabliert, um möglichst einen oder mehrere Klone mit besonders starker Expression zu gewinnen.

In identischer Weise wurden gemischte und klonale Zelllinien der beiden full-length DRA-Konstrukte (DRA-wt und DRA-myc-His) etabliert. Als Kontrolle für den methodischen Ablauf der Etablierung klonaler Zelllinien und als Schätzwert für das Verhältnis von Klonen mit nachweisbarer Expression zu Klonen ohne nachweisbare Expression wurden außerdem klonale Zelllinien des LacZ-myc-His-Konstruktes etabliert.

6 Testung des Antiserums auf Sensitivität und Spezifität

6.1 Allgemeines

Die Testung des Antiserums erfolgte einerseits an rekombinant in Bakterien hergestelltem Protein (HS-C-DRA und H-S-DRA) und andererseits an Lysaten der mit den verschiedenen DRA-Konstrukten transfizierten HEK-Zellen. Im weiteren wurde dann auch gereinigtes Antiserum getestet.

6.1.1 Testung des Antiserums an rekombinant in Bakterien hergestelltem Protein (HS-C-DRA und H-C-DRA)

Als Immunogen für die Kaninchen wurde HS-C-DRA verwendet, also ein Konstrukt, welches nicht nur DRA sondern zusätzlich den His- und den S-Tag beinhaltet. Das Immunogen bot sich daher als Testantigen für die Frage der Sensitivität an, mit der das Antiserum das Antigen erkennt. Andererseits war die Frage zu klären, ob tatsächlich der

DRA-Anteil des Immunogens – und nicht der S-Tag - erkannt wird. Hierfür wurden daher das HS-C-DRA und das H-C-DRA-Konstrukt, welches ja keinen S-Tag trägt, miteinander verglichen. Beide Konstrukte tragen den kurzen His-Tag, der jedoch als wenig immunogen gilt, so dass die Reaktion des Antiserums mit diesem Epitop nicht weiter untersucht wurde.

Um die Frage der Sensitivität abschätzen zu können, wurden jeweils zunehmende Verdünnungen beider Konstrukte miteinander verglichen. Die Verdünnung des Antiserums betrug jeweils 1:3000; sekundärer Antikörper: anti-Rabbit 1:3000; Expositionszeit: < 1 sec.

Abbildung 18 zeigt das Ergebnis dieses Experimentes. Auf der rechten Seite ist ein Coomassie-gefärbtes Gel mit den unverdünnten Konstrukten HS-C-DRA und H-C-DRA abgebildet. Es zeigt, dass jeweils etwas mehr H-C-DRA als HS-C-DRA eingesetzt wurde. Es ist auch zu erkennen, dass das H-C-DRA-Konstrukt (ca. 30 kDa) etwa 2 kDa kleiner ist als das HS-C-DRA-Konstrukt (ca. 32 kDa), passend zum fehlenden S-Tag.

Passend zur etwas geringeren Menge HS-C-DRA wird dieses Konstrukt auf den verschiedenen Verdünnungsstufen (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) im Western-Blot (Abbildung 18, linke Seite) jeweils etwas schlechter erkannt als das H-C-DRA-Konstrukt. Dies bedeutet, dass nicht der S-Tag, sondern der DRA-Anteil die entscheidenden antigenen Epitope trägt.

Anhand der eingesetzten Antigenmenge wurde abgeschätzt, dass das Antiserum in einer Verdünnung von 1:3000 ca. 1-10 ng des Antigens erkennt.

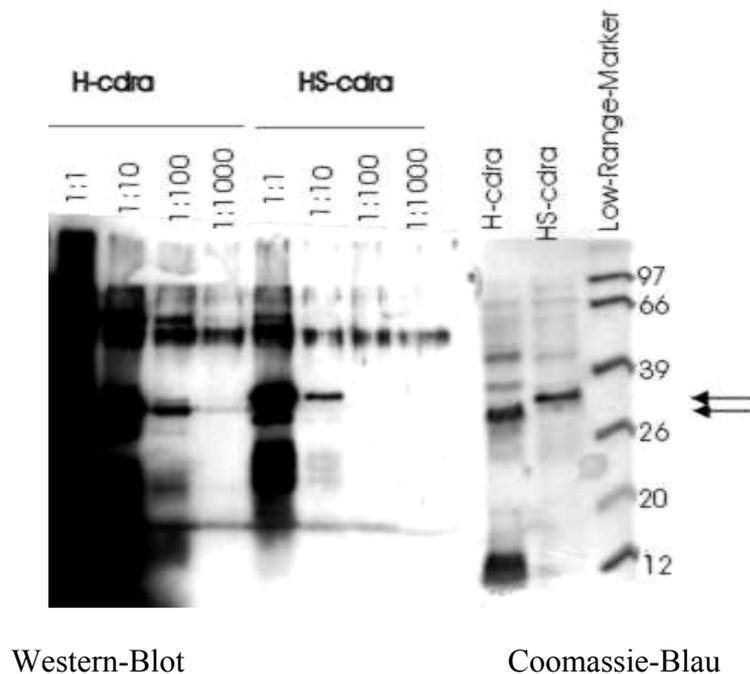


Abbildung 18: H-C-DRA und HS-C-DRA in Western-Blot und Coomassie-Blau-Färbung. Während die Sensitivität im Ersteren zu beobachten ist, läßt sich die Spezifität im Letzteren feststellen.

6.1.2 Testung des Antiserums an Lysaten transfizierter Zellen

Für die Testung des Antiserums wurden jeweils Komplett-Lysate der Zellen (also ohne vorangehende subzelluläre Fraktionierung) gewonnen. Es wurde prinzipiell folgender Lyse-Puffer verwendet: 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5. Ihm wurden Protease-Inhibitoren in der in Abschnitt 3.15.5 genannten Weise zugefügt. Für die Zellyse wurden zwei verschiedene Detergenzienzusätze verwendet, nämlich die sogenannte RIPA-Kombination von 0,1% SDS, 0,5% Natrium-Desoxycholat und 1% TritonX100 oder alternativ 1% Triton X-100 ohne zusätzliches Natrium-Desoxycholat und ohne SDS. Dabei konnte kein Unterschied hinsichtlich des Nachweises von LacZ-myc-His und HS-C-DRA festgestellt werden.

Die Expression von HS-C-DRA in transfizierten HEK 293-Zellen (nichtklonale, „gemischte“ Zelllinie: HEK 293/HS-C-DRA Passage 41+2) wurde mit Hilfe des

Antiserums im Western-Blot an Zellysaten getestet. Als negative Kontrolle dienten HEK 293 Zellen, die mit LacZ-myc-His transfiziert waren (nichtklonale, „gemischte“ Zelllinie: HEK 293/LacZ-MH Passage 41+2), und als positive Kontrolle das bakteriell exprimierte HS-C-DRA Konstrukt (vergleiche Abschnitt 4.2. und 5.1)

Auf dem 12%-igen PAGE-Gel wurde jeweils diesselbe Proteinmenge der Zellysate (70 µg) aufgetragen. Das bakteriell exprimierte HS-C-DRA (Fraktion a.p.1) wurde mit 10-facher und 100-facher Verdünnung aufgetragen. Das anti-DRA-Antiserum (primärer Antikörper) wurde wiederum in einer Verdünnung von 1:3000 über Nacht inkubiert; sekundärer Antikörper anti-Rabbit 1:3000 (Inkubation für 2 h); Expositionszeit:30 sec.

Abbildung 19 zeigt das Ergebnis dieses Experimentes. Es ist zu erkennen, dass im Lysat der HEK 293/HS-C-DRA Zellen mit dem anti-DRA-Antiserum eine Bande auf derselben Höhe wie das bakteriell exprimierte HS-C-DRA nachzuweisen ist (32 kDa). Diese Bande fehlt in der Negativ-Kontrolle Eine unmittelbar darunter laufende Bande und mehrere höher laufende Banden sind allerdings auch in den HEK/LacZ-myc-His Zellen nachzuweisen. Sie werden also unspezifisch vom anti-DRA-Antiserum erkannt, was auf eine ungenügende Reinheit des Antiserums hinweist.

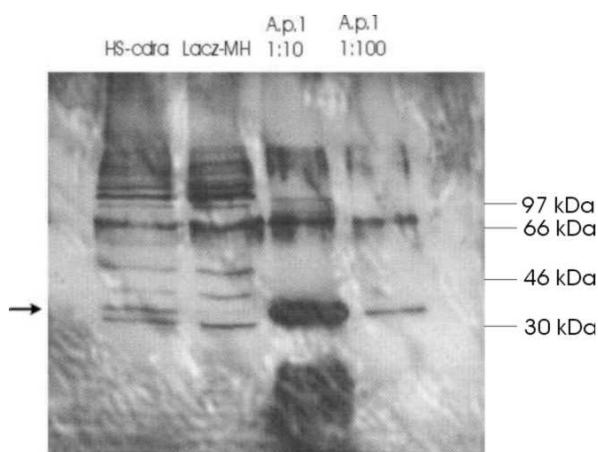


Abbildung 19: Kontrolle des Transfektionserfolges von HEK 293 Zellen mit HS-C-DRA mittels Western-Blot.

Um den erhobenen Befund zu bestätigen, wurden im folgenden klonale Zelllinien der mit HS-C-DRA transfizierten HEK 293 Zellen (HEK 293/HS-C-DRA Clon 3, 6, 7, 11

und 12, jeweils Passage 41+3) untersucht. In diesem Fall dienten nicht-transfizierte HEK 293 Zellen als Negativ-Kontrolle. Als Positiv-Kontrolle diente erneut das bakteriell exprimierte HS-C-DRA (a.p.1 Fraktion in einer Verdünnung von 1:10). Das anti-DRA-Antiserum (primärer Antikörper) wurde wiederum in einer Verdünnung von 1:3000 über Nacht inkubiert; sekundärer Antikörper anti-Rabbit 1:3000 (Inkubation für 2 h); Expositionszeit: 40 sec.

Abbildung 20 zeigt das Ergebnis dieses Western-Blots. In allen HEK 293/ HS-C-DRA Klonen ließ sich die 32 kDa-Bande, die dem HS-C-DRA-Protein entspricht, nachweisen. HEK 293/ HS-C-DRA Klon 3 zeigte die maximale Expression von HS-C-DRA. In den nicht-transfizierten HEK 293 Zellen war diese Bande nicht nachweisbar. Interessanterweise war die unmittelbar darunter laufende Bande, die ja in den HEK 293/LacZ-myc-His transfizierten Zellen aufgefallen und als unspezifisch eingeschätzt worden war (siehe Abbildungen 19 und 20) an den nicht-transfizierten HEK 293 Zellen nicht nachzuweisen. Erneut fanden sich die unspezifischen Banden im höher-molekularen Bereich.

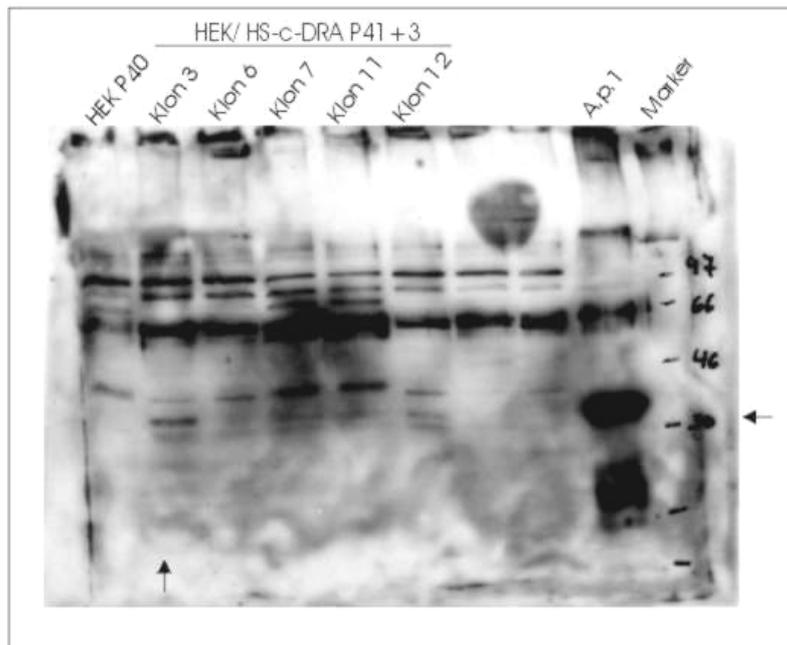


Abbildung 20: Klonale Zelllinie von HS-C-DRA

6.1.3 Testung des anti-DRA-Antiserums an full length DRA-transfizierten HEK 293 Zellen (HEK 293/DRA-wt und HEK 293/DRA-myc-His)

Eigentliches Ziel der Entwicklung eines anti-DRA-Antiserums war der Nachweis von full length DRA als ungetaggtetes, „wild type“ Protein. Hierfür wurden HEK 293 Zellen mit dem ungetaggteten Konstrukt pcDNA3.1/DRA-wt und dem myc-His-getaggteten Konstrukt pcDNA3.1/DRA-myc-His transfiziert (siehe Abschnitt 5.1). Obwohl jeweils G 418-resistente Zelllinien gewonnen werden konnten, ließ sich an diesen nicht-klonalen, „gemischten Zelllinien“ weder mit dem anti-DRA-Antiserum noch mit dem monoklonalen anti-myc-Antikörper full length DRA oder das myc-His-getaggte full length DRA Konstrukt nachweisen.

In der Folge wurden von diesen nicht-klonalen Zelllinien dann jeweils Zellklone etabliert unter der Annahme, dass die Expression auf wenige Klone beschränkt sein könnte. Es wurde jeweils ca. 10 Klone expandiert und getestet. Allerdings ließ sich auch

an diesen Klonen weder das ungetaggte, „wild type“ full length DRA oder das myc-His-getaggte full length DRA Konstrukt nachweisen.

6.2 Kontrolle für die Etablierung klonaler Zelllinien: HEK 293/LacZ-myc-His

Angesichts der zu diesem Zeitpunkt unverstandenen Probleme bei der Transfektion bzw. Expression von full length DRA wurde ein Kontrollexperiment mit der Expression eines vergleichbar großen Konstruktes, nämlich LacZ, exprimiert als LacZ-myc-His-Konstrukt, unternommen. Nach demselben Prinzip wie bei HS-C-DRA und bei den beiden full length DRA-Konstrukten wurde einerseits eine stabil transfizierte, nicht-klonale, „gemischte“ Zelllinie etabliert und andererseits Zellklone hiervon gewonnen.

Die Konstrukte wurden lysiert und anschließend auf ein 8%-iges PAGE-Gel aufgetragen. Verwendete Konstrukte waren HEK/Lacz-myc-His Klone 2-6, 14 und 17 (jeweils Passage 41 + 4) und die nicht-klonale, „gemischte“ Zelllinie. Als primärer Antikörper kam ein monoklonaler anti-Myc-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 zum Einsatz; sekundärer Antikörper waren anti-Mouse-Antikörper 1:3000; Expositionszeit: 1 sec.

Abbildung 21 zeigt, dass sowohl die nicht-klonale, „gemischte“ Zelllinie als auch die Klone 2, 4, 5, 14 und 17 das LacZ-myc-His-Konstrukt exprimieren. In den Lysaten von Klon 3 und 6 ließ sich hingegen keine LacZ-MH-Expression nachweisen. Klon 4 zeigt die maximale Expression.

Dieses Experiment zeigt, dass mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methodik auch ein großes Konstrukt wie LacZ-myc-His in HEK 293 Zellen erfolgreich transfiziert und exprimiert werden kann und dass der Anteil der Klone mit nachweisbarer Expression –zumindest für dieses Konstrukt (LacZ-myc-His) und diesen Antikörper (anti-myc)– bei über 50% liegt.

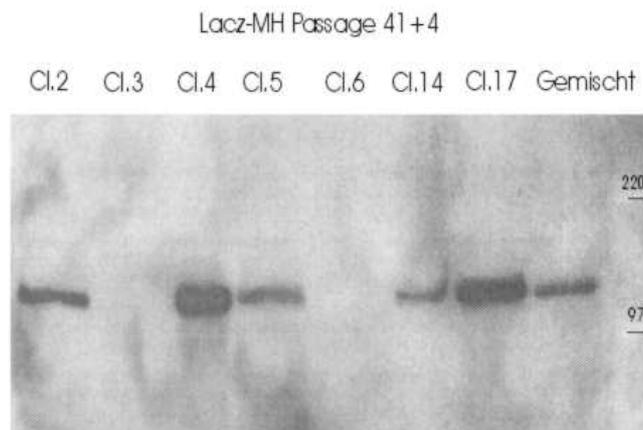


Abbildung 21: Nachweis von Lac-Z-myc-His mittels anti-mac-Antikörper an einer nicht-klonalen und mehreren klonalen Zelllinien von HEK/LacZ-MH (Passage 41+4).

6.3 Reinigung des anti-DRA-Antiserums

Das gewonnene Antiserum gegen DRA erkannte auch diverse Banden unspezifisch (siehe Abbildungen 18, 19 und 20). Es musste daher gereinigt werden. Das Prinzip der Antikörperreinigung beruht darauf, eine reversible Antigen-Antikörper-Reaktion an einem gereinigten Antigen zu induzieren, auf diese Weise unspezifisch reagierende Antikörper zu entfernen, und dann die spezifisch bindenden Antikörper aus der reversiblen Bindung wiederzugewinnen. Als gereinigtes Antigen wurde für diesen Ansatz das Immunogen HS-C-DRA verwendet.

6.3.1 Pilotversuch

Im Rahmen eines Pilotversuches wurde die Reinigung des Antigens zunächst auf einer mit HS-C-DRA beladenen Nitrozellulose-Membran getestet. Das Verfahren ähnelt einem Western-Blot mit sehr viel Antigen, wobei der Blot nach Inkubation mit dem primären Antikörper (ungereinigtes Antiserum) nicht „entwickelt“ sondern das im

Rahmen des Waschens gereinigte Antiserum durch saure Elution wiedergewonnen wird.

Im einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

HS-C-DRA wurde in mehrere Taschen eines SDS-PAGE-Gels aufgetragen (12%-Gel, Dicke: 1,5 mm), und zwar so, dass zwischen der ersten und dritten Spur der Molecular Weight Marker lief.

Die erste Spur des Gels wurde dann zusammen mit der Spur des Markers abgetrennt und gefärbt. Der Rest des Gels wurde auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet.

Die Marker des gefärbten Gelanteils und die Marker auf der Nitrozellulose wurden aneinandergelegt. Auf diese Weise war erkennbar, wo auf der Nitrozellulose-Membran die HS-C-DRA-Bande zu erwarten war. Die Membran wurde auf der Höhe des im Coomassie-Gel erkennbaren C-DRA-Band ausgeschnitten. Dieser Streifen Nitrocellulose-Membran wurde im folgenden als eine mit HS-C-DRA beladene Affinitätsmatrix verwendet.

Im folgenden wurde 1 ml des ungereinigten anti-DRA-Antiserums mit diesem HS-C-DRA beladenen Membranstreifen über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Membran wurde 4 mal für 5 min mit PBS gewaschen.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion auf der Membran wurde nun durch Inkubation mit 900 µl 100 mM Glycin, pH 2,5. (saure Elution) unterbrochen (10 min per Hand stark geschüttelt).

Die das gereinigte Antiserum enthaltende Glycin-Lösung wurde abgenommen und mit 90 µl 1 M Tris-Lösung, pH 8,0 neutralisiert. Diese Elution wurde dreimal wiederholt.

Das Ergebnis dieses Pilotexperimentes wurde an Lysaten der Zelllinie HEK 293/HS-C-DRA Klon 3 getestet. Hierzu wurden die einzelnen Spuren einer Blot-Membran als individuelle Western-Blots verarbeitet; und zwar indem sie mit unterschiedlichen Verdünnungen (1:30 bis 1:2000) des gereinigten Antiserums als primärem Antikörper inkubiert wurden. Eine 1:3000 Verdünnung des ungereinigten Antiserums diente als Kontrolle. Abbildung 22 zeigt das Ergebnis: Die dargestellte Reinigung führte dazu, dass die Mehrzahl der unspezifisch

erkannten Banden verschwand und lediglich die spezifische Bande bei 32 kDa und eine prominente unspezifische Bande bei etwa 65 kDa erkannt wurde. Die Reinigung war mit einem Titerverlust von 1:3000 (ungereinigtes Antiserum) auf 1:150 (im Pilotexperiment gereinigtes Antiserum) verbunden. Außerdem führte diese Art der Reinigung zu einem erheblichen Materialverlust.

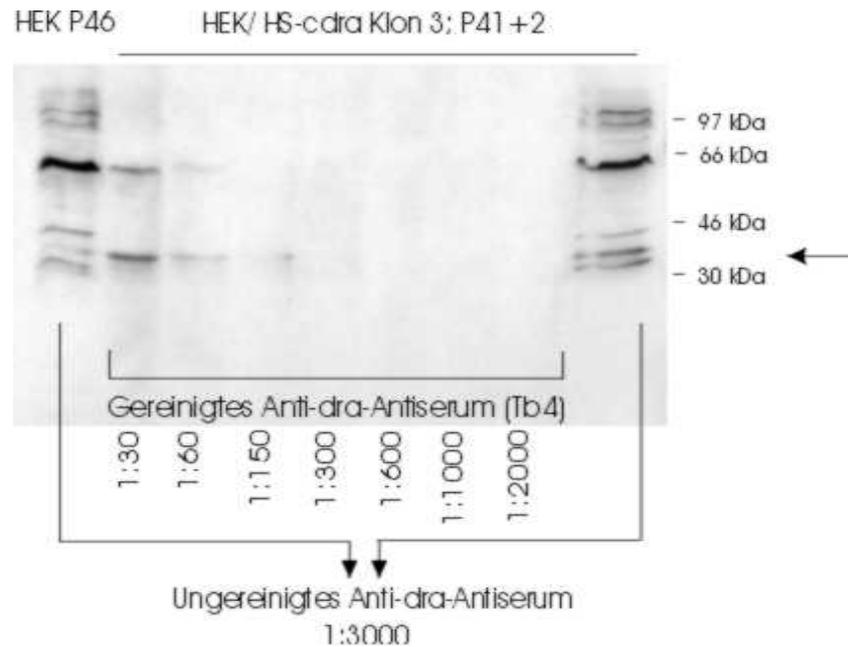


Abbildung 22: Affinitätsreinigung des Antiserums

6.3.2 Reinigung an einer Affinitätssäule

Im Anschluß an den erfolgreichen Pilotversuch wurde eine klassische Affinitätsreinigung des Antiserums durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Affinitätssäule mittels N-Hydroxylsuccinimid-aktivierter Sepharose (Affigel 15, Biorad) hergestellt, an der rekombinant in E.coli exprimiertes HS-C-DRA kovalent gebunden wurde. Zunächst wurden ca 2 mg HS-C-DRA gereinigt, wobei allerdings statt TRIS Natrium-Phosphat als Puffersubstanz verwendet wurde, da die Affinitätsmatrix (Affigel 15) mit primären Aminen reagiert und sich so die Verwendung von TRIS verbietet. Ein abschließender Pufferaustausch des

gerinigten, in 1 M Imidazol eluierten HS-C-DRA war nicht notwendig, da Imidazol zwar ein Stickstoff-Atom im Imidazol-Ring enthält, der jedoch kein primäres Amin darstellt.

Der berechnete pK_i von HS-C-DRA liegt bei 5.97; daher wurde Affigel 15 verwendet, da es besonders gut Proteine mit saurem pK_i bindet.

Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

3 ml der Affigel 15 Suspension, entsprechend 1.5 ml der Matrix, wurden mit eiskaltem 10 ml 10 mM Natrium-Acetat, pH 4.5 gewaschen und der Überstand abzentrifugiert.

5 ml der ebenfalls eiskalten HS-C-DRA Lösung für 4 Stunden bei 4 °C mit dem Resin unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert.

Die Suspension wurde auf eine Säule geladen und der Überstand durchlaufen gelassen.

Nicht-besetzte Bindungsstellen wurden mit 150 µl 1 M Ethanolamin, pH 8.0 geblockt.

Die Säule wurde mehrfach mit PBS gewaschen.

5 ml des abschließenden Bleeds eines der beiden Kaninchen (Antiserum 2057) wurden auf die Säule geladen und insgesamt dreimal durchlaufen gelassen.

Die Säule wurde 2 mal mit je 10 ml PBS gewaschen.

Die Säule wurde 1 x mit 10 mM NaPO₄, pH 6.8 gewaschen.

Die gereinigten, noch an der Affinitätssäule retinierten Antikörper wurden mit 4x 1 ml 100 mM Glycin, pH 2.5 in vier Eppendorff-Reaktionsgefäße eluiert, in die jeweils 50 µl 1M NaPO₄, pH 8.0 vorgelegt waren, um eine sofortige Neutralisation des Eluats zu bewirken (Fraktionen A1-A4).

Die Säule wurde 1x mit 10 mM NaPO₄, pH 6.8 gewaschen.

Die gereinigten, noch an der Affinitätssäule retinierten und durch die saure Elution nicht heruntergewaschenen Antikörper wurden mit 4x 1ml 100mM Triethanolamin pH 11.5 in vier Eppendorff-Reaktionsgefäße eluiert, in die jeweils 50 µl 1M NaPO₄, pH 6.8 vorgelegt, um eine sofortige Neutralisation des Eluats zu bewirken (Fraktionen B1-B4).

Den Fraktionen A1 bis A4 und B1 bis B4 wurde jeweils 10 µl 1% Merthiolat als Konservierungsmittel zugefügt.

Das gereinigte Antiserum ist nach Ende des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit sowohl für den Immunfluoreszenz-Nachweis als auch für Westernblots zum Nachweis von DRA wiederholt erfolgreich verwendet worden (siehe hierzu Abschnitt 7.1.7).

6.4 Semiquantitative RT-PCR aller Transfektionsansätze

Nachdem mehrere Transfektionen mit den Konstrukten HEK 293/DRA-wt und HEK 293/DRA-MH ohne positive Erkennung durch die jeweilige Antikörper (anti-DRA-Antikörper, anti-Myc-Antikörper) erfolgten, wurde ein semiquantitatives RT-PCR durchgeführt, um die mRNA-Expression zu analysieren. Als Vergleich zu den transfizierten HEK Zellen wurden Caco-2-Zellen, aus denen DRA ursprünglich kloniert wurde und der hoch-exprimierende Klon 3 der HEK/HS-C-DRA Zellen verwendet.

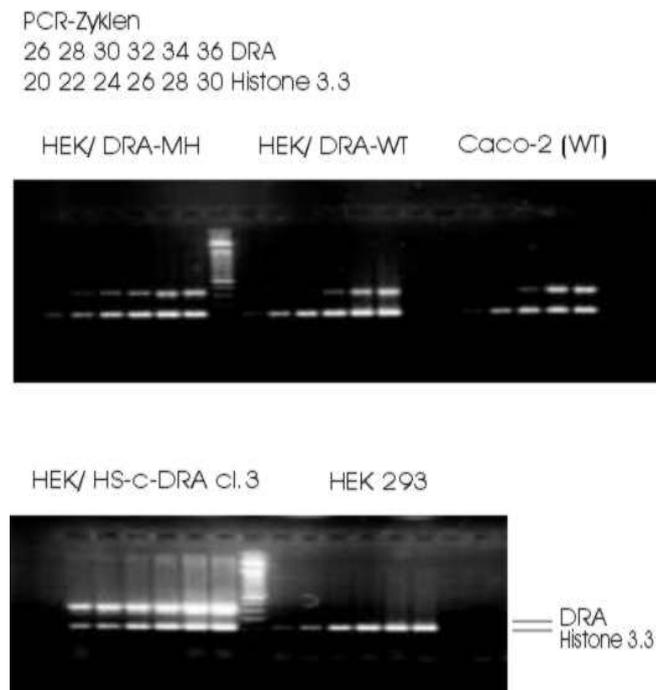


Abbildung 23: PCR als Nachweis des Transfektionserfolges.

In der Abbildung 23 ist die Amplifikation der genannten Konstrukte aus jeweils 4 µg Gesamt-RNA mit steigender Zyklenzahl dargestellt. In den Abbildungen 24 bis 28 ist

die integrierte optische Dichte, ODI, (vertikal) als Funktion der Zyklenzahl (horizontalen) aufgetragen. Die Histon 3.3a-Kurve diente jeweils als interne Kontrolle für die quantitative Auswertung der PCR-Daten. Der erwünschte parallele Verlauf der Kurven deutete auf ähnliche Amplifikationseffizienz von interessierendem Gen und Kontrolle. Im exponentiellem Bereich der Reaktion wurden der Quotient DRA-wt/Histon 3.3a, Quotient DRA-MH/Histon 3.3a, Quotient DRA-C-DRA/Histon 3.3a bzw. Quotient nicht-transfizierte HEK/Histon 3.3a errechnet. Entsprechende PCR-Reaktionen für jede Fraktion wurden dreimal durchgeführt. Abbildung 29 gibt das in dieser Weise berechnete Expressionsniveau der jeweiligen Konstrukte wieder. In nicht-transfizierten HEK-Zellen fand sich kein DRA-RT-PCR-Signal.

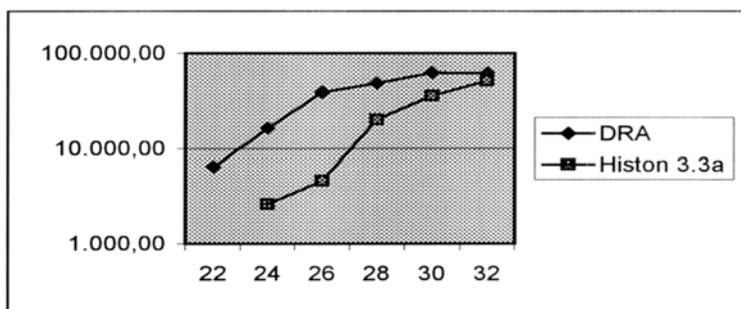


Abbildung 24: Amplifikationskurve von HEK/HS-C-DRA cl.3 aus 4 µg Gesamt-RNA.

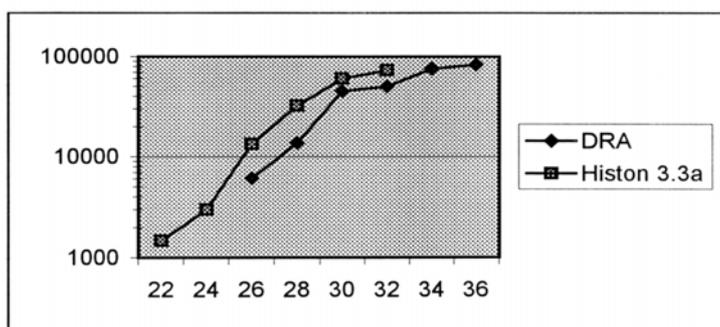


Abbildung 25: Amplifikationskurve von HEK/DRA-wt aus 4 µg Gesamt-RNA.

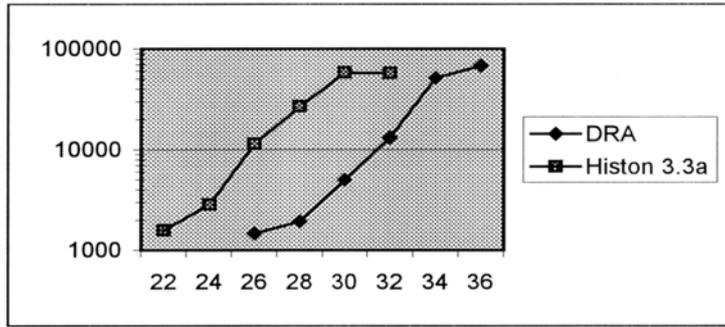


Abbildung 26: Amplifikationskurve von HEK/DRA-MH aus 4 µg Gesamt-RNA.

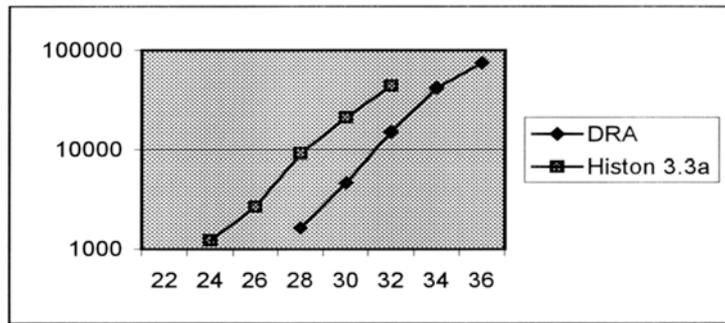


Abbildung 27: Amplifikationskurve von Caco 2 aus 4 µg Gesamt-RNA.

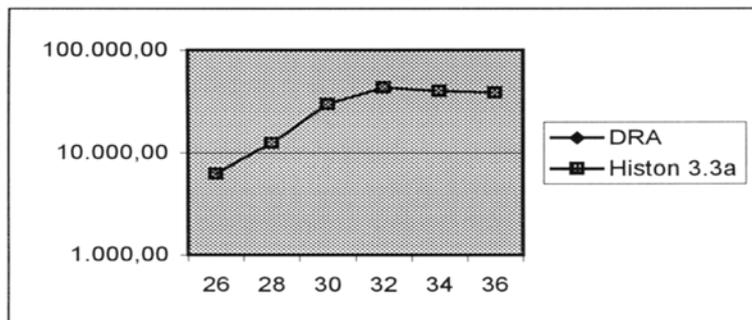


Abbildung 28: Amplifikationskurve von HEK 293 (negative Kontrolle) aus 4 µg Gesamt-RNA.

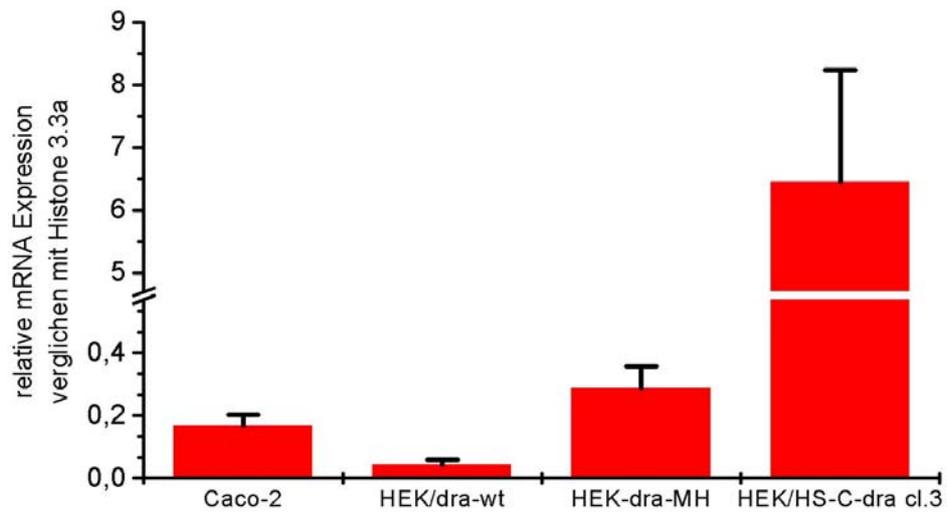


Abbildung 29: Relative Expressionsniveaus unterschiedlicher DRA-Konstrukte anhand einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse.

HS-C-DRA verfügte über eine vielfach stärkere m-RNA-Expression als die anderen Konstrukte. Das Expressionsniveau der DRA-wt- und DRA-MH-mRNA erwiesen sich als so niedrig, dass die daraus resultierende Proteinmenge wahrscheinlich zu gering ist, um vom anti-DRA- oder anti-myc-Antiserum erkannt zu werden.

Diskussion und Zusammenfassung

7 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein polyklonales Antiserum gegen DRA zu entwickeln und dieses Antiserum an einem heterolog mit DRA transfizierten Expressionssystem zu testen. Die für dieses Ziel durchzuführende Vorgänge werden lassen sich in drei Schritten zusammenfassen:

- A:** Entwicklung eines Antikörpers, der das DRA-Genprodukt spezifisch als Antigen erkennt.
- B:** Transfektion/ Expression einer humanen Zelllinie mit DRA.
- C:** Nachweis der DRA-Expression mit dem dafür zu entwickelnden Antikörper.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt, die im folgenden diskutiert werden:

- 1) Es wurde ein Teil des C-Terminus von DRA als Immunogen rekombinant in E.coli exprimiert.
- 2) Dieses Antigen wurde in ausreichender Menge gereinigt.
- 3) Es wurden zwei Kaninchen mit dem gereinigten Antigen immunisiert.
- 4) Das gewonnene Antiserum wurde an dem rekombinant in E.coli exprimierten Immunogen getestet.

- 5) Da es nicht gelungen ist, eine full length DRA exprimierende HEK 293 Zelllinie zu etablieren, wurde alternativ eine das Immunogen, also den C-Terminus von DRA, exprimierende HEK 293 Zelllinie etabliert, von der im folgenden klonale Zelllinien gewonnen wurden. An diesen wurde das Antiserum erfolgreich getestet.
- 6) Das Antiserum wurde gereinigt.

7.1 Expression und Reinigung des DRA-Immunogens

Die im Labor verwendete DNA-Sequenz für die gesamte Länge von DRA wurde mittels RT-PCR aus Caco 2-Zellen (bp 134-2529) kloniert. Dieses full length cDNA Konstrukt im Vektor pBS stand bereits zu Beginn der Arbeit zur Verfügung.

Caco 2 gehört zu den humanen Epithelzelllinien, die endogen DRA exprimieren (nachgewiesen auf mRNA-Ebene (Roßmann: unveröffentlichte Daten, Lamprecht: unveröffentlichte Daten, Alrifai, AJP 2001)) und die dem Magen-Darm-Trakt entstammen. Diese Zellen exprimieren DRA in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsgrad. Vermutlich regulieren sie auch DRA auf physiologische Weise. Sie werden außerdem aufgrund ihres schnellen Wachstums gerne in der Molekularbiologie verwendet. Ein wesentlicher Nachteil jedoch ist die Schleimproduktion, die charakteristisch für diese schleimbildenden Zellen ist und für eine Lyse der Zellen einen Störfaktor darstellt.

DRA besteht aus insgesamt 764 Aminosäuren. Anhand der hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften der verschiedenen DRA-Abschnitte ist erkennbar, dass das Protein einen kurzen hydrophilen N-Terminus, mehrere Transmembrandomänen im Bereich der N-terminalen 2/3 des Proteins und einen recht langen C-Terminus besitzt (Byeon et al., 1999, Moseley et al., 1999).

Der kurze, mitmaßlich intrazellulär gelegene N-Terminus von DRA erscheint als Immunogen zu kurz. Außerdem bestehen Hinweise darauf, dass der N-Terminus als Signalpeptid im Rahmen der Biosynthese von DRA abgespalten wird (Byeon et al.,

1996). Für diesen Fall hätte ein gegen den N-Terminus gerichtetes Antiserum in vivo full length DRA nicht als Antigen erkennen können, weil das vom Antiserum erkannte Epitop abgespalten ist.

Das DRA-Genprodukt ist ein Transmembranprotein. Die transmembranären Anteile solcher Proteine sind im nativen Zustand Antikörpern nicht zugänglich und lassen sich in E.coli im allgemeinen nicht als rekombinante Proteine exprimieren. Die Transmembrandomäne von DRA erschien daher nicht als Immunogen geeignet.

Das C-terminale Ende von DRA ist deutlich länger und besitzt einer Computervorhersage (PC-Gen) zufolge mehrere antigene Epitope. Der C-Terminus erschien daher das Immunogen der Wahl für eine rekombinante Expression in E.coli. Ebenfalls einer Computeranalyse zufolge stellt Prolin 505 den Beginn des zytoplasmatischen Endes von DRA dar.

Abbildung 30 zeigt eine vereinfachte Darstellung der gesamten Länge von DRA und den zytoplasmatischen Abschnitt, der als Antigen determinante fungiert.

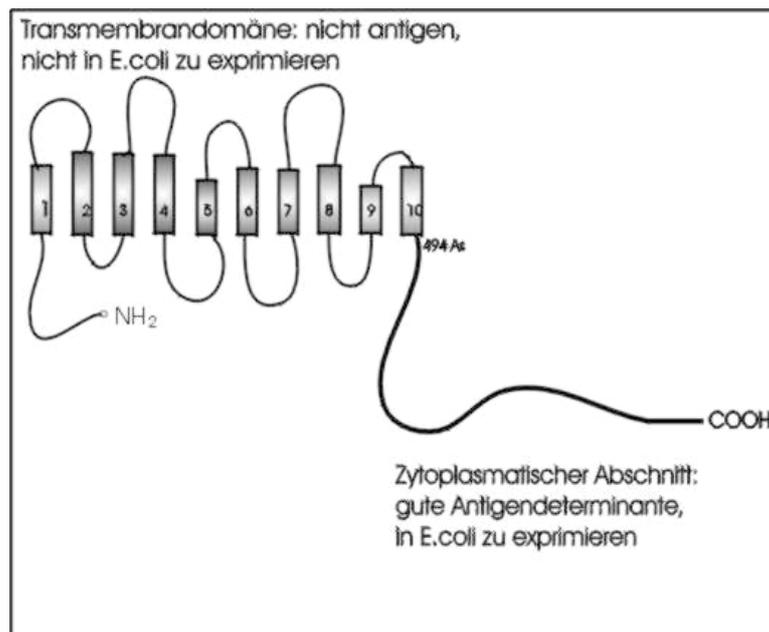


Abbildung 30: Zytoplasmatischer c-Terminus als Antigen determinante.

Auf der Basis dieser Überlegungen war bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit ein Expressionskonstrukt des gesamten, 291 Aminosäuren langen zytoplasmatischen C-Terminus von DRA für die Expression in E.coli kloniert worden (pET16b/C-DRA long). Das entsprechende bei der Aminosäure Prolin 505 beginnende zytoplasmatische bis zum Stop-Codon reichende Protein (C-DRA long) wurde jedoch aus unbekanntem Gründen in E.coli nicht exprimiert.

Es wurde daher stattdessen mittels einer günstig gelegenen EcoRI-Schnittstelle (bp 1881) ein bei Aminosäure Isoleucin-566 beginnendes Konstrukt in E.coli als „C-DRA short“ (bzw. im folgenden „C-DRA“) kloniert, pET30c/C-DRA short (siehe Abschnitt 4.4). Dieses Konstrukt lässt sich sehr stark in E.coli exprimieren. Die Reinigung dieses Immunogens erfolgte mittels des aus dem pET-Expressionssystem stammenden Affinitäts-Tags (Histidin-Tag).

Im folgenden sind die Funktionsweise des verwendeten pET-Expressionssystems dargestellt sowie seine Vor- und Nachteile diskutiert.

7.1.1 Das pET-Expressionssystem

Basis der rekombinanten Proteinexpression in E.coli ist die Überlegung, dass Proteine nur sehr schwierig und nur unter großem Aufwand in größeren Mengen in vitro zu synthetisieren sind, wie sie für die Immunisierung von Kaninchen benötigt werden. Die Synthese von antigenen Peptiden mit einer Länge von üblicherweise etwa 20 Aminosäuren ist eine alternative Möglichkeit, die hiermit gewonnenen Antiseren sind jedoch häufig nicht so sensitiv wie Antiseren, die gegen größere Proteine entwickelt wurden. DNA lässt sich vergleichsweise einfach manipulieren und es lassen sich so Expressionskonstrukte klonieren, die nach Transformation in E.coli dessen DNA-Replikationsapparat, sowie dessen RNA- und Proteinsyntheseapparat nutzen. Auf diese Weise lassen sich relativ große Proteine in vergleichsweise großen Mengen exprimieren. Um die Reinigung solcher rekombinant exprimierter Proteine zu ermöglichen, werden sogenannte Tags in das Expressionskonstrukt eingefügt, die eine Affinitätsreinigung ermöglichen. Die Sequenz für solche Tags stammt üblicherweise bereits aus dem Vektor.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren pET16 und pET30 aus dem pET-Expressionssystem kodieren beide für einen N-terminalen Hexahistidin-Tag der die Affinitätsreinigung sowohl unter nicht-denaturierenden als auch unter denaturierenden Bedingungen ermöglicht. Dieser Tag ist nicht antigen, was für die Entwicklung eines Immunogens hilfreich ist, da der Tag nach der Reinigung nicht entfernt werden muß, um die Entwicklung von gegen den Tag statt gegen das rekombinante Protein gerichteten Antikörpern zu verhindern. pET30 kodiert außerdem einen sogenannten S-Tag, der die Detektion des Fusionsproteins (Tag plus rekombinant exprimiertes Protein) mittels HRP-konjugiertem S-Protein nach Art eines Westernblots ermöglicht.

Diese Vektoren besitzen einen T₇-Promotor und lassen sich daher nur in einem speziellen E.coli-Stamm (BL21 DE3), der in seinem Genom eine T₇-RNA-Polymerase exprimiert, induzieren. Im BL21 DE3 steht die T₇-RNA-Polymerase unter Kontrolle des LacZ-Repressors. Mittels IPTG-Induktion wird die Wirkung vom Lac-Repressor aufgehoben, die T₇-RNA-Polymerase wird transkribiert und exprimiert und bindet im weiteren an den T₇-Promotor der pET-Expressionsvektoren. Hier vermittelt sie die

RNA-Synthese des Expressionskonstruktes, welche schließlich in Protein umgeschrieben wird.

Der Vorteil dieses Systems ist die nahezu vollständig fehlende Expression des pET-Konstruktes in Abwesenheit von IPTG (keine oder allenfalls minimale „Leakyness“) und die hohe Expression in Anwesenheit von IPTG, die darauf zurückgeführt wird, dass das pET-Konstrukt wegen seines viralen T₇-Promotors das einzige Target für die T₇-Polymerase ist. Der potentielle Nachteil dieses hocheffektiven Expressionsverfahrens liegt darin, dass das rekombinante Protein häufig in sogenannten Einschlusskörperchen aggregiert und aus diesen nur unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden kann.

Abbildung 31 zeigt ein Modell des Prinzips der IPTG induzierten Proteinexpression.

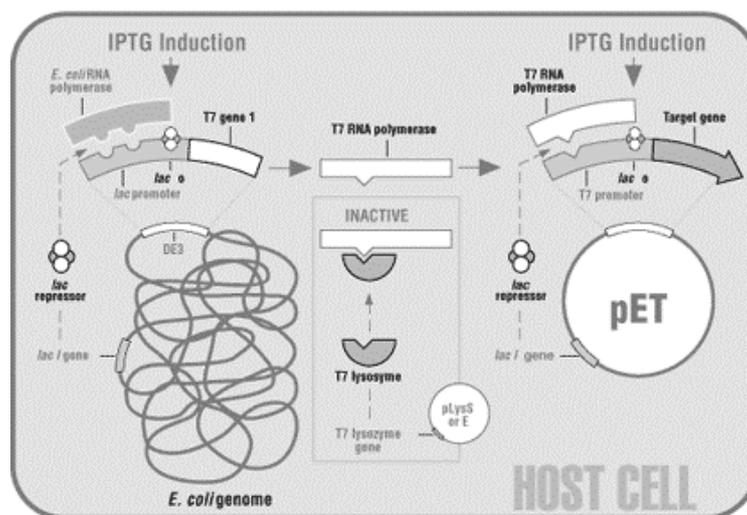


Abbildung 31: Modell des T₇-Promotors und des IPTG-Expressionssystems (Novagen).

Die Anwendung von E.coli NM522 für die „primäre“ Transformation des Ligationsproduktes erfolgt aus folgendem Grund:

Die Klonierung von C-DRA in pET 30c führt dazu, dass das Vektor seine natürliche Konformation verliert. Die Ursache liegt in dem „Schneiden“ des Vektors an Restriktionsschnittstellen. Der nicht mehr zirkuläre Vektor verliert automatisch seine

spiralisierte (supercoiled) Form. E.coli BL21 DE3, im Gegensatz zu E.coli NM522, kann nur fremde DNA aufnehmen, die eine „super coiled“-Struktur aufweist. Nach der Transformation des Ligationsproduktes pET 30c/C-DRA in E.coli NM522 wird die DNA in diesem E.coli-Stamm repliziert und erwirbt dabei wiederum die „supercoiled“ Konformation.

7.1.2 Reinigung von HS-C-DRA

In der Tat aggregierte das HS-C-DRA Fusionsprotein in Einschlusskörperchen. Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit bestand daher darin, eine geeignete Methode zum Aufschluss und zur Reinigung von HS-C-DRA aus diesen Einschlusskörperchen zu etablieren. Die Details des schließlich erfolgreichen Verfahrens sind in Abschnitt 4.2 dargestellt. Als entscheidender Schritt erwies sich der Aufschluss in 6 M Guanidinium-Hydrochlorid und die nachfolgende Verdünnung des Guanidinium-HCl auf 2 M, da sich das HS-C-DRA Konstrukt in Anwesenheit von 6 M GnHCl nicht an die Nickel-Agarose binden ließ. Um eine Renaturierung zu bewirken und die sehr hohe, für die Injektion in die Kaninchen unverträgliche GnHCl-Konzentration zu vermindern wurde während der üblichen Waschschriffe an der Agarose auch die GnHCl-Konzentration schrittweise auf 125 mM gesenkt. Die Elution erfolgte mittels 1 M Imidazol. Auch diese Pufferzusammensetzung ist nicht zur Injektion in Kaninchen geeignet, so dass der Puffer über einen Mikrofilter ausgetauscht werden musste. All diese Schritte sind mit einem Materialverlust verbunden. Trotzdem konnte schließlich genug Material, nämlich ca. 1 mg gereinigtes, in einem verträglichen Puffer gelöstes HS-C-DRA gewonnen werden.

Das Expressions- und Reinigungsverfahren kam in gering veränderter Form auch zur Expression von HS-C-DRA für die Affinitätssäule zur Anwendung, wobei hier in den Wasch- und Elutionspuffern das TRIS gegen NaPO₄ getauscht werden musste, da TRIS als primäres Amin an das Affigel 15 gebunden hätte. Die Verwendung von NaPO₄ hatte keinen negativen Einfluß auf das Reinigungsverfahren.

7.1.3 Immunisierung der Kaninchen

Die Immunisierung von zwei Kaninchen wurde von der Biogenes GmbH in Berlin durchgeführt. Die kommerzielle Immunisierung ist mittlerweile üblich, da alternativ ein Tierversuchsantrag zu stellen wäre und da die langfristige Haltung und die Blutentnahmen bei den Tieren technisch und hygienisch nicht unproblematisch sind.

7.1.4 Testung des ungereinigten Antiserums auf Spezifität und Sensitivität unter Verwendung des rekombinant exprimierten Immunogens

Diese erste Untersuchung, deren Details im Abschnitt Ergebnisse nicht im Detail dargestellt sind, diente ausschließlich der Frage, ob die Kaninchen ein Antiserum entwickelt haben, das das Immunogen detektiert. Es wurden drei Test-Seren und ein abschließendes Serum untersucht. Im Rahmen dieser Experimente konnte im Vergleich des ersten mit dem zweiten Testserum ein steigender Titer, im dritten Testserum dann jedoch wieder ein etwas geringerer Titer als im zweiten Testserum gefunden werden. Der abschließende Bleed wies eindeutig den höchsten Titer auf, so dass die nachfolgenden Experimente zur Reinigung des Antiserums ausschließlich mit dem abschließenden Serum des Kaninchens, das den höheren Titer entwickelt hatte, durchgeführt wurden.

7.1.5 Transfektion von DRA in eine humane Zelllinie (HEK 293 Zellen)

Die Transfektion ist eine Methode zur Einschleusung heterologer DNA in eukaryotische Zelllinien. Die DNA von Interesse wird dazu in Vektoren eingebracht, welche in den transfizierten Zellen zu einer zusätzlichen Proteinexpression führen, wobei das exprimierte Protein von der in den Vektor eingebrachten DNA kodiert wird.

Diese Methode ist in der Molekularbiologie von großer Bedeutung, da auf diese Weise die exprimierten Proteine in ihrer eigenen Funktion und in ihrem Einfluß auf die transfizierten Zellen relativ leicht untersucht werden können.

Die Transfektion erfolgt durch Bakteriophagen-Vektoren. Die cDNA von Interesse wird zunächst in ein Transfektionsplasmid kloniert. Der Plasmid ist eine ringförmige doppelsträngige DNA, die mit einem besonders effektiven, viralen Promotor z.B. dem Promotor des Cytomegalie-Virus und einem Antibiotika-Resistenzgen ausgestattet ist. Nach der Transfektion der Zellen mit diesem Plasmid integriert ein kleiner Teil der Zellen die Fremd-DNA in ihr Genom. Einige dieser Zellen exprimieren das Resistenzprotein und überleben deshalb die Selektion in einem Antibiotikum-haltigen Medium (Watson et al., 1992). Bei dem Gentransfer können genetische Informationen wie die Plasmid-DNA durch verschiedene Methoden in die Zellen eingebracht werden:

Elektroporation: Die Elektroporation ermöglicht die Einschleusung der Fremd-DNA in die Zelle durch spannungsgesteuerte Porenbildung an den Zellmembranen. Hier werden Zellkulturen im Kulturmedium an Elektroden angeschlossen.

Viren als Träger der Fremd-DNA: Nachdem die DNA in die Viren eingebracht wurde, werden diese Viren als Träger verwendet, um die eukaryoten Zellen damit zu infizieren.

Liposomen (Guide to eukaryotic transfections with cationic lipid reagents, Invitrogen, 2000): Hierbei handelt es sich um synthetische Lipid-Vesikel, die die Plasmid-DNA einkapseln und somit als Träger dienen. Die Inkubation der Liposomen mit den eukaryotischen Zellen in speziellen Kulturmedien ermöglicht die Fusionierung dieser Liposomen mit der Zellmembran und eine konsekutive Abgabe der Plasmid-DNA in die Zellen. Ein Beispiel für Liposomen ist die Mischung verschiedener kationischer Lipide in der kommerziell erhältlichen Präparation Lipofectin der Firma Invitrogen. In Abbildung 32 ist ein durch Lipofectin induzierter Gentransfer schematisch dargestellt.

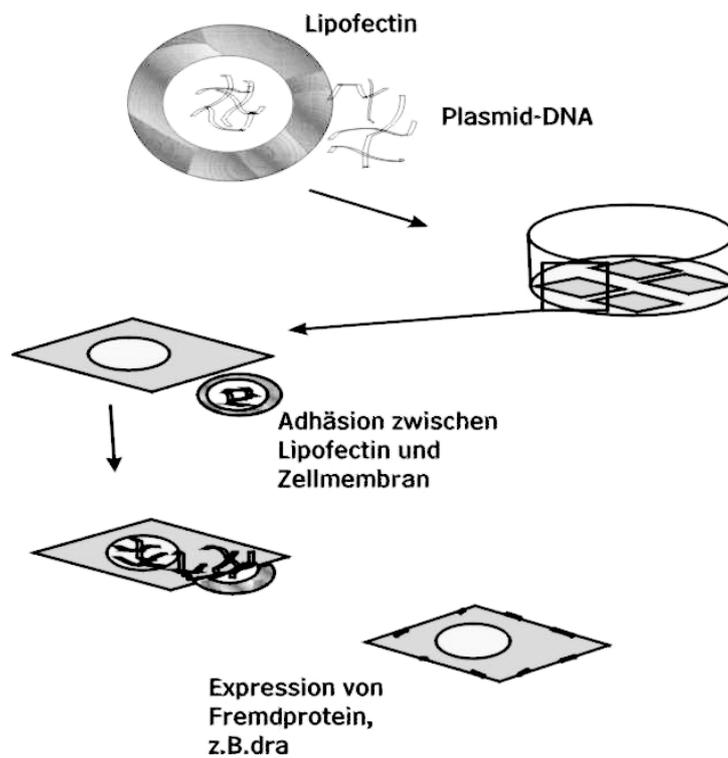


Abbildung 32: Schematische Darstellung eines durch Lipofectin induzierten Gentransfers.

Nach Fusionierung der Plasmid-DNA-haltigen Lipid-Membran mit der zu transfizierenden Zelle wird das neue genetische Material in die Zelle abgegeben. Obwohl der Mechanismus der Aufnahme noch nicht genau bekannt ist, geht man davon aus, dass die transfizierte DNA über Endozytose, ein Vorgang bei dem die Zelle kleine Partikel von der Außenseite aufnimmt, in das Zytoplasma der Zelle gelangt und in den Zellkern transportiert wird. Die DNA wird dort transkribiert, wobei eine mRNA entsteht. Diese wird zu den Ribosomen im Zytoplasma transportiert und dort translatiert.

In Abbildung 33 werden die Phasen der Transfektion chronologisch dargestellt.

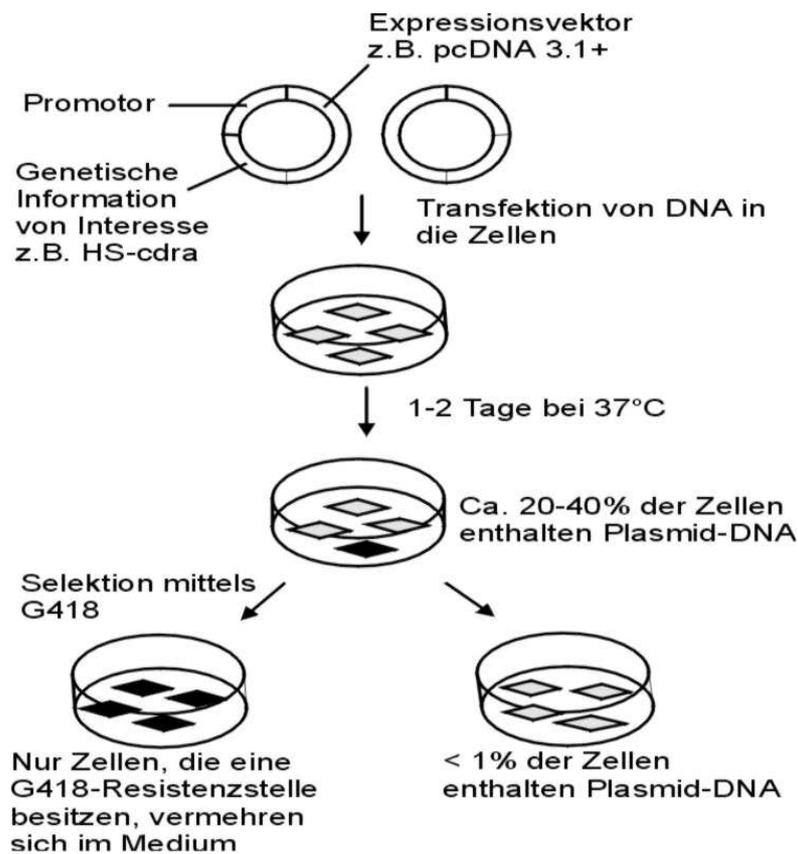


Abbildung 33: Phasen der Transfektion.

Zusammenfassend erfolgt die transiente Transfektion simultan in vielen Zellen, während die stabile Transfektion nur in wenigen Zellen erfolgt. Die ersten 1-2 Tage gehören zur transienten Phase. Während dieser Zeit verteilt sich die Plasmid-DNA an verschiedenen Stellen innerhalb und außerhalb der Zellen. Selbst wenn die Plasmid-DNA ins Genom der Zellen gelangt, besteht weiterhin die Möglichkeit, dass sie nicht ins Genom integriert wird. Anschließend folgt die stabile Phase, in der die stabile Integration der Plasmid-DNA in die Genome stattfindet. Das entspricht höchstens 10% der Gesamtzellpopulation. Mittels Selektion (G 418-Resistenz) ist es möglich, diese Zellen gezielt zu isolieren (Watson et al., 1992) und im weiteren zu expandieren.

Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten HEK 293-Zelllinie war ursprünglich geplant, ein die gesamte Länge von DRA (DRA-wt) umfassendes Konstrukt stabil zu transfizieren. Dieses Konstrukt sollte für die gesamte DRA-Proteinlänge kodieren und

keine Tags enthalten. Auf diese Weise sollte DRA im nativen Zustand (wild type) exprimiert werden; die Proteinbande war im 82,5 kDa-Bereich erwartet worden (Schweinfest et al., 1993, Byeon et al., 1996). An diesen stabil transfizierten HEK 293 Zellen sollten anschließend Sensitivität und Spezifität des anti-DRA-Antiserums überprüft werden.

Als Kontrolle für die erfolgreiche Transfektion sollte ein getaggttes DRA mit Myc- und His-Tag (ca.100 kDa, berechnet nach der Größe des Tags und der gesamten Länge von DRA) dienen; für dieses Konstrukt sollte wiederum ein getaggttes LacZ-Konstrukt, ebenfalls mit Myc-und His-Tag, dienen. Als negative Kontrolle dienten die nicht transfizierten HEK 293 Zellen.

In diesem experimentellen Ansatz hat sich herausgestellt, dass der anti-Myc-Antikörper zwar das LacZ-MH hervorragend erkennt, aber keine DRA-MH Banden. Der polyklonale anti-DRA-Antikörper erkennt ebenfalls keine spezifische Bande an den mit DRA-wt oder mit DRA-MH transfizierten Zellen. Unklar blieb an dieser Stelle zunächst, ob der Transfektionseffizienz bei DRA-wt und DRA-MH zu gering ist oder ob eine erfolgreiche Transfektion von einer mangelnder Proteinexpression gefolgt wird. Dieser Frage wurde mittels semiquantitativer RT-PCR später nachgegangen (siehe Abschnitt 6.4).

Zunächst galt es jedoch, ein geeignetes DRA-Konstrukt in HEK-Zellen zu exprimieren, an denen das Antiserum getestet werden konnte. Als Alternative zu einem full length DRA-Konstrukt wurde daher dasselbe zytoplasmatische DRA-Konstrukt, welches zunächst im prokaryoten Expressionsvektor pET 30c kloniert und als rekombinantes Protein für die Generierung des Immunogens verwendet wurde, in den eukaryoten Expressionsvektor pcDNA3.1+ umkloniert und zwar unter „Mitnahme der beiden aus dem pET30-Vektor stammenden Tags (His-Tag plus S-Tag). Die komplizierte Klonierungsstrategie ist in Abschnitt 4.1, 4.2, 4.5 und 5.1 im Detail dargestellt. Dieses Konstrukt (pcDNA3.1/HS-C-DRA) wurde stabil in HEK 293 Zellen transfiziert. An den Lysaten dieser Zellen, in denen das Konstrukt auch mittels RT-PCR nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 6.4), wurde im weiteren das Antiserum getestet.

Die anschließende Expression von His- und S-getaggetem zytoplasmatischen DRA in HEK 293 Zellen ist erfolgreich und zeigt die erwartete Proteinbande im 32 kDa-Bereich.

7.1.6 Etablierung von klonalen Zelllinien

Hintergrund des Ansatzes, klonale Zelllinien zu etablieren, war die Überlegung, dass möglicherweise der fehlende Nachweis der beiden full length DRA-Konstrukte (DRA-wt und DRA-MH) darauf beruht, dass nur ein kleiner Teil der G 418-resistenten Zellen, die ja das G 418-Resistenzgen exprimieren, auch die genetische Information für die Expression von DRA, d.h. den Vektorabschnitt vom CMV-Promotor bis zum Stop-Kodon der DRA-cDNA aufgenommen hat. Die Ergebnisse an den mit dem LacZ-MH Konstrukt, das sogar noch etwas länger ist als die beiden full length DRA-Konstrukte, transfizierten Zellen zeigt, dass mehr als 50% der Zellklone die cDNA von Interesse in einer exprimierbaren Form integriert haben. Erwarteterweise schwankte das Expressionsniveau auf Proteinebene etwas, was wahrscheinlich Ausdruck der Integration in unterschiedliche chromosomale Kontexte oder Ausdruck der Integration mehrerer Kopien des Expressionskonstruktes in das Zellgenom ist. Trotz dieses erfolgreichen Ansatzes bei den mit dem LacZ-MH Konstrukt transfizierten Zellen ließ sich an keinem der mit den beiden full length DRA-Konstrukten transfizierten Zellklone DRA auf Proteinebene nachweisen, was gegen die ursprüngliche Annahme spricht, dass ein sehr geringer Anteil der Zellen DRA exprimiert und daß dieses Signal dann in den nicht-exprimierenden Zellen „untergeht“. Es wurden 10 Zellklone, die mit den beiden full length DRA Konstrukten transfiziert waren untersucht. Eine größere Zahl von Klonen war technisch nicht zu handhaben. Vor diesem Hintergrund erscheint es möglich, dass vielleicht bei der Untersuchung einer sehr viel größeren Zahl von Klonen, ein Zellkon mit erfolgreicher DRA-Expression zu finden gewesen wäre. Die Tatsache, dass jedoch mehr als 50% der mit dem LacZ-MH Konstrukt transfizierten Klone dieses Konstrukt auch exprimieren, spricht gegen dies Annahme.

Tabelle 15 fasst die Ergebnisse der Proteinexpression von DRA-wt, DRA-MH, HS-C-DRA und Lacz-MH für die nicht-klonalen, „gemischten“ Zelllinien und die daraus

abgeleiteten klonalen Zelllinien noch einmal zusammen. Positive Ergebnisse können beim HS-C-DRA und bei LacZ-MH erzielt werden.

Tabelle 15: Nachweis der Antigen-Antikörper Reaktion bei Inkubation der verschiedenen DRA-Konstrukte sowie von LacZ-MH mit den jeweiligen Antikörpern. (+): nachweisbare Ag-Ak-Reaktion, (-): nicht nachweisbare Ag-Ak-Reaktion.

	DRA-wt	DRA-MH	Zytoplasmatische HS-C-DRA	Lacz-MH
Gemischte Kolonien	-	-	+	+
Klonale Zelllinien	-	-	+	+

Fazit: Der anti-Myc-Antikörper zeigt keine Antigen-Antikörper-Reaktion bei Inkubation mit der gesamten Länge von DRA-MH, jedoch ist die Reaktion im Falle von LacZ-MH sehr stark ausgeprägt. Parallel dazu reagiert das anti-DRA-Antiserum mit dem nativen DRA-wt nicht, die Detektion von HS-C-DRA ist dagegen sehr spezifisch und ausgeprägt.

In einer Arbeit von Chapman et al. (2002) wird postuliert, dass DRA das Wachstum von Zellen wie DLD-1, HT-29, SW480 und MCF-7 supprimiert. Diese Arbeit geht von folgender Situation aus: Durch die stabile Expression des G 418-Resistenzgens sind die initial erfolgreich transfizierten Zellen zwar auch in Anwesenheit von G 418 am Leben, jedoch erweisen sich Wachstum und Vermehrung der genannten Zellen aufgrund der Expression von DRA als stark reduziert oder sogar aufgehoben. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigt ebenfalls, dass das zytoplasmatische COOH-Ende (Aminosäuren 606-764) zwar notwendig für dieses Wachstumsphänomens ist, jedoch das genannte Ende alleine nicht die Wachstumssuppression der transfizierten Zellen vermittelt. Erst die Interaktion mehrerer Genabschnitte führt zur genannten Suppression. Die Arbeit von Chapman et al. beschrieb, dass genau dieser Prozeß in HEK 293 Zellen nicht zum Tragen kommt, weil diese Zellen das virale Protein E1A exprimieren. Insofern stellt diese Annahme allein keine überzeugende Erklärung für die nicht erfolgreiche Expression von full length DRA in vorliegenden Ansatz dar, zumal auch die in der vorliegenden Arbeit

verwendeten HEK 293 Zellen E1A exprimieren. Diese bisher unveröffentlichte Daten wurden erst nach Ende des experimentellen Teil der Arbeit erhoben, weil auch die Arbeit von Chapman erst später erschienen ist.

7.1.7 Entwicklung und Reinigung des polyklonalen anti-DRA-Antiserums

Die Immunisierung von Kaninchen mit dem rekombinanten, in E.coli exprimierten und gereinigten HS-C-DRA erfolgte mittels dreifacher Boosterung, deren Gesamtdauer drei Monate betrug.

Es wurden alle drei Test-Seren und das abschließende Serum untersucht. Diese erste Untersuchung, deren Details im Abschnitt Ergebnisse nicht im Detail dargestellt sind, diente ausschließlich der Frage, ob die Kaninchen ein Antiserum entwickelt haben, das das Immunogen detektiert. Im Rahmen dieser Experimente konnte im Vergleich des ersten mit dem zweiten Testserum ein steigender Titer, im dritten Testserum dann jedoch wieder ein etwas geringerer Titer als im zweiten Testserum gefunden werden. Der abschließende Bleed wies eindeutig den höchsten Titer auf (1:3000), wobei die Sensitivität des anti-DRA-Antiserums bei HS-C-DRA (32 kDa) und H-C-DRA (30 kDa) etwa gleich ist. Dieses Experiment war notwendig, um auszuschließen, dass das Antiserum in erster Linie den S-Tag und nicht den DRA-Anteil des Immunogens erkennt. H-C-DRA, welches von Grund auf neu kloniert wurde (siehe Abschnitt 4.4), trägt lediglich den kurzen His-Tag, der als wenig immunogen gilt. Die Tatsache, dass H-C-DRA genauso gut erkannt wurde wie HS-C-DRA bedeutet, dass nicht der S-Tag sondern der DRA-Anteil vom anti-DRA-Antiserum erkannt wird.

In einer Verdünnung von 1:3000 erkennt das Antiserum ca. 1-10 ng des rekombinanten in E.coli exprimierten Antigens.

Dieses ungereinigte Antiserum erkennt neben der spezifische HS-C-DRA-Bande auch eine Reihe unspezifische Banden, was Ausdruck der natürlichen Immunisierung der Kaninchen gegen diverse Proteine ist, die sicher zum Teil auch unspezifisch, also nur

mit geringem Titer, erkannt werden, der jedoch ausreicht, um im Western-Blot zu einer erkennbaren Bande zu führen. Das Antiserum musste also gereinigt werden.

Die Methode der Wahl zur Reinigung von Antigen-spezifischen Antiseren für die Entwicklung eines polyklonalen Antiserums ist die Purifikation mittels Immunoaffinität (Harlow et al., 1998). Bei diesem Verfahren werden gereinigte Antigene kovalent an eine Sepharose-Matrix gebunden. Die spezifischen polyklonalen Antikörper bzw. Antiseren binden an die an der Matrix fixierten antigenen Epitope. Die nicht-gebundenen Antikörper anderer Spezifität werden anschließend von der Säule heruntergewaschen. Die spezifischen Antikörper werden schließlich unter Verwendung eines Puffers, der die nicht-kovalente Bindung von Antigen und Antikörper unterbricht, eluiert.

Generell wird davon abgeraten, das Immunogen als Antigen für die Reinigung von Antiseren im Rahmen einer Affinitätssäule zu verwenden (Harlow et al., 1998). Andererseits stand kein anderes Antigen, insbesondere kein full length DRA zur Verfügung. Auch das erfolgreich in den HEK 293 Zellen exprimierte HS-C-DRA konnte nicht in ausreichender Menge für eine Säule aus diesen Zellen gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde vor der eigentlichen Säulenreinigung zunächst ein Pilotexperiment unternommen, um zu klären, ob das Antiserum am ursprünglich verwendeten Immunogen HS-C-DRA gereinigt werden kann. Das Ergebnis dieses Pilotexperimentes ist in Abschnitt 6.3.1 ausführlich dargestellt und zeigt, dass eine Immunoaffinitätsreinigung mittels HS-C-DRA prinzipiell möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit hat sich sowohl im Pilotexperiment als auch bei der Säulenreinigung die saure Elution mit einem pH von 2.5 als effektiv erwiesen. In den Fraktionen der alkalisichen Elution (B1 bis B4, siehe Abschnitt 6.3.2) war praktisch keine Immunoreaktivität gegen DRA mehr zu finden. Dies bedeutet nicht, dass die alkalische Elution per se unwirksam war, möglicherweise wurden jedoch bereits alle spezifischen Antikörper unter den sauren Bedingungen eluiert.

Erwarteterweise war die Reinigung auf der Affinitätssäule mit einem viel geringeren Titerverlust (1:3000 nach 1:1000) statt (1:3000 nach 1:150) verbunden.

Das beschriebene Antiserum stellte das physische Ergebnis vorliegender Arbeit dar. Es ist seitdem, „außerhalb“ der vorliegenden Arbeit erfolgreich bei der Detektion von DRA mittels Western-Blot und mittels Immunfluoreszenz verwendet worden (Jacob, Lamprecht 2002).

7.1.8 Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis und zur Quantifizierung der transfizierten DRA-Konstrukte

Um der Frage nachzugehen, warum die full length DRA-Konstrukte (DRA-WT und DRA-MH) auch nach Etablierung klonaler Zelllinien nicht erfolgreich in HEK-Zellen exprimiert werden konnten, wurde die Transkriptionseffizienz der verschiedenen DRA-Konstrukte (DRA-wt, DRA-MH, HS-C-DRA), die ja alle in demselben Vektor (pcDNA3.1) vorlagen, mittels semiquantitativer RT-PCR an den transfizierten, G 418-resistenten HEK 293 Zellen durchgeführt. Als Vergleich dienten nicht transfizierte HEK 293 Zellen und Caco-2-Zellen, die DRA auf niedrigem Niveau exprimieren (Roßmann, Lamprecht, Alrefai 2001). Diese Analyse zeigte, dass von den beiden full length Konstrukten, DRA-wt und DRA-MH, eine sehr viel geringere mRNA-Expression erfolgte, als von dem kurzen Konstrukt HS-C-DRA. In HEK 293 Zellen ließ sich, wie erwartet, keine DRA mRNA nachweisen und in den zwei Wochen nach Erreichen der Konfluenz untersuchten Caco-2 Zellen lag die DRA mRNA-Expression ebenfalls auf dem erwarteten niedrigen Niveau. Zu beachten ist bei dieser Analyse, dass das HS-C-DRA-Konstrukt in einer klonalen Zelllinie untersucht wurde, während die beiden full length Konstrukte an gemischten, nicht-klonalen Zelllinien untersucht wurden. Nicht-transfizierte HEK 293 Zellen und Caco-2 Zellen waren ebenfalls nicht-klonalen Ursprungs. Selbst unter Berücksichtigung dieser Einschränkung wird auch anhand der Western-Blot-Daten, in denen HS-C-DRA bereits in der nicht-klonalen, „gemischten“ Zelllinie nachzuweisen war (siehe Abbildung 18 und 19) klar, dass das HS-C-DRA Konstrukt sehr viel besser exprimiert wird als die beiden full length Konstrukte. Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR legen nahe, dass dieser Effekt zumindest teilweise auf eine effektivere Transkription zurückzuführen ist. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die beiden full length Konstrukte jeweils Basen der

5' nicht-translatierten Region der cDNA enthalten. Möglicherweise befinden sich hier Elemente, die die Transkription behindern und die in vivo, d.h. im Setting einer vollständigen 5' nicht-translatierten Region nicht zum Tragen kommen. Hinzu kommt vielleicht auch, dass die das native Startkodon von DRA nicht in einer Kozak-Consensus-Sequenz liegt (Kozak et al., 1987), was die allerdings nicht die Transskription sondern die Translation negativ beeinflussen mag, die in der RT-PCR-Analyse allerdings nicht erfasst wurde. Insgesamt sind diese Überlegungen jedoch weitgehend spekulativ, insbesondere weil das von Melvin und Mitarbeitern (1999) transfizierte Maus-DRA-Konstrukt und das von Chapman und Mitarbeitern (2002) transfizierte humane DRA-Konstrukt unseren Konstrukten sehr ähnlich sind. Dem steht gegenüber, dass auch Chernova und Mitarbeiter (2003) Schwierigkeiten bei der Expression von DRA durch cRNA-Injektion in Oocyten beschrieben, die durch die Anwesenheit flankierender Sequenzen überwunden werden konnten.

Schließlich haben Chapman et al. (2002) beschrieben, dass DRA wachstumsinhibierende Effekte hat, die die stabile heterologe Expression in den meisten untersuchten Zellen unmöglich machte. Dieser Effekt konnte durch das virale, in HEK 293 Zellen endogen exprimierte Protein E1A überwunden werden. Der Mechanismus hierfür ist jedoch nicht klar, und möglicherweise spielen andere Faktoren eine Rolle bei der schlechten Expression von DRA, die in der vorliegenden Arbeit nicht kontrolliert werden konnten, eben weil sie bisher unbekannt sind.

Für die Zukunft ist geplant, ein full length DRA-Expressionskonstrukt zu entwickeln, welches keine 5' untranslatierte Region enthält und in dem eine Kozak-Consensus-Sequenz integriert ist.

Zusammenfassend ist es in der vorliegenden Arbeit also nicht gelungen, das zweite „molekulare Werkzeug“ für die Charakterisierung von DRA, nämlich die heterologe Expression in HEK 293 Zellen zu etablieren, wobei die hierfür verantwortlichen Faktoren offensichtlich vielgestaltig sind und auch eine schlechte Transskriptionseffizienz der verwendeten full length DRA Konstrukte beinhaltet. Ein alternatives Konstrukt, an dem das gereinigte Antiserum getestet werden konnte (HS-C-DRA) wurde jedoch erfolgreich in den HEK 293 Zellen exprimiert.

8 Zusammenfassung

Der C-terminale zytoplasmatische Teil des DRA-Genproduktes wurde unter Verwendung einer „proof-reading“ DNA-Polymerase ohne Mutation amplifiziert und in mehreren Schritten in den Expressionsvektor pET 16b und pET 30c kloniert und in E.coli BL21 DE3 exprimiert. Die Transformation beider Konstrukte in den Bakterien war erfolgreich.

Expression und Purifikation vom zytoplasmatischen His-S-DRA mittels Nickel-Resin-Reinigung unter denaturierenden und anschließenden renaturierenden Bedingungen gelangen mit hoher Ausbeute (>1 mg/100 ml Medium) und hoher Reinheit (> 99%). Die Immunisierung von Kaninchen mit diesem His- und S-getaggtten rekombinanten Antigen führte zur Bildung eines hochtitrigen Antiserums (1:3000), welches die Antigen determinanten im Western-Blot spezifisch erkannte. Die Reinigungssäule war die Methode der Wahl zur Reinigung des anti-DRA-Antiserums mit der folglich höheren Spezifität jedoch mit niedrigerer Sensitivität (1:1000) als bei dem ungereinigten Antiserum.

Das Fusionprotein aus His-S-Tag und das zytoplasmatische C-Terminus von DRA wurde zusätzlich in pcDNA3.1+ kloniert und in HEK 293 Zellen mittels Liposomen transfiziert. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte mittels G 418 unter

Beachtung der „killing-curve“. Die heterologe Expression von DRA als His-Myc-Konstrukt und als DRA-wild-type an HEK 293-Zellen konnten mittels anti-Myc-Antikörper und anti-DRA-Antikörper nicht nachgewiesen werden. Ein transfiziertes Kontroll-Konstrukt (LacZ-His-Myc) wurde jedoch exprimiert und im anti-Myc-Western erkannt. Die Etablierung einer klonalen Zelllinie bewies die ungleichmäßige Proteinexpression in His-S-C-DRA. Dasselbe Ergebnis wurde bei LacZ-His-Myc beobachtet. Aus anfänglich unbekanntem Gründen war die Detektion von DRA-wild-type sowie von His-Myc-DRA durch die entsprechenden Antikörpern nicht erfolgreich. Die Ursache wurde mittels semiquantitatives RT-PCR aller Transfektionsprodukten nachgegangen. Dabei erwiesen sich das mRNA-Expressionsniveau von DRA-wild-type und DRA-MH als zu niedrig. Dies erklärte die mangelnde bzw. fehlende Erkennung der Proteinexpression durch das anti-DRA-Antiserum.

Das polyklonale gereinigte anti-DRA-Antiserum für die Detektion und Charakterisierung von DRA ist in dieser Arbeit etabliert worden.

Literaturverzeichnis

Altfai ASP 2001.

Amersham (1995): Amersham Life Science.

Antalis T. M., Reeder J. A., Gotley D. C., Byeon M. K., Walsh M. D., Henderson K. W., Papas T. S. und Schweinfest C. W. (1998): Down-regulation of the down-regulated in adenoma (DRA) gene correlates with colon tumor progression. *Clin. Cancer Res.* **4**, 1857-1863.

Ausubel F., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. und Struhl K. (1987): *Current Protocols in Molecular Biology*. Greeny Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York, USA.

Badawi M. H., Zaki M., Ismail E. A. und Majid Molla A. (1998): Congenital chloride diarrhoea in Kuwait: a clinical reappraisal. *J. Trop. Pediatr.* **44**, 296-299.

Byeon M. K., Frankel A., Papas T. S., Henderson K. W. und Schweinfest C. W. (1998): Human „DRA“ functions as a sulfate transporter in Sf9 insect cells. *Protein Expr. Purif.* **12**, 67-74.

Byeon M. K., Westerman M. A., Maroulakou I. G., Henderson K. W., Suster S., Zhang X. K., Papas T. S., Vesely J., Willingham M. C., Green J. E. und Schweinfest C. W. (1996): The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein. *Oncogene* **12**, 387-396.

Chapman J. M., Knoepp S. M., Byeon M. K., Henderson K. W., Schweinfest C. (2002): The colon anion transporter DRA induces growth suppression the is abrogated by E1A. *Cancer re.* **62**, 5082-5088.

- Chernova M. N., Jiang L., Shmukler B. E., Schweinfest C. W., Freedman S. D., Steward A. K., Alper S. L. (2003): Acute regulation of the SLC26A3 congenital chloride diarrhoea anion exchanger (DRA) expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 10.1113
- Etani Y., Mushiake S., Tajiri H., Miki K., Kozaiwa K., Sawada A., Tada K., Ozono K. und Okada S. (1998): A novel mutation of the down-regulated in adenoma gene in a Japanese case with congenital chloride diarrhea. Mutations in brief no. 198. *Hum. Mutat.* **12**, 362.
- FCM BioProducts (1997): *Your Complete Guide for DNA Separation and Analysis. The Sourcebook.* FCM BioProducts, USA.
- Greeley T., Shumaker H., Wang Z., Clifford W., Schweinfest C. W. und Soleimani M.(2001): Down regulated in adenoma and putative anion transporter are regulated by CFTR in cultured pancreatic duct cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**, G1301-1308.
- Haila S., Saarialho-Kere U., Karjalainen-Lindsberg M.-L., Lohi H., Airola K., Holmberg C., Hästbacka J., Kere J. und Höglund, P. (2000): The congenital chloride diarrhea gene is expressed in seminal vesicle, sweat gland, inflammatory colon epithelium, and in some dysplastic colon cells. *Histochem. Cell Biol.* **113**, 279-286.
- Harlow E., Kane D. and Harlow E. (1998): *Using Antibodies, A Laboratory Manual : Portable Protocol NO. I*, Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- Höglund P., Auranen M., Socha J., Popinska K., Nazer H., Rajaram U., Al Sanie A., Al-Ghanim M., Holmberg C., de la Chapelle A. und Kere J. (1998): Genetic background of congenital chloride diarrhea in high-incidence populations: Finland, Poland, and Saudi Arabia and Kuwait. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 760-768.
- Höglund P., Haila S., Scherer S. W., Tsui L. C., Green E. D., Weissenbach J., Holmberg C., de la Chapelle A. und Kere J. (1996a): Positional candidate genes for congenital chloride diarrhea suggested by high-resolution physical mapping in chromosome region 7q31. *Genome Res.* **6**, 202-210.
- Höglund P., Haila S., Socha J., Tomaszewski L., Saarialho-Kere U., Karjalainen-Lindsberg M.-L., Airola K., Holmberg C., de la Chapelle A. und Kere, J. (1996b): Mutations of the down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. *Nature Genet.* **14**, 316-319.
- Höglund P., Holmberg C., Sherman P. und Kere J. (2001): Distinct outcomes of chloride diarrhoea in two siblings with identical genetic background of the disease: implications for early diagnosis and treatment. *GUT.* 48 (5): 724-727.
- Höglund P., Sistonen P., Norio R., Holmberg C., Dimberg K. H., Gustavson G., de la Chapelle A. und Kere J. (1995): Fine mapping of the congenital chloride diarrhea gene by linkage disequilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 95-102.
- Holmberg C. (1986): Congenital chloride diarrhoea. *Clin. Gastroenterol.* **15**, 583-602.
- Holmberg C., Perheentupa J., Launiala K. und Hallman N. (1977): Congenital chloride diarrhoea. Clinical analysis of 21 Finnish patients. *Arch. Dis. Child.* **52**, 255-267.

- Jacob P., Roßmann H., Lamprecht G., Kretz A., Neff C., Lin Wu E., Gregor M., Groneberg D. A., Kere J. und Seidler U. (2002): Down regulated in adenoma mediates apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in rabbit, rat and human duodenum. *Gastroenterology*. **122**, 709-724.
- Kere J., Sistonen P., Holmberg C. und de la Chapelle A. (1993): The gene for congenital chlorid diarrhea maps close to but is distinct from the gene for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10686-10689.
- Kere J., Lohi H., Höglund P. (1999): Genetic disorders of membrane transport. III. Congenital chlorid diarrhea. *Am. J. Physiol.* **276**, G7-13.
- Knickelbein R., Aronson P. S., Atherton W. und Dobbins J. W. (1983): Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange. *Am. J. Physiol.* **245**, G504-510.
- Knickelbein R., Aronson P. S. und Dobbins J. W. (1988): Properties of distinct luminal and basolateral Na-H exchangers in rabbit ileum: *Faseb journal* **2**: A941.
- Knickelbein R., Aronson P. S., Schron C. M., Seifter J. und Dobbins J. W. (1985): Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -exchange and mechanism of coupling. *Am. J. Physiol.* **249**, G236-245.
- Knickelbein R. und Dobbins J. W. (1990): Sulfate and oxalate exchange for bicarbonate across the basolateral membrane of rabbit ileum. *Am. J. Physiol.* **259**, G807-813.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamprecht G., Seidler U. und Claasen M. (1993): Intracellular pH-regulating ion transport mechanisms in parietal cell basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **265**, G903-910.
- Lamprecht G., Heil A., Baisch S., Lin Wu E., Yun C., Kalbacher H., Gregor M. und Seidler U. (2002): The Down Regulated in Adenoma (DRA) Gene Product binds to the Second PDZ Domain of the NHE3 Kinase A Regulatory Protein (E3KARP), Potentially Linking Intestinal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Exchange to Na^+/H^+ -Exchange. *Biochemistry* **41**, 12336-12342.
- Lohi H., Makela S., Pulkkinen K., Höglund P., Karjalainen-Lindsberg M. L., Puolakkainen P. und Kere J. (2002): Upregulation of CFTR expression but not SLC26A3 and SLC9A3 in ulcerative colitis. *Am. J. Physiol. - Gastr. and Liver Physiol.* **283**, G567-G575.
- Lohi H., Lamprecht G., Markovich D., Heil A., Kujala M., Seidler U. und Kere J. (2003): Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **284**, C769-C779.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. und Randall R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **19**, 265-275.

- Lubani M. M., Doudin K. I., Sharda D. C., Shaltout A. A., al-Shab T. S., Abdul Al Y. K., Said M. A., Salhi M. M. und Ahmed S. A. (1989): Congenital chloride diarrhoea in Kuwaiti children. *Eur. J. Pediatr.* **148**, 333-336.
- Melvin J. E., Park K., Richardson L., Schultheis P. J. und Shull G. E. (1999): Mouse Down Regulated in Adenoma (DRA) Is an Intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ Exchanger and Is Up-regulated in Colon of Mice Lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ Exchanger. *J. Biol. Chem.* **274**, 22855-22861.
- Moseley R. H., Höglund P., Wu G. D., Silberg D. G., Haila S., de la Chapelle A., Holmberg C. und Kere J. (1999): Down regulated in adenoma gene encodes a chloride transporter defective in congenital chloride diarrhea. *Am. J. Physiol.* **276**, G185-192.
- Norio R., Perheentupa J., Launiala K. und Hallman N. (1971): Congenital chloride diarrhea, an autosomal recessive disease. Genetic study of 14 Finnish and 12 other families. *Clin. Genet.* **2**, 182-192.
- Norio R., Nevanlin H. R. und Perheentupa J. (1973): Hereditary diseases in Finland – Rare flora in rare soil. *Ann. Clinic. Res.* **3**, 109-141.
- Rajendran V. M. und Binder H. J. (1993): Cl⁻/HCO₃⁻- and Cl-OH exchanges mediate Cl uptake in apical membrane vesicles of rat distal colon. *Am. J. Physiol.* **264**, G874-879.
- Rajendran V. M. und Binder H.J. (1999): Distribution and regulation of apical Chlorid anion exchangers in surface and crypt cells of rat distal colon. *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **276**, G132-137.
- Roßmann H. (1999): Molekulare Charakterisierung der Cl⁻/HCO₃⁻- und Na⁺/H⁺-Austauscher des Magenepithels des Kaninchen. Dissertation an der Universität Tübingen, Deutschland.
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York, USA.
- Schron C. M., Knickelbein R. G., Aronson P. S., Della P. J. und Dobbins J. W. (1985a): Effects of cations on pH gradient-stimulated sulfate transport in rabbit ileal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **249**, G614-621.
- Schron C. M., Knickelbein R. G., Aronson, P. S., Della P. J. und Dobbins J. W. (1985b): pH gradient-stimulated sulfate transport by rabbit ileal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **249**, G607-613.
- Schweinfest C. W., Henderson K. W., Suster S., Kondoh N. und Papas, T. S. (1993): Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**, 4166-4170.
- Silberg D. G., Wang W., Moseley R. H. und Traber P. G. (1995): The Down Regulated in Adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane sulfate transport protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 11897-11902.

- Taguchi T., Testa J. R., Papas T. S. und Schweinfest C. (1994): Localization of a candidate colon tumor-suppressor gene (DRA) to 7q22-q31.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **20**, 146-147.
- Tomaszewski L., Kulesza E. und Socha, J. (1987): Congenital chloride diarrhoea in Poland. *Mater. Med. Pol.* **19**, 271-277.
- Turnberg L. A. (1970): Electrolyte absorption from the colon. *Gut* **11**, 1049-1054.
- Wang Z., Orłowski J. und Shull, G. E. (1993): Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na⁺/H⁺-exchanger. *J. Biol. Chem.* **268**, 11925-11928.
- Watson J. D., Gilman M., Witkowski J. und Zoller M. (1992): *Recombinant DNA*. W. H. Freeman and Company, New York, USA.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mir dabei geholfen und mich unterstützt haben, diese Doktorarbeit anzufertigen und alle dafür notwendigen Arbeiten im Labor durchzuführen.

Herrn Professor Dr. Michael Gregor, Ärztlicher Direktor der Abteilung Innere Medizin I der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen, danke ich für die Übernahme der Leitung meiner Dissertation.

Ich bedanke mich herzlichst bei **Frau Privat-Dozentin Dr. Ursula Seidler**, Abteilung Innere Medizin I der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, als Mitglied ihrer Arbeitsgruppe sämtliche Geräte in den Laboren ihrer Arbeitsgruppe verwenden zu dürfen und auch Zugang zu allen Einrichtungen dort zu haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Herrn Doktor Hans-Georg Lamprecht**, Abteilung Innere Medizin I der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen. Er war nicht nur mein wissenschaftlicher Betreuer, sondern Freund und Mentor. Ich danke ihm, dass ich an seinem Forschungsprojekt teilnehmen durfte und dass er mich (als unwissende Medizin-Studentin) in das wissenschaftliche Arbeiten sowohl im Labor als auch in der Bibliothek und am Computer eingeführt hat. Er war stets mein erster und

unmittelbarer Ansprechpartner bei zahllosen Fragen. Ich danke ihm für die organisatorische Arbeit, für seine Hilfsbereitschaft und Geduld mir gegenüber, seine Einweisungen, seine Vor- und Ratschläge zu den Versuchsdurchführungen, infolge dessen diese Arbeit überhaupt erst möglich war.

Frau Doktor Heidi Roßmann, Abteilung Innere Medizin I der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen, danke ich ganz herzlich für ihre unermüdliche Hilfe bei allen kleinen und großen Problemen, die beim alltäglichen Arbeiten im Labor entstehen können und auch immer wieder mal entstanden sind. Ich danke ihr für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, in denen sie auch mal eine „zweite Meinung“ abgegeben hat.

Allen meinen Kolleginnen und Kollegen im „C-Bau“ der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die sie mir gegenüber erwiesen haben.

Nicht zuletzt gebührt mein ganz spezieller Dank meinen Vater und meiner verstorbenen Mutter. Ich danke ihnen von ganzem Herzen für ihr seelisches Dasein während meines Studiums und meiner Promotion, für all ihren moralischen Rückhalt, die sie mir während dieser Zeit gegeben haben (auch wenn der ganze Atlantische Ozean zwischen uns lag) und die für mich sehr wichtig waren.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Elena Schönleber geborene Lin Wu
Geburt	11. Oktober 1973 in Santa Cruz, Bolivien
Nationalität	bolivianisch
Familienstand	verheiratet

Schule

1980 - 1992	Deutsche Schule in Santa Cruz, Bolivien (Grundschule und Gymnasium)
1990 - 1991	Schüler-Austausch-Programm: Besuch des Isolde-Kurz Gymnasiums in Reutlingen
1992	Bolivianisches Abitur
1992 - 1993	Studienkolleg in Hamburg

1992 **Allgemeine deutsche Hochschulreife**

Studium

1994 - 1997 Vorklinikum
Christian-Albrechts Universität zu Kiel

1997 **Physikum**

1997 - 1998 Klinischer Studienabschnitt
Christian-Albrechts Universität zu Kiel

1998 **1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

1998 - 2001 Klinischer Studienabschnitt
Eberhard-Karls Universität Tübingen

1999 Im Rahmen der Promotion Freisemester für Forschungs- und
Laborarbeiten

2000 Auslandsfamulatur im Universitätsklinikum Torreón, Mexiko

2001 **2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

2001 - 2002 Praktisches Jahr
Klinikum Stuttgart - Katharinenhospital, Akademisches Lehr-
krankenhaus der Universität Tübingen

26.04.2002 **3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

Stipendien / Wissenschaftliche Hilfsstelle

1999 Im Rahmen der Promotion Stipendiatin des „Graduiertenkollegs
Zellbiologie in der Medizin“ an der Universität Tübingen

1999 - 2000 Im Rahmen der Promotion studentische Hilfskraft in der
Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen,
Abteilung Innere Medizin I - Gastroenterologie, Hepatologie,
Infektionskrankheiten

2000 Im Rahmen der Auslandsfamulatur im Universitätsklinikum Torreón,
Mexiko, Stipendiatin der Deutschen Stiftung für Internationale
Entwicklung

Beruf

2002 -2003 Ärztin im Praktikum
Marienhospital Stuttgart, Akademisches Lehrkrankenhaus der
Universität Tübingen

