Aus dem Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Institutsdirektor: Prof. Dr. Bernhard Fleischer

Prozessierung des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors LKLF im Verlauf der Aktivierung von T-Zellen

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von Philip Dießenbacher

aus Tübingen

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin Der Universität Hamburg am: 15.09.2005 Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. F. Haag Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. M. Aepfelbacher Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. F. Koch-Nolte

Meinen Eltern Brunhild und Hartmut Dießenbacher

ABB	ILDU	INGSVERZEICHNIS	6		
ABK	ABKÜRZUNGEN9				
FREI	MDW	ÖRTER UND ANGLIZISMEN	10		
FRA	GES	TELLUNG	12		
ZUS/	AMM	ENFASSUNG	12		
ABS	TRA	СТ	13		
1 EIN	ILEI	ΓUNG	14		
1.1	Da	s Immunsystem	14		
1.1	.1	Allgemeines	14		
1.1	.2	Die Rolle der T-Lymphozyten im Immunsystem	15		
1.1	.3	Die T-Zell-Aktivierung	15		
1.2	Da	s Proteasom	17		
1.3	Die	e Familie der KLF-Transkriptionsfaktoren	18		
1.4	De	r Transkriptionsfaktor LKLF	20		
1.4	.1	Das LKLF-Gen	20		
1.4	.2	Funktionelle Regionen des LKLF-Proteins	20		
1.4	.3	Die Rolle von LKLF für die Funktion von T-Zellen	22		
1.4	.4	Zusammenfassung und medizinische Bedeutung	24		
1.5	He	rstellung von Antikörpern mittels DNA-Immunisierung	26		
1.5	.1	Einführung	26		
1.5	.2	Techniken der DNA-Immunisierung	26		
1.5	.3	Immunologie der DNA-Immunisierung	27		
2 MA	TER	IAL UND METHODEN	32		

2.1	Zellkultur und Transfektion von Kulturzellen	32
2.1	1 Materialien und Geräte	32
2.1	2 Zellkultur	32
2.1	3 Transfektion von festwachsenden Zellen	
2.1	4 Transfektion von Suspensionszellen	
2.1	5 Stabile Transfektion von DC27.10-Zellen	
2.1	6 T-Zell-Anreicherung aus humanem Blut	34
2.2	Herstellung von aktiviertem Vanadat und Pervanadat	34
2.2	1 Materialien	34
2.2	2 Aktivierung von Natriumorthovanadat	34
2.2	3 Herstellung von Pervanadat	34
2.3	Western-Blot und Immunpräzipitation	35
2.3	1 Prinzip des Western-Blot	35
2.3	2 Materialien und Geräte	35
2.3	3 Durchführung des Western-Blot	36
2.3	2.3.4 Durchführung der Silberfärbung	
2.3	5 Blocken der Membranen und Durchführung der Immundetektionen	
2.3	6 Prinzip und Durchführung der Immunpräzipitationen	
2.4	Molekularbiologische Methoden	
2.4	1 Materialien und Geräte	
2.4	2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.4	3 Restriktionsverdau	41
2.4	4 Entfernung von endständigen Phosphatgruppen	42
2.4	5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA	42
2.4	6 Extraktion von DNA aus dem Agarosegel	42
2.4	7 Ligationsreaktionen	42
2.4	8 Transformation von E. coli	43
2.4	9 Plasmidpräparation	43
2.4	10 Herstellung der einzelnen Expressionskonstrukte	44
4	4.10.1 Herstellung des pCDNA3.1/LKLF-FlagMyc-Expressionsvektors	46
4	4.10.2 Herstellung des pEGFP/LKLF-FlagMyc-Expressionsvektors	47
4	4.10.3 Herstellung des pDisplay/hLKLF-Expressionsvektors	47

	2.4.10.	4 Herstellung der HA-LKLF-eGFP-Expressionsvektoren	47	
	2.4.10.	5 Herstellung des pEGFP/HA-LKLF-TAD-sez-Vektors	48	
2.4.10.6		6 Herstellung der Y-Mutagenese-Vektoren	48	
2.5	DNA	A-Sequenzierung	49	
2.6	Dur	chführung der DNA-Immunisierungen	49	
2	.6.1	Materialien, Geräte und Tiere	49	
2	.6.2	Durchführung	49	
2.7	Dur	chführung der verwendeten ELISA-Methoden	50	
2	.7.1	Materialien und Geräte	50	
2	.7.2	Zell-ELISA	50	
2	.7.3	Sandwich-ELISA	50	
2.8	Dur	chflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie	51	
2	.8.1	Materialien und Geräte	51	
2	.8.2	Fluoreszenzmikroskopie	51	
2	.8.3	Intrazelluläre Anfärbung	52	
2	.8.4	FACS-Analysen	53	
2.8.5		lalbwertszeitbestimmungen		
2.9	Ver	wendung von Hard- und Software sowie des Internet	54	
3 E	RGEBN	NISSE	55	
3.1	Unt	ersuchungen zur aktivierungsinduzierten Prozessierung sowie zu		
post	ttransla	tionalen Proteinmodifikationen des LKLF-Proteins	55	
3	.1.1	Klonierung von LKLF-Expressionskonstrukten	55	
	3.1.1.1	Untersuchung der Nachweisbarkeit eines LKLF-Expressionskonstrukt	tes in	
	HEK 2	93T- und Jurkat-Zellen	55	
	3.1.1.2	Nachweis unterschiedlicher Mengen eines fluoreszierenden LKLF-		
	Expres	sionskonstruktes in HEK 293T und in Jurkat-Zellen	57	
3	.1.2	Die Jurkat-Zelle als Modell für die aktivierte T-Zelle	59	
3	.1.3	Untersuchung von destabilisierenden Regionen im LKLF-Protein und		
N	lachweis	s von Kernlokalisationssignalen	61	
	3.1.3.1 Klonierung von LKLF-Deletionskonstrukten			
			3	

3.1.3.2	Analyse der subzellulären Lokalisation der einzelnen Deletionskonstrukte61
3.1.3.3	Nachweis der unterschiedlichen HA-LKLF-eGFP-Expressionskonstrukte in
HEK 2	93T-Zellen mittels Western-Blot
3.1.3.4	Analyse der destabilisierenden Potenz der einzelnen Deletionskonstrukte .67
3.1.3.5	Untersuchung der Aminosäuresequenz des humanen LKLF auf PEST-
Seque	nzen
3.1.4	Ein System zur Untersuchung der Eliminationsgeschwindigkeit von eGFP-
markierte	en Proteinen
3.1.5	Untersuchung der Elimination von HA-LKLF-eGFP unter Einfluss von
Proteason	neninhibitoren
3.1.6	Untersuchung der Ubiquitinylierung von LKLF mittels Western-Blot-
Analyser	von HA-LKLF-eGFP-Fusionsproteinen
3.1.7	Untersuchungen zum Einfluss von Phosphorylierungsreaktionen auf die
Stabilität	des LKLF-Proteins in Zellen
3.1.7.1	Einfluss von Vanadat auf die Menge rekombinanten intrazellulären HA-
LKLF	eGFP-Fusionsproteins
3.1.7.2	Untersuchungen zu serin- und threoninspezifischen Phosphorylierungen des
LKLF	92

3.2	Entwicklung einer Methode zur Erzeugung von Anti-	LKLF-Antikörpern
mitte	s DNA-Immunisierung	96
3.2	1 Das Prinzip der DNA-Immunisierung und Herstellu	ng eines Plasmids zur
ex	azellulären Expression einer LKLF-Domäne	
3.2	2 Vergleich zweier Methoden zum Screening von anti	ikörperproduzierenden
Ze	klonen	
3.2	3 Beobachtung des Titerverlaufs im Rahmen der DNA	A-Immunisierung103
3.2	4 Nachweis der Reaktivität des gewonnenen Antiseru:	ms in der intrazellulären
Ar	ärbung	
3.2	5 Nachweis der Reaktivität des gewonnenen Antiseru	ms im Western-Blot105
4 DI	KUSSION UND PERSPEKTIVEN	107

4 DISKUSSION UND PERSPEKTIVEN107

4.1	Methoden	.10)7
-----	----------	-----	----

4.2 Die Rolle von LKLF und des Proteasoms in der T-Zell-Aktivierung......109

4.3	LKLF und Signaltransduktion1	10
4.4	Potenzielle medizinische Bedeutung1	12
4.5	Die Methode der DNA-Immunisierung1	15
LITER	ATURVERZEICHNIS1	18
DANK	SAGUNG1	24
LEBENSLAUF125		
ERKLÄRUNG126		
ANHA	NG: Aminosäure- und cDNA-Sequenz des humanen LKLF12	27

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Familie der SP/xKLF-Transkriptionsfaktoren1	9
Abb. 2: Lage bekannter funktioneller Regionen im LKLF-Molekül	21
Abb. 3: Schema des LKLF-FlagMyc-Expressionskonstruktes und Western-Blot-Analyse	
von transfizierten Jurkat- und HEK 293T-Zellen5	56
Abb. 4: Nachweis eines fluoreszierenden LKLF-Expressionskonstruktes in HEK 293T-	
Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie5	57
Abb. 5: Nachweis eines fluoreszierenden LKLF-Expressionskonstruktes in Jurkat-Zellen	
und HEK 293T-Zellen	58
Abb. 6: Vergleich von ruhenden T-Lymphozyten mit Jurkat-Zellen bezüglich zweier	
Aktivierungsmarker mittels FACS-Analyse	50
Abb. 7: Schematische Darstellung der verschiedenen HA-LKLF-eGFP-	
Expressionskonstrukte6	52
Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit unterschiedlichen HA-LKLF-	
eGFP-Fusionsproteinen transfizierten CHO-Zellen6	53
Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit unterschiedlichen HA-LKLF-	
eGFP-Fusionsproteinen transfizierten CHO-Zellen6	54
Abb. 10: Darstellung der Deletionskonstrukte der Serie HA-LKLF-eGFP im Western-Blo	t 56
Abb. 11: Analyse der destabilisierenden Potenz einzelner HA-LKLF-eGFP-Konstrukte mittels Durchflusszytometrie	59
Abb. 12: Analyseresultat des PESTfind-Programms bezüglich der Aminosäuresequenz de humanen LKLF	s 70
Abb. 13: Schema zur Bestimmung der Halbwertszeit von eGFP-markierten Proteinen7	12
Abb. 14: Einfluss von Lactacystin auf die Elimination HA-LKLF-eGFP und eGFP in	
Jurkat-Zellen	74
Abb. 15: Einfluss von 3-Aminobenzamide auf die Elimination HA-LKLF-eGFP und eGF	Р
in Jurkat-Zellen	75
Abb. 16: Nachweis ubiquitinylierter Proteine in Präzipitaten von LKLF-	
Expressionskonstrukten	78
Abb. 17: Einfluss von Vanadat auf die Menge rekombinanten HA-LKLF-eGFP-Proteins i	n
DC27.10-Zellen	31
	6

Abb. 18: Einfluss von Vanadat auf die Menge rekombinanten HA-LKLF-eGFP-Proteins in
Jurkat-Zellen
Abb. 19: Untersuchung der Halbwertszeit von HA-LKLF-eGFP in vanadatbehandelten
Zellen und nicht vanadatbehandelten Zellen
Abb. 20: Eine Online-Analyse der LKLF-Aminosäuresequenz bezüglich potenzieller Ziele
der Tyrosinphosphorylierung85
Abb. 21: Nachweis der gezielten Mutagenese von zwei Tyrosinresten im HA-LKLF-eGFP
mittels Restriktionsverdau
Abb. 22: Einfluss von Vanadat auf die Stabilität von mutierten HA-LKLF-eGFP-
Fusionsproteinen (1)
Abb. 23: Einfluss von Vanadat auf die Stabilität von mutierten HA-LKLF-eGFP-
Fusionsproteinen (2)
Abb. 24: Nachweis der Tyrosinphosphorylierung von HA-LKLF-eGFP-
Expressionskonstrukten mittels Western-Blot
Abb. 25: Potenzielle Ziele der Serinphosphorylierung im humanen LKLF
Abb. 26: Potenzielle Ziele der Threoninphosphorylierung im humanen LKLF94
Abb. 27: Halbwertszeitmessung von eGFP und HA-LKLF-eGFP unter Einfluss von
Okadaic Acid95
Abb. 28: Schema des Expressionsvektors zur DNA-Immunisierung
Abb. 29: Schema der Technik der DNA-Immunisierung mittels Gene-Gun
Abb. 30: Nachweis des LKLF-Expressionskonstruktes auf der Zelloberfläche von HEK
293T-Zellen
Abb. 31: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CHO-Zellen, die das lösliche LKLF-
eGFP-Fusionsprotein produzieren100
Abb. 32: Schema des Zell-ELISA, sowie des Sandwich-ELISA100
Abb. 33: Titrierung des Anti-LKLF-Serums, sowie des Präimmunserums mithilfe des
Sandwich-ELISA
Abb. 34: Titrierung des Anti-LKLF-Serums, sowie des Präimmunserums mithilfe des Zell-
ELISA
Abb. 35: Immunreaktivität der zu verschiedenen Zeiten gewonnenen Antiseren einer gegen
LKLF immunisierten Ratte
Abb. 36: Intrazelluläre Anfärbung von transfizierten CHO-Zellen mittels des Anti-LKLF-
Antiserums
Abb. 37: Nachweis der Immunreaktivität des Anti-LKLF-Serums im Western-Blot106

Abkürzungen

3-ABA	3-Aminobenzamide
Ap-2rep	"activating enhancer binding protein 2 repressor", identisch mit KLF12,
	Mitglied der Sp/xKLF Transkriptionsfaktoren
ATP	Adenosintriphosphat
BBdp	Ein für den autoimmunologischen Diabetes mellitus prädestinierter
1	Rattenstamm
BKLF	Basic Krüppel-like Factor, Mitglied der Sp/xKLF Transkriptionsfaktoren
Bp	Basenpaare
C2H2	Typ von Zinkfingerproteinen, bei dem Zink durch 2 Cysteinyl- und 2
	Histidyl-Reste cheiliert wird
CD	"Cluster of Differentiation", fortlaufend nummerierte
	Differenzierungsmarker von Leukozyten
Cdc	"Cyclin dependent Kinase"; Zyklinabhängige Kinase
СНО	"Chinese Hamster Ovary"; aus dem Ovar des chinesischen Hamsters
	stammende Zelllinie
cMvc	Transkriptionsfaktor mit Ähnlichkeit zum MYC-Protein (Avian
5	myelocytomatosis virus)
CpG-Inseln	DNA-Bereiche die sich durch eine erhöhte Frequenz an CpG-
- F	Dinukleotiden auszeichnen, potenzielle Ziele der DNA-Methylierung
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	"Desoxyribonucleic Acid". Desoxyribonukleinsäure
eGFP	Enhanced green flourescent protein. Grün fluoreszierendes
0011	Protein ursprünglich von der Quallenart Aequorea victoria kloniert
	Grünfluoreszenz durch Mutagenese verstärkt
FKIF	Frythroid Krünnel like Factor Mitglied der Sn/xKIE-
	Transkriptionsfaktoren naher Verwandter des IKIF
FS	Embryonale Stammzellen
EACS	Flowcytometry activated cell sorter": Durchflusszytometer
Fac	"ES7-associated cell surface antigen" Zelloberflächenprotein
FSC	Forward Scatter" Maß für die Zellgröße bei der Durchflusszutometrie
CEE	Guanin nucleotide exchange factors" Guaninnukleotid
U EF	"Ouannin nucleonue exchange factors, Ouanninukleonu
CVLE	Austauschlichten
UKLF CM CSE	",Gut Kruppel-like Factor", Mitglied der Sp/XKLF Transkriptionstaktoren
UM-CSF	"Granulocyte/Macrophage Colony sumulating Factor; Zytokin
HBB	
HEK 2931	"Human emoryonal Kidney (cells) I, mit dem I-Antigen stabil
	transfizierte, aus humanen embryonalen Nierenzellen abgeleitete
HIV	"Human immunodeficiency virus", Humanes immunschwachevirus
IFN	Interferon
lg	Immunglobulin
IL ID2	Interleukin
IP3	Inositoltriphosphat
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif", Tyrosinhaltige
	konservierte Regionen in Immunrezeptoren
k.o.	"knock out"
Kd	Kilodalton

LKLF	"Lung Krüppel-like	Factor",	Mitglied	der	Sp/xKLF-
	Transkriptionsfaktoren				
MHC	"Major Histokompatil	oility	Complex",	Komple	x von
	Zelloberflächenmolekülen				
mRNA	"Messenger ribonucleic aci	d"			
NFAT	"Nuclear factor of activate	d T cells"	, Transkriptions	faktor akt	tivierter T-
	Lymphozyten				
ΝΓκΒ	"Nuclear factor к В"				
OVA	Ovalbumin				
PARP	Poly-ADP-Polymerase				
PCR	"Polymerase chain reaction	", Polyme	rase Kettenreakt	ion	
PDGFR	"Platelet derived growth fac	ctor recept	or", Wachstums	faktorreze	eptor
PEST-Motive	Sequenzabschnitte in Prote	einen, die	reich an den A	minosäu	ren Prolin,
	Glutamat, Serin und Threor	nin sind			
PLC	Phospholipase C				
PV	Pervanadat				
RAG	"Recombination-activating	-gene"			
RC20	Rekombinanter Antikörper	r, welchei	phosphoryliert	e Tyrosi	nreste von
	Proteinen detektiert			•	
RT-PCR	"Reverse transcription PCR	t", mit RN	A arbeitende PC	'R	
S	"Svedberg", Sedimentation	skonstante	2		
TCR	"T cell receptor", T-Zell-Re	ezeptor			
TH	"T helper"; T-Zell-Subpop	ulation, di	e durch den Diff	erenzieru	ngsmarker
	CD4 gekennzeichnet ist				-

Fremdwörter und Anglizismen

Destruction-Box	Definierte Aminosäuresequenz, die zum proteasomalen Abbau eines Proteins prädestiniert
Gene Gun	"Gen-Gewehr", Gerät zur ballistischen DNA-Immunisierung
in utero	Im Uterus (Gebärmutter)
Insert	DNA-Fragment, welches mittels Ligation in einen Vektor eingefügt wird
KEN-Box	Definierte Aminosäuresequenz, die zum proteasomalen Abbau eines Proteins prädestiniert
Leader	"Führer", Adressierungssequenzen, welche die subzelluläre Lokalisation von Proteinen steuern
NetPhos	Programm zum Auffinden potenzieller Phosphorylierungsstellen in vorgegebenen Aminosäuresequenzen
Online	In direkter Verbindung mit einer Datenverarbeitungsanlage oder dem Internet
PEST-Sequenz	Definierte Aminosäuresequenz, die zum proteasomalen Abbau eines Proteins prädestiniert
PESTfind	Programm zum Auffinden von möglichen PEST-Sequenzen in vorgegebenen Aminosäuresequenzen
post transfectionem	nach der Transfektion
Score	Wert
Screening	Reihenuntersuchung
Software	"Weiche Ware", die zum Betrieb einer Datenverarbeitungsanlage erforderlichen nichtapparativen Funktionsbestandteile (z.B.

Einsatzar	iweisungen, Pr	ogramme)		
Entfernen von Antikörpern, welche während einer Immundetektion				
an einer V	i einer Western-Blot-Membran gebunden wurden			
Durch	Antikörper	detektierbare	Aminosäuresequenz	in
rekombinanten Proteinen				
DNA-Quellstrang bei PCR-Reaktionen				
System zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen				
	Einsatzar Entferner an einer V Durch rekombin DNA-Qu System z	Einsatzanweisungen, Pr Entfernen von Antikörp an einer Western-Blot-M Durch Antikörper rekombinanten Proteine DNA-Quellstrang bei P System zur Untersuchut	Einsatzanweisungen, Programme) Entfernen von Antikörpern, welche währ an einer Western-Blot-Membran gebund Durch Antikörper detektierbare rekombinanten Proteinen DNA-Quellstrang bei PCR-Reaktionen System zur Untersuchung von Protein-Pr	Einsatzanweisungen, Programme) Entfernen von Antikörpern, welche während einer Immundetekt: an einer Western-Blot-Membran gebunden wurden Durch Antikörper detektierbare Aminosäuresequenz rekombinanten Proteinen DNA-Quellstrang bei PCR-Reaktionen System zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Fragestellung

LKLF ist ein Transkriptionsfaktor, welcher aktivierungsabhängig in T-Lymphozyten exprimiert wird. Experimentelle Arbeiten an k.o.-Mäusen, sowie an T-Zelllinien, zeigten dass LKLF sowohl suffizient als auch essenziell ist, einen ruhenden Zustand von T-Lymphozyten zu induzieren. Nach Aktivierung der T-Zelle kommt es zu einer raschen Herabregulation von LKLF auf Protein- als auch auf RNA-Ebene.

Diese Arbeit soll der Fragestellung nachgehen, ob es aktivierungsinduziert zu einer proteasomenabhängigen Degradierung von LKLF-Protein in lebenden Zellen kommt. Ferner sollen weitere Einflussfaktoren auf das LKLF-Proteinlevel, wie beispielsweise der Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Proteine, untersucht werden.

Um das Aufspüren des LKLF-Proteins mit verschiedenen Methoden der Proteinbiochemie künftig zu erleichtern, sollen mithilfe der ballistischen DNA-Immunisierung spezifische Antikörper gegen LKLF erzeugt werden und somit auch die Methode der DNA-Immunisierung anhand eines physiologischerweise nukleär exprimierten Proteins evaluiert werden.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den aktivierungsinduzierten Abbauweg des Transkriptionsfaktors LKLF in lebenden Zellen näher zu charakterisieren, sowie mittels einer modernen Immunisierungsmethode Antikörper gegen humanes LKLF-Protein herzustellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen starke Hinweise dafür, dass LKLF in lebenden Zellen einem proteasomenabhängigen Abbau unterliegt. Proteinmodifikationen wie Ubiquitinylierung und Phosphorylierung scheinen hierbei den Umsatz des Proteins zu modifizieren.

Eine Hemmung des Proteasoms von Zellkulturzellen resultiert, ebenso wie eine Hemmung von intrazellulären Phosphatasen, in einer verlängerten Halbwertszeit des Abbaus eines LKLF-eGFP-Fusionsproteins.

Des Weiteren konnte sowohl eine Ubiquitinylierung als auch eine Tyrosinphosphorylierung von LKLF-eGFP-Fusionsproteinen nachgewiesen werden.

Durch die Methode der ballistischen DNA-Immunisierung mittels einer "Gene Gun" konnten erfolgreich Antiseren gegen humanes LKLF hergestellt werden. Die Antiseren waren in der Lage unterschiedliche LKLF-Expressionskonstrukte sowohl in Primär- als auch in Tertiärstruktur zu detektieren.

Abstract

The objective of this work was on the one hand to further characterize the activation induced degradation pathway of LKLF protein in living cells. On the other hand antibodies against human LKLF protein should be generated by a modern immunization method.

The results of this work show strong evidence for a proteasome dependent degradation of LKLF in living cells. Protein modifications as ubiquitination and phosphorylation seem to modify the turnover of the protein. Inhibition of the proteasome as well as inhibition of intracellular phophatases resulted in a prolongated half life time of the destruction of LKLF-eGFP fusion proteins.

Further on ubiquitination and tyrosine phosphorylation of LKLF-eGFP fusion proteins were shown by the use of specific antibodies wich are able to detect phophotyrosin and ubiquitin respectively.

Antisera against human LKLF were successfully generated by the method of ballistic DNA-immunization using a "gene gun". The antisera were able to detect different LKLF expression constructs in primary as well as in tertiary protein structure.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Allgemeines

Das Immunsystem des Menschen hat eine Vielzahl von Aufgaben zu erbringen: So dient es der Abwehr von außen eindringender Mikroorganismen und Fremdkörper, genauso wie der Kontrolle körpereigener Zellen und somit der Vorbeugung der Entstehung bösartiger Tumoren (Janeway, Travers et al. 1999).

Das Immunsystem der Wirbeltiere wird allgemein in zwei große Anteile aufgeteilt. Der eine Anteil vermittelt die natürliche (angeborene) Immunität, der andere die spezifische (erworbene) Immunität. Durch den erworbenen Anteil ist der Organismus in der Lage, sich dem auf ihn einwirkenden Erregerspektrum anzupassen.

Das angeborene Immunsystem eliminiert eingedrungene Fremdkörper weitgehend unabhängig von ihrer Natur. Ihm werden unterschiedliche Zelltypen wie Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems sowie Granulozyten zugeordnet. Ferner zählen verschiedene humorale Faktoren wie das Komplementsystem, das bakterienspaltende Lysozym, das C-reaktive Protein und verschiedene Interferone zur natürlichen Immunität.

Die erworbene Immunität wird im Wesentlichen von den Lymphozyten vermittelt, welche wiederum in zwei Subtypen mit unterschiedlichen Funktionen eingeteilt werden. B-Lymphozyten sind für die Bildung von Antikörpern verantwortlich, während T-Lymphozyten, die zelluläre Immunität repräsentieren.

Die ständig wechselnden Anforderungen an das Immunsystem machen eine Vielzahl von Regulationsmechanismen erforderlich, die auf unterschiedlichen Ebenen ablaufen.

Das Versagen von Regulationsmechanismen kann zu einer Reihe von Krankheiten führen. Als Beispiele seien die Autoimmunerkrankungen genannt, bei denen das Immunsystem körpereigene gesunde Strukturen angreift, sowie maligne Lymphome und Leukämien, bei denen u.a. die Kontrolle über die Zellzyklusregulation verloren gegangen ist.

Diese Arbeit beschäftigt sich im weiteren Sinne mit diesen Regulationsmechanismen. Dabei beziehen sich meine Arbeiten auf einen Transkriptionsfaktor, der u.a. den Aktivierungsstatus von Lymphozyten steuert und somit Einfluss auf die Homöostase zwischen ruhenden und aktivierten T-Zellen hat.

1.1.2 Die Rolle der T-Lymphozyten im Immunsystem

T-Zellen werden im Thymus gebildet und zirkulieren dann zwischen Blut und lymphatischen Organen. Sie befinden sich solange in einem ruhenden Zustand, bis sie auf das auf ihren Rezeptor passende Antigen treffen. Wird einem T-Lymphozyten das auf seinen Rezeptor passende Antigen auf einem Klasse I oder –II-MHC-Molekül präsentiert, wird die T-Zelle aktiviert. Erst die aktivierte T-Zelle übt Effektorfunktionen gegenüber einer Zielzelle aus. Hierzu zählen:

- die Expression von IL-2, sowie dessen Rezeptor und klonale Expansion
- die Bildung zytotoxischer Effektormoleküle wie Perforin und Granzyme durch CD8positive T-Zellen
- die Sekretion inflammatorischer Mediatoren wie IFN-γ und GM-CSF durch CD4positive TH1-Zellen zur Aktivierung von Makrophagen
- die Sekretion von Zytokinen wie IL-4 und IL-5 durch CD4-positive TH2-Zellen zur Stimulation von B-Zellen.

Ruhende T-Zellen können viele Jahre im Organismus verweilen ohne sich zu teilen. Nach Aktivierung teilen sich T-Zellen zwei- bis dreimal pro Tag für mehrere Tage. Auf diese Weise entsteht eine große Zellpopulation, die spezifisch gegen ein eingedrungenes Pathogen agieren kann.

Nach Beseitigung der Infektion wird diese Zellpopulation jedoch nicht mehr benötigt. Aus diesem Grunde exprimieren aktivierte T-Zellen die Oberflächenproteine Fas und Fas-Ligand (Nagata 1994; Nagata 1997; Wallach, Kovalenko et al. 1998). Durch Interaktion dieser Moleküle (sowie durch andere weniger gut definierte Mechanismen) treten die aktivierten T-Zellen in die Apoptose ein, den sogenannten "programmierten Zelltod" (Nagata 1997; Wallach, Kovalenko et al. 1998).

Zahlreiche pro- und anti-apoptotische Faktoren wurden bereits beschrieben. Der Transkriptionsfaktor LKLF gehört zu jenen Faktoren, die dem programmierten Zelltod entgegenwirken (Kuo, Veselits et al. 1997).

1.1.3 Die T-Zell-Aktivierung

Nach bisheriger Auffassung wurde der ruhende Status von T-Zellen durch ein Ausbleiben aktivierender Signale erklärt (Freitas and Rocha 1997; Di Santo 2001).

In den letzten Jahren wurden jedoch Proteine identifiziert, die notwendig sind, den

ruhenden Status von T-Lymphozyten aufrecht zu erhalten. Diese Erkenntnisse werfen die Frage auf, ob nach T-Zell-Aktivierung neben direkten aktivierenden Prozessen, nicht auch die Faktoren eliminiert werden müssen, die den ruhenden Zustand der Zelle aufrecht erhalten.

Zu Beginn der T-Zell-Aktivierung, nach Bindung des spezifischen, von MHC-Molekülen präsentierten Antigens, steht das Zusammentreten des T-Zellrezeptor-Komplexes mit den Co-Rezeptoren CD4 bzw. CD8. Daraufhin kommt es durch die Tyrosinkinasen Lck und Fyn zur Tyrosin-Phosphorylierung der ITAM-Motive des T-Zell-Rezeptor(TCR)-Komplexes. Die Tyrosinkinase ZAP-70 wird sodann am TCR-Komplex gebunden und durch Lck aktiviert. ZAP-70 aktiviert einerseits die Phospholipase PLC-γ, was zur Freisetzung von Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3) führt, andererseits werden GEFs (Guanin-Nukleotid-Exchange-Faktoren) aktiviert. Neben der Bindung des spezifischen Liganden an den TCR ist für eine Aktivierung naiver T-Zellen ein costimulatorisches Signal erforderlich. Dieses besteht in einer Interaktion von B7-Molekülen antigenpräsentierender Zellen mit CD28-Molekülen der T-Zell-Membran. Auch dieser Signalweg führt zur Aktivierung eines GEF, des Proto-Onkogens Vav.

Die Signalwege, die von DAG und IP3 angestoßen werden, münden in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und NFAT.

GEFs wie SOS und Vav bewirken über kleine G-Proteine wie Ras und Rac eine Serin-/Threonin-Phosphorylierungskaskade, die schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führt. Daraufhin induzieren die aktivierten Transkriptionsfaktoren Proteine, die für die aktivierte T-Zelle erforderlich sind (Janeway, Travers et al. 1999 S.178-180).

In scheinbarem Widerspruch zur Mehrproduktion bestimmter Proteine kommt es nach T-Zell-Aktivierung auch zu einer Steigerung der Aktivität des Proteasoms, eines multimolekularen Komplexes zur Degradation von Proteinen, auf das 4-fache der Aktivität ruhender T-Zellen (Wang, Omura et al. 1997).

Dies wirft die Hypothese auf, durch das Proteasom der T-Zelle würden daraufhin Proteine eliminiert, die vorwiegend in ruhenden, teilungsinaktiven T-Zellen vorliegen.

So kommt es z.B. zum proteasomalen Abbau des I κ B α , eines Inhibitors des Transkriptionsfaktors NF κ B (Renard, Percherancier et al. 2000). NF κ B dagegen wird

durch proteasomale Spaltung seines Vorläuferproteins NFκB1 erst in seiner aktiven Form bereitgestellt (Palombella, Rando et al. 1994).

Des Weiteren werden diverse regulatorische Proteine des Zellzyklus, wie p53 und p27, proteasomal abgebaut (Pagano, Tam et al. 1995; An, Hwang et al. 2000).

Nach Behandlung von T-Zellen mit Proteasomeninhibitoren kommt es zu einer Resistenz der T-Zelle gegenüber Aktivierung (Wang, Luo et al. 1998).

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass auch der Transkriptionsfaktor LKLF in die Reihe der oben genannten aktivierungsinduziert proteasomal prozessierten Proteine gehört.

1.2 Das Proteasom

Beim Proteasom handelt es sich um ein in eukaryontischen Zellen vorhandenes ATPabhängiges proteolytisches System, welches diverse proteolytische Spaltungsspezifitäten in einem einzigen Organell vereinigt. Es besteht aus einer 20S-Untereinheit, die zusammen mit einer 19S-Regulatoruntereinheit, das 26S-Proteasom bildet (Ciechanover 1994). Die 19S-Untereinheit kontrolliert die Bindung ubiquitinylierter Proteine (Jentsch and Schlenker 1995). Außerdem ist eine Assoziation der 20S-Untereinheit mit einer 11S-Aktivatoruntereinheit, dem PA28 möglich, was zu einer Steigerung der proteasomalen Aktivität führt (Groettrup, Soza et al. 1996; Wang, Omura et al. 1997). Ob eine gleichzeitige Assoziation der 20S-Untereinheit mit der 19S- und der 11S-Untereinheit möglich ist, wurde noch nicht abschließend aufgeklärt.

In T-Zellen findet man eine aktivierungsinduzierte Hochregulation des PA28, was zur Aktivitätssteigerung des Proteasoms nach T-Zell-Aktivierung auf das Vierfache beiträgt (Wang, Omura et al. 1997).

Das Proteasom dient dem Abbau von falsch synthetisierten, geschädigten oder kurzlebigen zytoplasmatischen, membranständigen und nukleären Proteinen, sowie der Bereitstellung von proteolytischen Peptiden zur Antigenpräsentation auf MHC-Klasse I-Molekülen (Jentsch and Schlenker 1995).

70% -90% der zellulären Proteine werden über das proteasomale System abgebaut (Rock, Gramm et al. 1994).

In vielen Fällen geht der Zuführung von Proteinen zum Proteasom die kovalente Verknüpfung bestimmter Lysinreste des betreffenden Proteins mit einem kleinen Protein, dem Ubiquitin, voraus. Ubiquitin dient somit der Markierung von Proteinen, die dem proteasomalen Abbau zugeführt werden sollen. Des Weiteren wurden ubiquitinähnliche Proteine identifiziert, die ebenfalls u.a. der Markierung für den proteasomalen Abbau dienen (Yeh, Gong et al. 2000).

Zunächst wird Ubiquitin mittels einer E1-Ubiquitin-Ligase in einer ATP-abhängigen Reaktion aktiviert. Daraufhin wird Ubiquitin über ein E2-Carrierprotein auf einen Lysinrest des zu markierenden Proteins übertragen. Im Folgenden ist eine Übertragung von weiteren Ubiquitinmolekülen auf bereits verknüpfte Ubiquitinreste möglich, was zu einer Polyubiquitinylierung des Zielproteins führt (Ciechanover 1994).

Verschiedene Aminosäure-Sequenzmotive, die Proteine für den proteasomalen Abbau prädestinieren, wurden bereits identifiziert. Für die Gruppe der Cycline beispielsweise wurde eine konservierte "destruction box", für die den Zellzyklus regulierenden Proteine Cdc20, Nek2 und B99 die "KEN-Box" beschrieben (Glotzer, Murray et al. 1991; Hershko and Ciechanover 1998; Pfleger and Kirschner 2000). Ein bei zahlreichen proteasomal abgebauten Proteinen identifiziertes Sequenzmotiv ist die "PEST-Sequenz". Hierbei handelt es sich um Regionen, die reich an Resten der Aminosäuren Prolin, Glutamat, Serin und Threonin sind. Häufig werden diese Regionen von Lysin- oder Argininresten flankiert (Rogers, Wells et al. 1986; Rechsteiner and Rogers 1996).

Der proteasomale Umsatz der einzelnen Proteine kann auf unterschiedliche Weise gesteuert werden. Als häufige Regulationsmechanismen werden Phosphorylierung und Dephosphorylierung gefunden, aber auch andere kovalente Proteinmodifikationen scheinen den Umsatz eines Proteins durch das Proteasom zu beeinflussen (Musti, Treier et al. 1997; Hershko and Ciechanover 1998; Ku and Omary 2000).

Im Rahmen meiner Arbeit fand ich starke Hinweise auf eine Beteiligung des Ubiquitin-Proteasomen-Systems am Abbau des LKLF-Proteins. Ferner ging es um die Charakterisierung von destabilisierenden Sequenzmotiven mit der Frage, ob PEST-Sequenzen im LKLF vorhanden sind, und ob diese den Abbau des LKLF beeinflussen können. Darüber hinaus werden Indizien für eine Beteiligung von Tyrosinphosphorylierungen in der Regulation der LKLF-Prozessierung gezeigt.

1.3 Die Familie der KLF-Transkriptionsfaktoren

LKLF ist eines von wenigstens 18 Mitgliedern der Sp/xKLF-Familie von Zinkfingerproteinen. Bei allen bekannten eukaryontischen Mitgliedern handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, welche drei eng benachbarte C-terminal gelegene Zinkfingerdomänen vom C2H2-Typ aufweisen.



Abb. 1: Die Familie der SP/xKLF-Transkriptionsfaktoren

Strukturelle Merkmale der einzelnen Mitglieder der SP/xKLF-Familie. Jeder farbige Abschnitt markiert eine Region, die durch eine Dominanz bestimmter Aminosäuretypen gekennzeichnet ist. Die schwarzen Abschnitte kennzeichnen die Zinkfinger. Aktivierende (A)- und reprimierende (R) Domänen sind gekennzeichnet. Die Verbindungslinien kennzeichnen Ähnlichkeiten unter den Transkriptionsfaktoren außerhalb der Zinkfinger. Die Größen der Proteine, gemessen an ihrer Anzahl an Aminosäuren sind auf der rechten Seite angegeben und beziehen sich auf die humanen Proteine, mit Ausnahme von LKLF, AP-2rep, BKLF und IKLF, bei welchen sich die Größenangaben auf die murinen Proteine beziehen. (Philipsen and Suske 1999)

Die engsten Verwandten des LKLF innerhalb dieser Familie sind das GKLF und das EKLF. Eine Übersicht über die wichtigsten Vertreter dieser Familie gibt Abb. 1 Für einige Mitglieder dieser Familie konnten die DNA-Bindungsspezifitäten und z.T. auch Zielgene charakterisiert werden (Asano, Li et al. 1999; Asano, Li et al. 2000; Gray, Feinberg et al. 2002; Banerjee, Feinberg et al. 2003). Das EKLF z.B. ist ein physiologischer Transaktivator des Hämoglobin- (HBB-) Promotors, welchen es über eine CACCC-Sequenz bindet. Es spielt somit eine wichtige Rolle in erythroiden Zellen. Auch für rekombinant exprimiertes LKLF konnte eine transaktivierende Aktivität auf den HBB-Promotor nachgewiesen werden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein physiologisches Zielgen handelt, da LKLF in erythroiden Zellen nicht exprimiert wird.

Als weitere DNA-Bindungssequenzen von Mitgliedern der Sp/xKLF-Familie gelten die GC- und GT-Boxen.

1.4 Der Transkriptionsfaktor LKLF

1.4.1 Das LKLF-Gen

Das Zinkfingerprotein LKLF wurde erstmals 1995 durch Anderson et al. von der Maus kloniert und als ein naher Verwandter des Transkriptionsfaktors EKLF beschrieben (Anderson, Kern et al. 1995).

Das murine LKLF-Gen befindet sich auf Chromosom 8B3.3, das des Menschen auf Chromosom 19p13.11-p13.13 (Kozyrev, Hansen et al. 1999; Wani, Conkright et al. 1999) und das der Ratte auf Chromosom RNO16 (D16Rat39) (Diessenbacher, Bartels et al. 2003). Das humane LKLF-Gen erstreckt sich über einen Bereich von mehr als drei kb und besteht aus drei Exons der Länge 174 bp, 817 bp und 680 bp, die von zwei Introns getrennt werden. Eine CpG-reiche Region erstreckt sich vom Promotorbereich bis zum Ende des zweiten Exons (Kozyrev, Hansen et al. 1999).

1.4.2 Funktionelle Regionen des LKLF-Proteins

Das LKLF-Gen kodiert für ein Protein mit einer vorhergesagten Länge von 355 (Mensch) bzw. 354 (Maus) bzw. 351 (Ratte) Aminosäureresten, sowie einer Molekülgröße von rund 32,4 kd. Durch einen Abgleich der Aminosäuresequenz von murinem und humanem LKLF sowie von verschiedenen weiteren Mitgliedern der xKLF-Familie wurden am C-terminalen Ende drei hochkonservierte Regionen gefunden, die die Strukturmerkmale von Zinkfingerregionen aufweisen (Abb. 2 A). Der N-terminale Anteil (im Folgenden Aktivierungsdomäne genannt) ist sehr prolinreich und enthält eine Oligo-Alanin-Folge 40 Aminosäuren proximal des ersten potenziellen Zinkfingers (Anderson, Kern et al. 1995).



Abb. 2: Lage bekannter funktioneller Regionen im LKLF-Molekül

A: Lage der Zinkfinger, B: Lage der Kernlokalisationssignale, C: Lage der autoinhibitorischen Domäne.

Deletionsexperimente mit dem nächsten Verwandten des LKLF, dem GKLF wiesen zwei potente Kernlokalisationssignale nach (Abb. 2 B). Aufgrund starker Sequenzhomologie in den betreffenden Proteinabschnitten liegt die Vermutung nahe, auch LKLF könnte durch die entsprechenden homologen Bereiche für den Transport in den Zellkern adressiert werden. Das erste Kernlokalisationssignal befindet sich im murinen GKLF-Molekül in einem Bereich zwischen den Aminosäureresten 382 und 402. Der homologe Bereich des Maus-LKLF-Moleküls liegt im Bereich der Reste 253 bis 273. Das zweite Kernlokalisationssignal befindet sich distal des ertsen, wobei eine exakte Zuordnung zu bestimmten Aminosäureresten nicht erfolgte (Shields and Yang 1997).

Im Rahmen von Deletionsexperimenten konnte ich die im GKLF gefundenen Kernlokalisationssignale für das LKLF bestätigen und ferner nachweisen, dass sich in der Aktivierungsdomäne keine weiteren Kernlokalisationssignale befinden.

Im Bereich der Aminosäurereste 111-267 befindet sich eine autoinhibitorische Domäne, die die transkriptionelle Aktivität von LKLF herabsetzt (Abb. 2 C). Wird diese Domäne aus einem Fusionsprotein aus LKLF und einer GAL4-DNA-bindenden Domäne deletiert, so steigt die induzierende Wirkung des Fusionsproteins auf einen GAL4-induzierbaren Promotor drastisch an. Mit Hilfe eines Two-Hybrid-Systems wurde diese Region als Bindungsstelle für die E3-Ubiquitin-Ligase WWP1 identifiziert (Conkright, Wani et al. 2001).

1.4.3 Die Rolle von LKLF für die Funktion von T-Zellen

Neben der Lunge, sowie verschiedenen Geweben des Herz-Kreislauf-Systems, wurde die Milz als Ort der LKLF-Expression nachgewiesen (Anderson, Kern et al. 1995).

Northern-Blot Untersuchungen unterschiedlicher lymphozytärer Subtypen und Reifungsstadien ergaben eine hohe Expression von LKLF in reifen einzelpositiven (CD4⁺ bzw. CD8⁺) T-Lymphozyten, B220⁺/IgM⁺-B-Lymphozyten sowie auf einzelpositiven Thymozyten. Eine geringe Expression fand sich in Gesamtthymozyten, Milzzellen und Makrophagen. Keine nachweisbare Expression wurde in doppeltpositiven (CD4⁺, CD8⁺) Thymozyten gefunden. In-Situ-Hybridisierungsexperimente zeigten eine hohe Expression im Thymus-Mark, der Region der reifen einzelpositiven T-Lymphozyten. In der Thymus-Rinde war keine Expression nachweisbar (Kuo, Veselits et al. 1997).

Aktivierung von Lymphozyten mittels Anti-CD3-Antikörpern in vitro führte zu einer Herabregulation von LKLF auf der Ebene von mRNA und Protein innerhalb einiger Stunden, wobei die Elimination des Proteins schneller vonstatten ging als die der mRNA (Kuo, Veselits et al. 1997). Dies legt die Vermutung nahe, dass aktivierungsinduziert proteolytische Prozesse, die zum Abbau des LKLF-Proteins führen, aktiviert wurden.

Während der komplette knock out (k.o.) des LKLF-Gens bei Mäusen zu letalen itraabdominellen Blutungen zwischen Tag 11,5 und 13,5 (Wani, Means et al. 1998), bzw. Tag 12,5 und 14,5 (Kuo, Veselits et al. 1997) in utero führt, sind Mäuse mit einem

selektiven k.o. von LKLF im Immunsystem vital. Diese chimären Mäuse wurden durch Injektion von LKLF-defizienten embryonalen Stammzellen (ES) in Blastozysten von RAG-defizienten Mäusen erzeugt (Kuo, Veselits et al. 1997). RAG-defiziente Mäuse bilden weder T- noch B-Lymphozyten, so dass alle in den chimären Mäusen gebildeten T- und B-Zellen somit den LKLF-defizienten ES entstammen (Chen, Lansford et al. 1993).

Quantitative Analysen der Lymphozyten von LKLF^{-/-}-Mäusen weisen eine normale Population an peripheren B220⁺/IgM⁺ B-Zellen sowie normale Immunglobulinkonzentrationen auf, jedoch eine um ca. 90% reduzierte T-Zell-Population. Einzelpositive Milz- und Lymphknoten-T-Zellen zeigen einen aktivierten Phänotyp, charakterisiert durch vermehrte Proliferation, erhöhten Metabolismus sowie durch folgende Oberflächenmarker: CD44^{hi}, CD69^{hi}, CD62L^{lo}. Die Fas-Ligand-Expression auf einzelpositiven T-Zellen ist im Gegensatz zu ruhenden T-Zellen von Wild-Typ-Mäusen stark erhöht. Frisch isolierte Milzzellen zeigen einen drastisch erhöhten Anteil an toten und apoptotischen Zellen. (Kuo, Veselits et al. 1997)

Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde eine Hochregulation der LKLF-Expression in murinen CD8⁺ T-Gedächtniszellen nach abgelauferner viraler Infektion in vivo gefunden. Nach Aktivierung der T-Gedächtniszellen zu sekundären Effektorzellen in vivo kommt es zu einer erneuten Herabregulation der LKLF-mRNA (Grayson, Murali-Krishna et al. 2001).

Werden native T-Lymphozyten in vitro aktiviert, kommt es zur Herabregulation von LKLF-Protein innerhalb von vier Stunden. Eine Inkubation der aktivierten T-Zellen mit IL-7 führte, im Gegensatz zu aktivierten T-Zellen, die ohne IL-7 kultiviert wurden und innerhalb von 72 Stunden nach Aktivierung zu sterben begannen, zu einer Reexpression von LKLF innerhalb weniger Stunden und einer über Wochen andauernden Viabilität der Zellen in vitro. Solch eine Reexpression von LKLF wurde ebenfalls durch Inkubation der Zellen mit IL-2 oder einer Kombination aus IL-2 und IL-7 bewirkt. Eine Inkubation mit IL-12 führte zu keiner Zunahme, sondern eher zu einer Abnahme des LKLF-Proteins in den Zellen. Mit Hilfe von OT-I-Mäusen, die einen transgenen, für ein aus dem Ovalbumin abgeleitetes Peptid spezifischen T-Zell-Rezeptor tragen, wurde gezeigt, dass auch *in vivo* die bereits *in vitro* nachgewiesene Herabregulation des LKLF-Proteins nach Stimulation der T-Zellen und die Reexpression in T-Gedächtniszellen stattfindet (Schober, Kuo et al. 1999).

Wie bereits bei der Beschreibung des k.o.-Modells dargestellt, bewirkt LKLF in T-

Lymphozyten einen ruhenden Phänotyp, der Charakteristika wie verminderte Zellgröße, herabgesetzte Proliferation, verminderte Apoptoserate, sowie nur eine geringe Expression von Aktivierungsmarkern wie CD71, CD30, CD69 und CD1a, aber eine hohe Expression von CD62L, aufweist (Kuo, Veselits et al. 1997).

Über die Art und Weise wie LKLF seine Wirkungen innerhalb der T-Zellen entfaltet ist bislang wenig bekannt und Erkenntnisse über definitive physiologische Zielgene sind bis dato noch lückenhaft.

Ein direkter transaktivierender Effekt von LKLF auf einen Bereich des Vav-Promotors konnte in U937-Zellen nachgewiesen werden. Allerdings wurde dieser Effekt in HeLa-Zellen nicht beobachtet (Denkinger, Cushman-Vokoun et al. 2001). Ob dieser Effekt in lymphatischen Zellen eine Rolle spielt wurde bisher nicht untersucht.

Durch ein induzierbares Expressionssystem konnte LKLF in Jurkat tet on Zellen tetracyclinabhängig exprimiert werden. Mit Hilfe dieses Systems konnte auch in Jurkat-Zellen durch LKLF-Expression ein ruhender Phänotyp induziert werden. Neben einer negativen Korrelation mit den genannten Aktivierungsmarkern fand eine signifikante Herabregulation des cMyc Proteins durch LKLF statt, wobei ein direkter suppressiver Effekt des LKLF auf die cMyc-Promotor-Region bislang nicht nachgewiesen werden konnte (Buckley, Kuo et al. 2001).

1.4.4 Zusammenfassung und medizinische Bedeutung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der selektive k.o. von LKLF in Zellen des Immunsystems zu einer drastischen Störung des Gleichgewichts zwischen ruhenden und aktivierten T-Lymphozyten führt. Die Vermutung liegt nahe, dass LKLF eine wichtige Rolle in der Beibehaltung des ruhenden Status von reifen naiven T-Lymphozyten und T-Gedächtniszellen, nicht jedoch von B-Lymphozyten, hat und somit die spontane Aktivierung von T-Zellen verhindert.

Eine Überexpression von LKLF bewirkt die Induktion eines ruhenden Zustandes von T-Lymphozyten.

Induzierende Wirkung auf das LKLF konnte zwar für verschiedene Zytokine gezeigt werden, jedoch liegen weder über die Signalwege, die von der Zellmembran ausgehend zur Induktion des LKLF-Gens oder zum Abbau des Proteins führen, noch zu den Proteinmodifikationen, die in diesen Signalwegen eine Rolle spielen, gesicherte Erkenntnisse vor.

Obgleich verschiedene funktionelle Regionen im LKLF-Molekül charakterisiert wurden, konnten physiologische Zielgene bislang nicht mit Sicherheit identifiziert werden.

Genauso wenig liegen zurzeit Erkenntnisse vor, ob es Störungen des Immunsystems gibt, bei denen LKLF eine Rolle spielt.

Ein Rattenmodell, das einen ähnlichen Phänotyp wie die immunologische LKLF k.o.-Maus aufweist, ist die BBdp-Ratte, ein Modell für den autoimmunen insulinabhängigen Diabetes mellitus. Das Immunsystem der BBdp-Ratte fällt durch eine periphere Lymphopenie und einen hohen Anteil an aktivierten T-Zellen auf. Obwohl bei der BBdp-Ratte ein intaktes LKLF-Gen vorliegt (Diessenbacher, Bartels et al. 2003), wurde der Frage, ob die Ursache dieses Phänotyps möglicherweise in einem alterierten LKLF-Expressionsmuster oder in einem vom LKLF gesteuerten genetischen Programm zu suchen sein könnte, bislang noch nicht nachgegangen.

Auch in der Atherogeneseforschung spielt LKLF eine Rolle. So wird LKLF in vaskulären Endothelien durch Scherkräfte induziert, und gilt als potenziell anti-atherosklerotisches Protein. (Monajemi, Arkenbout et al. 2001; Dekker, van Soest et al. 2002; Arkenbout, Dekker et al. 2003).

1.5 Herstellung von Antikörpern mittels DNA-Immunisierung

1.5.1 Einführung

Im Jahre 2001 wurde die (nahezu) komplette Sequenzierung des menschlichen Genoms bekannt gegeben (Jasny and Kennedy 2001; Morgan 2001). Damit erlangten die sogenannten "Proteomics", also die Erforschung der Genprodukte, mehr und mehr an Bedeutung (Abbott 2001). Der Schwerpunkt der künftigen biochemischmolekularbiologischen Forschung ist daher, im Gegensatz zu der bislang dominierenden Erforschung von Genen, im Bereich der Charakterisierung von Proteinen zu erwarten.

Die Erforschung von Proteinen erfordert prinzipiell andere Forschungsinstrumente als die Molekulargenetik. Während Techniken zur Erkennung bestimmter Gene oder DNA-Sequenzen mittlerweile weit fortgeschritten sind, gestalten sich entsprechende Techniken für die Identifizierung von Proteinen technisch und zeitlich noch recht aufwendig. So stehen zahlreiche molekularbiologische Methoden zur Verfügung, die mit schnell und billig herstellbaren Oligonukleotiden arbeiten, welche spezifisch an komplementäre Sequenzen binden und mit unterschiedlichen Markern markiert werden können. Als Beispiele für diese Techniken seien der Southern-Blot, die In-Situ-Hybridisierung und die Microarray-Technik, mit welcher gleichzeitig die Expression mehrerer tausend Gene untersucht werden kann, genannt.

Die Erkennung einzelner intra- oder extrazellulärer Proteine, sei es mittels mikroskopischer Techniken, Western-Blot oder Durchflusszytometrie, setzt das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen das Protein, welches Gegenstand der Untersuchung ist, voraus. Die "klassische" Methode zur Gewinnung von Antikörpern besteht in der Immunisierung von Tieren mit dem in der Regel rekombinant hergestellten Protein. Die Herstellung und Aufreinigung der zur Immunisierung benötigten Proteinmengen ist häufig kostspielig und langwierig (Tang, DeVit et al. 1992). Der Impferfolg ist, insbesondere bei stark konservierten Proteinen, ungewiss.

1.5.2 Techniken der DNA-Immunisierung

Infolge der Erkenntnis, dass eine *in vivo* Transfektion von Zellen eines Wirtes mit einem Expressionsplasmid, das für ein Protein kodiert, zu einer Immunantwort gegen das Protein führt (s.u.), wurden verschiedene Methoden und Impfprotokolle für die Applikation von

DNA in vivo entwickelt. Die nachfolgende Liste gibt eine Auswahl an Beispielen.

- Intravenöse Injektion (Fynan, Webster et al. 1993)
- Intramuskuläre Injektion (Fynan, Webster et al. 1993; Ulmer, Donnelly et al. 1993; Wang, Ugen et al. 1993; Davis, Michel et al. 1994; Agadjanyan, Trivedi et al. 1997)
- Ballistische Inokulation von an Goldpartikel gekoppelter DNA ("Gene Gun" Immunisierung) (Fynan, Webster et al. 1993; Sundaram, Xiao et al. 1996; Surman, Irvine et al. 1998; Koch-Nolte, Duffy et al. 1999; Waine, Mazzer et al. 1999; Han, Reed et al. 2000; Ito, Shinohara et al. 2003; Sakai, Hisaeda et al. 2003)
- Intranasale Applikation (Fynan, Webster et al. 1993)
- Intravaginale Applikation (Bagarazzi, Boyer et al. 1997)

Auf die Methoden der Gene-Gun-Immunisierung und der intramuskulären Injektion wird im folgen Abschnitt verwiesen, da ihnen z.T. unterschiedliche Mechanismen beim Zustandekommen einer Immunantwort zugrunde liegen.

1.5.3 Immunologie der DNA-Immunisierung

Die Idee der DNA-Immunisierung geht auf die Beobachtung von Tang et al. zurück, dass ein Transfer von Plasmiden *in vivo*, welche das Gen für humanes Wachstumshormon (hGH) enthielten, in die Haut von Mäusen, nicht nur zur Produktion und systemischen Verteilung von Wachstumshormon führte, sondern auch die Produktion von spezifischen, gegen hGH gerichteten, Antikörpern zur Folge hatte (Tang, DeVit et al. 1992).

Infolgedessen wurde die Technik der DNA-Immunisierung mit unterschiedlichen Intentionen weiterentwickelt. So wurde die DNA-Immunisierung zum einen als preiswerte und wenig aufwendige Methode zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern sowie von polyklonalen Antiseren als Forschungsinstrumente erkannt und optimiert (Sundaram, Xiao et al. 1996; Koch-Nolte, Duffy et al. 1999; Tearina Chu, Halverson et al. 2001). Andererseits wuchs auch das Interesse, die DNA-Immunisierung als Impfmethode zur Krankheitsprävention zu etablieren (Robinson, Hunt et al. 1993; Ulmer, Donnelly et al. 1993).

Je nach angestrebtem Ziel der Immunisierung sollen unterschiedliche Wege der Immunantwort angestoßen werden. So soll für die Gewinnung von Antikörpern zu Forschungszwecken und zur Prävention von Infektionen mit extrazellulären Erregern vorwiegend die humorale Immunität angesprochen werden, während für die Bekämpfung intrazellulärer Krankheitserreger, wie Mykobakterien oder Viren, vor allem die zelluläre Immunität von Interesse ist. Darüber hinaus sind bei bestimmten Erregern (wie HIV und Malaria) sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort erwünscht (Gurunathan, Klinman et al. 2000).

Im Design von DNA-Immunisierungen lassen sich unterschiedliche Variablen an die individuellen Anforderungen der Immunisierung anpassen. Die wichtigsten Variablen bei der Erstellung einer Immunisierungsstrategie sind die Art der DNA-Applikation und das Zellkompartiment der Antigenexpression. Bei den Arten der DNA-Applikation ist es von einem immunologischen Standpunkt aus sinnvoll zwischen

- A) ballistischen Methoden (bei denen die DNA an Partikel gekoppelt, meist in die Haut oder Schleimhaut des Versuchstieres, appliziert wird, und dadurch z.T. direkt in die Zielzellen gelangt) sowie
- B) nicht-ballistischen Methoden (bei denen die DNA ausschließlich extrazellulär appliziert wird und erst in die Zielzellen aufgenommen werden muss)

zu unterscheiden

Des Weiteren kann das interessierende Antigen in unterschiedlichen Zellkompartimenten zur Expression gebracht werden. So kann die Expression des rekombinanten Proteins z.B. erfolgen:

- 1. Als sezerniertes Protein.
- 2. Als auf der Zelloberfläche exprimiertes Protein.
- 3. Als im Zytoplasma oder anderen intrazellulären Kompartimenten exprimiertes Protein.

Durch Veränderung der Signalsequenzen kann die Expression auch in anderen Kompartimenten als der physiologischen Lokalisation des Antigens erfolgen.

Von der DNA-Immunisierung können unterschiedliche Schenkel der Immunantwort angestoßen werden, die sich nach der Art der aktivierten T-Zell-Population unterscheiden lassen. Im Einzelnen lassen sich so drei Schenkel der Immunreaktion differenzieren:

- I. zytotoxische Reaktion durch CD8⁺ T-Zellen
- II. T-Helferzellantwort durch CD4⁺ Th1-Zellen
- III. T-Helferzellantwort durch CD4⁺ Th2-Zellen

Je nach verwendeter Applikationsmethode und Kompartiment der Antigenexpression dominiert einer der unter I bis III angeführten Mechanismen. Dies führt zu unterschiedlichen Formen der Immunantwort (Gurunathan, Klinman et al. 2000).

Während intrazellulär exprimiertes Antigen prinzipiell auf MHC-Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert wird, führt die extrazelluläre Expression des rekombinanten Proteins nach Aufnahme durch antigenpräsentierende Zellen (APC) zu einer Präsentation

auf MHC-Klasse II Molekülen. Präsentation auf den unterschiedlichen Klassen von MHC-Molekülen führt zu Aktivierung unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen. So werden über MHC-Klasse I Moleküle $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert, während über MHC-Klasse II Moleküle eine $CD4^+$ Lymphozytenpopulation angesprochen wird. $CD4^+$ T-Helferzellen wiederum lassen sich in zwei Untergruppen aufteilen, Th1- und Th2-Zellen. Eine T-Helferzell-Immunantwort wird in der Regel nur von einer der beiden Untergruppen getragen, da sich beide Schenkel der T-Helferzell-Antwort gegenseitig hemmen (Janeway, Travers et al. 1999 S. 395). Während eine Th1-Antwort über Mediatoren wie GM-CSF und IFN- γ vorwiegend die Aktivierung von Makrophagen zur Folge hat, resultiert aus einer Th2-Immunreaktion, gekennzeichnet durch Zytokine wie IL-4 und IL-5, eine Aktivierung von B-Zellen und infolgedessen eine Antikörperproduktion (Janeway, Travers et al. 1999 S. 281).

Je nach Applikationsmethode variiert die Art der T-Helferzellantwort. So führt die ballistische Applikation der an Goldpartikel gekoppelten DNA eher zu einer Th2-Antwort mit dominierender Immunglobulinproduktion vom Typ IgG1, während die nichtballistische Immunisierung mittels DNA-Injektion in den Skelettmuskel eher zu einer Th1-Antwort mit Makrophagenaktivierung und in geringerem Maße auch der Produktion von Antikörpern vom IgG2a-Typ führt (Feltquate, Heaney et al. 1997). Eine mögliche Erklärung hierfür stellen die bei den nicht ballistischen Methoden in größerer Menge extrazellulär anfallenden CpG-haltigen Plasmide dar, welche immunmodulatorisch wirken (s.u.).

Die bei der DNA-Immunisierung in den Zielzellen gebildeten Proteinmengen werden in einer Größenordnung von Pico- bis Nanogramm angegeben. Trotz dieser geringen Mengen im Vergleich zur Protein- oder Peptidimmunisierung ist der Impfeffekt beider Methoden vergleichbar (Boyle, Silva et al. 1997). Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen sind immunverstärkende Eigenschaften der DNA selbst, sowie eine effektive Involvierung professioneller APCs. Immunverstärkende Eigenschaften von DNA werden vor allem unmethylierten CpG-Sequenzen zugeschrieben, welche in bakteriellen Plasmiden, die als Vektoren bei der DNA-Immunisierung fungieren, weitaus häufiger vorkommen als in eukaryontischer DNA. Verschiedene Mechanismen der Induktion von immunologischen Reaktionen wurden diesbezüglich beschrieben (Razin and Friedman 1981; Krieg, Yi et al. 1995; Halpern, Kurlander et al. 1996; Klinman, Yi et al. 1996; Sato, Roman et al. 1996; Stacey, Sweet et al. 1996). Unterschiedlichen Arbeiten zur Aufklärung der Mechanismen des Zustandekommens einer Immunantwort nach DNA-Immunisierung zufolge kommt APCs eine zentrale Rolle bei der Initiierung einer Immunantwort zu. Zur Aufrechterhaltung hingegen sind auch transfizierte somatische Zellen von Bedeutung. Unter Berücksichtigung der potenziellen Zielzellen der *in vivo* Transfektion, lassen sich drei Mechanismen der Antigenexpression- bzw. – präsentation unterscheiden:

- APCs werden direkt mit dem DNA-Impfstoff transfiziert und produzieren das rekombinante Protein (Corr, Lee et al. 1996; Doe, Selby et al. 1996; Iwasaki, Torres et al. 1997; Akbari, Panjwani et al. 1999).
- Somatische Körperzellen werden transfiziert und produzieren das rekombinante Protein (Wolff, Malone et al. 1990; Ulmer, Donnelly et al. 1993; Wolff 1997).
- APCs phagozytieren von somatischen Zellen produziertes extrazelluläres rekombinantes Protein bzw. apoptotische oder nekrotische somatische Zellen, welche zuvor das rekombinante Protein intrazellulär gebildet haben (Ulmer, Deck et al. 1996; Fu, Ulmer et al. 1997; Albert, Pearce et al. 1998; Albert, Sauter et al. 1998)

In dieser Arbeit wurde für die Herstellung von anti-LKLF-Antikörpern mit der Intention der Induzierung einer starken humoralen Immunantwort die Methode der Gene-Gun-Immunisierung angewandt, da diese vorwiegend zu einer Th2-dominierten Helferzellantwort führt. Des Weiteren wurde, um ein optimales Ansprechen der humoralen Immunität zu erreichen, für die Immunisierung ein Expressionskonstrukt verwendet, welches die Expression der Aktivierungsdomäne von LKLF als Zelloberflächenprotein vermittelt.

Zielsetzung

In dieser Arbeit werden zwei thematisch und methodologisch unterschiedliche Zielsetzungen bearbeitet.

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, unterliegt das LKLF-Protein in T-Zellen einer raschen aktivierungsinduzierten Elimination. Ziel des ersten Abschnitts meiner Arbeit ist daher die Untersuchung des aktivierungsinduzierten Abbaus des LKLF-Proteins in lebenden Zellen. Hierbei sollte insbesondere der Fragestellung nachgegangen werden, ob posttranslationale Proteinmodifikationen wie Phosphorylierung und Ubiquitinylierung Auswirkungen auf die Stabilität des LKLF-Proteins haben könnten. Außerdem sollte untersucht werden, ob abgrenzbare Regionen des LKLF-Proteins destabilisierende Potenz aufweisen, und ihnen daher besondere Bedeutung im Zusammenhang mit dem aktivierungsinduzierten Abbau zukommt.

Ein nahezu unentbehrliches Werkzeug zur Erforschung von Proteinen sind spezifische Antikörper. Bislang sind weder gegen humanes LKLF noch gegen das LKLF anderer Spezies spezifische Antikörper in größerer Menge verfügbar. Daher widmet sich der zweite Abschnitt dem Vorhaben der Herstellung von Antikörpern als Werkzeug zur weiteren Erforschung des LKLF-Proteins. Hierzu sollte die Methode der DNA-Immunisierung Anwendung finden, welche bislang überwiegend zur Erzeugung von Antikörpern gegen Zelloberflächenproteine angewandt wurde. Es soll somit anhand des LKLF ebenfalls exemplarisch untersucht werden, ob die Methode der DNA-Immunisierung erfolgreich zur Herstellung von Antikörpern gegen nukleäre Proteine modifiziert werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur und Transfektion von Kulturzellen

2.1.1 Materialien und Geräte

•	3-Aminobenzamide	Sigma
•	CHO-Zelllinie	ATCC
•	DC27.10-Zelllinie	Arne von Bonin, Tropeninstitut Hamburg
•	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
•	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Invitrogen)
•	Fetal Bovine Serum (FCS)	Biochrom KG
•	Ficoll-Paque Research Grade	Pharmacia Biotech
•	Gene Pulser mit Capacitance Extender	Bio Rad
•	GenePulser Cuvette 0,2 cm	Bio Rad
•	GenePulser Cuvette 0,4 cm	Bio Rad
•	Geneticin	Gibco (Invitrogen)
•	HEK 293T-Zelllinie	Carol Stocking, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
•	HEPES Pufferlösung 1M, Flüssig	Gibco (Invitrogen)
•	Jurkat-tet-on-Zelllinie	Clontech
•	Lactacystin	Alexis
•	Laminar Flow (Hera Safe)	Heraeus instruments
•	L-Glutamine (100x), Flüssig	Gibco (Invitrogen)
•	Lipofectamine-Reagent	Gibco (Invitrogen)
•	MACS Pan T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec
•	MEM Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	Gibco (Invitrogen)
•	Natriumpyruvat MEM 100 mM, Flüssig	Gibco (Invitrogen)
•	Nunclon Surface Zellkulturflaschen (T75)	Nunc
•	Optimem-1	Gibco (Invitrogen)
•	PBS Dulbecco's	Gibco (Invitrogen)
•	RPMI 1640 Medium	Gibco (Invitrogen)
•	Sca-I	NEB
•	Trypsin-EDTA (10x), Flüssig	Gibco (Invitrogen)
•	Zellkulturschalen (Petrieschalen)	Greiner bio-one

2.1.2 Zellkultur

Suspensionszellen wurden in RPMI-Medium, supplementiert mit 10% FCS und 1 mM Pyruvat, festwachsende Zellen in DMEM-Medium, supplementiert mit 10% FCS, 1 mM Pyruvat, 10 mM HEPES-Puffer, 0,1 mM MEM nichtessentielle Aminosäuren und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Zellkultur-Inkubator bei 37° C und 5% CO₂-Gehalt. Die Zellen wurden spätestens bei beginnendem Farbumschlag des Mediums umgesetzt.

2.1.3 Transfektion von festwachsenden Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen fremder DNA in Zellen oder Bakterien. Festwachsende Zellen (HEK 293T- und CHO-Zelllinie) wurden mit der Methode der Lipofektion, unter Verwendung des Lipofectamin-Reagenz, transfiziert. Für die Transfektion einer 75 ml-Zellkulturflasche wurden 20 µl Lipofectamin-Reagenz, sowie 10 µg DNA nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.1.4 Transfektion von Suspensionszellen

Suspensionszellen (Jurkat- und DC27.10-Zellen) wurden mit der Methode der Elektroporation transfiziert. Die Transfektion von Jurkat-Zellen erfolgte in 4 mm Elektroporationsküvetten, welche mit 7 x 10^6 Zellen in 700 µl RPMI-Medium gefüllt wurden. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser mit 280 V. Pro Transfektion wurden 10 µg DNA eingesetzt.

2.1.5 Stabile Transfektion von DC27.10-Zellen

Unter einer stabilen Transfektion versteht man das dauerhafte Einbringen fremden Erbgutes in das Genom von Zellen.

Für die stabile Transfektion von DC27.10-Zellen mit dem pEGFP/HA-LKLF-Vektor wurde dieser mit dem Restriktionsenzym ScaI linearisiert und per Elektroporation transfiziert.

Die Transfektion erfolgte in 2 mm Elektroporationsküvetten, welche mit 4 x 10^6 Zellen in 400 µl RPMI-Medium gefüllt wurden. Die Elektroporation erfolgte mit einem Gene Pulser mit 250 V. Pro Transfektion wurden 10 µg DNA eingesetzt.

Die Selektion erfolgte mit Geneticin in einer Konzentration von 1 mg/ml über die gesamte Dauer der Kultur.

Etwa vier Wochen nach der Transfektion wurden grün fluoreszierende Zellen per FACS selektioniert und weiterkultiviert. Drei weitere Wochen später wurden die Zellen subkloniert. 13 Klone wurden ausgewählt und ca. sechs Wochen weiterkultiviert. Danach wurde die Expression des Fusionsproteins nach 14-stündiger Inkubation in Gegenwart oder
Abwesenheit von 10 µM Vanadat im FACS untersucht.

2.1.6 T-Zell-Anreicherung aus humanem Blut

Mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) wurden mittels Ficoll-Zentrifugation aus 1:1 mit PBS verdünntem Blut abgetrennt. Die enthaltenen T-Zellen wurden mittels des "Pan T Cell Isolation Kit" angereichert und nach Anfärbung durchflusszytometrisch analysiert.

2.2 Herstellung von aktiviertem Vanadat und Pervanadat

2.2.1 Materialien

•	Natriumhydroxid	Merck
•	Natriumorthovanadat	Sigma
•	Salzsäure	Merck
•	Wasserstoffperoxyd	Merck

2.2.2 Aktivierung von Natriumorthovanadat

Natriumorthovanadat wurde in einer Konzentration von 10 mM in Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH und HCl auf 10 eingestellt. Die Lösung wurde gekocht bis sie klar wurde und auf Zimmertemperatur abgekühlt. pH-Wert-Einstellung und Aufkochen der Lösung wurden so oft wiederholt bis sich der pH-Wert bei 10 stabilisiert hatte. Die Vanadatlösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.3 Herstellung von Pervanadat

Pervanadat wurde vor jeder Verwendung frisch angesetzt. 100 μ l einer 50 mM Natriumorthovanadat-Stammlösung wurde mit 30 μ l Wasserstoffperoxyd (30%) versetzt und 1:5 mit Wasser verdünnt. Die so erhaltene Lösung wurde in einer 1:100-Verdünnung, also in einer Endkonzentration von 100 μ M, den Zellen zugegeben.

Je nach zu untersuchender Fragestellung wurde eine der beiden Vanadatpräparationen eingesetzt. Für die Western-Blot-Analysen phosphorylierter Proteine wurde unter Intention einer möglichst hochgradigen Proteasehemmung 100 μ M Pervanadat verwendet. Aktiviertes Vanadat wurde bei länger dauernden Inkubationszeiten eingesetzt, um die Zellen einer möglichst geringen Toxizität auszusetzen.

2.3 Western-Blot und Immunpräzipitation

2.3.1 Prinzip des Western-Blot

Der Western-Blot (auch Protein-Blot oder Immuno-Blot genannt) ist eine Methode, bei der nach elektrophoretischer Auftrennung eines Proteingemisches die aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert und anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert werden. Für die Auftrennung der Proteine wurde das NuPage-System (Novex/Invitrogen) verwendet. Der Blot (also der Transfer der Proteine auf die Membran) wurde mittels eines Wet-Blot-Verfahrens (X Cell II Blotting System von Novex/Invitrogen) durchgeführt.

2.3.2 Materialien und Geräte

•	AEBSF	Sigma
•	Anti-Flag M2 Monoclonal Antibody	Sigma
•	Anti-HA High Affinity Antibody	Roche
•	Anti-Mouse Ig, Horseradish Peroxidase linked	Amersham Biosciences
•	Anti-Phosphotyrosine RC20-Antibody,	
	Horseradish Peroxidase linked	Dianova
•	Anti-Rabbit Ig, Horseradish Peroxidase linked	Amersham Biosciences
•	Anti-Rat Ig, Horseradish Peroxidase linked	Amersham Biosciences
•	Complete Protease Inhibitor	Roche
•	ECL Western Blotting detection reagent	Amersham-Pharmacia
•	EDTA	Sigma
•	Eisen(II)-sulfat Heptahydrat zur Analyse	Merck
•	Ethanol	Merck
•	Glycerin	Merck
•	Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
•	Kaliumchlorid zur Analyse	Merck
•	Methanol reinst DAB	Walter CMP GmbH
•	Mouse Anti-Human cMyc Antibody	PharMingen (BD)
•	MultiMark Multi-Colored Standard	Novex (Invitrogen)
•	Natriumchlorid für die Molekularbiologie	Merck
•	Natriumcitrat-Dihydrat für die Molekularbiologie	Merck
•	Neubauer-Zählkammer	Plan Optik
•	Nitrocellulose Transfer Membrane "Protran"	Schleicher und Schuell
•	NuPage Antioxidant	Novex (Invitrogen)
•	NuPage LDS Sample Buffer (4x)	Novex (Invitrogen)

•	NuPage MOPS SDS Running Buffer (20x)	Novex (Invitrogen)
•	NuPage Novex 10% Bis-Tris Gel 1 mm 10 Well	Novex (Invitrogen)
•	NuPage Novex 10% Bis-Tris Gel 1 mm 12 Well	Novex (Invitrogen)
•	NuPage Sample Reducing Agent (10x)	Novex (Invitrogen)
•	NuPage Transfer Buffer (20x)	Novex (Invitrogen)
•	Polyvinylendifluorid- (PVDF) -Membran	
	(ImmobilonP)	Roche
•	Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham
•	Re-Blot Western Blot Recycling Kit	Chemicon
•	Rinder-Serumalbumin (BSA)	Sigma
•	Salzsäure 25 % zur Analyse	Merck
•	SeeBlue Pre-Stained Standard	Novex (Invitrogen)
•	Silbernitrat zur Analyse	Merck
•	TBS (10x), bestehend aus 80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g	g Tris-HCl pH 7,4 ad 1000 ml H_2O
•	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan für die	
	Molekularbiologie	Merck
•	Triton X-100	Sigma
•	Tween 20	USB Corporation
•	Ziegenserum	Sigma

2.3.3 Durchführung des Western-Blot

Suspensionszellen wurden durch Zentrifugation bei 1200 rpm geerntet und anschließend in 50 ml PBS gewaschen. Festwachsende Zellen wurden mittels Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst und anschließend zunächst mit supplementiertem DMEM-Medium und dann mit 50 ml PBS gewaschen.

Die Zelldichte wurde beim letzten Waschgang mittels Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Zellen wurden in einem Lysepuffer der folgenden Zusammensetzung lysiert:

0,05 M Tris-HCl (pH 7,8) 0,1375 M NaCl 1 mM Natrium-Orthovanadat 0,5 mM EDTA 10 % Glycerin 1 mM AEBSF oder empfohlene Menge Complete-Proteaseinhibitormischung (jeweils erst kurz vor Verwendung des Puffers zugegeben)

1 % Triton X-100 (erst kurz vor Verwendung des Puffers zugegeben)

Pro 10⁶ Zellen wurden 50 µl (Abb. 10, Abb. 16 C-E, Abb. 24) bzw. 30 µl (Abb. 3 C und

D) bzw. 10 µl (Abb. 3 A und B). Lysepuffer verwendet. Die Lyse erfolgte 30 Min. auf Eis. Unsolubilisierte Zellbestandteile wurden bei 13000 rpm für 10 Minuten pelletiert und verworfen. Das Lysat wurde ggf. bei -20° C zwischengelagert.

Die Taschen eines Gels wurden mit Zelllysaten entsprechend einer jeweils gleichen Menge an Zelläquivalenten beladen (die Anzahl der Zelläquivalente ist in der jeweiligen Abbildungslegende angegeben). Die Auftrennung und der Transfer wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde den Proteinproben, dem Laufpuffer und dem Blotpuffer ein Reduktionsmittel (DTT) zugegeben. Vor dem Beladen der Spuren wurden die Proteinproben mit dem Reduktionsmittel (2µl Sample Reducing Agent) und dem LDS-Ladepuffer (4 µl) versetzt, mit Lysepuffer auf 20 µl aufgefüllt und für 10 Minuten auf 70° C erhitzt. Für die Auftrennung wurde für ca. 30 Minuten eine Spannung von 200 Volt angelegt. Für den Transfer der Proteine wurden Nitrocellulose-Membranen, welche zuvor 10 Minuten in Blotpuffer angefeuchtet wurden und PVDF-Membranen, welche 30 Sekunden in Methanol aktiviert wurden, verwendet. Das Elektrophoresegel mit den aufgetrennten Proteinen wurde in einem "Blotsandwich" zwischen die NC- und PVDF-Membranen gelegt, und der verbleibende Freiraum wurde mit Schwämmen ausgefüllt. Die Blotkammer wurde Luftblasenfrei mit Blotpuffer gefüllt. Daraufhin wurde mit 30 Volt Spannung zunächst 2 Minuten auf die NC-Membran und dann 90 Minuten auf die PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde für die Immundetektion verwendet, die NC-Membran wurde einer Silberfärbung unterzogen, um eine vergleichbare Spurbeladung zu kontrollieren.

2.3.4 Durchführung der Silberfärbung

Um eine vergleichbare Proteinbeladung der einzelnen Spuren eines Gels zu kontrollieren wurde die NC-Membran einer Silberfärbung unterzogen. Hierzu wurde die NC-Membran nach dem Blot zunächst ca. 2-3 Minuten in demineralisiertem Wasser gewaschen. Zur Färbung der Membran wurde eine Lösung mit folgender Zusammensetzung jeweils frisch angesetzt und ca. 5 Minuten unter ständigem Schwenken mit der Membran inkubiert:

9 ml demineralisiertes Wasser
0,08 g Eisen(II)-sulfat
0,5 ml Natriumcitrat (40 % in H₂O)
0,1 ml Silbernitrat (20 % in H₂O).

Anschließend wurde die Membran mehrmals in demineralisiertem Wasser gewaschen um

überschüssiges Färbereagenz zu entfernen, und danach luftgetrocknet.

2.3.5 Blocken der Membranen und Durchführung der Immundetektionen

Die Immundetektion beim Western-Blot beruht auf dem Prinzip der spezifischen Antigenerkennung durch Antikörper.

Die Sichtbarmachung der Proteinbanden erfolgte mithilfe Meerettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper. Die gekoppelte Peroxidase katalysiert die Bildung einer lumineszierenden Substanz, welche wiederum zur Schwärzung eines lichtempfindlichen Films führt. Als Substrat wurde das "ECL Western Blotting detection reagent" (Amersham) verwendet.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran zunächst für wenigstens 10 Minuten geblockt, um die noch freie Proteinbindungskapazität zu sättigen. Hierzu wurde, mit Ausnahme der mit dem RC-20-Antikörper detektierten Membranen, Ziegenserum (2 ml in 18 ml TBS) verwendet. Bei Membranen, welche mit dem RC-20 Antikörper detektiert werden sollten, wurde ein spezieller BSA-haltiger, phosphatasefreier Blockpuffer verwendet (1 % BSA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1 % Tween 20).

Die Inkubation der Antikörper mit der PVDF-Membran erfolgte in einem Tris basierten Puffer (9 ml TBS, 1 ml Ziegenserum, 0,5% Tween 20) bei 4° C für mindestens 1 Stunde, längstens jedoch über Nacht. Die einzelnen Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen verwendet:

•	Anti-cMyc	1:1000
•	Anti-GFP	1:1000
•	Anti-Flag-M2	1:2500
•	Anti-HA	1:1000
•	Anti-PY-RC20	1:2500
•	Anti-Ubiquitin	1:500

Nach Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran zwei Mal für eine Minute und drei Mal für fünf Minuten in Waschpuffer (0,5% Tween 20 in TBS) gewaschen.

Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte analog zu der des Erstantikörpers. Alle Zweitantikörper wurden 1:5000 verdünnt. Da der Anti-PY-RC20 bereits Peroxidasegekoppelt zur Verfügung stand, entfiel hier eine Zweitantikörperinkubation. Das Ansetzen und Verwenden des ECL-Reagenz erfolgte nach Herstellerangaben. Die Membran wurde zwischen zwei Plastikfolien gelegt, und der Film wurde für 10 Sekunden bis 10 Minuten (je nach Signalstärke) exponiert und in einer Entwicklungsmaschine entwickelt. Sollte eine Zweitdetektion einer Membran erfolgen, so wurde diese mit dem "Re-Blot Western Blot Recycling Kit" nach Herstellerangaben gestrippt und erneut detektiert.

2.3.6 Prinzip und Durchführung der Immunpräzipitationen

Die matrixbasierte Immunpräzipitation dient dem spezifischen Binden eines Antigens aus einem Antigengemisch an eine Matrix. Das an der Matrix gebundene Antigen kann daraufhin einer weiteren Untersuchung, z.B. mittels Western-Blot zugeführt werden.

Als Matrix fand Protein-G-Sepharose Verwendung. Protein-G-Sepharose besteht aus an Agarosepartikel gebundenem Protein G. Protein G vermag mit dem Fc-Teil von Immunglobulinen eine starke Molekülbindung einzugehen. Auf diese Weise lassen sich Antikörper verschiedener Spezies an einer Agarosematrix immobilisieren.

Zur Durchführung der Immunpräzipitation wurde die Matrix zunächst ein Mal mit 1 ml 1% Triton-X-100 in PBS gewaschen. Die Bindung der Antikörper an die Matrix erfolgte für wenigstens eine Stunde bei 4° C ebenfalls in 1% Triton-X-100 in PBS. Die Matrix wurde erneut gewaschen und mit dem Zelllysat für 30-60 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat entfernt und die Matrix mit Lysepuffer fünf Mal für 10 Minuten bei 4° C gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Präzipitat in 18 µl LDS Sample Buffer (1x) aufgenommen und ggf. bei -20° C zwischengelagert. Vor dem Erhitzen auf 70° C (s.o.) wurde das Reduktionsmittel zugegeben. Zur Vermeidung von unspezifischer Bindung von Proteinen an die Matrix wurde das Lysat vor der Immunpräzipitation für 30-60 Minuten mit ungekoppelter Matrix bei 4° C vorinkubiert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Materialien und Geräte

•	2-Propanol zur Analyse	Merck
•	Agarose Electrophoresis Grade	Novex (Invitrogen)
•	AmpliTaq Gold und PCR-Puffer (10x)	Perkin Elmer
•	Aqua ad injectabilia (a.i.)	Braun
•	Carbenicillin. 2 Na-Salt	Serva
•	Digitalkamera	Kodak
•	DNA-Ligase (T4)	Invitrogen
•	dNTP Set PCR Grade, je 100 mM	Invitrogen

•	Dye Terminator Sequenzierungs Kit	Applied Biosystems ABI
•	E. coli (SoloPack Gold Supercompetent Cells)	Stratagene
•	EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
•	Ethanol getrocknet	Merck
•	Ethidiumbromid	Molecular Probes
•	Gelkammern und Netzgeräte	Biometra und peqlab
٠	GeneRuler 1 kb DNA Ladder	MBI
•	Kanamycin (500x)	Roche
•	LB Agar	Gibco (Invitrogen)
•	LB Broth Base	Gibco (Invitrogen)
٠	Loading Dye (6x) (DNA-Ladepuffer)	MBI
٠	pCDNA3.1 Vektor	Invitrogen
•	pDisplay Vektor	Invitrogen
٠	pEGFP-N1 Vektor	Clontech
•	PFU Turbo DNA Polymerase	Stratagene
٠	Phosphatase alkaline (AP)	Roche
٠	pOPE215-Vektor	Stefan Dübel, Heidelberg
٠	Progene Termocycler	Techne
•	QIAprep Spin Minirep Kit	Qiagen
٠	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
•	Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
•	Restriktionsendonukleasen (SalI, BamHI, NheI,	
	BglII, EcoRI, XmnI, SfcI, ScaI, SacI)	New England Biolabs
•	SOC Medium	Gibco (Invitrogen)
•	Schüttelinkubator Unitron	HT
•	Sorvall RC26 Plus Zentrifuge	Sorvall
•	StrataCleanResin	Stratagene
•	T4 TA Cloning Kit	Novex (Invitrogen)
•	TAE Puffer (50x)	Gibco (Invitrogen)
•	UV-Tisch	Kodak

2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren der Gentechnologie zur selektiven Amplifikation von DNA-Abschnitten durch DNA-Neusynthese mittels DNA-Polymerase. Hierbei wird die zwischen zwei synthetischen Oligonukleotiden ("Primer") liegende DNA-Sequenz exponentiell angereichert (Pschyrembel 1993). Die Synthesevorgänge werden mehrfach wiederholt.

Durch Modifikationen der Technik kann sie neben der selektiven Amplifikation auch für andere Zwecke eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde von der Möglichkeit der gezielten Mutagenese Gebrauch gemacht.

Ein typischer PCR-Ansatz besteht aus der Quell-DNA (z.B. Plasmid-Miniprep 1:500), den Vorwärts- und Rückwärts-Primern (siehe Tabelle 1), der DNA-Polymerase, einer Nukleosidmischung (dNTPs), sowie einem Puffer.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurde die Ampli Taq Gold DNA-Polymerase verwendet. Um die Fehlerquote in der Amplifikation herabzusetzen wurde bei einigen Ansätzen eine geringe Menge PFU-Turbo-Polymerase zugesetzt (Cline, Braman et al. 1996). Die PCR-Reaktionen wurden in einer PCR-Maschine (Thermocycler) durchgeführt. Ein typisches PCR-Programm sieht folgendermaßen aus:

10 Minuten	94°C	Aktivierung der Taq-Polymerase
1 Minute	96°C	Denaturierung der DNA
1 Minute	65°C	"Annealing"= Aneinanderlegen der DNA-Stränge
3 Minuten	72°C	DNA-Synthese
8 Minuten	72°C	DNA-Synthese

Die Schritte 2 bis 4 werden 32 mal wiederholt.

2.4.3 Restriktionsverdau

Unter Restriktionsverdau versteht man das Schneiden von DNA-Strängen mit bestimmten Enzymen, den sog. Restriktionsendonukleasen, welche spezifisch an bestimmten Erkennungssequenzen von wenigen Basenpaaren Länge binden, und an definierten Stellen schneiden.

Restriktionsverdaus wurden in einem Reaktionsvolumen von 20-60 µl durchgeführt, je nachdem wie viel geschnittene DNA benötigt wurde. Für einen 20 µl Ansatz wurden zwischen 5 und 20 Units der jeweiligen Restriktionsenzyme verwendet. Die Reaktion erfolgte unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen. Für Kontrollverdaus von Plasmid-Miniprep-Präparationen wurde 2 µl der Präparation in einem Reaktionsvolumen von 20 µl verdaut. Für Verdaus, deren Restriktionsfragmente für spätere Ligationen eingesetzt werden sollten, wurden größere Mengen DNA in größeren Reaktionsvolumina eingesetzt. Bei Verdaus mit zwei Enzymen wurde entweder ein sequenzieller Verdau oder ein Doppelverdau mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer

Alle Verdaus wurden bei 37° C für ein bis zwei Stunden durchgeführt.

2.4.4 Entfernung von endständigen Phosphatgruppen

Sollten die DNA-Fragmente für anschließende Ligationsreaktionen eingesetzt werden, so wurden zur Reduktion der Religationsrate des Vektors dessen 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase (1-2 Units pro 20 μ l) für ca. 20 Minuten bei 37° C dephosphoryliert. Nach der Inkubation wurde das Enzym mittels des Protein-bindenden Harzes StrataCleanResin (Stratagene) entfernt (2 x 10 μ l).

2.4.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von mittels Restriktionsverdaus gewonnenen DNA-Fragmenten oder von PCR-Produkten erfolgte durch eine Agarosegelelektrophorese. Hierzu wurde zunächst ein Gel hergestellt, indem 1% Agarose in 30 ml (für ein Gel der Größe 7 x 8 cm) bzw. 90 ml (für ein Gel der Größe 12 x 14 cm) TAE-Puffer unter Aufkochen in einem Mikrowellenherd gelöst wurde. Nach Abkühlung auf ca. 50-70° C wurde eine 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung in einer Verdünnung von 1:10000 zugegeben. Die Lösung wurde in die entsprechende Gelform gegossen, und ein passender Kamm wurde zur Formung der Taschen eingehängt. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel wurde in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt, und die mit Ladepuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Taschen des Gels einpipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 70-80 Volt (7 x 8 cm Gel) bzw. bei 80-110 Volt (12 x 14 cm Gel). Die Laufweite der DNA konnte anhand der Farbbanden des Puffers verfolgt werden. Nach Abschluss der Auftrennung wurde das Gel aus der Kammer genommen, auf einen UV-Transilluminator gelegt und mit einer Digitalkamera fotografiert. Sollten die Schnittfragmente für Ligationsreaktionen weiterverwendet werden, so wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und die DNA extrahiert (s.u.)

2.4.6 Extraktion von DNA aus dem Agarosegel

Die Extraktion erfolgte mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben.

2.4.7 Ligationsreaktionen

Um das optimale Verhältnis von Vektor und Insert zu bestimmen wurde eine kleine Probe

(zwischen 1 und 5 μ l) der DNA-Präparationen nach der beschriebenen Art und Weise mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Stärke der Banden wurde geschätzt oder durch Analyse mit dem Programm Kodak 1D bestimmt. Es wurde ein Vektor zu Insert Verhältnis von 1:2 angestrebt. Ligationsreaktionen wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 μ l angesetzt, wobei 1 μ l auf den empfohlenen Puffer, sowie 1 μ l auf die Ligase entfiel. Die Ligationsreaktion wurde bei 16° C über Nacht inkubiert. Es wurde stets eine Kontrollligation ohne Insert mitgeführt, um die Religationsrate des Vektors abschätzen zu können.

Ligationen von PCR-Produkten in den pCR2.1-Vektor wurden mit dem TA Cloning Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.8 Transformation von E. coli

Für die Amplifikation von Vektor-DNA in *Escherichia coli* Bakterien wurden XL-10 Supercompetent Cells verwendet, welche nach Angaben des Herstellers transformiert wurden. Abweichend zu den Herstellerangaben wurden jedoch nur 25 μl anstelle von 50 μl Bakteriensuspension pro Transformation eingesetzt. Es wurde ein Volumen von 3-10 μl der Ligationsreaktion verwendet. Eine Transformation der Kontrollligation ohne Insert erfolgte parallel. Die transformierten Bakterien wurden auf einer Agarplatte von 10 cm Durchmesser ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Für die Selektionierung der transformierten Bakterien wurde dem Agar ein Antibiotikum zugesetzt, gegen welches der verwendete Vektor ein Resistenzgen trägt. Bei Verwendung von Ampicillinresistenz-Vektoren (pCDNA3.1, pCR2.1, pDisplay) wurde dem Agar Carbenicillin in einer Endkonzentration von 100 μg/ml zugesetzt. Bei Verwendung von Kanamycinresistenz-Vektoren (pEGFP-N1) wurde dem Agar Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 μg/ml zugesetzt.

2.4.9 Plasmidpräparation

Für die Gewinnung kleinerer DNA-Mengen wurden Bakterienkolonien von einer Agarplatte gepickt und in 4 ml LB-Medium über Nacht bei 37° C und unter ständigem Schütteln im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA mittels des MiniPrep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben.

Für die Gewinnung größerer Mengen DNA wurden Bakterienkolonien gepickt und in 250

ml LB-Medium über Nacht unter ständigem Schütteln kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmidpräparation mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Zur Zentrifugation der Bakterienkultur, sowie der präzipitierten DNA wurde die Sorvall-Zentrifuge benutzt.

Die Kulturmedien wurden jeweils mit einem der oben genannten Antibiotika versetzt.

2.4.10 Herstellung der einzelnen Expressionskonstrukte

Allen in dieser Arbeit verwendeten, auf der humanen LKLF-Sequenz basierenden, Expressionskonstrukten lag durch PCR amplifizierte cDNA-Sequenz des humanen LKLF zugrunde. Abweichend zur publizierten DNA-Sequenz fand sich eine zu einem Aminosäureaustausch führende Abweichung (Position 283 T zu C, entsprechend einem Aminosäureaustausch im Protein von Leucin zu Prolin). Möglicherweise liegt dieser Abweichung ein Polymorphismus zugrunde, was jedoch nicht weitergehend aufgeklärt wurde.

Eine schematische Darstellung der wichtigsten Expressionsvektoren zeigt die nachfolgende Abbildung.



Tab. 1: Verwendete Primer:

Primername	DNA Sequenz
cMyc(Not-Bam)-F	ACACATGGCGGCCGCTGGATCC
cMyc(Xba-Bgl)-R	AGATCTAGAGATCTTCTTCTGA
hLKLF(Sal)-F	GCCTTCGGTCTTgTCGACGACG
HA(Nhe)-F	GGGTTCCAGCTAGCACTATGGGCTATCCA
hLKLF(Y302F)-F	GAGAAGCCCTtCCACTGCAAC
hLKLF(Y302F)-R	GTTGCAGTGGaAGGGCTTCTC
hLKLF(Y84F)-F	CCCGCCCTtCAGCGCCC
hLKLF(Y84F)-R	GGGCGCTGaAGGGCGGG
hLKLF-APPA(Bam)-F	GCGCCCggAtCCTTCGGTCTTTTCG
hLKLF-DFIL(Bam)-F	GGACTTCATCggaTCCATGGGGCTG
hLKLF-Displ-R	CGTCGTCGAcAAGACCGAAGGC
hLKLF-TRGP(Bam)-F	ACCCGTGGAtccCGCGGCCTCAAG
TA0F-Flag	accATGGAcTAcAAgGAcGAgGCtagcGAgCCtATctTgCCg
ZF3R(Bam)	CCCGGatcCATGTGcCgtTTCATgTG

2.4.10.1 <u>Herstellung des pCDNA3.1/LKLF-FlagMyc-Expressionsvektors</u>

Der cMyc-Tag wurde mit den Primern cMyc-F und cMyc-R aus dem pOPE215-Vektor amplifiziert. Die Sequenz des humanen LKLF wurde mit den Primern TA0F-Flag und ZF3R(Bam) amplifiziert. Durch den TA0F-Flag-Primer wurde an das 5'-Ende der cDNA-Sequenz die Sequenz des sogenannten Flag-Tag angehängt. In einer dritten PCR-Reaktion wurde als Template eine Mischung aus der amplifizierten cMyc-Tag-Sequenz, sowie der Flag-Tag-LKLF-Fusionssequenz verwendet und mittels Amplifikation mit den Primern cMyc-R und TA0F-Flag das LKLF-FlagMyc-Gen erzeugt.

Das resultierende PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-Vektor ligiert, welcher durch seine "Sticky-Ends" in besonderem Maße geeignet ist, PCR-Produkte aufzunehmen, und dort sequenziert. Das Fusionsgen wurde durch einen EcoRI/XbaI-Doppelverdau aus dem Vektor ausgeschnitten und in einen gleichartig geschnittenen pCDNA3.1-Leervektor ligiert.

2.4.10.2 Herstellung des pEGFP/LKLF-FlagMyc-Expressionsvektors

Die LKLF-FlagMyc-Sequenz wurde aus dem pCDNA3.1/LKLF-FlagMyc-Expressionsvektors mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BglII ausgeschnitten und in einen EcoRI/BamHI-geschnittenen pEGFP-N1-Vektor ligiert.

2.4.10.3 Herstellung des pDisplay/hLKLF-Expressionsvektors

Ein 5'-Anteil der LKLF-Sequenz (entsprechend der codierenden Sequenz für die Aminosäuren 7-218) wurde aus dem pCDNA3.1/LKLF-FlagMyc-Expressionsvektor mit den Primern hLKLF (Bam)-F und hLKLF-Displ-R amplifiziert, in den pCR2.1-Vektor ligiert und dort sequenziert. Das amplifizierte Fragment wurde mittels der Enzyme BamHI und SalI aus dem pCR2.1-Vektor ausgeschnitten und in einen gleichartig geschnittenen pDisplay-Vektor ligiert. Der auf diese Weise erhaltene Vektor wurde erneut mit Bam-H1 geschnitten. Außerdem wurde ein pDisplay-Leervektor ebenfalls mit BamHI geschnitten und das ausgeschnittene Fragment in den BamHI-geschnittenen pDisplay/LKLF-Vektor ligiert, welcher somit zu einem funktionellen Expressionsvektor wurde.

2.4.10.4 Herstellung der HA-LKLF-eGFP-Expressionsvektoren

Zunächst wurde der 5'-LKLF-Anteil mitsamt der für den HA-Tag codierenden Sequenz aus dem oben beschriebenen pDisplay/hLKLF-Vektor mittels der Primer HA-(Nhe)-F und hLKLF-Displ-R amplifiziert, in den pCR2.1-Vektor ligiert und dort sequenziert. Der 3'-Anteil wurde mittels der Primer hLKLF(Sal)-F und ZF3R(Bam) amplifiziert, in den pCR2.1-Vektor ligiert und sequenziert. Der mit den Primern hLKLF(Sal)-F und ZF3R(Bam) amplifizierte Anteil wurde mit den Enzymen SalI und BamHI ausgeschnitten und in einen gleichartig geschnittenen pEGFP-N1-Vektor ligiert. Der erhaltene Vektor wurde mit den Enzymen SalI und NheI geschnitten. Der mit den Primern HA-(Nhe)-F und hLKLF-Displ-R amplifizierte Anteil wurde gleichartig geschnitten, und das erhaltene Insert in den genannten Vektor ligiert.

Der so erhaltene pEGFP/HA-LKLF(7-355)-Vektor diente auch als Rückgrad für die weiteren Konstrukte der HA-LKLF-eGFP-Serie.

Die unterschiedlich langen Abschnitte der LKLF-Sequenz wurden mit dem

Rückwärtsprimer ZF3R(Bam) und den Vorwärtsprimern hLKLF-DFIL(Bam)-F, hLKLF-TRGP(Bam)-F sowie hLKLF-APPA(Bam)-F amplifiziert, in den pCR2.1-Vektor-ligiert und sequenziert. Die amplifizierten Sequenzen wurden jeweils mit BamHI ausgeschnitten und in den BglII/BamHI-geschnittenen pEGFP/HA-LKLF(7-355) ligiert. Die Kontrolle der korrekten Ausrichtung der Inserts erfolgte durch einen SacI/NheI-Doppelverdau.

Die Herstellung der zytoplasmatisch exprimierten Expressionskonstrukte HA-LKLF-eGFP (7-216) sowie HA-LKLF-eGFP(145-216) erfolgte durch Ausschneiden des jeweiligen LKLF-Anteils aus den Vektoren pEGFP/HA-LKLF-eGFP(7-355) bzw. pEGFP/HA-LKLF-eGFP (145-355) mit SalI und NheI und Ligieren in den gleichartig geschnittenen pEGFP-N1-Vektor. Um ein einheitliches Leseraster herzustellen wurden die überhängenden Enden der SalI-Schnittstellen mittels Mung-Bean-Nuklease abgedaut.

2.4.10.5 Herstellung des pEGFP/HA-LKLF-TAD-sez-Vektors

Der pDisplay/hLKLF-Vektor, sowie der pEGFP-N1-Vektor wurden mit Sal-I geschnitten und die überstehenden Enden mit Mung-Bean-Nuklease abgedaut. Sodann wurden beide Vektoren mit EcoR1 geschnitten. Durch Agarosegelelektrophorese wurden das Insert des verdauten pDisplay/hLKLF-Vektors, sowie das Vektorrückgrad des pEGFP-N1-Vektors aufgereinigt. Beide Fragmente wurden ligiert.

Hieraus resultierte ein Fusionsgen, das für ein Protein kodiert, welches von N-terminal nach C-terminal folgenden Aufbau zeigt: Igκ-Leader – HA-Tag – Aminosäuren 7 bis 218 des LKLF – eGFP.

2.4.10.6 Herstellung der Y-Mutagenese-Vektoren

Der pEGFP/HA-LKLF(Y84F)-Vektor wurde hergestellt, indem zunächst überlappende Fragmente von der Mutationsstelle aufwärts (hLKLF(Y84F)-F x ZF3R(Bam)) und abwärts (HA-(Nhe)-F x hLKLF(Y84F)-R) amplifiziert wurden. Auf diese Weise wurde die in den Primern enthaltene Mutation eingefügt. Danach wurden beide Sequenzabschnitte zusammengefügt, indem beide PCR-Produkte zusammengebracht und mittels der Primer HA-(Nhe)-F und ZF3R(Bam) amplifiziert wurden. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-Vektor ligiert, dort sequenziert und mittels Restriktionsverdau (NheI/BamHI) und Ligation in den pEGFP-N1-Vektor umkloniert. Der pEGFP/HA-LKLF(Y302F)-Vektor wurde auf die gleiche Weise hergestellt. Anstelle der Primer hLKLF(Y84F)-F und hLKLF(Y84F)-R wurden die Primer hLKLF(Y302F)-F und hLKLF(Y302F)-R verwendet.

Der Vektor pEGFP/HA-LKLF(Y84F,Y302F) wurde hergestellt, indem aus dem pEGFP/HA-LKLF(Y84F)-Vektor der vordere Abschnitt, der die Mutation Y84F enthielt, mittels eines Sall/BamHI-Verdaus ausgeschnitten und in einen gleichartig geschnittenen pEGFP/HA-LKLF(Y302F)-Vektor ligiert wurde.

2.5 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde das Dye Terminator Sequenzierungs Kit verwendet. Abweichend zu den Herstellerangaben wurde von allen Reagenzien nur die halbe Menge eingesetzt.

2.6 Durchführung der DNA-Immunisierungen

2.6.1 Materialien, Geräte und Tiere

•	Helios Gene-Gun	BioRad
•	Goldpartikel 1 µm Durchmesser	BioRad
•	Kunststoffschlauch	BioRad
•	Wistar-Ratte	UKE-Zucht

2.6.2 Durchführung

50 μg der pDisplay/hLKLF-Plasmid-DNA, gelöst in 100 μl Wasser wurden durch Zugabe von 10 μl 3 M Natriumacetat und 300 μl Ethanol eine Stunde bei -80°C präzipitiert. Nach Abzentrifugieren der DNA und Waschen mit 70% Ethanol, sowie Trocknen der DNA wurde diese in 50 μl TE-Puffer (aus EndoFree Maxi Kit) gelöst.

Die so erhaltene DNA wurde unter Verwendung des "DNA cartridge kits" (BioRad) nach Angaben des Herstellers an 50 μ g Goldpartikel (Durchmesser 1 μ m) gekoppelt und als dünne Beschichtung in einem Kunststoffschlauch fixiert, welcher danach in Stücke definierter Größe geschnitten wurde. Diese Goldpartikel wurden mit einem Druck von 400 psi mittels einer Helios Gene-Gun in die Haut einer Ratte geschossen. Für die gesamte Immunisierungsserie wurden zwischen 50 und 100 μ g DNA eingesetzt. Ca. zwei Tage vor der Tötung der Ratte wurde eine Immunisierung mit pDisplay/hLKLFtransfizierten HEK 293T-Zellen durchgeführt, unter der Vorstellung durch einen akuten Entzündungsreiz eine Proliferation spezifischer B-Lymphozyten zu bewirken. Die Milz der Ratte wurde unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Milzzellen wurden mit Sp2/0-Zellen fusioniert und für ein späteres Screening eingefroren.

2.7 Durchführung der verwendeten ELISA-Methoden

2.7.1 Materialien und Geräte

•	Nunc-Immuno Module MaxiSorp C8	Nunc
•	Nunclon Surface Zellkulturplatten 96 Well	Nunc
•	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	USB
•	Schwefelsäure 0,5 M	Pharmacia
•	BSA	Sigma

2.7.2 Zell-ELISA

Eine 75 cm²-Zellkulturflasche wurde bei beginnender Konfluenz der Zellen mit pDisplay/hLKLF mittels Lipofectamine transfiziert. Am ersten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und in neuem Medium auf die 96 Näpfe einer 96-Well-Zellkulturflasche umgesetzt. Am zweiten oder dritten Tag nach der Transfektion wurde der Überstand der Zellen dekantiert und je 100 μ l der jeweiligen Verdünnungsstufe des jeweiligen Serums zugegeben. Die Zellen wurden 30-50 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 Minuten mit 1400 rpm zentrifuguiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen zweimalig mit 1% BSA in PBS (=PBS/BSA) gewaschen. Als Zweitantikörper wurde 100 μ l Anti-Ratten-Ig-POD 1:2000 in PBS/BSA zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde 100 μ l TMB als Substrat zugegeben und die Reaktion wurde nach 5-10 Minuten durch Zugabe von Stoplösung (0,5 M Schwefelsäure) beendet. Um Messwertverfälschungen durch Schaumbildung zu unterbinden wurde die 96-Well-Platte erneut ein Mal zentrifugiert und die Extinktion wurde photometrisch (450/620 nm) bestimmt.

2.7.3 Sandwich-ELISA

ELISA-Platten (C8-Module im 96-Well-Rahmen) wurden über Nacht mit Anti-GFP-

Antikörper (1 µg/Napf in 100 µl PBS) beschichtet. Am nächsten Tag wurden die freien Bindungsstellen der beschichteten Näpfe mit 150 µl PBS/BSA für 15 Minuten geblockt. Die Näpfe wurden mit je 100 µl Zellkulturüberstand von pEGFP/HA-LKLF-TAD-sez transfizierten HEK 293T-Zellen beschickt und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Der Zellkulturüberstand war direkt nach Abnehmen von der Zellkultur steril filtriert und mit Complete Proteaseinhibitor versetzt wurden und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert worden.

Die Näpfe wurden fünfmalig mit PBS/BSA gewaschen und mit den Seren in den angegebenen Verdünnungsstufen gefüllt. Es folgte eine erneute Inkubation bei 4°C für eine Stunde und anschließend sechs weitere Waschgänge. Als Zweitantikörper wurde 100 µl Anti-Ratten-Ig-POD 1:2000 in PBS/BSA zugegeben und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach sechs weiteren Waschschritten wurde 100 µl Substrat (TMB) zugegeben, 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Farbreaktion mit 50 µl Stoplösung beendet. Die optische Dichte wurde photometrisch (450/620 nm) bestimmt und gegen die Verdünnungsstufe aufgetragen.

2.8 Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

2.8.1 Materialien und Geräte

•	3-Aminobenzamide	Sigma
•	Anti-Rt-Ig-PE	BD Pharmingen
•	Coverslips, 13 mm	Nunc
•	Cycloheximide	Sigma
•	FACS Calibur Durchflusszytometer mit	
	Loader-Manager	Becton Dickinson
•	Fluoreszenz-/Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss
•	Glycerol Gelatin	Sigma
•	Igepal	Sigma
•	Lactacystin	Alexis
•	Okdaic Acid	Sigma
•	Paraformaldehyd (PFA), rein	Serva
•	Rundboden-Röhrchen (Polystyrene) 5 ml	Becton Dickinson

2.8.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikrokopie ist eine mikroskopische Methode, welche sich nicht nur der

morphologischen lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellen bedient. Vielmehr können zusätzlich spezifisch bestimmte Bestanteile des Untersuchungsmaterials, hier der Zellkulturzellen, ähnlich immunhistochemischen Methoden, angefärbt und beurteilt werden. Im Gegensatz zu immunhistochemischen Methoden ist jedoch keine Fixierung des Untersuchungsmaterials erforderlich, sondern es können bei Bedarf auch lebende Zellen angefärbt werden. Eine Dokumentation ist durch Fotografie möglich.

Die Anfärbung der mit dem pDisplay/hLKLF-Vektor transfizierten Zellen erfolgte in der Zellkulturschale (24-Well). Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, und mit Antikörperlösung (Anti-cMyc 1:100) überschichtet. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut gewaschen und daraufhin mit PE-markierten Anti-Mse-Ig-Antikörpern (1:100) überschichtet. Nach ca. 30 Minuten Inkubation wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

Untransfizierte HEK 293T-Zellen wurden gleichartig behandelt und zeigten keine Anfärbung.

Die Expressionskonstrukte mit fluoreszierenden Eigenschaften wurden ohne weitere Anfärbung fluoreszenzmikroskopiert und fotografiert.

2.8.3 Intrazelluläre Anfärbung

CHO-Zellen wurden auf 13-mm-Coverslips in 24-Well-Platten kultiviert und mit pEGFP/HA-LKLF (7-355) transfiziert.

An Tag 1 nach der Transfektion wurde das Zellkulturmedium abgezogen und die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Inkubation mit 500 µl PFA-Lösung (4% PFA in PBS) bei Raumtemperatur fixiert und anschließend drei Mal mit 200 µl PBS für je 10 Minuten gewaschen. Sodann wurden die fixierten Zellen für 30-60 Minuten mit 500 µl Blocking-Lösung (2% BSA, 3% Ziegenserum und 0,5% Igepal in PBS) inkubiert. Die Reaktion mit dem Erstantikärper (Anti-LKLF, letzes Serum) erfolgte in einer 1:800-Verdünnung in Antikörperinkubationslösung (3% Ziegenserum, 0,1% Igepal in PBS) für 1-3 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen zunächst zwei Mal mit "high salt PBS" (PBS mit 500 mM NaCl) und danach zwei Mal mit PBS für je 10 Minuten gewaschen. Die Zweitantikörperinkubation (Anti-Rt-Ig-PE) erfolgte analog zu der Erstantikörperinkubation für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Zellen

wurden erneut dreimalig mit PBS gewaschen. Zum Eindeckeln der Zellen wurde Glycerol Gelatin auf 42° C erwärmt, und ein Tropfen auf einen Objektträger luftblasenfrei aufgebracht. Das Coverslip wurde aus der 24-Well-Platte vorsichtig herausgenommen und mit den Zellen nach unten auf den Tropfen Glycerol Gelatin gelegt.

Anschließend wurden die Zellen fluorezenzmikroskopiert und fotografiert.

2.8.4 FACS-Analysen

Die Durchflusszytometrie erlaubt neben einer Quantifizierung der Fluoreszenz von Zellen auch die Analyse der Zellgröße sowie der Granularität. Für FACS-Analysen werden, im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie, Einzelzellsuspensionen benötigt. Neben der reinen Analyse ist auch die Möglichkeit einer Zellsortierung nach bestimmten Merkmalen (z.B. Fluoreszenz) gegeben, wovon auch Gebrauch gemacht wurde (siehe "Stabile Transfektion von DC27.10-Zellen")

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm "CellQuest" auf Apple Personal Computern.

2.8.5 Halbwertszeitbestimmungen

Um die Abbaugeschwindigkeit von Proteinen in lebenden Zellen erheben zu können ist es, insbesondere bei kurzlebigen Proteinen, erforderlich, die Proteinbiosynthese zu inhibieren, um eine Nachproduktion von Protein während der Messung zu unterbinden.

Zu diesem Zweck wurde den Zellen ca. eine Stunde vor Beginn der Messung Cycloheximide (CHX) in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben.

Die Inhibitoren, deren Einflüsse auf die Halbwertszeit von HA-LKLF-eGFP bestimmt werden sollten, wurden folgendermaßen zugegeben:

- Lactacystin 20 µM und Lösungsmittelkontrolle ca. 3 Stunden vor CHX-Zugabe
- 3-ABA 10 mM und Lösungsmittelkontrolle ca. 3 Stunden vor CHX-Zugabe
- Aktiviertes Vanadat 20 µM (Ansatz 1) ca. 14 Stunden vor CHX-Zugabe
- Aktiviertes Vanadat 20 µM (Ansatz 2) gemeinsam mit CHX-Zugabe

Okadaic Acid und Lösungsmittelkontrolle gemeinsam mit CHX-Zugabe
 Die Proben wurden zwischen den einzelnen Messungen, welche jeweils nur maximal fünf
 Minuten dauerten, bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um möglichst physiologische
 Stoffwechselbedingungen zu ermöglichen.

Jede Probe wurde vier Mal gemessen. Von den erhobenen Messwerten wurde die

unspezifische Hintergrundfluoreszenz (gemessen an untransfizierten Zellen), abgezogen. Die so erhaltenen Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen. Mittels der Tabellenkalkulation Excel wurde eine Ausgleichskurve errechnet. Nach logarithmischer Transformation wurde aus der Steigung die Halbwertszeit berechnet.

2.9 Verwendung von Hard- und Software sowie des Internet

•	Personal Computer	Apple
•	Word Textverarbeitungsprogramm	Microsoft
•	Excel Tabellenkalulationsprogramm	Microsoft
•	Internet-Explorer	Microsoft
•	Canvas 3.5.1 Präsentationssoftware	Deneba Software
•	PESTfind-Programm	(Rechsteiner)
•	NetPhos Programm	(Blom, Gammeltoft et al. 1999)
•	CellQuest FACS-Software	Becton Dickenson
•	Photoshop	Adobe
•	Lasergene	DNA Star
•	Sequencher 3.0	Gene Codes

Für sämtliche Software-Anwendungen wurden Apple-Computer (iMac u.a.) verwendet. Abbildungen wurden erstellt durch Verarbeiten von Bilddaten mit den Programmen Photoshop und Canvas. Texte wurden mit Word erstellt. Die Nutzung des Internet erfolgte mit dem Internet-Explorer. Die Programme PESTfind und NetPhos sind online kostenlos nutzbar (Rechsteiner; Rechsteiner and Rogers 1996; Blom, Gammeltoft et al. 1999). Die Auswertung von FACS-Daten erfolgte mit CellQuest. Für Auswertung von DNA-Sequenzen wurde das Lasergene Paket (DNA-Star) verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zur aktivierungsinduzierten Prozessierung sowie zu posttranslationalen Proteinmodifikationen des LKLF-Proteins

3.1.1 Klonierung von LKLF-Expressionskonstrukten

Da zu Beginn meiner Arbeiten noch keine spezifischen Antikörper gegen LKLF zur Verfügung standen, sollte zunächst ein LKLF-Expressionskonstrukt hergestellt werden, welches für ein LKLF-Protein kodiert, das sowohl amino- als auch carboxyterminal sogenannte Epitop-Tags trägt. Epitop-Tags sind Aminosäuresequenzen, welche unabhängig von ihrem Sequenzkontext von spezifischen Antikörpern detektiert werden können. In dem zuerst hergestellten Expressionskonstrukt findet N-terminal der Flag-Tag sowie C-terminal der cMyc-Tag Verwendung. Diese können mithilfe der kommerziell erhältlichen M2- bzw. Anti-cMyc-Antikörper detektiert werden. Abb. 3 E zeigt das Schema des resultierenden Fusionsproteins aus der LKLF-Aminosäuresequenz und den flankierenden Epitop-Tags.

3.1.1.1 <u>Untersuchung der Nachweisbarkeit eines LKLF-Expressionskonstruktes in</u> <u>HEK 293T- und Jurkat-Zellen</u>

Das FlagMyc-markierte LKLF-Expressionskonstrukt wurde sowohl in die humane Tlymphozytäre Jurkat-Zelllinie als auch in die embryonale humane Nierenzelllinie HEK 293T transfiziert und mittels Western-Blot analysiert. Die Detektion wurde mit den erwähnten M2- sowie Anti-cMyc-Antikörpern durchgeführt. In Lysaten von transfizierten HEK 293T -Zellen war sowohl in der Detektion mit dem M2- als auch mit dem AnticMyc- Antikörper neben einigen unspezifischen Banden eine Bande des vorhergesagten Molekulargewichtes zu erkennen (Abb. 3 C und D, Pfeil b), die in entsprechenden Detektionen nicht-transfizierter Zellen fehlte (Abb. 3 A und B). Die ausreichende Solubilisation von Kernproteinen wurde durch Detektion des endogenen cMyc-Transkriptionsfaktors in Lysaten von Jurkat Zellen angezeigt.Dabei wurde in wiederholten Experimenten ein Intensitätsunterschied der dem cMyc-Protein entsprechenden Bande von transfizierten und untransfizierten Jurkat-Zellen beobachtet (Abb. 3 B, Pfeil a).



Abb. 3: Schema des LKLF-FlagMyc-Expressionskonstruktes und Western-Blot-Analyse von transfizierten Jurkat- und HEK 293T-Zellen

A und B: Western-Blot-Analyse von transfizierten (Spuren 2 und 4) sowie untransfizierten (Spuren 1 und 3) Jurkat-Zellen mit dem Anti-Flag-M2-Antikörper (A) sowie dem Anti-cMyc-Antikörper (B) - ca. $1x10^7$ Zelläquivalente pro Spur. C und D: Western-Blot-Analyse von transfizierten (Spuren 2 und 4) sowie untransfizierten (Spuren 1 und 3) HEK 293T-Zellen mit dem Anti-Flag-M2-Antikörper (C) sowie dem Anti-cMyc-Antikörper (D) - ca. $3x10^5$ Zelläquivalente pro Spur. E: Schema des LKLF-FlagMyc-

Expressionskonstruktes (pCDNA3.1/LKLF-FlagMyc-Vektor). a: endogenes cMyc-Protein der Jurkat-Zellen. b: Bande des LKLF-FlagMyc im Western-Blot. Unterhalb der Immundetektionen sind jeweils Ausschnitte der Silberfärbungen dargestellt.

Dieser ist möglicherweise auf die auch von anderen beobachtete negative Regulation von cMyc durch LKLF zurückzuführen (Buckley, Kuo et al. 2001). Es ist denkbar, dass auch geringe, mittels Western Blot nicht nachweisbare, Mengen an LKLF-Protein, ausreichen, eine biologische Wirkung zu erzielen.

3.1.1.2 <u>Nachweis unterschiedlicher Mengen eines fluoreszierenden LKLF-</u> <u>Expressionskonstruktes in HEK 293T und in Jurkat-Zellen</u>

Um neben dem Western-Blot eine weitere Methode zur Quantifizierung rekombinanten LKLF-Proteins zur Verfügung zu haben, wurde ein Expressionskonstrukt hergestellt,

Abb. 4: Nachweis eines fluoreszierenden LKLF-Expressionskonstruktes in HEK 293T-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie



A: Schema des LKLF-FlagMyc-eGFP-Fusionsproteins. B: floureszenzmikroskopisches Bild (rechter Teil) sowie gemischt lichtmikroskopisch-fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (linker Teil) von pEGFP/LKLF-FlagMyc-transfizierten HEK 293T-Zellen.

welches C-terminal als weiteren Epitop-Tag das eGFP aufweist (Abb. 4 A). eGFP ist ein Protein, welches in blauem Spektrallicht eine grüne Fluoreszenz zeigt. Auch bei Verwendung des eGFP als Epitop-Tag bleibt die Grünfluoreszenz erhalten und kann somit auch zur Detektion bzw. Quantifizierung rekombinanten Proteins in der Fluoreszenzmikroskopie, als auch in der Durchflusszytometrie (FACS) benutzt werden. Der nun vorliegende pEGFP/LKLF-FlagMyc-Expressionsvektor wurde in Jurkat- sowie in HEK 293T-Zellen transfiziert und das LKLF-FlagMyc-eGFP-Fusionsprotein mittels FACS bzw. Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Abb. 5: Nachweis eines fluoreszierenden LKLF-Expressionskonstruktes in Jurkat-Zellen und HEK 293T-Zellen



A-C: FACS-Analyse von untransfizierten (A), pEGFP-N1-transfizierten (B) und pEGFP/LKLF-FlagMyc-transfizierten (C) Jurkat-Zellen. D-F: FACS-Analyse von untransfizierten (D), pEGFP-N1-transfizierten (E) und pEGFP/LKLF-FlagMyc-transfizierten (F) HEK 293T-Zellen.

Wie Abb. 4 B (rechts) zeigt, war in transfizierten HEK 293T-Zellen eine deutliche

Grünfluoreszenz zu erkennen, welche sich im Vergleich mit der lichtmikroskopischen Aufnahme (links, mit zusätzlicher Darstellung der Grünfluoreszenz) als im Zellkern lokalisiert erwies. Das Fluoreszenzmuster stimmte somit mit einem im Zellkern lokalisierten Protein, z.B. einem Transkriptionsfaktor, wie es das LKLF ist, überein.

Im Gegensatz zur deutlichen Expression in HEK 293T-Zellen war das Fusionsprotein in transfizierten Jurkat-Zellen fluoreszenzmikroskopisch überhaupt nicht (Daten nicht abgebildet) und mittels der sensitiveren Durchflusszytometrie bei einer befriedigenden Transfektionseffizienz von 73,3% nur in geringer Menge (6,3 % positive Zellen mit niedriger Fluoreszenzintensität) nachweisbar (Abb. 5 A-C). In HEK 293T-Zellen hingegen fand sich bei einer deutlich geringeren Transfektionseffizienz von 25,7%, ein Anteil von 21,5% posisitven Zellen mit deutlich höherer Fluoreszenzintensität (Abb. 5 D-F).

Da sowohl das eGFP als auch das LKLF-FlagMyc-eGFP-Fusionsgen in demselben Expressionsvektor (pEGFP-N1) in die Zellen transfiziert wurden, und die Expression des LKLF-FlagMyc-eGFP-Fusionsproteins in HEK 293T-Zellen nachgewiesen wurde, lag die Vermutung nahe, dass nicht eine unterschiedlich schnelle Synthese der Proteine die Ursache für die unterschiedlich starke Fluoreszenz war. Vielmehr musste eine unterschiedlich rasche Elimination der beiden grünfluoreszierenden Proteine als Ursache für die stark differierende Nachweisbarkeit beider Proteine angenommen werden.

3.1.2 Die Jurkat-Zelle als Modell für die aktivierte T-Zelle

Die verwendete Jurkat-Zelllinie hat ihren Ursprung in einem Tumorzellklon eines Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (Drexler 2001). Tumorzellen unterscheiden sich von nativen Zellen unter anderem durch eine hohe Proliferationsrate, die sich bei Jurkat-Zellen in einer Verdopplungszeit von ca. 30 Stunden wiederspiegelt (Drexler 2001). Im Folgenden sollte untersucht werden, in wie weit Jurkat-Zellen neben der hohen Proliferationsrate auch andere Charakteristika aktivierter T-Lymphozyten zeigen und somit als experimentelles Modell für aktivierte T-Zellen dienen können.

Zu diesem Zweck wurden Jurkat-Zellen hinsichtlich Zellgröße und der Expression des Aktivierungsmarkers CD 69 mit ruhenden, aus peripherem Blut isolierten T-Lymphozyten, verglichen. Hierzu wurden periphere Blutleukozyten partiell von Nicht-T-Zellen depletiert und mittels FACS hinsichtlich Zellgröße (FSC) und nach Anfärbung mittels CD69-spezifischer Antikörper hinsichtlich CD69-Expression analysiert. Die gleichen Parameter

Abb. 6: Vergleich von ruhenden T-Lymphozyten mit Jurkat-Zellen bezüglich zweier Aktivierungsmarker mittels FACS-Analyse



Vergleich von Jurkat-Zellen und T-zell-angereicherten peripheren Blutleukozyten bezüglich ihrer Zellgröße (A). FACS-Analyse der CD69-Expression auf ruhenden T-Zellen aus peripherem Blut nach teilweiser Depletion von Nicht-T-Zellen (B) sowie auf Jurkat-Zellen (C).

wurden bei kultivierten Jurkat-Zellen erhoben (Abb. 6 A-C).

Bezüglich beider erhobener Parameter ergab sich bei Jurkat-Zellen ein aktivierter Phänotyp, verglichen mit ruhendenden nativen T-Lymphozyten: Jurkat-Zellen zeigten eine deutlich höhere mittlere Zellgröße (Abb. 6 A) sowie eine deutlich stärkere CD69-Expression (rund 28% positive Zellen gegenüber rund 2% positiven Zellen bei primären T-Lymphozyten) (Abb. 6 B-C).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Jurkat-Zellen zumindest einen zum Teil aktivierten Phänotyp aufweisen. Die geringe Nachweisbarkeit des LKLF Proteins in Jurkat-Zellen nach Transfektion von LKLF-Expressionskonstrukten steht mit dem aktivierten Phänotyp dieser Zellen im Einklang. Daher erscheint die Jurkat-Zelllinie als geeignetes Modell, das Schicksal von LKLF-Protein in aktivierten T-Zellen zu untersuchen.

3.1.3 Untersuchung von destabilisierenden Regionen im LKLF-Protein und Nachweis von Kernlokalisationssignalen

3.1.3.1 Klonierung von LKLF-Deletionskonstrukten

Bei vielen kurzlebigen zellulären Proteinen ist deren rascher Umsatz eng an bestimmte Sequenzabschnitte des Proteins gebunden. Durch Mutation oder Deletion derartiger destabilisierender Abschnitte lässt sich die intrazelluläre Lebensdauer dieser Proteine erhöhen.

Ziel der in diesem Abschnitt dargelegten Experimente war es potenzielle destabilisierende Regionen im LKLF-Molekül zu identifizieren. Des weiteren sollte untersucht werden, ob die Kernlokalisationssignale, die bisher nur anhand von Sequenzvergleichen mit dem nächsten Verwandten des LKLF, dem GKLF, vermutet wurden, auch im LKLF in dieser Art und Weise fungieren.

Zu diesem Zweck wurde eine Serie von Deletionskonstrukten nach dem gezeigten Schema (Abb. 7) hergestellt. Verwendung fand hierbei der bereits genannte eGFP-Tag als C-terminaler Tag. Ferner wurde N-terminal ein weiterer Epitop-Tag, der der Sequenz des humanen Influenza-Virus-Hämagglutinins entlehnte HA-Tag, angefügt.

Für beide Tags stehen kommerziell erhältliche Antikörper zur Verfügung, die sowohl für die Detektion im Western-Blot, als auch zu Zwecken der Immunpräzipitation eingesetzt werden können.

3.1.3.2 Analyse der subzellulären Lokalisation der einzelnen Deletionskonstrukte

Abb. 8 und 9 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CHO-Zellen, die mit den einzelnen Deletionskonstrukten transfiziert wurden. CHO-Zellen sind aufgrund ihrer Morphologie besonders gut zur Analyse der subzellulären Lokalisation geeignet. Alle vier Deletionskonstrukte, die die C-terminal gelegene Zinkfingerregion enthalten, sind erwartungsgemäß im Zellkern lokalisiert (Abb. 8 B - 9 E), woraus geschlossen werden kann, dass auch im LKLF, analog zum GKLF, in diesem Bereich Kernlokalisationssignale vorhanden sind. Bei Transfektion des Expressionskonstrukts HA-LKLF-eGFP (7-217), welchem die DNA- bindende Region fehlt, findet sich die Fluoreszenz im Zytoplasma

Abb. 7: Schematische Darstellung der verschiedenen HA-LKLF-eGFP-Expressionskonstrukte



A: eGFP. B-G: Schemata der unterschiedlichen HA-LKLF-eGFP-Expressionskonstrukte. In Klammern sind die Nummern der Aminosäurereste des LKLF-Moleküls angegeben, die im entsprechenden Expressionskonstrukt enthalten sind.

Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit unterschiedlichen HA-LKLFeGFP-Fusionsproteinen transfizierten CHO-Zellen



Fluoreszenzmikroskopisches Bild von CHO-Zellen, in die die unterschiedlichen HA-LKLF-eGFP-Expressionsvektoren transfiziert wurden. A: pEGFP-N1. B: pEGFP/HA-LKLF (7-355). C: pEGFP/HA-LKLF (50-355). D: pEGFP/HA-LKLF (145-355). Die linke Seite zeigt jeweils die lichtmikroskopische Aufnahme, die rechte Seite das entsprechende fluoreszenzmikroskopische Bild.

unter nahezu vollständiger Aussparung des Zellkerns (Abb. 9 F).

Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit unterschiedlichen HA-LKLFeGFP-Fusionsproteinen transfizierten CHO-Zellen



Fluoreszenzmikroskopisches Bild von CHO-Zellen, in die die unterschiedlichen HA-LKLF-eGFP-Expressionsvektoren transfiziert wurden. E: pEGFP/HA-LKLF (218-355). F: pEGFP/HA-LKLF (7-216). G: pEGFP/HA-LKLF (145-216). Die linke Seite zeigt jeweils die lichtmikroskopische Aufnahme, die rechte Seite das entsprechende fluoreszenzmikroskopische Bild.

In dieser Hinsicht unterscheidet es sich auch von dem Konstrukt HA-LKLF-eGFP (145-217) (Abb. 9 G), welches sich genauso wie das eGFP (Abb. 8 A) offenbar ohne Präferenz für eine bestimmte subzelluläre Lokalisation in der gesamten Zelle verteilt und insofern eine Fluoreszenz des Zellkerns und des Zytoplasmas hervorruft.

3.1.3.3 <u>Nachweis der unterschiedlichen HA-LKLF-eGFP-Expressionskonstrukte in</u> <u>HEK 293T-Zellen mittels Western-Blot</u>

Nachdem mittels Fluoreszenzmikroskopie die Expression der grün fluoreszierenden Fusionsproteine erfolgt war, sollte der Nachweis der rekombinanten Proteine im Western-Blot erfolgen. Es wurden HEK 293T-Zellen transfiziert und am ersten Tag nach der Transfektion lysiert. Ganzzelllysate aller Transfektanten wurden mit dem Anti-HA-Antikörper (Abb. 10 A und G) sowie mit dem Anti-GFP-Antikörper (Abb. 10 D und F) detektiert. Die vier nukleär exprimierten Fusionsproteine wurden außerdem mittels des Anti-GFP-Antikörpers immunpräzipitiert und die Präzipitate mit dem Anti-HA-Antikörper detektiert (Abb. 10 B).

Die in Abb. 10 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass alle Expressionskonstrukte mit dem vorhergesagten Molekulargewicht exprimiert wurden.

	1	2	3	4	5	6
	-	(7-355)	(50-355)	(145-355)	(218-355)	eGFP
Α	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL
	aHA	aHA	aHA	aHA	aHA	aHA
	-	(7-355)	(50-355)	(145-355)	(218-355)	
В	IP (aGFP)					
	aHA	aHA	aHA	aHA	aHA	
	-	(7-355)	(50-355)	(145-355)	(218-355)	
С	IP (aGFP)					
	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	
	-	(7-355)	(50-355)	(145-355)	(218-355)	eGFP
D	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL
	aGFP	aGFP	aGFP	aGFP	aGFP	aGFP
	-	(7-355)	(50-355)	(145-355)	(218-355)	eGFP
Е	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL
	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.
	-	eGFP	(7-216)	(145-216)		
F	GZL	GZL	GZL	GZL		
	aGFP	aGFP	aGFP	aGFP		
	-	eGFP	(7-216)	(145-216)		
G	GZL	GZL	GZL	GZL		
	aHA	aHA	aHA	aHA		
	-	eGFP	(7-216)	(145-216)		
H	GZL	GZL	GZL	GZL		
	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.		

Tab. 2: Spurbeladung der in Abb. 10 dargestellten Western-Blot-Analysen und Silberfärbungen

Darstellung der Spurbeladung der in Abb. 10 dargestellten Western-Blots und Silberfärbungen: Die Zeilenbezeichnung stimmt mit der Bezeichnung der einzelnen Membranen überein, die Spaltenbezeichnung mit der der Spuren. Jede Zelle der Tabelle enthält in der ersten Zeile das transfizierte Gen. Bei Expressionskonstrukten der HA-LKLF-eGFP-Serie ist nur der LKLF-Sequenzanteil in Klammern angegeben. Die Zweite Zeile enthält jeweils die aufgetragene Fraktion. In der dritten Zeile ist der Erstantikörper der

Immundetektion angegeben. Abkürzungen: GZL = Ganzzelllysat, IP = Immunpräzipitation, aHA = Anti-HA-Antikörper, aGFP = Anti-GFP-Antikörper.



Abb. 10: Darstellung der Deletionskonstrukte der Serie HA-LKLF-eGFP im Western-Blot

HEK 293T-Zellen wurden mit allen Konstrukten der HA-LKLF-eGFP-Serie, sowie mit eGFP transfiziert. Ferner wurden untransfizierte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden lysiert und Ganzzelllysate

im Western-Blot mittels Anti-HA- und Anti-GFP-Antikörpern analysiert. Des Weiteren wurde eine Immunpräzipitation der nukleär exprimierten Konstrukte, sowie einer Negativkontrolle mit dem an Protein-G-Sepharose gekoppelten Anti-GFP-Antikörper durchgeführt. Diese Immunpräzipitation wurde mit dem Anti-HA-Antikörper detektiert.

Die Erläuterung der Spurbeladung und der Membrandetektionen ist Tab. 2 zu entnehmen.

Spurbeladung: Membran A, D, (E): ca. $1,6x10^5$ Zelläquivalente, Membran F, G, (H): ca. $3x10^5$ Zelläquivalente, Membran B, (C): Immunpräzipitate aus ca. $1x10^6$ Zelläquivalenten, 1µg Antikörper/Ansatz. Pfeil: eGFP-Protein.

3.1.3.4 Analyse der destabilisierenden Potenz der einzelnen Deletionskonstrukte

Um mögliche destabilisierende Regionen im LKLF-Molekül zu identifizieren, wurden sämtliche Konstrukte in Jurkat-Zellen transfiziert und als Maß für die Stabilität der einzelnen Konstrukte die Anzahl der für Grünfluoreszenz positiven Zellen ermittelt. In die Analyse einbezogen wurde außer den bereits dargestellten Konstrukten der HA-LKLFeGFP-Serie ein Konstrukt welches lediglich aus der DNA-bindenden Region des Ratten-LKLF mit einem N-terminalen eGFP-Anteil besteht (eGFP-Rt-LKLF-DBD). Ferner wurde eine eGFP-Kontrolltransfektion mitgeführt.

Erwartungsgemäß wurde die geringste Stabilität für das Expressionskonstrukt HA-LKLFeGFP (7-355) ermittelt, welches nahezu die gesamte LKLF-Sequenz enthält (Abb. 11 B). Alle ausschließlich N-terminal verkürzten Varianten zeigten eine größere Stabilität, wobei allerdings nicht jede Verkürzung mit einem weiteren Stabilitätszuwachs verbunden war. Zwar ist das Konstrukt HA-LKLF-eGFP (50-355) stabiler als das HA-LKLF-eGFP (7-355) und das HA-LKLF-eGFP (145-355) wiederum stabiler als das HA-LKLF-eGFP (50-355), jedoch scheint eine weitere Verkürzung wieder zu einer leichten Abnahme des Anteils positiver Zellen zu führen (Abb. 11 C-F). In der Reihe der nukleär exprimierten Konstrukte hat offenbar das eGFP-Rt-LKLF-DBD die höchste Stabilität, beim gleichzeitig geringsten LKLF-Sequenzanteil. Allerdings hat dieses Konstrukt, wie oben erläutert ein abweichendes Konstruktionsprinzip, so dass der erhaltene Wert nur unter diesem Vorbehalt in die Messreihe eingegliedert werden kann.

Eine ebenfalls recht geringe Stabilität wurde bei dem zytoplasmatisch exprimierten Konstrukt HA-LKLF-eGFP (7-216) gefunden. Das zytoplasmatisch exprimierte HA-LKLF-eGFP (145-216) zeigt in der vorliegenden Messreihe den größten Anteil positiver Zellen und hat somit offenbar die größte Stabilität, ist allerdings auch das Konstrukt mit dem geringsten LKLF-Sequenzanteil.

An den erhaltenen Werten lässt sich erkennen, dass offenbar nicht eine diskrete Region des LKLF-Moleküls für die geringe Stabilität des LKLF in Jurkat-Zellen verantwortlich ist,

sondern vielmehr mehrere Regionen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, zum raschen Abbau des Proteins in Zellen beitragen. Bei den Konstrukten HA-LKLF-eGFP (218-355) und HA-LKLF-eGFP (7-216) handelt es sich um Konstrukte ohne überlappende Sequenzabschnitte. Beide Konstrukte zeigen eine, wenn auch unterschiedlich stark ausgeprägte, destabilisierende Potenz. Hierbei scheint dem nicht an der DNA-Bindung beteiligten Anteil die größere Bedeutung zuzukommen.

3.1.3.5 <u>Untersuchung der Aminosäuresequenz des humanen LKLF auf PEST-</u> <u>Sequenzen</u>

Viele kurzlebige intrazelluläre Proteine werden vom Ubiquitin-Proteasomen-System eliminiert. Hierbei spielen als Adressierungssignal verschiedene Sequenzmotive eine Rolle, von denen einige schon recht genau charakterisiert werden konnten. Als Beispiele seien die Destruction-Box der Cycline, die KEN-Box und die PEST-Sequenzen genannt. Im folgenden Abschnitt sollte untersucht werden, ob eines oder mehrere der bereits

bekannten Degradierungssignale im Abbauweg des LKLF-Proteins eine Rolle spielen.

Eine Durchsicht der Aminosäuresequenz des humanen LKLF nach Motiven der Destruction-Box, sowie der KEN-Box verlief negativ. PEST-Sequenzen sind im Gegensatz beiden erstgenannten Motiven nicht durch streng zu den konservierte Aminosäurekonstellationen definiert, sondern vielmehr Resultat einer Häufung bestimmter Aminosäurereste in umschriebenen Regionen eines Proteins. Zur Auffindung derartiger Strukturmerkmale stehen Softwareprogramme wie das PESTfind-Programm zur Verfügung, mithilfe derer online eine Sequenzanalyse von eingegeben Sequenzen durchgeführt werden kann.

Die Aminosäuresequenz des humanen LKLF wurde mithilfe des PESTfind-Programms analysiert. Das Ergebnis der Analyse zeigt Abb. 12. Insgesamt wurden sechs potenzielle PEST-Sequenzmotive vom Programm erkannt. Jedem der Motive ist ein Wert zwischen -50 und +50 zugeordnet, der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der die betreffende Sequenz als PEST-Sequenz fungiert. Je höher dieser Wert liegt, desto wahrscheinlicher ist das Vorhandensein einer funktionellen PEST-Region in diesem Bereich. Lediglich eine dieser Regionen findet sich laut Analyse der LKLF-Sequenz im DNA-bindenden Bereich. Die laut PESTfind-Programm stärkste PEST-Sequenz befindet sich im Bereich der Aminosäuren 166-183.

Relevante PEST-Sequenzen zeigen erfahrungsgemäß einen PESTfind-Score von über 0

(EMBnet). Dieses Merkmal erfüllen in der LKLF-Sequenz zwei Regionen. Die erste befindet



Abb. 11: Analyse der destabilisierenden Potenz einzelner HA-LKLF-eGFP-Konstrukte mittels Durchflusszytometrie

FACS-Analyse von mit unterschiedlichen Vektoren transfizierten Jurkat-Zellen sowie von untransfizierten Jurkat-Zellen. Auf der X-Achse ist die Intensität der Grünfluoreszenz, auf der Y-Achse die Zellzahl aufgetragen. Die in jedes FACS-Diagramm eingefügte Prozentzahl gibt den Anteil der im Bereich M1 liegenden Zellen an allen "lebenden" Zellen an.
Dia	grammbeschriftung:		
Α	Untransfiziert	F	HA-LKLF-eGFP (218-355)
В	eGFP	G	eGFP-Rt-LKLF-DBD
С	HA-LKLF-eGFP (7-355)	Н	HA-LKLF-eGFP (7-216)
D	HA-LKLF-eGFP (50-355)	Ι	HA-LKLF-eGFP (145-216)
Е	HA-LKLF-eGFP (145-355)		

sich mit einem Wert von 3,66 im Bereich zwischen den Aminosäureresten 29 und 97. Die andere ist die bereits erwähnte Region zwischen Aminosäurerest 166 und 183 mit einem Wert von 18,07.

In einem Vergleich der aufgefundenen potenziellen PEST-Sequenzen mit bereits bekannten funktionellen Regionen des LKLF-Moleküls fällt auf, dass sich vier der potenziellen PEST-Sequenzen in einem Bereich befinden, der von Conkright et al. als Bindungsstelle einer Ubiquitinligase identifiziert wurde. Allerdings konnte bislang nicht nachgewiesen werden, dass dies auch in einer Ubiquitinylierung mit nachfolgendem Abbau durch das Proteasom resultiert.

Abb. 12: Analyseresultat des PESTfind-Programms bezüglich der Aminosäuresequenz des humanen LKLF



Links: Zuordnung der vom PESTfind-Programm identifizierten PEST-Regionen zum korrelierenden PESTfind-Score. Rechts: Lage der potenziellen PEST-Sequenzen im LKLF-Molekül.

In einem Vergleich des PESTfind-Analyseresultats mit den durchflusszytometrischen Stabilitätsuntersuchungen der HA-LKLF-eGFP-Deletionsserie ist zu erkennen, dass das zytoplasmatisch exprimierte Konstrukt HA-LKLF-eGFP (7-216) nahezu die gleiche Stabilität aufweist, wie das längste Konstrukt HA-LKLF-eGFP (7-355), was dafür spricht, dass ein Großteil des destabilisierenden Potenzials im nicht-DNA-bindenden Bereich lokalisiert ist. Diese Hypothese wird auch durch das PESTfind-Resultat gestützt, dem zufolge die meisten potenziellen PEST-Motive in diesem Bereich liegen. Allerdings zeigt

auch das Konstrukt HA-LKLF-eGFP (218-355), welches laut PESTfind-Programm nur eine relativ schwache PEST-Sequenz aufweist, ein, wenn auch etwas geringer ausgeprägtes, destabilisierendes Potenzial. Ein Widerspruch zwischen den Resultaten der Deletionsexperimente und der Software-Analysen besteht ferner bezüglich des PEST-Motivs zwischen den Aminosäureresten 166-183. Da sich hier laut PESTfind-Analyse die stärkste PEST-Sequenz befinden sollte, wäre von dem Konstrukt HA-LKLF-eGFP (145-216) nur eine geringe Stabilität zu erwarten. Dieses Konstrukt erwies sich jedoch entgegen der Hypothese als unerwartet stabil.

3.1.4 Ein System zur Untersuchung der Eliminationsgeschwindigkeit von eGFPmarkierten Proteinen

Nachdem durch die im vorangehenden Abschnitt erhaltenen Erkenntnisse aus der Softwareanalyse der Aminosäuresequenz des LKLF eine Beteiligung des proteasomalen Systems am Abbau des LKLF-Proteins in Zellen als wahrscheinlich oder zumindest möglich erscheinen lassen, sollte überprüft werden, ob sich der Abbau eines LKLF-Fusionsproteins mittels spezifischer Hemmung des Proteasoms verlangsamen lässt.

Da der Einsatz von Proteasomeninhibitoren einen fundamentalen Eingriff in den Stoffwechsel der Zelle darstellt, sind Interferenzen mit dem Proteinsyntheseapparat der Zelle durch geeignete Methoden zu unterbinden.

In dem nachfolgend vorgestellten System wird die Proteinbiosynthese durch einen Hemmstoff der ribosomalen Proteinsynthese vollständig aufgehoben (Abb. 13 A), was eine selektive Beobachtung des Proteinabbaus erlaubt. Durch eine Messung der Proteinmenge zu verschiedenen Zeitpunkten, hier indirekt durch Erhebung der mittleren Grünfluoreszenzintensität (Abb. 13 B) realisiert, lässt sich die Abbaugeschwindigkeit des grün fluoreszierenden Proteins ermitteln. Zu diesem Zweck wird die mittlere Fluoreszenzintensität in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen. Nach logarithmischer Transformation kann die Steigung der Geraden bestimmt werden. In einer weiteren Rechenoperation wird ln(2) durch die ermittelte Steigung dividiert, wodurch die Halbwertszeit, einen exponentiellen Abbau des Proteins vorausgesetzt, berechnet werden kann (Abb. 13 C)(Borucki, Grötsch et al. 1974).

Die Halbwertszeit wiederum stellt ein direktes Maß für die Abbaugeschwindigkeit, bzw. für die Stabilität des Proteins dar. Abb. 13: Schema zur Bestimmung der Halbwertszeit von eGFP-markierten Proteinen



1) Inhibierung der Proteinbiosynthese durchCycloheximide



3.1.5 Untersuchung der Elimination von HA-LKLF-eGFP unter Einfluss von Proteasomeninhibitoren

Mit dem im vorangegangenen Kapitel vorgestellten System zur Bestimmung der Halbwertszeit von grün fluoreszierenden Proteinen sollte nun direkt nachgewiesen werden, ob sich die Halbwertszeit des HA-LKLF-eGFP (7-355) Fusionsproteins durch eine Hemmung des Proteasoms beeinflussen lässt. Um auszuschließen, dass ein beobachteter Einfluss auf den eGFP-Anteil des Fusionsproteins zurückzuführen ist, wurde parallel eine eGFP-Transfektion mitgeführt und gleichartig behandelt.

Zur Hemmung des Proteasoms wurden zwei Substanzen eingesetzt. Lactacystin ist ein spezifischer Hemmstoff des Proteasoms (Fenteany, Standaert et al. 1995). 3-Aminobenzamid (3-ABA) ist ein Hemmstoff der nukleären Poly-ADP-Polymerase (PARP). Die PARP wiederum bewirkt eine Aktivierung der nukleären Proteasomen, um u.a. oxidativ geschädigte Histone zu eliminieren (Ullrich, Reinheckel et al. 1999). Durch eine Hemmung der PARP bleibt folglich eine Aktivierung der nukleären Proteasomen aus, was zu einer geringeren Aktivität der nukleären Proteasomen im Vergleich nicht behandelter Zellen führt. Eine direkte Hemmung von Proteasomen findet bei 3-ABA-behandelten Zellen jedoch nicht statt.

Abb. 14 und 15 zeigen die Fluoreszenzintensität-Zeit-Diagramme eGFP- und HA-LKLFeGFP-transfizierter Zellen die mit Lactacystin bzw. 3-ABA behandelt wurden. Tab. 3 zeigt die aus den Kurven berechneten Halbwertszeiten und Bestimmtheitsmaße.

Zu erkennen ist in beiden Diagrammen, dass die dem Konstrukt HA-LKLF-eGFP (7-355) korrelierten Geraden, die der Lösungsmittelkontrolle entsprechen, einen wesentlich steileren Abfall zeigen als die Geraden, die dem jeweils verwendeten Inhibitor entsprechen (Abb. 14 und 15). Dies spiegelt sich folglich auch in den ermittelten Halbwertszeiten wieder (Tab. 3). Bei Verwendung von Lactacystin als Inhibitor steigt die Halbwertszeit von 70 Minuten auf 224 Minuten um mehr als das Dreifache. 3-Aminobenzamid verlängert die Halbwertszeit des HA-LKLF-eGFP-Fusionsproteins von 70 auf 110 Minuten.

Bei diesen beobachteten Einflüssen spielt offenbar der eGFP-Anteil des Fusionsproteins keine signifikante Rolle, da der Abbau des eGFP zum einen sehr viel langsamer vonstatten geht als der des LKLF-eGFP-Fusionsproteins, zum anderen hat die Verwendung der Inhibitoren nur einen marginalen Einfluss auf die Eliminationsgeschwindigkeit des eGFP-Proteins, wie Abb. 14 und 15 sowie Tab. 3 nahe legen.



Abb. 14: Einfluss von Lactacystin auf die Elimination HA-LKLF-eGFP und eGFP in Jurkat-Zellen

Jurkat-Zellen wurden mit pEGFP-N1 und pEGFP/HA-LKLF transfiziert. Zellen jeder Transfektion wurden entweder mit Lactacystin oder nur mit dem Lösungsmittel DMSO vorinkubiert. Die Proteinbiosynthese wurde mit Cycloheximid blockiert. Etwa drei Stunden später wurde die Abnahme der Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 140 min verfolgt. Zu vier verschiedenen Zeitpunkten wurde die mittlere Fluoreszenzintensität mittels FACS bestimmt. Gezeigt ist die halblogarithmische Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit.





Jurkat-Zellen wurden mit pEGFP-N1 und pEGFP/HA-LKLF transfiziert. Zellen jeder Transfektion wurden entweder mit 3-Aminobenzamid oder nur mit dem Lösungsmittel DMSO vorinkubiert. Die Proteinbiosynthese wurde mit Cycloheximid blockiert. Etwa drei Stunden später wurde die Abnahme der Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 140 min verfolgt. Zu vier verschiedenen Zeitpunkten wurde die mittlere Fluoreszenzintensität mittels FACS bestimmt. Gezeigt ist die halblogarithmische Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit.

Inhibitor(\downarrow)/Konstrukt(\rightarrow)	eGFP	HA-LKLF-eGFP
Lösungsmittelkontrolle	t _{1/2} : 1155 Min.	t _{1/2} : 70 Min.
	r ² : 0,8767	r ² : 0,9744
Lactacystin	t _{1/2} : 1386 Min.	t _{1/2} : 224 Min.
	r ² : 0,9370	r ² : 0,9862
Lösungsmittelkontrolle	t _{1/2} : 1386 Min.	t _{1/2} : 70 Min.
	r ² : 0,9370	r ² : 0,9744
3-Aminobenzamid	t _{1/2} : 1386 Min.	t _{1/2} :110 Min.
	r ² : 0,8636	r ² : 0,974

Tab. 3: Halbwertszeiten von HA-LKLF-eGFP unter Einfluss von Lactacystin und 3-ABA

Aus den Diagrammen der Abb. 14 und 15 wurden die Steigungen der Ausgleichsgeraden sowie das Bestimmtheitsmaß, das die Korrelation der Messpunkte mit der Ausgleichsgeraden angibt, bestimmt. Die Tabelle zeigt die aus den Steigungen berechneten Halbwertszeiten $(t_{1/2})$, sowie die Bestimmtheitsmaße (r^2) .

3.1.6 Untersuchung der Ubiquitinylierung von LKLF mittels Western-Blot-Analysen von HA-LKLF-eGFP-Fusionsproteinen

Die Hemmbarkeit der Elimination von LKLF-eGFP-Fusionsproteinen durch Proteasomeninhibitoren stellt einen starken Hinweis auf die Beteiligung des Proteasoms am Abbauweg des LKLF dar. Der Abbau der meisten vom Proteasom eliminierten Proteine erfordert eine vorherige Proteinmodifikation. Hierbei handelt es sich um die sogenannte Ubiquitinylierung, die in einem enzymatischen Anhängen des kleinen Proteins Ubiquitin an Lysinreste des zu modifizierenden Proteins besteht. Die modifizierten Zielproteine sind daher in der Regel größer als die unmodifizierten Formen, was sich in verlangsamten Wanderungsgeschwindigkeit in einer der Western-Blot-Analyse widerspiegelt. Da die Anzahl der angehängten Ubiquitinmoleküle pro Zielproteinmolekül nicht konstant ist, besteht das typische Bild eines ubiquitinylierten Proteins im Western-Blot in einem unscharfen Schmier oberhalb des unmodifizierten Ursprungsproteins.

Abb. 16 A zeigt eine Western-Blot-Analyse einer Immunpräzipitation des HA-LKLFeGFP aus Lysaten transfizierter HEK 293T-Zellen mittels an Protein-G-Sepharose immobilisierter Anti-GFP-Antikörper. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-GFP (A)- bzw. mit dem Anti-HA-Antikörper (B). Neben der Hauptbande des HA-LKLF-eGFP (b) und der schweren (c) und leichten (d) Kette des präzipitierenden Antikörpers ist ein unscharfer Bereich oberhalb der Hauptbande zu erkennen (a). Eine unspezifische Reaktion der Antikörper wurde durch eine Negativkontrolle untransfizierter Zellen (Spur A1 und B1) ausgeschlossen. Offenbar liegt hier das HA-LKLF-eGFP-Protein in einer Modifikation höheren Molekulargewichtes vor, wie es für ein ubiquitinyliertes Protein typisch wäre. Anzumerken ist, dass das modifizierte Protein quantitativ nur einen sehr kleinen Anteil des rekombinanten Proteins ausmacht. Dies passt zu der Tatsache, dass in Transfektionen von HEK 293T-Zellen stets mehr rekombinantes HA-LKLF-eGFP-Protein nachweisbar ist als in Jurkat-Zellen, was für einen wesentlich langsameren Abbau in HEK 293T-Zellen spricht.

In einer weiteren Western-Blot-Analyse sollte überprüft werden, ob in Präzipitaten rekombinanten HA-LKLF-eGFP-Proteins ubiquitinylierte Proteine nachweisbar sind. Hierzu wurden die im Zellkern exprimierten HA-LKLF-eGFP-Expressionskonstrukte in HEK 293T-Zellen transfiziert. Aus den Lysaten der transfizierten Zellen sowie der Negativkontrolle wurden eGFP-haltige Proteine mittels des immobilisierten Anti-GFP-Antikörpers immunpräzipitiert und zunächst mit dem Anti-HA-Antikörper detektiert (Abb. 16 C). Der Blot wurde gestrippt und anschließend mit einem polyklonalen Anti-Ubiquitin-Antikörper detektiert (Abb. 16 D).

In der Negativkontrolle erkennt man bei Detektion mit dem Anti-Ubiquitin-Antikörper keine signifikanten Banden mit Ausnahme der schweren Antikörperkette. Dagegen findet man in den Präzipitaten der HA-LKLF-eGFP-Konstrukte unscharf detektierte Bereiche mit einem zentralen Bereich, der etwa zwischen 97 und 188 kd liegt. Dies stimmt mit dem oben erwähnten, auch von Epitop-Tag-spezifischen Antikörpern erkannten unscharfen Bereich überein (Abb. 16 A und B).

Die schwachen, abgrenzbaren Banden der Spuren 2 bis 5 entsprechen Resten der beim Strippen nicht von der Membran entfernten Antikörper.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich in Präzipitaten von HA-LKLF-eGFP-Fusionsproteinen ubiquitinylierte Proteine befinden, die vom Molekulargewichtsspektrum in einem höheren Bereich liegen als die unmodifizierten Fusionsproteine. Ob es sich hierbei tatsächlich um ubiquitinylierte LKLF-Expressionskonstrukte handelt, lässt sich nicht mit letzter Sicherheit sagen. Allerdings spricht hierfür, dass sich in diesem Größenbereich auch mittels der Epitop-Tag-spezifischen Antikörper unscharfe Banden detektieren lassen, wenn auch nur unter Verwendung wesentlich größerer Proteinmengen wie in Blot A und B geschehen.



Abb. 15: Nachweis ubiquitinylierter Proteine in Präzipitaten von LKLF-Expressionskonstrukten

A und B: untransfizierte und mit HA-LKLF-eGFP transfizierte HEK 293T-Zellen wurden lysiert und mit immobilisiertem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert (0,4 μ g pro Spur). Die Präzipitate (ca. 5x10⁶ Zelläquivalente pro Ansatz) wurden per SDS-Elektrophorese aufgetrennt, geblottet, und die Membranen mit dem Anti-GFP- sowie mit dem Anti-HA-Antikörper detektiert. Unter den jeweiligen Detektionen sind die Silberfärbungen der Immunpräzipitation, sowie äquivalenter Mengen Ganzzelllysate, dargestellt. Spurbeladung: 1) untransfizierte HEK 293T-Zellen, 2) mit HA-LKLF-eGFP (7-355) transfizierte HEK 293T-

Zellen.

C, D und E: Die vier nukleär exprimierten HA-LKLF-eGFP-Expressionskonstrukte (ca. $1x10^6$ Zelläquivalenten pro Ansatz) wurden mit immobilisiertem Anti-GFP-Antikörper (1µg Antikörper pro Ansatz) immunpräzipitiert. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-HA-Antikörper (C), sowie nach Strippen des Blots mit dem Anti-Ubiquitin-Antikörper (D). E zeigt analog zu C und D die entsprechenden Silberfärbungen einschließlich äquivalenter Mengen Ganzzelllysat (E unten).

Spurbeladung: 1) untransfizierte, 2) mit HA-LKLF-eGFP (7-355), 3) mit HA-LKLF-eGFP (50-355), 4) mit HA-LKLF-eGFP (145-355), 5) mit HA-LKLF-eGFP (218-355) transfizierte HEK 293T-Zellen. Membran C identisch mit Membran B aus Abb. 10.

3.1.7 Untersuchungen zum Einfluss von Phosphorylierungsreaktionen auf die Stabilität des LKLF-Proteins in Zellen.

Die intrazelluläre Eliminierung einzelner Proteine ist ein regulierter Prozess, der je nach Situation der Zelle mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ablaufen kann. Wie bereits dargelegt unterliegt LKLF in aktivierten T-Lymphozyten einem raschen Abbau. In den vorangegangenen Abschnitten wurden verschiedene Indizien für die Beteiligung des Ubiquitin-Proteasomen-Systems **LKLF-Proteins** am Umsatz des gezeigt. Ein regulatorischer Mechanismus, der den Eintritt von zahlreichen Proteinen in den Ubiquitin-Proteasomen-Apparat reguliert, ist die Phosphorylierung von bestimmten Aminosäureresten dieser Proteine. In lebenden Zellen spielen insbesondere die Phosphorylierung von Serin-Threoninund Tyrosinresten in verschiedensten Signaltransduktionswegen eine Rolle.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Phosphorylierung von Tyrosinresten im Umsatz des LKLF eine Rolle spielen könnte.

3.1.7.1 <u>Einfluss von Vanadat auf die Menge rekombinanten intrazellulären HA-LKLF-eGFP-Fusionsproteins</u>

Natriumorthovanadat ist ein Hemmstoff von tyrosinspezifischen Phosphatasen (Gordon 1991). Diese Phosphatasen spalten kovalent gebundene Phosphatgruppen von Tyrosinresten ab, die dort von tyrosinspezifischen Kinasen kovalent gebunden wurden. Durch Zugabe von Vanadat verschiebt sich das Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem Protein zur Seite des phosphorylierten Proteins.

Um den Einfluss von Vanadat auf den Stoffwechsel des LKLF zu untersuchen, wurden zwei Zelllinien verwendet.

Die murine T-Zelllinie DC27.10 wurde stabil mit dem HA-LKLF-eGFP (7-355) Expressionskonstrukt transfiziert. Nach einer Subklonierung der durch Geneticin selektionierten Zellen wurden 12 Klone nach 14 Stunden Inkubation mit bzw. ohne Vanadat mittels FACS auf Grünfluoreszenz hin untersucht.

Analog dazu wurden Jurkat-Zellen transient mit demselben Konstrukt transfiziert und ebenfalls nach Vanadatbehandlung bzw. ohne Vanadat mittels FACS analysiert.

Abb. 17 zeigt die FACS-Analysen von untransfizierten (A) DC27.10-Zellen sowie von 3 repräsentativen aus der Subklonierung gewonnenen Zellklonen (B-D). Bei allen drei Klonen der stabil transfizierten DC27.10 Zellen, nicht jedoch bei der untransfizierten Negativkontrolle, zeigt sich eine Zunahme der grün fluoreszierenden Zellen. Folglich führt eine Behandlung mit Vanadat zu einer Zunahme von rekombinantem HA-LKLF-eGFP-Protein in DC27.10-Zellen.

Ein gleichsinniger Effekt wurde bei den transient transfizierten Jurkat-Zellen gesehen (Abb. 18). Auch hier führte eine Behandlung mit dem Phosphataseinhibitor zu einer Zunahme der HA-LKLF-eGFP positiven Zellen von rund 50%, nicht jedoch zu einer Zunahme der positiven Zellen bei der Kontrolltransfektion mit eGFP.

Eine Behandlung von Zellen mit Vanadat, genauso wie mit Proteasomeninhibitoren, stellt einen fundamentalen Eingriff in die Steuerungsmechanismen der Zellen dar. Daher kann eine Zunahme positiver Zellen weder eindeutig einer vermehrten Produktion des Proteins (welche als Artefakt gewertet werden müsste, da die Produktion des rekombinanten Proteins unter Kontrolle eines viralen Promotors steht), noch einem verminderten Abbau zugeordnet werden. Zwar erscheint eine vermehrte Produktion eher unwahrscheinlich, da eGFP-transfizierte Zellen von der Vanadatbehandlung nicht signifikant in ihrer Fluoreszenz beeinflusst werden, kann aber nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Aus diesem Grunde wurde die bereits zur Halbwertszeitbestimmung unter Einfluss von Proteasomeninhibitoren genutzte Methode verwendet.

Es wurden die Halbwertszeiten von HA-LKLF-eGFP unter Einfluss von Vanadat im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt, wobei außerdem zwei Messreihen von Vanadat behandelten Zellen verglichen wurden. Bei einer Messreihe wurde das Vanadat 15 Stunden vor Zugabe des Cycloheximids zugegeben, bei der anderen fand die Zugabe des Vanadats gleichzeitig mit der des Cycloheximids statt.

Abb. 19 zeigt die bei der Messung erhaltenen Werte. Tabelle 4 gibt die aus dem Diagramm ermittelten Werte für die Halbwertszeiten, sowie deren Bestimmtheitsmaße an.



Abb. 16: Einfluss von Vanadat auf die Menge rekombinanten HA-LKLF-eGFP-Proteins in DC27.10-Zellen

DC27.10-Zellen wurden stabil mit HA-LKLF-eGFP transfiziert. Die aus einer Subklonierung gewonnen Klone wurden durchflusszytometrisch auf Grünfluoreszenz hin untersucht. Hierbei wurden jeweils Zellen des gleichen Klons verglichen, die für 14 Stunden mit 10 μ M aktiviertem Vanadat inkubiert wurden bzw. ohne Inhibitor kultiviert worden waren. Gezeigt sind die Daten 3 repräsentativer Klone (B-D), sowie eine

untransfizierte Negativkontrolle (A).



Abb. 17: Einfluss von Vanadat auf die Menge rekombinanten HA-LKLF-eGFP-Proteins in Jurkat-Zellen

Jurkat-Zellen wurden transient mit HA-LKLF-eGFP (C) sowie mit eGFP (B) transfiziert. Ein Tag nach der Transfektion wurde den Zellen, einschließlich einer untransfizierten Negativkontrolle (A), der Inhibitor Natrium-Orthovanadat in eine Konzentration von 10 μ M zugefügt. Am nächsten Tag erfolgte die FACS-Messung. Die in die Diagramme eingefügten Prozentzahlen geben den jeweils im Bereich M1 liegenden Anteil der Zellen an.



Abb. 18: Untersuchung der Halbwertszeit von HA-LKLF-eGFP in vanadatbehandelten Zellen und nicht vanadatbehandelten Zellen

Jurkat-Zellen wurden mit HA-LKLF-eGFP transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder für 15 Std. mit Natrium-Orthovanadat vorinkubiert oder das Vanadat wurde gleichzeitig mit dem Cycloheximid zugegeben. Die Proteinbiosynthese wurde mit Cycloheximid blockiert. Zu vier verschiedenen Zeitpunkten wurde die mittlere Fluoreszenzintensität mittels FACS bestimmt. Gezeigt ist die halblogarithmische Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit.

	t _{1/2} (Min.)	r ²
Ohne Inhibitor	68	0,9957
20 µM Vanadat	108	0,9659
20 µM Vanadat (15 h)	86	0,9372

Tab. 4: Einfluss von Vanadat auf die Halbwertszeit von HA-LKLF-eGFP in Jurkat-Zellen

Aus dem Diagramm der Abb. 19 wurden die Steigungen der Ausgleichsgeraden sowie das Bestimmtheitsmaß, das die Korrelation der Messpunkte mit der Ausgleichsgeraden angibt, bestimmt. Die Tabelle zeigt die aus den Steigungen berechneten Halbwertszeiten $(t_{1/2})$, sowie die Bestimmtheitsmaße (r^2) .

Zu erkennen ist, dass beide Arten der Vanadatbehandlung zu einer verlängerten Halbwertszeit des HA-LKLF-eGFP führen. Dass hierbei offenbar nicht der eGFP-Anteil die entscheidende Rolle spielt, ist Abb. 18 B zu entnehmen, da es hier nicht zu einer Kumulation des grün fluoreszierenden Proteins kommt. Die in Abb. 19 dargestellten Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Tyrosinphosphorylierung, entweder direkt am LKLF-Fusionsprotein oder aber an einem an der Regulation der LKLF-Eliminierung beteiligten Protein, zu einer Verlängerung der Halbwertszeit des LKLF führt, was eine Kumulation in vanadatbehandelten Zellen zur Folge hat.

Hierbei fällt ferner auf, dass eine Vanadatzugabe gleichzeitig mit der CHX-Zugabe einen stärkeren Effekt zu haben scheint (Verlängerung von 68 auf 108 Min.) als die 15 stündige Vorinkubation mit Vanadat (Verlängerung von 68 auf 86 Min.). Dies spricht gegen einen Mechanismus, der erst über einen Umweg der Mehrproduktion eines oder mehrer Proteine unter Vanadateinfluss zur Abbauhemmung des LKLF führen könnte. Vielmehr muss ein direkt durch einen Phosphorylierungsvorgang zustande kommender Effekt angenommen werden. Ob es sich hierbei um eine Tyrosinphosphorylierung direkt an einem oder mehreren Aminosäureresten des LKLF oder um eine Phosphorylierung regulatorischer Proteine im weiteren Sinne handelt, ist diesen Daten nicht zu entnehmen.

Um weitere Indizien zur Rolle der Tyrosinphosphorylierung bei der Regulation der Stabilität des LKLF zu erhalten, wurde eine Online-Analyse der LKLF Aminosäuresequenz mit dem NetPhos-Programm bezüglich Tyrosinphosphorylierung durchgeführt.

Das Resultat dieser Analyse zeigt Abb. 20. Der NetPhos-Score gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein bestimmter Tyrosinrest Substrat einer Phosphorylierungsreaktion ist. Bei resultierenden Werten unter 0,5 ist eine Phosphorylierung unwahrscheinlich, bei Werten über 0,5 hingegen wahrscheinlich. Zwei der neun im LKLF enthaltenen Tyrosinreste müssen angesichts des NetPhos-Ergebnisses als wahrscheinliche Ziele der Tyrosinphosphorylierung angenommen werden. Hierbei handelt es sich um die Reste Y84 und Y302.





Um zu überprüfen, ob es sich bei den beiden identifizierten Tyrosinresten tatsächlich um Ziele der Phosphorylierung handelt, und um zu untersuchen, ob dies möglicherweise Einfluss auf den Abbau von LKLF hat, wurden beide Reste jeweils einzeln und in Kombination durch gezielte Mutagenese des HA-LKLF-eGFP-Expressionskonstrukts zu Phenylalaninresten mutiert.

Um den Erfolg der Mutagenese anschließend zu objektivieren, wurden zum einen mit Einführung der Mutationen in die entsprechenden Expressionsvektoren Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme verändert, zum anderen wurde die Mutation durch DNA-Sequenzierung nachgewiesen. Bei der Mutation des Restes 84 wurde somit eine

Die Aminosäuresequenz des humanen LKLF wurde online mit dem NetPhos-Programm analysiert. Das Diagramm zeigt die erhaltenen Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Tyrosinreste, Substrat von Phosphorylierungsreaktionen zu sein.

Schnittstelle für das Enzym Sfc-I entfernt, bei der Mutation des Restes 302 wurde eine Schnittstelle für das Enzym Xmn-I hinzugefügt.



Abb. 20: Nachweis der gezielten Mutagenese von zwei Tyrosinresten im HA-LKLFeGFP mittels Restriktionsverdau

Abb. 21 zeigt die Restriktionsverdaus der Expressionsvektoren für die einfach- und doppel- Mutanten mit den Enzymen Sfc-I (Spuren 1-4) sowie mit Sal-I und Xmn-I (Spuren 5-8).

Mittels der hergestellten Mutanten sollte der Effekt des Vanadats auf die Stabilität des LKLF näher untersucht werden. Hierzu wurden alle drei Mutanten, sowie das unmutierte Expressionskonstrukt in Jurkat-Zellen transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen geteilt und je eine Hälfte in Anwesenheit, die andere in Abwesenheit von Vanadat für weitere 15 Std. kultiviert. Eine Kontrolle untransfizierter Zellen wurde gleichartig behandelt.

Abb. 22 und 23 zeigen die Auswirkung der Vanadatbehandlung auf die einzelnen Expressionskonstrukte.

Restriktionsverdau der Expressionsvektoren der Tyrosin-Mutageneseserie mit Sfc-I (Spuren 1-4) bzw. Sal-I/Xmn-I (Spuren 5-8). Spuren 1 und 5: Ausgangskonstrukt ohne Y-Mutation. Spuren 2 und 6: Y84F-Konstrukt. Spuren 3 und 7: Y302F-Konstrukt. Spuren 4 und 8: Y84F/Y302F-Kontrukt. a: Bande, die die intakte Sfc-I-Schnittstelle anzeigt. b: Bande, die die intakte Xmn-I-Schnittstelle anzeigt.



Abb. 21: Einfluss von Vanadat auf die Stabilität von mutierten HA-LKLF-eGFP-Fusionsproteinen (1)

Jurkat-Zellen wurden mit pEGFP-N1 (B), pEGFP/HA-LKLF (C), pEGFP/HA-LKLF (Y84F) (D) transfiziert. An Tag 1 nach der Transfektion wurden die Zellen in zwei Hälften aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit 20 µM aktiviertem Vanadat, die andere Hälfte ohne Vanadat für weitere 15 Std. kultiviert. Anschließend wurden alle Transfektanten sowie untransfizierte (A) gleichartig behandelte Zellen mittels FACS auf Grünfluoreszenz hin analysiert.



Abb. 22: Einfluss von Vanadat auf die Stabilität von mutierten HA-LKLF-eGFP-Fusionsproteinen (2)

Jurkat-Zellen wurden mit pEGFP/HA-LKLF (Y203F) (E) und pEGFP/HA-LKLF (Y84F/Y302F) (F) transfiziert. An Tag 1 nach der Transfektion wurden die Zellen in zwei Hälften aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit 20 μ M aktiviertem Vanadat, die andere Hälfte ohne Vanadat für weitere 15 Std. kultiviert. Anschließend wurden alle Transfektanten mittels FACS auf Grünfluoreszenz hin analysiert.

Expressionskonstrukt	Quotient
eGFP	1,01
HA-LKLF-eGFP	1,46
HA-LKLF-eGFP (Y84F)	1,23
HA-LKLF-eGFP (Y302F)	1,65
HA-LKLF-eGFP (Y84F/Y302F)	1,55

Tab. 5: Stabilisierender Effekt von Vanadat auf HA-LKLF-eGFP-Mutationskonstrukte in Jurkat-Zellen

Während eine Vanadatbehandlung auf eGFP-transfizierte Zellen wie erwartet keinen Einfluss hat, werden alle vier transfizierten HA-LKLF-eGFP-Fusionsproteine durch Vanadat stabilisiert, was sich in einer Kumulation des grünfluoreszierenden Proteins in den Zellen zeigt. Das Ausmaß dieses Effektes variiert von Konstrukt zu Konstrukt etwas. Aus diesem Grunde wurde für jedes Konstrukt ein Quotient berechnet, der das Verhältnis des Anteils positiver Zellen unter Vanadateinfluss zu dem ohne Vanadateinfluss erhobenen setzt. Die Errechneten Quotienten sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Bei der unmutierten Variante des HA-LKLF-eGFP findet man infolge der Vanadatbehandlung einen Anstieg der positiven Zellen um 46%. Dagegen hat eine Vanadatbehandlung bei Zellen, die mit dem Expressionskonstrukt, welches von den beiden untersuchten Tyrosinresten nur noch denjenigen an Position 302 aufweist (HA-LKLF-eGFP (Y84F)), mit einem Anstieg um 23% einen geringeren Effekt. Eine Mutagenese des Tyrosinrests an Position 302 hingegen führt mit einem Zuwachs von 65% zu einem stärken Effekt der Vanadatbehandlung. Eine Mutation beider Tyrosinreste wiederum führt zu einem Anteil positiver Zellen, der nahe demjenigen der unmutierten Variante liegt.

Eine Erklärung dieses Phänomens könnte ein Mechanismus bieten, der von einer gegenläufigen Beeinflussung der Stabilität des LKLF bei Phosphorylierung unterschiedlicher Tyrosinreste ausgeht. Bei einem solchen Mechanismus würde der Phosphorylierung des Restes Y302 ein destabilisierender Effekt, der Phosphorylierung des Restes Y84 ein stabilisierender Effekt zukommen. Die erhaltenen Daten legen allerdings nahe, dass neben den untersuchten Tyrosinresten weitere Phosphorylierungsreaktionen stattfinden, die in ihrer Bilanz einen stabilisierenden Effekt bewirken. Um dieses Phänomen eindeutig aufzuklären, wären allerdings weitere Mutageneseexperimente erforderlich, um idealerweise alle Tyrosinreste im LKLF einzelnen erfassen zu können.

Da in den Abschnitten Effekt vorangegangenen ein von Tyrosinphosphorylierungsreaktionen auf die Stabilität von LKLF-Fusionsproteinen nachgewiesen werden konnte und eine Phosphorylierung mehrerer Tyrosinreste im LKLF wahrscheinlich erscheint. sollte der Phosphorylierungsstatus der verwendeten Mutagenesekonstrukte direkt mittels Westen Blot untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde der rekombinante Antikörper RC20 angewendet, welcher einen Großteil der tyrosinphosphorylierten zellulären Proteine im Western-Blot zu detektieren vermag (Ruff-Jamison and Glenney 1993). Für die Western-Blot-Untersuchungen wurden HEK 293T-Zellen mit den beschriebenen Mutanten, der unmutierten Variante, sowie mit eGFP transfiziert. Als Kontrolle wurden untransfizierte HEK 293T-Zellen mitgeführt. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mittels Trypsin von der Kulturflasche gelöst, jeweils in 2 Portionen geteilt, von denen je eine fünf Minuten lang mit Pervanadat

inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Lysate direkt oder nach Immunpräzipitation im Western-Blot untersucht.

Abb. 24 zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse, Tabelle 6 die entsprechende Spurbeladung sowie die Detektion.

Abb. 24 A und B zeigen, dass alle der Mutageneseserie entstammenden HA-LKLF-eGFP-Fusionsproteine mit dem gleichen Molekulargewicht exprimiert werden (a, b). Die erfolgreiche Inhibierung der zellulären tyrosinspezifischen Phosphatasen lässt sich in Abb. 24 C erkennen, da hier nach Detektion der Lysate pervanadatbehandelter Zellen mit dem phosphotyrosinspezifischen Antikörper RC20 ein erheblich dichteres Bandenmuster vorzufinden ist, als bei Lysaten nicht mit PV behandelter Zellen. In Abb. 24 D sind exakt in der Höhe, die der der Fusionsproteine entspricht, deutliche Banden zu erkennen, wobei die Stärken der Banden der einzelnen Konstrukte keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Offenbar sind alle Fusionsproteine der Mutagenesereihe Substrate tyrosinspezifischer Kinasen (c). Jedoch scheint sich der Großteil der gebundenen Phosphatgruppen weder am Rest an Position 84 noch an Position 302 zu befinden.

Anzumerken ist ferner, dass offenbar ein weiteres Protein mit höherem Molekulargewicht kopräzipitiert wird, welches ebenfalls tyrosinphosphoryliert ist (d).

Eine gleichstarke Proteinbeladung der Spuren wurde durch die Silberfärbungen (Abb. 24 E und F) kontrolliert.



Abb. 23: Nachweis der Tyrosinphosphorylierung von HA-LKLF-eGFP-Expressionskonstrukten mittels Western-Blot

239T-Zellen wurden mit eGFP sowie mit den verschiedenen Expressionskonstrukten der HA-LKLF-eGFP-Mutagenese-Serie transfiziert. Die transfizierten Zellen sowie untransfizierte HEK 293T-Zellen wurden einen Tag post transfectionem je in zwei Portionen aufgeteilt von denen je eine 5 Minuten mit 100 μ M Pervanadat (PV) behandelt wurde. Die Zellen wurden lysiert und als Ganzzelllysate (ca. 4x10⁴ Zelläquivalente pro Spur), sowie nach Immunpräzipitation (2x10⁶ Zelläquivalente pro Spur) mit immobilisiertem aGFP-Antikörper (0,5 μ g Antikörper pro Spur), im Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-HA-Antikörper, sowie mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper RC20. Die Spurbeladung und Membrandetektion sind Tabelle 6 zu entnehmen.

	1	2	3	4	5	6
	7 (PV)	8 (PV)	9 (PV)	10 (PV)	11 (PV)	12 (PV)
	-	eGFP	(unmutiert)	(Y84F)	(Y302F)	(Y84/302F)
Α	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL
	aHA	aHA	aHA	aHA	aHA	aHA
	-	eGFP	(unmutiert)	(Y84F)	(Y302F)	(Y84/302F) IP
В	IP (aGFP)	(aGFP)				
	aHA	aHA	aHA	aHA	aHA	aHA
	-	eGFP	(unmutiert)	(Y84F)	(Y302F)	(Y84/302F)
С	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL
	RC20	RC20	RC20	RC20	RC20	RC20
	-	eGFP	(unmutiert)	(Y84F)	(Y302F)	(Y84/302F) IP
D	IP (aGFP)	(aGFP)				
	RC20	RC20	RC20	RC20	RC20	RC20
	-	eGFP	(unmutiert)	(Y84F)	(Y302F)	(Y84/302F)
Е	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL	GZL
	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.
	-	eGFP	(unmutiert)	(Y84F)	(Y302F)	(Y84/302F)
F	IP	IP	IP	IP	IP	IP
	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.	Silberfärb.

Tab. 6: Spurbeladung Abb.24

Darstellung der Spurbeladung der in Abb. 24 dargestellten Western-Blots und Silberfärbungen: Die Zeilenbezeichnung stimmt mit der Bezeichnung der einzelnen Membranen überein, die Spaltenbezeichnung mit der der Spuren. Jede Zelle der Tabelle enthält in der ersten Zeile das transfizierte Gen. Bei Expressionskonstrukten der Mutagenese-Serie ist nur die entsprechende Mutation in Klammern angegeben. Die Zweite Zeile enthält jeweils die aufgetragene Fraktion. In der dritten Zeile ist der Erstantikörper der Immundetektion angegeben. Abkürzungen: GZL = Ganzzelllysat, IP = Immunpräzipitation, aHA = Anti-HA-Antikörper, aGFP = Anti-GFP-Antikörper, RC20 = Anti-Phosphotyrosin-Antikörper, PV = Pervanadat behandelte Zellen.

3.1.7.2 <u>Untersuchungen zu serin- und threoninspezifischen Phosphorylierungen des</u> <u>LKLF</u>

Um der Frage nachzugehen, ob auch serin- oder threoninspezifische Phosphorylierungsreaktionen bei der Regulation der Stabilität des LKLF eine Rolle spielen könnten, wurde zunächst auch bezüglich dieser Fragestellung eine Analyse mit dem Programm NetPhos durchgeführt.

Das Ergebnis zur Frage der Serinphosphorylierung des humanen LKLF zeigt Abb. 25. Zu erkennen ist, dass den Berechnungen von NetPhos zufolge 11 der 20 Serinreste des LKLF-Moleküls als potenzielle Phosphorylierungsstellen anzusehen sind. Die entsprechenden Wahrscheinlichkeiten zur Threoninphosphorylierung sind Abb. 26 zu entnehmen. Hiernach können zwei der 14 Threoninreste als potenzielle Phosphorylierungsziele gelten.

Da Serinphosphorylierungen und –dephosphorylierungen häufig an der Regulation von Ubiquitinylierungsreaktionen beteiligt sind, sollte der Einfluss des



Serinphosphatasehemmstoffes Okadaic Acid (Bialojan and Takai 1988) auf die Stabilität des HA-LKLF-eGFP-Fusionsproteins untersucht werden. Hierzu wurde die bereits dargelegte Strategie zur Halbwertszeitmessung von grün fluoreszierenden Proteinen angewandt. Das Ergebnis dieser Halbwertszeitbestimmung zeigt Abb. 27. Die Daten sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Zu erkennen ist der deutlich flachere Verlauf der Ausgleichsgeraden der mit OA inkubierten im Gegensatz zu den nur mit Lösungsmittel inkubierten mit pEGFP/HA-LKLF transfizierten Zellen, was eine Prolongation der Halbwertszeit in Anwesenheit von OA anzeigt. Allerdings waren die Bestimmtheitsmaße in diesem Versuch nicht zufriedenstellend. Die ungenauen Ergebnisse sind möglicherweise auf eine hohe Toxizität des zugegebenen Stoffes, welche sich in einem hohen Anteil toter Zellen äußerte, zurückzuführen. Dieser Versuch weist auf den Einfluss von Serin-Threonin-phosphorylierung auf die Stabilität des LKLF hin.



Abb. 25: Potenzielle Ziele der Threoninphosphorylierung im humanen LKLF



Abb. 26: Halbwertszeitmessung von eGFP und HA-LKLF-eGFP unter Einfluss von Okadaic Acid

Jurkat-Zellen wurden mit eGFP und HA-LKLF-eGFP transfiziert. Zellen jeder Transfektion wurden entweder mit Okadaic Acid oder nur mit dem Lösungsmittel DMSO vorinkubiert. Die Proteinbiosynthese wurde mit Cycloheximid blockiert. Zu vier verschiedenen Zeitpunkten wurde die mittlere Fluoreszenzintensität mittels FACS bestimmt. Gezeigt ist die halblogarithmische Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit.

Inhibitor(\downarrow)/Konstrukt(\rightarrow)	eGFP	HA-LKLF-eGFP
Lösungsmittelkontrolle	t _{1/2} : 1386 r ² : 0,9329	t _{1/2} : 85 r ² : 0,9610
10 μM Okadaic Säure	$t_{1/2}$: -1155 r^2 : 0,2125	t _{1/2} : 169 r ² : 0,6411

Tab. 7: Einfluss von Okadaic Acid auf die Halbwertszeit von HA-LKLF-eGFP in Jurkat-Zellen

Aus dem Diagramm der Abb. 27 wurden die Steigungen der Ausgleichsgeraden sowie das Bestimmtheitsmaß, das die Korrelation der Messpunkte mit der Ausgleichsgeraden angibt, bestimmt. Die Tabelle zeigt die aus den Steigungen berechneten Halbwertszeiten, sowie die Bestimmtheitsmaße.

3.2 Entwicklung einer Methode zur Erzeugung von Anti-LKLF-Antikörpern mittels DNA-Immunisierung

Ziel des zweiten Abschnitts meiner Arbeiten war die Erzeugung von spezifischen Antikörpern gegen das humane LKLF-Protein. Hierzu sollte die Methode der DNA-Immunisierung verwendet werden, die in unserem Labor bislang vorwiegend zur Erzeugung von Antikörpern gegen membranständige oder zytoplasmatische Proteine verwendet wurde.

Durch gentechnische Veränderungen der Gensequenz des LKLF-Gens konnte ein Abschnitt des LKLF auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Als Expressionsvektor wurde der kommerziell erhältliche pDisplay-Vektor eingesetzt. Die DNA-Immunisierung wurde in Form der sogenannten Gene-Gun-Immunisierung angewandt. Das Prinzip der DNA-Immunisierung besteht im Einbringen von codierender DNA in Organe des zu immunisierenden Organismus, zum Beispiel in die Haut von Nagetieren. Hierbei dienen in der Regel bakterielle Plasmide mit regulatorischen Elementen für die Expression in eukaryontischen Zellen als Vektoren. Die DNA wird in Zellen des immunisierten Organismus aufgenommen, welche daraufhin das rekombinante Protein produzieren. Das Protein wird vom Immunsystem des immunisierten Tieres als fremd erkannt und provoziert auf diese Weise eine Immunreaktion, z.B. in Form von Antikörperproduktion. Auf die Mechanismen der Immunantwort wurde in der Einleitung bereits eingegangen.

3.2.1 Das Prinzip der DNA-Immunisierung und Herstellung eines Plasmids zur extrazellulären Expression einer LKLF-Domäne

Die transaktivierende Domäne (entsprechend den Aminosäuren 7-218) des LKLF-Moleküls wurde in den Expressionsvektor pDisplay (Invitrogen) kloniert (Abb. 28). Die in dieser Arbeit verwendete Methode der ballistischen DNA-Immunisierung mittels Gene-Gun ist in Abb. 29 dargestellt.

LKLF-Anteil Ig-kappaB-Leader HA-Tag Myc-Tag PDGFR-Transmembrandomäne

Abb. 27: Schema des Expressionsvektors zur DNA-Immunisierung

Ansonsten enthält der Vektor alle Eigenschaften eines eukaryontischen Expressionsvektors. Das Schema des Vektors wurde entnommen aus: "Comments for pDisplay", Invitrogen life technologies

Nach der Klonierung des pDisplay/hLKLF-Expressionsvektors sollte zunächst überprüft werden, ob das rekombinante Protein wie vorhergesagt auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden HEK 293T-Zellen transfiziert und mit Antikörpern

Über die Klonierungsregion des kommerziell erhältlichen pDisplay-Vektors wurde die transaktivierende Region des LKLF als Insert in den Vektor eingefügt. Der pDisplay-Vektor enthält 5'wärts der Klonierungsregion eine Leader-Sequenz für sezernierte- bzw. membranständige Proteine (ursprünglich vom Ig-κ-Gen kloniert), sowie den HA-Tag. In der 3'-flankierenden Region findet sich der cMyc-Tag, sowie die Transmembrandomäne und eine trunkierte intrazelluläre Domäne aus dem PDGF-Rezeptor. Auf diese Art und Weise resultiert ein Fusionsgen, das für ein auf der Zelloberfläche exprimiertes Protein codiert, welches N-terminal einen HA-Tag, sowie C-terminal einen cMyc-Tag aufweist und zwischen diesen beiden Tags die eingefügte Sequenz, hier die transaktivierende Domäne des LKLF, enthält.

angefärbt, welche gegen den flankierenden cMyc-Tag gerichtet sind. Wie man im fluoreszenzmikroskopischen Bild erkennen kann, wird die Oberfläche der transfizierten Zellen angefärbt (Abb. 30), im Gegensatz zu nicht transfizierten Zellen (nicht abgebildet), die keine Fluoreszenz zeigten. Der klonierte Vektor scheint also geeignet, ein LKLF-Fusionsprotein auf der Zelloberfläche zu exprimieren.





Plasmide, welche das interessierende Gen enthalten werden an Goldpartikel gekoppelt (A) und in spezielle Patronen einbracht. Die Patronen werden in die Gene Gun eingelegt und mittels eines Heliumgasstoßes in die Bauchhaut des Versuchstieres geschossen (B). In den Zellen des Versuchstieres wird das rekombinante Protein erzeugt (C), was eine Antikörperproduktion durch B-Zellen zur Folge hat (D).

Nachdem nachgewiesen wurde, dass das klonierte Fusionsgen wie vorhergesagt auf der Zelloberfläche exprimiert wurde, fand eine Immunisierungsserie einer Ratte mit dem pDisplay/hLKLF-Vektor statt. Jeweils zwei Wochen nach jeder Immunisierung fand eine Blutentnahme statt, und das gewonnene Serum wurde asserviert.

Abb. 29: Nachweis des LKLF-Expressionskonstruktes auf der Zelloberfläche von HEK 293T-Zellen



HEK 293T-Zellen wurden mit dem pDisplay/hLKLF-Vektor transfiziert und mittels Anti-cMyc-Antikörpern, sowie PE-markierten Anti-Maus-Ig-Antikörpern angefärbt. Die Zellen wurden daraufhin mit grünem Spektrallicht mikroskopiert und fotografiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen mitgeführt, welche sich nicht anfärbten.

3.2.2 Vergleich zweier Methoden zum Screening von antikörperproduzierenden Zellklonen

Um eine einfache und in größerem Maßstab durchführbare Methode zum Nachweis LKLFspezifischer Antikörper zur Verfügung zu haben, erprobten wir zwei ELISA-Verfahren im Vergleich. Beide Methoden wurden zum Vergleich von Präimmunserum mit Immunserum der mit dem pDisplay/hLKLF-Vektor immunisierten Ratte herangezogen.

Bei der ersten Methode wurde zunächst ein lösliches LKLF-eGFP-Fusionsprotein rekombinant in CHO-Zellen produziert (Abb. 31 zeigt die transfizierten CHO-Zellen). Das lösliche rekombinante LKLF-eGFP-Fusionsprotein wurde mittels Anti-GFP-Antikörpern in den ELISA-Näpfen immobilisiert. In die so beschichteten ELISA-Näpfe wurde daraufhin das zu testende Serum in verschiedenen Verdünnungsstufen pipettiert. Die Menge der spezifisch gebundenen Antikörper wurde nach Zugabe von peroxidasegekoppelten Anti-Ratten-Ig-Antikörpern durch einen von der Peroxidase katalysierten Farbumschlag eines Substrates sichtbar gemacht (Abb. 32 A).

Abb. 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CHO-Zellen, die das lösliche LKLF-eGFP-Fusionsprotein produzieren



Fluoreszenzmikroskopisches Bild von transient mit dem pEGFP/LKLF-TAD-sez-Vektor transfizierten CHO-Zellen. Das Bild zeigt ein Fluoreszenzmuster passend zu einem sezernierten Protein (Anfärbung des Golgi-Apparates).

Abb. 31: Schema des Zell-ELISA, sowie des Sandwich-ELISA



Nach dem Farbumschlag wurde die optische Dichte mit einem Photometer gemessen und gegen die Verdünnungsstufe aufgetragen (Abb. 33).



Abb. 32: Titrierung des Anti-LKLF-Serums, sowie des Präimmunserums mithilfe des Sandwich-ELISA

ELISA-Platten wurden über Nacht mit Anti-GFP-Antikörpern beschichtet (2,5 μ g/Napf). Freie Bindungsstellen der ELISA-Platte wurden mit BSA geblockt. Daraufhin wurde Zellkulturüberstand von Zellen, welche das LKLF-eGFP-Fusionsprotein sezernierten zugegeben. Als dritter Inkubationsschritt folgte die Zugabe des Anti-LKLF-Antiserums bzw. des Präimmunserums in der angegebenen Verdünnungsstufe. Daraufhin wurden peroxidasegekoppelte Anti-Rt-Ig-Antikörper zugegeben, durch welche der Farbumschlag des Substrates TMB katalysiert wurde. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte der einzelnen Näpfe photometrisch bestimmt.

Bei der zweiten Methode wurde das Antigen in Form von Zellen, welche mit dem pDisplay/hLKLF-Vektor transfiziert worden waren, in den ELISA-Näpfen immobilisiert. Das weitere Vorgehen war mit der zuerst beschriebenen Methode identisch (Abb. 32 B).

Die Auswertung zeigt Abb. 34.



Abb. 33: Titrierung des Anti-LKLF-Serums, sowie des Präimmunserums mithilfe des Zell-ELISA

Das für beide Methoden verwendete Immunserum entspricht dem letzten asservierten Serum vor Gewinnung des Finalblutes (bei Tötung des Tieres gewonnenes Blut).

Man erkennt, dass beide Methoden geeignet sind zwischen Immunserum und Präimmunserum zu unterscheiden. Somit können beide Methoden auch als Screeningmethoden für eine bevorstehende Herstellung monoklonaler Antikörper

⁹⁶⁻Napf Zellkulturplatten wurden mit HEK 293T-Zellen beschickt, welche mit dem pDisplay/hLKLF-Vektor transfiziert worden waren. Anti-LKLF-Antiserum bzw. das Präimmunserum wurde in der angegebenen Verdünnungsstufe hinzugegeben. Daraufhin wurden peroxidasegekoppelte Anti-Rt-Ig-Antikörper zugegeben, durch welche der Farbumschlag des Substrates TMB katalysiert wurde. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte der einzelnen Näpfe photometrisch bestimmt.

fungieren. Ferner ist festzustellen, dass offenbar die Methode des "Zell-ELISA" noch in höheren Verdünnungsstufen eine Diskriminierung von spezifischer und unspezifischer Antikörperreaktion erlaubt als der "Sandwich-ELISA". Allerdings zeigt der "Sandwich-ELISA" einen konstanteren Kurvenverlauf der Verdünnungsreihe. Möglicherweise ist dieser Effekt auf einen ungleichmäßigen Zellverlust während der Waschschritte des "Zell-ELISA" zurückzuführen, während der "Sandwich-ELISA" eine festere Bindung des Antigens aufweist.

3.2.3 Beobachtung des Titerverlaufs im Rahmen der DNA-Immunisierung

Da in der Literatur unterschiedliche Immunisierungsstrategien mit unterschiedlich gestalteten Boosterserien beschrieben wurden (Fynan, Webster et al. 1993; Sundaram, Xiao et al. 1996; Surman, Irvine et al. 1998; Koch-Nolte, Duffy et al. 1999; Waine, Mazzer et al. 1999; Han, Reed et al. 2000; Ito, Shinohara et al. 2003; Sakai, Hisaeda et al. 2003), sollte anhand einer sehr langen Gene-Gun-Immunisierungsserie die Immunreaktivität der zu verschiedenen Zeiten gewonnenen Anti-LKLF-Antiseren untersucht werden. Hierzu wurde der Zell-ELISA verwendet. Abb. 35 zeigt die im ELISA ermittelte optische Dichte als Maß für die Immunreaktivität des Präimmunserums sowie der zu verschiedenen Stadien der Immunisierungsserie gewonnenen Antiseren.

Wie zu erkennen ist, findet man bereits nach der ersten Immunisierung eine deutliche Immunreaktivität, die sich bis etwa zur dritten Boosterimmunisierung noch steigert. Nach einer längeren Immunisierungspause von etwa 8 Wochen fällt der Titer wieder deutlich ab, um nach zwei weiteren Immunisierungen wieder den Stand nach dem dritten Boost erreicht zu haben. Weitere Immunisierungen führen nicht zu einem weiteren Anstieg der Immunreaktivität auf Antikörperebene. Vielmehr scheint eine Fortsetzung der Immunisierungsserie eher zu einem Abfall der Reaktivität zu führen. Das finale Serum weist schließlich etwa den gleichen Gehalt an spezifischen Antikörpern auf, wie das Serum nach der ersten Immunisierung. Auch die vor der Gewinnung des Finalblutes durchgeführte Zellimmunisierung zeigte, zumindest keinen im Titerverlauf erkennbaren Erfolg. Die Ergebnisse legen nahe, dass ein kurzes Immunisierungsprotokoll mit einer kurzen raschen Folge von Immunisierungen besser geeignet erscheint eine starke Antikörperantwort auszulösen, als langdauernde Immunisierungsserien mit größeren Pausen zwischen den Boosterimmunisierungen. Abb. 34: Immunreaktivität der zu verschiedenen Zeiten gewonnenen Antiseren einer gegen LKLF immunisierten Ratte.



Das Präimmunserum sowie die zu verschiedenen Stadien der Immunisierung gewonnenen Anti-LKLF-Antiseren wurden jeweils 1:800 verdünnt und mit Hilfe des Zell-ELISA mit pDisplay/hLKLF transfizierten HEK 293T-Zellen untersucht. Für jedes Serum wurden drei Ansätze getestet. Die Streubreite der Werte ist durch Fehlerbalken dargestellt. X-Achse: Zeitpunkte der Immunisierungen. Y-Achse: Optische Dichte.

3.2.4 Nachweis der Reaktivität des gewonnenen Antiserums in der intrazellulären Anfärbung

Die beiden im vorangegangen Kapitel verwendeten ELISA-Methoden detektieren rekombinantes LKLF in Tertiärstruktur, jedoch nicht im Kompartiment der physiologischen Expression des Proteins. Um zu überprüfen, ob auch LKLF-Protein, welches im Zellkern lokalisiert ist, von dem erzeugten Antiserum erkannt wird, wurde eine intrazelluläre Anfärbung nach Permeabilisierung festwachsender transfizierter CHO-Zellen durchgeführt. Abb. 36 zeigt die transfizierten Zellen, einerseits unter Darstellung der Grünfluoreszenz des transfizierten LKLF-eGFP-Fusionsproteins, andererseits unter Darstellung der Rotfluoreszenz, die die Bindung der Antikörper anzeigt. Deutlich zu

erkennen ist, dass nur die transfizierten Zellen und nicht die dazwischenliegenden nicht transfizierten Zellen vom Anti-LKLF-Serum angefärbt werden. Auch die subzelluläre Lokalisation, sowie die Intensität der Anfärbung korrelieren zwischen Grün- und Rotfluoreszenz. Die erzeugten Antikörper erkennen folglich auch rekombinantes LKLF-Proteien, welches sich im Zellkompartiment der physiologischen Expression, nämlich dem Zellkern, befindet.

Abb. 35: Intrazelluläre Anfärbung von transfizierten CHO-Zellen mittels des Anti-LKLF-Antiserums



CHO - HA-LKLF-eGFP Eigenfluoreszenz CHO - HA-LKLF-eGFP aLKLF-Serum + aRt-Ig-PE

3.2.5 Nachweis der Reaktivität des gewonnenen Antiserums im Western-Blot

Nachdem die Reaktivität des Immunserums der immunisierten Ratte gegen nativ gefaltetes Protein mittels zweier ELISA-Methoden, sowie der intrazellulären Anfärbung nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob auch denaturiertes, also entfaltetes Protein vom Antiserum erkannt wird. Hierzu wurden HEK 293T-Zellen mit dem pCDNA3.1/LKLF-FlagMyc-Expressionsvektor transfiziert und im Western-Blot analysiert. Für die Immundetektion wurden das gewonnene Immunserum sowie das

Auf 13-mm-Coverslips kultivierte CHO-Zellen wurde mit 4% PFA in PBS fixiert und für 30-60 Minuten mit "Blocking-Lösung" inkubiert. Die Anfärbung erfolgte mit dem Anti-LKLF-Antiserum als Erstantikörper, sowie mit einem PE-markierten Zweitantikörper. Zuletzt wurden die Zellen mittels Glycerol Gelatin luftblasenfrei auf einen Objektträger aufgebracht.
Präimmunserum derselben Ratte verwendet.

Wie Abb. 37 zeigt wird eine Bande (a), die dem Molekulargewicht nach dem LKLF-FlagMyc-Protein entspricht (siehe auch Abb. 3), in transfizierten aber nicht in untransfizierten HEK 293T-Zellen detektiert. Einige weitere kleinere Banden könnten proteolytischen Fragmenten entsprechen.



Abb. 37: Nachweis der Immunreaktivität des Anti-LKLF-Serums im Western-Blot

HEK 293T-Zellen wurden mit dem pCDNA3.1/LKLF-FlagMyc-Vektor transfiziert und einen Tag post transfektionem lysiert. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK 293T-Zellen mitgeführt. Ganzzelllysate der Zellen wurden mittels Western-Blot analysiert (1 und 3: transfiziert, 2 und 4: untransfiziert) und mit dem Präimmunserum (1 und 2), sowie den Anti-LKLF-Serum (3 und 4) detektiert. Die Seren wurden jeweils 1:500 verdünnt. Eine gleichmäßige Spurbeladung wurde durch Silberfärbung (rechts) kontrolliert. Spurbeladung: ca. 3x10⁵ Zellen pro Spur. a: LKLF-FlagMyc-Protein.

4 Diskussion und Perspektiven

4.1 Methoden

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, wie es zur aktivierungsinduzierten Herabregulation von LKLF auf Proteinebene nach T-Zell-Aktivierung kommt. In diesem Abschnitt soll diskutiert werden, ob die angewandten Methoden zur Beantwortung dieser Fragestellung geeignet waren.

Da LKLF in primären T-Zellen nur in geringen Mengen vorkommt, und zu Beginn meiner Arbeiten kein kommerziell erhältlicher Antikörper gegen das LKLF-Protein zur Verfügung stand, mussten die Experimente mit rekombinant in Zellkulturzellen exprimiertem LKLF erfolgen.

Zur Untersuchung des Schicksals des LKLF-Proteins nach T-Zell-Aktivierung wurden somit eine oder mehrer Zelllinien benötigt, in denen das LKLF-Protein überexprimiert werden konnte.

In der Zellkultur wachsende Zelllinien sind jedoch i.d.R. immortalisierte Krebszellen, welche sich insofern auch in unterschiedlichem Maße von differenzierten Zellen ihres Ursprungsgewebes unterscheiden. Ein charakteristisches Merkmal von immortalisierten Zellen ist, dass ihre Proliferation nicht mehr den physiologischen Kontrollmechanismen des Zellzyklus unterliegt. Häufig treten weitere Änderungen des biologischen Verhaltens ein. wie z.B. Alterationen in der Expression oder der Struktur von Zelladhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und anderen Proteinen (Löffler and Petrides 1998 S. 1089-1100). Es ist daher bei der Wahl der Zelllinie und bei der Interpretation der Ergebnisse stets zu bedenken, dass auch Interferenzen des abweichenden biologischen Verhaltens der Zelllinie mit der zu untersuchenden Fragestellung auftreten können.

Ich habe in meiner Arbeit zwei Zelllinien verwendet: die humane T-Zelllinie Jurkat und die humane embryonale Nierenzellinie HEK 293T. Die Jurkat-Zelllinie wurde in verschiedenen Arbeiten als eine T-Zelllinie mit einem zumindest partiell aktivierten Phänotyp beschrieben (Aussel, Marhaba et al. 1996; Dong and Hughes 1996; Buckley, Kuo et al. 2001). Auch die in dieser Arbeit unternommenen Analysen zeigten deutliche Unterschiede zu ruhenden primären T-Zellen z.B. im Expressionsmuster von Oberflächenantigenen auf. Natürlich lassen sich nicht alle Eigenschaften von aktivierten primären T-Zellen mit denen von Zellkulturzellen vergleichen, jedoch erscheint die Jurkat-

Zelllinie geeignet, das Verhalten von aktivierten T-Zellen zu imitieren. Leider lässt sich jedoch mit dieser Zelllinie nicht das Verhalten von ruhenden T-Zellen oder die Phase der initialen Aktivierung simulieren.

Rekombinantes LKLF war in Jurkat-Zellen mit den mir zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachweisbar. Dieser Befund ist mit der Hypothese des raschen Abbaus von LKLF Protein in aktivierten T-Zellen durchaus konform. Aus diesem Grund war es jedoch nicht möglich, Proteinmodifikationen des rekombinanten LKLF in dieser Zelllinie nachzuweisen. Daher wurde eine weitere Zelllinie benötigt, in welcher sich rekombinantes LKLF-Protein nachweisen ließ. Es stellte sich heraus, dass sich rekombinantes LKLF in der HEK 293T-Zelllinie in größerer Menge nachweisen ließ als in Jurkat-Zellen. Zwar handelt es sich bei der HEK 293T-Zelllinie nicht um eine lymphatische Linie, sie wurde jedoch trotzdem verwendet, unter der Annahme, dass LKLF in humanen Zellen prinzipiell dem gleichen Abbauweg folgt, wenn auch möglicherweise mit einer unterschiedlichen Kinetik.

Um Einflussfaktoren auf die Abbaugeschwindigkeit erfassen zu können, wurde ein Maß für die Eliminationsgeschwindigkeit des rekombinanten LKLF-Proteins benötigt. Da intrazelluläre biologische Abbauvorgänge i.d.R. einem exponentiellen Zusammenhang folgen, wurde als Maß die Halbwertszeit, also die Zeit, in der sich die Menge an rekombinantem Protein halbiert, gewählt. Um das Schicksal des LKLF-Proteins in lebenden Zellen verfolgen zu können, habe ich Varianten des LKLF-Proteins als Fusionsprotein mit dem grün fluoreszierenden Protein (eGFP) exprimiert. Dieses Vorgehen erlaubte auch die klare Abgrenzung derjenigen Zellpopulation, die erfolgreich transfiziert war und somit das Fusionsprotein exprimierte, als Grundlage für die kinetische Analyse.

Mit dieser Methodik war es mir möglich, sowohl den Einfluss bestimmter Sequenzabschnitte des LKLFs, als auch die Wirkung verschiedener posttranslationaler Modifikationen auf den Abbau zu untersuchen. Ersteres geschah durch die Verwendung unterschiedlich trunkierter Teilbereiche des LKLF-Proteins für die Konstruktion der Fusionsproteine, letzteres durch die Verwendung bekannter Inhibitoren verschiedener zellulärer Prozesse, wie beispielsweise der Phosphorylierung oder des proteasomalen Abbaus. Ein bei Verwendung von Tag-markierten Proteinen zu bedenkender Nachteil ist, dass als weitere potenzielle Einflussgröße die Tagsequenz selbst mit in das biologische Verhalten des Proteins einfließt, und sich das Fusionsprotein somit anders als das native Protein verhalten kann. Aus den erwähnten methodischen Gründen wurde dieser Nachteil jedoch in Kauf genommen.

4.2 Die Rolle von LKLF und des Proteasoms in der T-Zell-Aktivierung

Verschiedene Arbeiten legen eine zentrale Rolle des Proteasoms bei der T-Zell-Aktivierung nahe. So konnte gezeigt werden, dass es nach T-Zell-Aktivierung zu einer Steigerung der proteasomalen Aktivität um das Vierfache kommt (Wang, Omura et al. 1997). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung von T-Zellen mit Proteasomeninhibitoren zu einer Resistenz der Zellen gegenüber Aktivierung führt (Wang, Luo et al. 1998). Die Mechanismen, die für diesen Effekt verantwortlich sind, wurden bislang nicht eindeutig geklärt. Eine mögliche Ursache dieses Effektes könnte in der Natur der proteasomal abgebauten Proteine liegen. So konnte gezeigt werden, dass wichtige Regulatoren des Zellzyklus, sowie der T-Zell-Aktivierung proteasomal gespalten werden (Palombella, Rando et al. 1994; Maki, Huibregtse et al. 1996; Renard, Percherancier et al. 2000).

In dieser Arbeit sollte die Hypothese überprüft werden, LKLF könnte ebenfalls in die Gruppe der proteasomal abgebauten Proteine gehören, und somit für die beschriebene Rolle der Proteasomen bei der T-Zell-Aktivierung mitverantwortlich sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen diesen Schluss nahe. Eine Hemmung der Proteasomen in Jurkat-Zellen als Modell für die aktivierte T-Zelle, führt zu einer deutlichen Verlangsamung des LKLF-Abbaus.

Um diese Hypothese weiter zu erhärten, wären Untersuchungen an *Ex-vivo*-T-Lymphozyten wünschenswert. Für derartige Experimente sind jedoch spezifische, gegen das LKLF gerichtete Antikörper, unerlässlich. Mit der Erzeugung derartiger Antikörper beschäftigt sich der zweite Teil der Arbeit.

Weitergehende Erkenntnisse zur Rolle des Proteasoms könnten das bisherige Bild der T-Zell-Aktivierung erweitern. So war das bisherige Bild der T-Zell-Aktivierung von der Vorstellung geprägt, die entscheidenden Mechanismen lägen in der aktivierungsabhängigen Induktion einer Reihe von Proteinen, welche zum Einen die Zellproliferation fördern und zum Anderen Effektormechanismen der T-Lymphozyten ermöglichen. Die Erkenntnis, dass es neben den aktivierenden Faktoren, welche nach T-Zell-Aktivierung erst bereitgestellt werden, auch eine aktive Induktion eines ruhenden Zustandes gibt, an welcher Faktoren wie das LKLF beteiligt sind, legt den Schluss nahe, dass auch proteolytischen Prozessen eine unerlässliche Rolle bei der T-Zell-Aktivierung zukommt.

In einem derartigen Modell wäre zu erwarten, dass die Proteine, die zu einem ruhenden Status der T-Zelle beitragen, entweder generell suszeptibler gegenüber einer proteasomalen Proteolyse sind als jene, die zu einem aktivierten Zustand führen, oder im Verlauf der Zellaktivierung spezifisch für den proteasomalen Abbau markiert werden. Für einige Proteine konnte ein derartiger Mechanismus bereits nachgewiesen werden. So kommt es aktivierungsinduziert beispielsweise zu einer proteasomalen Degradierung von I- κ -B, dem Inhibitor von NF- κ -B, einem Transkriptionsfaktor, welcher in aktivierten T-Zellen dominiert (Renard, Percherancier et al. 2000). Andererseits kommt es zu einer proteasomalen Spaltung des NF- κ -B selbst, die jedoch nicht zu einer Inaktivierung des Proteins führt, sondern im Gegenteil erst seine aktive Form bereitstellt (Palombella, Rando et al. 1994).

Um diese Hypothese zu erhärten, wären Untersuchungen weiterer pro- und antiaktivatorischer Proteine hinsichtlich ihrer Suszeptibilität gegenüber proteasomaler Degradierung erforderlich. Ein nützliches Hilfsmittel zur Quantifizierung der proteasomalen Spaltung könnte das in dieser Arbeit vorgestellte System zur Halbwertszeitbestimmung eGFP-markierter Proteine sein. In diesem Zusammenhang interessante Proteine könnten z.B. das GKLF, der nächste Verwandte des LKLF, sein, welcher ebenfalls präferenziell in ruhenden Zellen exprimiert wird (Shields, Christy et al. 1996; Chen, Johns et al. 2001).

Eine Analyse des GKLF mit dem PESTfind-Programm ergab mehrere potenzielle PEST-Sequenzen (Ergebnisse nicht gezeigt), was auf einen proteasomalen Abbau hinweist. Des Weiteren könnten andere regulatorische Proteine des Zellzyklus untersucht werden.

4.3 LKLF und Signaltransduktion

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Frage, ob Phosphorylierungsprozesse einen Einfluss auf die Stabilität rekombinanten LKLF-Proteins in lebenden Zellen haben. Hintergrund dieser Fragestellung war es. nähere Erkenntnisse über den Signaltransduktionsweg, welcher zur Degradierung von LKLF führt, zu erlangen. Da ein häufiger Mechanismus für die Weiterleitung von Signalen von der Zellmembran über das Zytosol in den Zellkern die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Proteinen ist, und darüber hinaus Phosphorylierungsereignisse als wichtige Marker für die Ubiquitinylierung und die Zuführung zum protasomalen Abbauweg bekannt sind, wurde diesem Mechanismus besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Mithilfe von Phosphataseinhibitoren konnte gezeigt werden, dass sowohl Tyrosin- als auch Serin-/Threoninphosphorylierung einen Einfluss auf die Stabilität von LKLF-Protein in Zellen hat. So gelang in dieser Arbeit der Nachweis, dass eine Inhibierung tyrosinspezifischer Phosphatasen der Zelle zu einer verlängerten Halbwertszeit des LKLF-Proteins führte. Hierbei kommt es offenbar zu einer direkten Modifikation im Abbauweg des LKLF, die ohne eine zwischengeschaltete Mehrproduktion von regulatorischen Proteinen vonstatten geht. Hierauf weist die Tatsache hin, dass eine Verlängerung der Halbwertszeit des LKLF-Proteins auch nach Blockierung der Proteinbiosynthese duch Cycloheximide auftrat.

In silico Analysen der LKLF-Aminosäuresequenz mit Hilfe des NetPhos-Programms zeigten zwei Tyrosinreste als wahrscheinliche Substrate der Phophorylierung. Mittels Western-Blot-Analysen konnte tatsächlich eine Tyrosinphosphorylierung des LKLF-Proteins nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich diese auch nach Mutation der fraglichen Tyrosinreste zu Phenylalanin. Somit ist anzunehmen, dass weitere der im LKLF vorhandenen neun Tyrosinreste als Phosphorylierungssubstrate fungieren. Desweiteren wurde die Stabilität der LKLF-Mutanten analysiert, denen jeweils einer oder beide der durch das NetPhos-Programm aufgefundenen Tyrosinreste fehlt. Hierbei zeigte sich, dass einer der beiden untersuchten Tyrosinreste eine stabilisierende Wirkung auf das LKLF ausübt, während der andere zu einer Destabilisierung führt. Insgesamt scheint die Tyrosinphosphorylierung jedoch bei der Regulation des Proteinlevels eher einen geringen Effekt auszuüben.

Zu bedenken ist bei der Interpretation der Ergebnisse allerdings, dass bei Verwendung derartiger Inhibitoren ein Eingriff in ein komplexes regulatorisches Netzwerk vorgenommen wird, und damit eine ganze Reihe von Signaltransduktionswegen betroffen sein kann. Auf diese Weise können sekundär auch weitere Phosphatasen inhibiert werden. Daher kann der erzielte Effekt nur als ein Summationsmaß verschiedener Einzeleffekte interpretiert werden.

Somit könnten unterschiedliche tyrosinspezifische Dephosphorylierungsereignisse gegenläufige Effekte bezüglich der Stabilität des LKLF zeigen. Einen Hinweis hierauf liefern die Experimente unter Verwendung der mutierten LKLF-Expressionskonstrukte, denen unterschiedliche Tyrosinreste fehlen. Es konnte jedoch mit den durchgeführten Untersuchungen nicht der Nachweis geführt werden, dass LKLF tatsächlich an einem oder beiden der vorhergesagten Tyrosinreste phosphoryliert wird. Angesichts der Tatsache, dass

das LKLF insgesamt neun Tyrosinreste aufweist, wären weitere Mutageneseexperimente erforderlich, um tatsächlich nachzuweisen, welche Tyrosinreste als Substrate von Kinasen fungieren.

Auch im Bereich der Serin-/Theronin-Phosphorylierung, der aufgrund methodischer Schwierigkeiten und durch die hohe Anzahl potenzieller Zielreste schwieriger zu untersuchen ist, fanden sich starke Hinweise auf eine Involvierung von Phosphorylierungsund Dephosphorylierungsereignissen bei der Regulation des LKLF-Proteinlevels. So stellten sich in der NetPhos-Analyse 11 der 20 Serinreste, sowie zwei der 14 Threoninreste als potenzielle Ziele der Phosphorylierung heraus. Desweiteren hatte ein Inhibitor der Serin-/Threoninphosphorylierung, bei aufgrund methodischer Mängel eingeschränkter Aussagekraft, ebenfalls einen Stabilisierenden Effekt auf das LKLF-eGFP-Fusionsprotein.

4.4 Potenzielle medizinische Bedeutung

Wie in der Einleitung bereits dargelegt, führt die selektive Inaktivierung von LKLF in Immunzellen bei Mäusen zu einer drastischen Störung der Homöostase des Immunsystems, die sich vor allem durch ein gestörtes Verhältnis zwischen aktivierten und ruhenden T-Lymphozyten äußert. Der komplette k.o. von LKLF bei der Maus führt zum intrauterinen Fruchttod durch Störungen der Vaskulogenese (Kuo, Veselits et al. 1997; Wani, Means et al. 1998). Von daher ist es unwahrscheinlich, dass beim Menschen angeborene Gendefekte des LKLF zu Erkrankungen führen könnten. Jedoch wäre eine erworben oder konstitutionell veränderte Aktivität von LKLF möglich, was die Anfälligkeit gegebüber autoimmunologischen Erkrankungen erhöhen könnte. Unklar ist ferner , ob erworbene Defekte des LKLF-Gens (oder regulatorischer DNA-Sequenzen) zu immunologischen Erkrankungen beim Menschen führen, z.B. im Sinne einer klonalen lymphoproliferativen Erkrankung.

Wie erwähnt, führt der Defekt des LKLF-Gens zu einem aktivierten T-Zell-Phänotyp, der u.a. durch eine erhöhte Proliferationsrate und eine erhöhte Apoptoserate gekennzeichnet ist. Lymphome weisen i.d.R. entweder eine erhöhte Proliferationsrate oder eine erniedrigte Apoptoserate auf. Insofern ist die Entwicklung eines Lymphoms durch eine Mutation des LKLF-Gens nur unter bestimmten Bedingungen denkbar. Die Entstehung von bösartigen Tumoren ist in den meisten Fällen von einer Mutation mehrerer Gene begleitet, die erst durch ihr Zusammentreffen zur malignen Entartung eines Zellklons führen (Löffler and Petrides 1998, S. 1089-1100).

Für den nächsten Verwandten des LKLF, das GKLF, konnte eine Herabregulation und Mutation im Rahmen der Tumorigenese von Karzinomen des Ösophagus, des Colons, sowie der Harnblase nachgewiesen werden und gezeigt werden, dass eine Überexpression in kultivierten Tumorzellen zu einer Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion führt (Wang, Liu et al. 2002; Ohnishi, Ohnami et al. 2003; Luo, Kong et al. 2004; Zhao, Hisamuddin et al. 2004). Interessanterweise konnte in Mammakarzinom-Zelllinien im Gegensatz zur verminderten Expression in Karzinomen des Verdauungstraktes eine erhöhte Expression von GKLF nachgewiesen werden und gezeigt werden, dass eine nukleäre Expression GKLF in Karzinomgewebe (nachgewiesen von in immunhistologischen Schnitten) mit einem besonders aggressiven Phänotyp assoziiert ist (Pandya, Talley et al. 2004).

Ob LKLF in der Entstehung von Karzinomen oder Lymphomen eine Rolle spielen könnte, wurde bisher nicht untersucht. Mögliche Kandidaten wären z.B. kutane T-Zell-Lymphome vom Typ der Mycosis fungoides. Die Zellen dieses Lymphomtypes, insbesondere der frühen Stadien, zeichnen sich durch einen aktivierten Phänotyp aus, der u.a. durch eine erhöhte Expression von CD25 und Fas-Ligand gekennzeichnet ist (Eriksen, Kaltoft et al. 2001; Ni, Hazarika et al. 2001). Sie zeigen insofern einen ähnlichen Phänotyp wie die T-Zellen der immunologische LKLF k.o.- Maus. Jedoch ist die erhöhte Proliferationsrate nicht, wie bei der k.o.-Maus, durch eine erhöhte Apoptoserate überkompensiert. Vielmehr führt die erhöhte Fas-Ligand-Expression wahrscheinlich zur Induktion der Apoptose zytotoxischer CD8⁺ T-Lymphozyten und trägt somit zum "Escape" und zur Progression des Lymphoms bei (Ni, Hazarika et al. 2001). Denkbar wäre z.B. eine initiale Entartung kutaner T-Zellen durch eine Mutation oder Deletion des LKLF-Gens, die zu einem aktivierten Phänotyp und verstärkter Proliferation führt. Aufgrund der im Gegensatz zu einem Lymphknoten andersartigen Gewebestruktur der Haut mit weniger dicht gepackten Zellen und mehr Bindegewebe kommt es daher möglicherweise zu weniger Zell-Zell-Interaktionen und somit zu weniger Fas-Fas-Ligand-Interaktionen, was wiederum die geringere Apoptoserate erklären könnte. Mutationsanalysen zur Entstehung der Mycosis fungoides sind noch lückenhaft. Jedoch wurden in einem Teil der untersuchten Fälle Mutationen oder sogar das Fehlen des Chromosoms 19 beschrieben, auf dem sich das LKLF-Gen befindet (Mao, Lillington et al. 2002).

Die Mycosis fungoises stellt im dermatologischen Bereich ein diagnostisches Problem dar, da sie sowohl klinisch als auch histopathologisch in den frühen Stadien häufig nicht von benignen Hauterkrankungen wie z.B. Ekzemen abgegrenzt werden kann. Sollte sich die pathogenetische Bedeutung des LKLF für kutane Lymphome bestätigen lassen, bestünde die Möglichkeit LKLF als diagnostischen Marker zu nutzen, z.B. durch Einsatz spezifischer Antikörper in der Immunhistologie, analog der Anwendung von Anti-GKLF-Antikörpern an histologisch aufgearbeitetem Mammakarzinomgewebe. Die Erzeugung derartiger LKLF-spezifischer Antikörper war ein weiterer Schwerpunkt meiner Arbeit.

Beim Zusammentreffen einer LKLF-Mutation mit weiteren Gen-Mutationen, die z.B. eine Hemmung der Apoptose bedingen, wäre eine maligne Entartung auch in anderen lymphatischen Geweben als der Haut denkbar, bzw. ein stadienhafter Verlauf, wie er für kutane Lymphome typisch ist, erklärbar.

Neuere Untersuchungen an Mausmodellen für Autoimmunerkrankungen, wie z.B. an der für autoimmunologischen Diabestes mellitus anfälligen NOD-Maus zeigen, dass offenbar eine gestörte Homöostase des T-Zell-Kompartiments für die Anfälligkeit der NOD-Maus für Diabetes mellitus verantwortlich ist. So weisen derartige Mäuse eine T-Zell-Lymphopenie auf. Dies führt wiederum zu einem verminderten Volumen der peripheren lymphatischen Organe, was eine kompenstorische Proliferation, die sogenannte homöostatische Proliferation zur Folge hat. Es konnte gezeigt werden, dass sich die proliferierenden Zellen zu einem hohen Anteil aus autoreaktiven Lymphozyten rekrutieren, welche für die Entstehung des Diabetes mellitus verantwortlich sind (King, Ilic et al. 2004). Eine naheliegende Schlussfolgerung ist die Hypothese, dass Zustände der Lymphopenie die Anfälligkeit gegenüber Autoimmunerkrankungen generell erhöhen könnten. In der Tat ist seit längerem bekannt, dass viral induzierte Lymphopenien das Auftreten von Autoimmunerkrankungen triggern können. Die Tatsache, dass Autoimmunerkrankungen jedoch auch ohne vorangegangenen viralen Infekt auftreten können, und dass derartige Erkrankungen familiär gehäuft auftreten zeigt, dass auch endogene prädisponierende Faktoren bestehen müssen. In Anbetracht der oben erläuterten Mechanismen, wären in diesem Zusammenhang Konstellationen interessant, welche mit dauerhafter oder passagärer Lymphopenie, oder mit einer besonderen Anfälligkeit gegenüber viral induzierten Lymphopenien einhergehen, oder aber solche, die in besonderem Maße die homöostatische Proliferatrion fördern. Da die Regulation der Lymphozytenproliferation durch ein komplexes Netzwerk realisiert wird, an welchem zahlreiche Instanzen mitwirken, ist eine Fehlregulation an vielen Stellen denkbar. So spielen bei der Regulation der Lymphozytenproliferation sowohl exogen auf die Zelle einwirkende Faktoren, wie verschiedene Zytokine, als auch intrazelluläre Prozesse wie die Signaltransduktion oder die Steuerung der Expression von mitoseregulierenden Proteinen durch Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Für den Transkriptionsfaktor LKLF wurde eine zentrale Rolle bei der Regulation der Lymphozytenproliferation und –apoptose nachgewiesen. Insofern wäre es denkbar, dass auch durch eine veränderte Aktivität oder Expression von LKLF entweder Zustände der Lymphopenie begünstigt werden könnten, oder aber eine homöostatische Proliferation zum Beispiel infolge einer viral bedingten Lymphopenie gefördert wird.

Zur Aufklärung der Rolle von LKLF in der Entstehung von autoimmunologischen oder lymphoproliferativen Erkrankungen wären vergleichende Untersuchungen von Patientenmaterial, z.B. von Patienten mit Lymphomen oder Autoimmunerkrankungen mit dem von gesunden Vergleichspersonen hinsichtlich Gensequenz und Expressionslevel von LKLF, sinnvoll. Auf molekularer Ebene wäre die Identifikation von Genen, deren Expression von LKLF gesteuert wird, sowie die weitere Aufklärung der Regulation des LKLF-Expressionslevels von großem Interesse. Ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge der T-Zell-Aktivierung sind nicht zuletzt auch für die Entwicklung immunmodulatorischer Medikamente von fundamentaler Bedeutung.

4.5 Die Methode der DNA-Immunisierung

Die Methode der DNA-Immunisierung, insbesondere die Gene-Gun-Immunisierung, ist eine v.a. zur Erzeugung von Antikörpern gegen extrazelluläre Antigene etablierte Methode. Jedoch sind zahlreiche Modifikationen der DNA-Immunisierung publiziert worden, z.T. mit wiedersprüchlichen Resultaten bzgl. ihrer Effizienz. So gibt es zum einen unterschiedliche Methoden der DNA-Applikation. In der Einleitung wurden bereits einige dieser Methoden besprochen und auf ihre Besonderheiten eingegangen. Eine starke Induktion der Antikörperproduktion wurde u.a. für die Methode der Gene-Gun-Immunisierung beschrieben, welche sich an Goldpartikel gekoppelter DNA bedient. Durch entsprechende Konstruktion der Expressionsplasmide lässt sich durch Verwendung geeigneter Signalsequenzen der Ort der Antigenexpression frei wählen. Die effizientesten Antikörperreaktionen wurden für extrazelluläre Antigene beschrieben. Allerdings gibt es wiedersprüchliche Ergebnisse, ob ein sezerniertes oder ein membrangebundenes Antigen eine effizientere Antikörperbildung auslöst (Xiang, Spitalnik et al. 1995; Boyle, Silva et al. 1997; Chow, Huang et al. 1997; Waine, Mazzer et al. 1999; Kahl 2002). Desweiteren sind unterschiedlich gestaltete Boosterserien beschrieben worden, bei denen zum einen die Anzahl der Immunisierungen, zum anderen aber auch die zeitlichen Abstände zwischen den Immunisierungen variieren (Fynan, Webster et al. 1993; Sundaram, Xiao et al. 1996; Leitner, Seguin et al. 1997; Prayaga, Ford et al. 1997; Surman, Irvine et al. 1998; Kahl 2002). Nicht zuletzt wurden auch verschiedene Strategien zur Verstärkung der Immunantwort erprobt. So besteht die Möglichkeit gemeinsam mit der Applikation der Plasmide, welche die Antigen-Sequenz enthalten, weitere Plasmide zu applizieren, die Gene bestimmter immunologisch wirksamer Botenstoffe tragen. So wurde für eine Applikation von Plasmiden welche für GM-CSF (Yeung, Anderson et al. 1997), unterschiedliche Interleukine und TNF- α (Kim, Trivedi et al. 1998), bzw. aktivierende Zellobenflächenmoleküle wie CD40, CD80 und CD86 (Kim, Trivedi et al. 1998) codieren, eine Verstärkung der Immunreaktion beschreiben.

In dieser Arbeit sollte einerseits überprüft werden, ob ein normalerweise nukleär exprimiertes Antigen, welches durch gentechnische Methoden auf der Zellmembran exprimiert wird, ebenfalls als potentes Antigen fungiert. Andererseits sollte der Verlauf der Immunreaktivität des Serums des immunisierten Tieres im Verlauf einer langen Immunisierungsserie ohne Einsatz von Adjuvantien beobachtet werden.

Ich konnte zeigen, dass die gewonnenen Antiseren mit rekombinantem LKLF-Protein im ELISA, sowie im Western-Blot, als auch in der intrazellulären Anfärbung reagieren. Sie erkennen somit sowohl natives Protein in Tertiärstruktur (ELISA, intrazelluläre Anfärbung), als auch entfaltetes Protein in Primärstruktur (Western-Blot).

Das langangelegte Immunisierungsschema wurde nach Asservation von Serum zu den unterschiedlichen Stadien der Immunisierung evaluiert, indem die einzelnen Seren im Zell-ELISA in ihrer Immunreaktivität verglichen wurden.

Es zeigte sich, dass sich die Immunreaktivität nur etwa bis zur vierten Immunisierung steigern ließ. Danach kam es trotz weiterer Immunisierungen tendenziell wieder zu einem Abfall der Immunreaktivität (siehe Abb. 35). Eine denkbare Ursache dieses Phänomens könnte eine Toleranzentwicklung gegenüber dem applizierten Antigen sein, ein Effekt, der bei Impfungen natürlich unerwünscht ist. Für folgende Immunisierungsserien mit derartigen Expressionskonstrukten erscheint daher eine rasche Folge weniger Immunisierungen sinnvoller als derartig lang angelegte Immunisierungsserien. Außerdem könnte der Einsatz von Adjuvantien sinnvoll sein, wenn sich hierdurch die Toleranzentwicklung unterbinden ließe.

Insgesamt lässt sich jedoch feststellen, dass das Anwendungsspektrum nicht durch den physiologischen Expressionsort des Antigens limitiert ist. Außerdem konnte auf diese Weise ein wertvolles Forschungsinstrument geschaffen werden, welches neben der Anwendung in der weiteren molekularen Charakterisierung des LKLF auch eine Brücke zur klinischen Forschung schlagen könnte, z.B. durch Anwendung in der Immunhistologie.

Literaturverzeichnis

Abbott, A. (2001). "And now for the proteome." Nature 409(6822): 747.

- Agadjanyan, M. G., N. N. Trivedi, et al. (1997). "An HIV type 2 DNA vaccine induces cross-reactive immune responses against HIV type 2 and SIV." <u>AIDS Res Hum</u> <u>Retroviruses</u> **13**(18): 1561-72.
- Akbari, O., N. Panjwani, et al. (1999). "DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity." J Exp Med **189**(1): 169-78.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med 188(7): 1359-68.
- Albert, M. L., B. Sauter, et al. (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." <u>Nature</u> **392**(6671): 86-9.
- An, W. G., S. G. Hwang, et al. (2000). "Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition." <u>Leukemia</u> 14(7): 1276-83.
- Anderson, K. P., C. B. Kern, et al. (1995). "Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family." <u>Mol Cell Biol</u> 15(11): 5957-65.
- Arkenbout, E. K., R. J. Dekker, et al. (2003). "Focusing on transcription factor families in atherogenesis: the function of LKLF and TR3." <u>Thromb Haemost</u> **89**(3): 522-9.
- Asano, H., X. S. Li, et al. (1999). "FKLF, a novel Kruppel-like factor that activates human embryonic and fetal beta-like globin genes." <u>Mol Cell Biol</u> **19**(5): 3571-9.
- Asano, H., X. S. Li, et al. (2000). "FKLF-2: a novel Kruppel-like transcriptional factor that activates globin and other erythroid lineage genes." <u>Blood</u> **95**(11): 3578-84.
- Aussel, C., R. Marhaba, et al. (1996). "Submicromolar La3+ concentrations block the calcium release-activated channel, and impair CD69 and CD25 expression in CD3- or thapsigargin-activated Jurkat cells." <u>Biochem J</u> **313** (**Pt 3**): 909-13.
- Bagarazzi, M. L., J. D. Boyer, et al. (1997). "Safety and immunogenicity of intramuscular and intravaginal delivery of HIV-1 DNA constructs to infant chimpanzees." J Med <u>Primatol</u> **26**(1-2): 27-33.
- Banerjee, S. S., M. W. Feinberg, et al. (2003). "The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis." J <u>Biol Chem</u> 278(4): 2581-4.
- Bialojan, C. and A. Takai (1988). "Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics." <u>Biochem J</u> **256**(1): 283-90.
- Blom, N., S. Gammeltoft, et al. (1999). NetPhos. DK-2800 Lyngby, Center for Biological Sequence Analysis at the Technical University of Denmark.
- Blom, N., S. Gammeltoft, et al. (1999). "Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites." J Mol Biol **294**(5): 1351-62.
- Borucki, H., E. Grötsch, et al. (1974). <u>Schülerduden "Die Physik"</u>. Mannheim, Bibliographisches Institut Mannheim.
- Boyle, J. S., A. Silva, et al. (1997). "DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **94**(26): 14626-31.
- Buckley, A. F., C. T. Kuo, et al. (2001). "Transcription factor LKLF is sufficient to program T cell quiescence via a c-Myc--dependent pathway." <u>Nat Immunol</u> 2(8): 698-704.
- Chen, J., R. Lansford, et al. (1993). "RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development." Proc Natl Acad Sci U S A

90(10): 4528-32.

- Chen, X., D. C. Johns, et al. (2001). "Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle." J Biol Chem **276**(32): 30423-8.
- Chow, Y. H., W. L. Huang, et al. (1997). "Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2." J Virol **71**(1): 169-78.
- Ciechanover, A. (1994). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway." <u>Cell</u> **79**(1): 13-21.
- Cline, J., J. C. Braman, et al. (1996). "PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases." <u>Nucleic Acids Res</u> **24**(18): 3546-51.
- Conkright, M. D., M. A. Wani, et al. (2001). "Lung Kruppel-like factor contains an autoinhibitory domain that regulates its transcriptional activation by binding WWP1, an E3 ubiquitin ligase." J Biol Chem **276**(31): 29299-306.
- Corr, M., D. J. Lee, et al. (1996). "Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming." J Exp Med **184**(4): 1555-60.
- Davis, H. L., M. L. Michel, et al. (1994). "Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen." <u>Vaccine</u> 12(16): 1503-9.
- Dekker, R. J., S. van Soest, et al. (2002). "Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2)." <u>Blood</u> **100**(5): 1689-98.
- Denkinger, D. J., A. M. Cushman-Vokoun, et al. (2001). "Regulation of the vav protooncogene by LKLF." <u>Gene</u> 281(1-2): 133-42.
- Di Santo, J. P. (2001). "Lung Krupple-like factor: a quintessential player in T cell quiescence." <u>Nat Immunol</u> **2**(8): 667-8.
- Diessenbacher, P., K. Bartels, et al. (2003). "T-cell survival regulator LKLF is not involved in inappropriate apoptosis of diabetes-prone BBDP rat T cells." <u>Ann N Y</u> <u>Acad Sci</u> **1010**: 548-51.
- Doe, B., M. Selby, et al. (1996). "Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> 93(16): 8578-83.
- Dong, S. and R. C. Hughes (1996). "Galectin-3 stimulates uptake of extracellular Ca2+ in human Jurkat T-cells." <u>FEBS Lett</u> **395**(2-3): 165-9.
- Drexler, H. (2001). <u>THE LEUKEMIA-LYMPHOMA CELL LINE FactsBook</u>. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Academic Press.

EMBnet, A. WWW PESTfind Analysis, EMBnet Austria.

- Eriksen, K. W., K. Kaltoft, et al. (2001). "Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells." <u>Leukemia</u> **15**(5): 787-93.
- Feltquate, D. M., S. Heaney, et al. (1997). "Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization." J Immunol **158**(5): 2278-84.
- Fenteany, G., R. F. Standaert, et al. (1995). "Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin." <u>Science</u> 268(5211): 726-31.
- Freitas, A. A. and B. Rocha (1997). "Lymphocyte survival: a red queen hypothesis." <u>Science</u> 277(5334): 1950.
- Fu, T. M., J. B. Ulmer, et al. (1997). "Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes." <u>Mol Med</u> 3(6): 362-71.

- Fynan, E. F., R. G. Webster, et al. (1993). "DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 90(24): 11478-82.
- Glotzer, M., A. W. Murray, et al. (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." <u>Nature</u> **349**(6305): 132-8.
- Gordon, J. A. (1991). "Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor." <u>Methods Enzymol</u> 201: 477-82.
- Gray, S., M. W. Feinberg, et al. (2002). "The Kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4." J Biol Chem 277(37): 34322-8.
- Grayson, J. M., K. Murali-Krishna, et al. (2001). "Gene expression in antigen-specific CD8+ T cells during viral infection." J Immunol 166(2): 795-9.
- Groettrup, M., A. Soza, et al. (1996). "Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency." <u>Immunol Today</u> **17**(9): 429-35.
- Gurunathan, S., D. M. Klinman, et al. (2000). "DNA vaccines: immunology, application, and optimization*." <u>Annu Rev Immunol</u> **18**: 927-74.
- Halpern, M. D., R. J. Kurlander, et al. (1996). "Bacterial DNA induces murine interferongamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factoralpha." <u>Cell Immunol</u> **167**(1): 72-8.
- Han, R., C. A. Reed, et al. (2000). "Immunization of rabbits with cottontail rabbit papillomavirus E1 and E2 genes: protective immunity induced by gene gunmediated intracutaneous delivery but not by intramuscular injection." <u>Vaccine</u> 18(26): 2937-44.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." <u>Annu Rev Biochem</u> 67: 425-79.
- Ito, K., N. Shinohara, et al. (2003). "DNA immunization via intramuscular and intradermal routes using a gene gun provides different magnitudes and durations on immune response." <u>Mol Immunol</u> **39**(14): 847-54.
- Iwasaki, A., C. A. Torres, et al. (1997). "The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites." J <u>Immunol</u> 159(1): 11-4.
- Janeway, C. A., P. Travers, et al. (1999). <u>IMMUNOBIOLOGY The Immun System in</u> <u>Health and Disease</u>. London
- New York, Current Biology Publications, part of Elsevier Science London Middlesex House, 34-42 Cleveland Street, London W1P 6LB, UK and
- Garland Publishing, a member of Taylor & Francis Group, 19 Union Square West, New York, NY 10003, US.
- Jasny, B. R. and D. Kennedy (2001). "The Human Genome." Science 291(5507): 1153-.
- Jentsch, S. and S. Schlenker (1995). "Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome." <u>Cell</u> **82**(6): 881-4.
- Kahl, S. (2002). Charakterisierung der mono-ADP-Ribosyltransferasen mART2.2 und hART4 mithilfe von durch Gene-Gun Immunisierungen generierten Antiseren und monoklonalen Antikörpern. <u>Institut für Immunologie</u>. Hamburg, Universität Hamburg: 159.
- Kim, J. J., N. N. Trivedi, et al. (1998). "Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens." <u>Eur J Immunol</u> 28(3): 1089-103.
- King, C., A. Ilic, et al. (2004). "Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity." <u>Cell</u> **117**(2): 265-77.
- Klinman, D. M., A. K. Yi, et al. (1996). "CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 93(7): 2879-83.

- Koch-Nolte, F., T. Duffy, et al. (1999). "A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation." J <u>Immunol</u> 163(11): 6014-22.
- Kozyrev, S. V., L. L. Hansen, et al. (1999). "Structure of the human CpG-island-containing lung Kruppel-like factor (LKLF) gene and its location in chromosome 19p13.11-13 locus." <u>FEBS Lett</u> 448(1): 149-52.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." <u>Nature</u> 374(6522): 546-9.
- Ku, N. O. and M. B. Omary (2000). "Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion." J Cell Biol **149**(3): 547-52.
- Kuo, C. T., M. L. Veselits, et al. (1997). "The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis." <u>Genes Dev</u> 11(22): 2996-3006.
- Kuo, C. T., M. L. Veselits, et al. (1997). "LKLF: A transcriptional regulator of singlepositive T cell quiescence and survival." <u>Science</u> 277(5334): 1986-90.
- Leitner, W. W., M. C. Seguin, et al. (1997). "Immune responses induced by intramuscular or gene gun injection of protective deoxyribonucleic acid vaccines that express the circumsporozoite protein from Plasmodium berghei malaria parasites." <u>J Immunol</u> 159(12): 6112-9.
- Löffler, G. and P. Petrides (1998). Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Springer.
- Luo, A., J. Kong, et al. (2004). "Discovery of Ca2+-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray." <u>Oncogene</u> 23(6): 1291-9.
- Maki, C. G., J. M. Huibregtse, et al. (1996). "In vivo ubiquitination and proteasomemediated degradation of p53(1)." <u>Cancer Res</u> 56(11): 2649-54.
- Mao, X., D. Lillington, et al. (2002). "Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphomas: identification of common genetic alterations in Sezary syndrome and mycosis fungoides." <u>Br J Dermatol</u> 147(3): 464-75.
- Monajemi, H., E. K. Arkenbout, et al. (2001). "Gene expression in atherogenesis." <u>Thromb</u> <u>Haemost</u> **86**(1): 404-12.
- Morgan, M. J. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." <u>Nature</u> **409**(6822): 860-921.
- Musti, A. M., M. Treier, et al. (1997). "Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases." <u>Science</u> **275**(5298): 400-2.
- Nagata, S. (1994). "Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas ligand and Fas." <u>Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci</u> **345**(1313): 281-7.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell 88(3): 355-65.
- Ni, X., P. Hazarika, et al. (2001). "Fas ligand expression by neoplastic T lymphocytes mediates elimination of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in mycosis fungoides: a potential mechanism of tumor immune escape?" <u>Clin Cancer Res</u> **7**(9): 2682-92.
- Ohnishi, S., S. Ohnami, et al. (2003). "Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Kruppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **308**(2): 251-6.
- Pagano, M., S. W. Tam, et al. (1995). "Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27." <u>Science</u> 269(5224): 682-5.
- Palombella, V. J., O. J. Rando, et al. (1994). "The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B." <u>Cell</u> 78(5): 773-85.
- Pandya, A. Y., L. I. Talley, et al. (2004). "Nuclear localization of KLF4 is associated with

an aggressive phenotype in early-stage breast cancer." <u>Clin Cancer Res</u> **10**(8): 2709-19.

- Pfleger, C. M. and M. W. Kirschner (2000). "The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1." <u>Genes Dev</u> 14(6): 655-65.
- Philipsen, S. and G. Suske (1999). "A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors." <u>Nucleic Acids Res</u> **27**(15): 2991-3000.
- Prayaga, S. K., M. J. Ford, et al. (1997). "Manipulation of HIV-1 gp120-specific immune responses elicited via gene gun-based DNA immunization." <u>Vaccine</u> 15(12-13): 1349-52.
- Pschyrembel, W. (1993). <u>Pschyrembel Medizinisches Wörterbuch</u>. Berlin, Walter de Gruyter.
- Razin, A. and J. Friedman (1981). "DNA methylation and its possible biological roles." <u>Prog Nucleic Acid Res Mol Biol</u> **25**: 33-52.
- Rechsteiner, M. and S. W. Rogers (1996). "PEST sequences and regulation by proteolysis." <u>Trends Biochem Sci</u> 21(7): 267-71.
- Rechsteiner, M. a. R., SW and Grabner, M PESTfind.
- Renard, P., Y. Percherancier, et al. (2000). "Inducible NF-kappaB activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear IkappaBalpha." J Biol Chem 275(20): 15193-9.
- Robinson, H. L., L. A. Hunt, et al. (1993). "Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA." <u>Vaccine</u> **11**(9): 957-60.
- Rock, K. L., C. Gramm, et al. (1994). "Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules." <u>Cell</u> 78(5): 761-71.
- Rogers, S., R. Wells, et al. (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." <u>Science</u> **234**(4774): 364-8.
- Ruff-Jamison, S. and J. R. Glenney, Jr. (1993). "Molecular modeling and site-directed mutagenesis of an anti-phosphotyrosine antibody predicts the combining site and allows the detection of higher affinity interactions." <u>Protein Eng</u> **6**(6): 661-8.
- Sakai, T., H. Hisaeda, et al. (2003). "Gene gun-based co-immunization of merozoite surface protein-1 cDNA with IL-12 expression plasmid confers protection against lethal Plasmodium yoelii in A/J mice." <u>Vaccine</u> **21**(13-14): 1432-44.
- Sato, Y., M. Roman, et al. (1996). "Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization." <u>Science</u> **273**(5273): 352-4.
- Schober, S. L., C. T. Kuo, et al. (1999). "Expression of the transcription factor lung Kruppel-like factor is regulated by cytokines and correlates with survival of memory T cells in vitro and in vivo." J Immunol 163(7): 3662-7.
- Shields, J. M., R. J. Christy, et al. (1996). "Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest." J Biol Chem 271(33): 20009-17.
- Shields, J. M. and V. W. Yang (1997). "Two potent nuclear localization signals in the gutenriched Kruppel-like factor define a subfamily of closely related Kruppel proteins." <u>J Biol Chem</u> 272(29): 18504-7.
- Stacey, K. J., M. J. Sweet, et al. (1996). "Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA." J Immunol 157(5): 2116-22.
- Sundaram, P., W. Xiao, et al. (1996). "Particle-mediated delivery of recombinant expression vectors to rabbit skin induces high-titered polyclonal antisera (and circumvents purification of a protein immunogen)." <u>Nucleic Acids Res</u> 24(7): 1375-7.
- Surman, D. R., K. R. Irvine, et al. (1998). "Generation of polyclonal rabbit antisera to

mouse melanoma associated antigens using gene gun immunization." <u>J Immunol</u> <u>Methods</u> **214**(1-2): 51-62.

- Tang, D. C., M. DeVit, et al. (1992). "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response." <u>Nature</u> 356(6365): 152-4.
- Tearina Chu, T. H., G. R. Halverson, et al. (2001). "A DNA-based immunization protocol to produce monoclonal antibodies to blood group antigens." <u>Br J Haematol</u> **113**(1): 32-6.
- Ullrich, O., T. Reinheckel, et al. (1999). "Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6223-8.
- Ulmer, J. B., R. R. Deck, et al. (1996). "Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells." Immunology **89**(1): 59-67.
- Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, et al. (1993). "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein." <u>Science</u> **259**(5102): 1745-9.
- Waine, G. J., D. R. Mazzer, et al. (1999). "DNA immunization by intramuscular injection or gene gun induces specific IgG antibodies against a Schistosoma japonicum 22 kDa antigen, Sj22, when fused to the murine Ig K-chain secretory leader sequence." Parasite Immunol 21(1): 53-6.
- Wallach, D., A. V. Kovalenko, et al. (1998). "Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict." <u>Curr Opin Immunol</u> 10(3): 279-88.
- Wang, B., K. E. Ugen, et al. (1993). "Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(9): 4156-60.
- Wang, N., Z. H. Liu, et al. (2002). "Down-regulation of gut-enriched Kruppel-like factor expression in esophageal cancer." <u>World J Gastroenterol</u> 8(6): 966-70.
- Wang, X., H. Luo, et al. (1998). "Role of proteasomes in T cell activation and proliferation." <u>J Immunol</u> 160(2): 788-801.
- Wang, X., S. Omura, et al. (1997). "Rapamycin inhibits proteasome activator expression and proteasome activity." <u>Eur J Immunol</u> 27(11): 2781-6.
- Wani, M. A., M. D. Conkright, et al. (1999). "cDNA isolation, genomic structure, regulation, and chromosomal localization of human lung Kruppel-like factor." <u>Genomics</u> 60(1): 78-86.
- Wani, M. A., R. T. Means, Jr., et al. (1998). "Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice." <u>Transgenic Res</u> 7(4): 229-38.
- Wolff, J. A. (1997). "Naked DNA transport and expression in mammalian cells." <u>Neuromuscul Disord</u> **7**(5): 314-8.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." <u>Science</u> 247(4949 Pt 1): 1465-8.
- Xiang, Z. Q., S. L. Spitalnik, et al. (1995). "Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus." <u>Virology</u> **209**(2): 569-79.
- Yeh, E. T., L. Gong, et al. (2000). "Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles." <u>Gene 248(1-2): 1-14.</u>
- Yeung, S. C., J. Anderson, et al. (1997). "Production of rabbit polyclonal antibody against apobec-1 by genetic immunization." J Lipid Res **38**(12): 2627-32.
- Zhao, W., I. M. Hisamuddin, et al. (2004). "Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer." <u>Oncogene</u> **23**(2): 395-402.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag für die Überlassung eines spannenden Themas und die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit der experimentellen Arbeiten sowie der Aufarbeitung der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte Danke ich für seine Hilfsbereitschaft und seine konstruktiven Anregungen im Rahmen dieser Arbeit.

Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, insbesondere Katrin Bartels und Vivienne Welge für die Einarbeitung in viele der angewandten Techniken.

Herrn Wolfgang Köstner danke ich sowohl für die kollegiale und freundschaftliche Unterstützung bei der Laborarbeit sowie für seine Bereitschaft sich in alle ihm angetragenen Fragestellungen einzudenken und mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Lebenslauf

Name:	Dießenbacher
Vorname:	Philip Sebastian
Adresse:	Heidestr. 33, 39112 Magdeburg
Geburtsdatum:	2. Juli 1976
Geburtsort:	Tübingen
Familienstand:	ledig

Ausbildung:

08/1983-07/1987	Grundschule am Baumschulenweg, Bremen
08/1987-07/1996	Kippenberggymnasium, Bremen
08/1996-09/1997	Zivildienst am Zentralkrankenhaus StJürgen-Straße, Bremen
10/1997-10/2004	Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der
	Universität Hamburg
	Dissertation: seit 02/2000 unter Leitung von Prof. Dr. Friedrich
	Dissertation: seit 02/2000 unter Leitung von Prof. Dr. Friedrich Haag am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums
	Dissertation: seit 02/2000 unter Leitung von Prof. Dr. Friedrich Haag am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Seit 02/2005	Dissertation: seit 02/2000 unter Leitung von Prof. Dr. Friedrich Haag am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Assistenzarzt an der Universitätsklinik für Dermatologie und
Seit 02/2005	Dissertation: seit 02/2000 unter Leitung von Prof. Dr. Friedrich Haag am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Assistenzarzt an der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

1
0
·
5
m.
8
~
σ
g
7
×
2
\circ
Гщ
Ы
1
н

+	Met Ala Leu Ser Glu Pro Ile Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Ala Ser Pro Cys Arg Glu Arg Gly Leu Gln Glu Arg Trp Pro Arg Ala Glu Pro Glu Ser
Ч	ATGGCGCTGA GTGAACCCAT CCTGCCGTCC TTCTCCACTT TCGCCAGCCC GTGCCGCGAG CGCGGCCTGC AGGAGCGCTG GCCGCGCC GAACCCGAGT
	TACCGCGACT CACTTGGGTA GGACGGCAGG AAGAGGTGAA AGCGGTCGGG CACGGCGCTC GCGCGGGACG TCCTCGCGAC CGGCGCGCGG CTTGGGCTCA
+	Sei Gly Gly Thr Asp Asp Asp Leu Asn Ser Val Leu Asp Phe Ile Leu Ser Met Gly Leu Asp Gly Leu Gly Ala Glu Ala Ala Pro Glu Pro Pro Pro Pro-
101	CCGGCGGCAC CEACGACGAC CTCAACAGCG TGCTGGACTT CATCCTGTCC ATGGGGCTGG ATGGCCTGGG CGCCGAGGCC GCCCGGAGC CGCCGCCGCC
	GECCECCETE GETECTECTE AGETTETCEC ACGACCTGAA GTAGGACAGE TACCCCGACC TACCGGACCC GEGECTECGE CGGGGCCTEG GEGEGGGGGGG
+	to Pro Pro Pro Pro Ala Phe Tyr Tyr Pro Glu Pro Gly Ala Pro Pro Pro Tyr Ser Ala Pro Ala Gly Gly Leu Val Ser Glu Leu Arg Pro Glu Leu
201	GCCCCCGCCG CCTGCGTTCT ATTACCCCCGA ACCCGGCGCG CCCCGGCCCC CGCGGGGGGGG
	CGGGGGGGGGG GGACGCAAGA TAATGGGGGT TGGGCCGGGG TGTCGCGGGG GCGCCACCG GACCACAGAC TCGACGACG TGGGCTCGAC
+	Asp Ala Pro Leu Gly Pro Ala Leu His Gly Arg Phe Leu Leu Ala Pro Pro Gly Arg Leu Val Lys Ala Glu Pro Pro Glu Ala Asp Gly Gly Gly Tyr
301	GATECECCEC TEGEGECCECE ACTECACEGE CECTITETEC TEGEGECECEC CEGECECECE GICAAGECCE AGECECTEA AGEGEACEGE GECEGECECT
	CTACGCGGGCG ACCCCGGGCG TGACGTGCCG GCGGGGGGGGGG
+	Tyr Gly Cys Ala Pro Gly Leu Thr Arg Gly Pro Arg Gly Leu Lys Arg Glu Gly Ala Pro Gly Pro Ala Ala Ser Cys Met Arg Gly Pro Gly Gly Arg Pro-
401	ACGECTECEC CCCCGGGCTG ACCCGTGGAC CGCGGGCCT CAAGCGGCGAG GGCGCCCGGG GCCCGGGGGG TTCGTGCATG CGAGGTCCCG GGGGCCGCCC
	TECCEACECE GEGECCCEAC TEGECACCTE ECECECEGA GTTCECECTC CCECEGEGECC CEGECCECCE AAGCACGTAC GCTCCAGGEC CCCCEGEGEG
+	to Pro Pro Pro Pro Asp Thr Pro Pro Leu Ser Pro Asp Gly Pro Ala Arg Leu Pro Ala Pro Gly Pro Arg Ala Ser Phe Pro Pro Pro Phe Gly Gly Pro
501	ссовосее соседолого сессестоде сосседсеес сосесесо десосесес сестосесес сопостто сессостт сестессот
	GGGCGGCGGC GGGCTGTGTG GCGCCGAGTC GGGGCTGCCG GGGGGGGGGG
+	Gly Phe Gly Ala Pro Gly Pro Gly Leu His Tyr Ala Pro Pro Ala Pro Pro Ala Phe Gly Leu Phe Asp Asp Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Leu
601	сетттосесе сессоесесе сесстесат тасесесее стесессее ассеттосят стеттосасе ассессее сессесеет есстесесе
	CCAAAGCCGC GCGGGGCCCGG GCCGGACGTA ATGCGCGGGGG GACGCGGGGG TCGGAAGCCA GAGAAGCTGC TGCGCCGGCG GCGGCGCGT CGGGACCCGG
+	Let Ala Pro Pro Ala Ala Arg Gly Leu Leu Thr Pro Pro Ala Ser Pro Leu Glu Leu Leu Glu Ala Lys Pro Lys Arg Gly Arg Arg Ser Trp Pro Arg Lys
701	TGGCGCCCCCC CGCCGCCCCC GETCTCCTCA CGCCGCTGC GAGCTGCTGG AGGCCAAGCC AAAGCGCGGGC CGCCGCTTT GGCCCCGCAA
	ACCECEGEGE ECEGEGEGE CCAEAGEAGT ECEGEGEACE CAEGEGEGEAC CTCEACEACC TCCEGETTCEG TTTCECECCE ECEGEGEAAA CCEGEGEGETT
+	ys Arg Thr Ala Thr His Thr Cys Ser Tyr Ala Gly Cys Gly Lys Thr Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His Thr Gly Glu Lys
801	ACGCACCGCC ACTCACACCT GCAGCTACGC GGGCTGCGGC AAGACCTACA CCAAGAGTTC GCATCTGAAG GCGCATCTGC GCACGACAC AGGTGAAGG
	TGCGTGGCGG TGAGTGTGGGA CGTCGATGCG CCCGACGCCG TTCTGGATGT GGTTCTCAAG CGTAGACTTC CGCGTAGACG CGTGCGTGTG TCCACTCTTC
+	Pro Tyr His Cys Asn Trp Asp Gly Cys Gly Trp Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly His Arg Pro Phe Gln Cys
901	CCCTACCACT GCAACTGGGA CGGCTGCGGC TGGAGGTTTG CGCGCTCAGA CGAGCTCACG CGCCACTACC GAAAGCACAC GGGCCACCGG CCATTCCAGT
	GGGATGGTGA CGTTGACCCT GCCGACGCCG ACCTTCAAAC GCGCGAGTCT GCTCGAGTGC GCGGTGATGG CTTTCGTGTG CCCGGTGGCC GGTAAGGTCA
+	Cys His Leu Cys Asp Arg Ala Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Met
1001	GCCATCTGTG CGATCGTGCC TTCTCGCGCT CCGATCACCT GGCGCTGCAC ATGAAACGGC ACATGTAG
	CGGTAGACAC GCTAGCACGG AAGAGCGCGG GGCTAGTGGA CCGCGACGTG TACTTTGCCG TGTACATC

Die Abbildung zeigt die cDNA- sowie die Aminosäuresequenz des humanen LKLF. Die im Methodenteil beschriebene Abweichung der Basensequenz zur publizierten LKLF-Sequenz ist in rot hervorgehoben.

Anhang