

**Aus dem
Institut für Immunologie
Universitätsklinik
Hamburg Eppendorf
kommissarischer Direktor: Prof. Dr. F. Nolte**

**Expression rekombinanter Formen des
Ratten-T Zell Differenzierungsmarkers RT6
in eukaryontischen und prokaryontischen
Systemen und Analyse seiner
ADP- Ribosyltransferase- Aktivität**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

**Stefan Karsten
aus Braunschweig**

Hamburg, 1999

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1.	Der T-Zell Differenzierungsmarker RT6	5
1.2.	Der Polymorphismus des Alloantigens RT6	7
1.3.	RT6 und Autoimmunprozesse	8
1.4.	Das RT6 Gen	9
1.5.	Die T-Zellspezifische mono-ADP-Ribosyltransferase RT6	10
1.6.	RT6 Homologe anderer Spezies	13
1.7.	Ziel	14
2.	Material und Methoden	15
2.1.	Materialien	15
2.1.1.	Lösungen und Reagenzien	15
2.1.2.	Geräte	21
2.2.	Methoden	22
2.2.1.	DNA-Klonierung	22
2.2.1.1.	DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen	22
2.2.1.2.	Agarosegelelektrophorese des Restriktionsenzymverdau und Aufreinigung der DNA-Fragmente	23
2.2.1.3.	Dephosphorylierung des 5' Ende des Vektors	23
2.2.1.4.	Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.2.1.5.	Bakterientransformation	24
2.2.2.	PCR	24
2.2.3.	RT-PCR	24
2.2.4.	Sequenzierung	25
2.2.5.	Rekombinante Expression in COS7-Zellen	25
2.2.5.1.	Kultivierung	25
2.2.5.2.	Transfektion	25
2.2.5.2.1.	Transfektion per Liposomen	25
2.2.5.2.2.	Transfektion per Elektroporation	26
2.2.5.3.	Ernte	26
2.2.6.	Rekombinante Expression in E. coli	26
2.2.6.1.	Transformation und Kultivierung	26
2.2.6.2.	Herstellung des Periplasmalysats	26
2.2.7.	Fusionsproteinnachweis	27
2.2.7.1.	Slot Blot	27

2.2.7.2.	SDS-PAGE	27
2.2.7.3.	Western Blot	28
2.2.7.4.	Silberfärbung	28
2.2.7.5.	Immunodetektion	28
2.2.7.6.	ECL-Detektion	29
2.2.8.	Quantifizierung der prokaryontischen Expression	29
2.2.9.	Aufreinigung der COS7-Zellkulturüberstände	29
2.2.9.1.	Protein-G Sepharose	29
2.2.9.2.	Chromatographie mit Protein-G Sepharosesäulen	30
2.2.10.	Aufreinigung der Periplasmalysate	30
2.2.11.	Analyse der enzymatischen Aktivität	30
2.2.11.1.	Radioaktive Markierung	30
2.2.11.2.	Dünnschichtchromatographie	31
2.2.11.3.	Autoradiographie	31
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Expression rekombinanter RT6 Formen in eukaryontischen COS7-Zellen und Funktionsuntersuchung	32
3.1.1.	Konstruktion einer RT6-Fc Chimäre	32
3.1.2.	Expression der Fusionsproteine	36
3.1.3.	Nachweis der Fusionsproteine	36
3.1.4.	Sequenzierung der RT6-Fc Expressionsplasmide	39
3.1.5.	Korrektur der RT6-Fc Sequenzen	39
3.1.6.	Konstruktion der Fusionsproteine Fas-Ligand-Fc, B7-Fc, CD28-Fc	41
3.1.7.	Sequenzierung der Fusionsproteine Fas-Ligand-Fc, B7-Fc, CD28-Fc	44
3.1.8.	Korrektur des Fas-Ligand-Fc Konstrukts	44
3.1.9.	Expression der korrekten Fusionsproteine	44
3.1.10.	Nachweis der korrekten Fusionsproteine	44
3.1.11.	Aufreinigung der Fusionsproteine	50
3.1.12.	Funktionsuntersuchung der Fusionsproteine	58
3.2.	Expression rekombinanter RT6 Formen in prokaryontischen Systemen und Funktionsuntersuchung	62
3.2.1.	Konstruktion der prokaryontischen Expressionsplasmide	62
3.2.2.	Korrektur der RT6 Sequenzen	63

3.2.3.	Expression der RT6-Streptag Proteine	63
3.2.4.	Nachweis der RT6-Streptag Proteine	64
3.2.5.	Quantifizierung der Expression	72
3.2.6.	Aufreinigung der Periplasmalysate	73
3.2.7.	Funktionsuntersuchungen	74
4.	Diskussion	88
5.	Zusammenfassung	96
6.	Literaturverzeichnis	98
7.	Danksagung	104
8.	Lebenslauf	105
9.	Erklärung	106

1. Einleitung

1.1. Der T-Zell Differenzierungsmarker RT6

Zur Wahrung seiner Individualität und zur biologischen Arterhaltung ist es für den Organismus nötig, über ein Abwehrsystem zu verfügen, das die zahllosen Mikroorganismen, die in ihn eindringen, bekämpft.

Dazu stehen unspezifische Abwehrmechanismen wie z.B. Epithelschranken, Lysozym, Komplementsystem und spezifische Abwehrmechanismen zur Verfügung.

Das spezifische Abwehrsystem (=Immunsystem) ist in der Lage, zwischen selbst und fremd zu unterscheiden. Hierbei spielen vor allem zwei Arten von Lymphozyten die Hauptrolle: B-Lymphozyten als Produzent von spezifischen Antikörpern und T-Lymphozyten als Träger der zellulären Immunantwort und zentraler regulativer Funktionen zur Koordination der humoralen, zellulären und unspezifischen Immunantwort über Zytokine [1].

Gut untersucht wurde die Entwicklung der T-Zellen am Beispiel der Ratte.

Die Bildung und Reifung von T-Zellen findet in mehreren Schritten und in mehreren Organen statt. Während dieses Differenzierungsprozesses ändern sich die Oberflächenantigene der T-Zellen, so daß die T-Zellentwicklung anhand dieser veränderten Expression der Oberflächenantigene verfolgt werden kann. Manche Oberflächenantigene werden demzufolge auch T-Zell Differenzierungsmarker genannt.

Die Entwicklung der T-Zellen nimmt im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen ihren Anfang. Vorläuferzellen wandern von dort in den Thymus ein. Hier findet die Rekombination der Genabschnitte für den T-Zellantigenrezeptor (TCR) statt. Er liegt CD3-assoziiert in zwei Formen vor: als α/β Kette oder als γ/δ Kette. Die γ/δ Ketten tragenden T-Zellen bilden nach der Emigration aus dem Thymus vornehmlich die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) des Darms und der Haut. Die α/β Ketten tragenden T-Zellen hingegen bilden die Mehrzahl der zirkulierenden T-Zellen der Peripherie [2].

Nach positiver Selektion an Thymusepithelzellen und negativer Selektion an antigenpräsentierenden Zellen (APC) werden T-Zellen mit sinnloser Rezeptorkonstellation oder überschießender Reaktion mit dem präsentierten Antigen eliminiert. Gleichzeitig wird die Bestückung mit den Korezeptoren CD4 oder CD8 festgelegt [2].

Die so ausgestattete T-Zelle verläßt den Thymus und wandert in peripheres lymphatisches Gewebe. Dabei wird die Einwanderung in Lymphknoten durch die Expression von L-Selektin ermöglicht.

In der Ratte ist damit die Entwicklung jedoch noch nicht abgeschlossen. Die aus dem Thymus auswandernden T-Zellen exprimieren wie schon im Thymus das Thy-1 Antigen, das aber mit zunehmender Dauer in der Peripherie abgeschaltet wird. Es wird durch die Antigene RT6 und CD45RC abgelöst, die vorher nicht nachweisbar sind [3,4].

Wird die T-Zelle durch Begegnung mit ihrem Antigen aktiviert, verliert sie L-Selektin, und die hochmolekulare Isoform CD45RC wird zugunsten einer niedermolekularen, welche eine leichtere weitere Aktivierung ermöglicht, abgeschaltet [5,6]. Es findet eine Proliferation statt und gleichzeitig differenzieren CD8 positive T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen, während sich CD4 positive T-Zellen je nach Umgebung zu entzündungsfördernden Th1-Zellen oder zu B-Zellen stimulierenden Th2-Zellen entwickeln.

Im Zuge der Aktivierung wird auch die RT6 Expression zunehmend schwächer [7-10].

Die Expression dieses T-Zell Oberflächenantigens ist damit auf ein bestimmtes Differenzierungsstadium beschränkt: intrathymische T-Zellen sind RT6 negativ und Thy-1 positiv. Auf reifen, ruhenden T-Zellen in peripheren Lymphknoten hingegen findet sich kein Thy-1, sondern stattdessen RT6. RT6 läßt sich nur auf T-Zellen nachweisen [3].

Genauere Untersuchungen zeigen, daß der Wechsel in der Oberflächenantigenstruktur von Thy-1 zu RT6 in der Peripherie erfolgt. So sind periphere Lymphknotenzellen der Ratte direkt nach der Geburt RT6 negativ und Thy-1 positiv. Dieses Verhältnis ändert sich in den ersten Wochen kontinuierlich zugunsten des RT6. Auch frische, aus dem Thymus emigrierte T-Zellen adulter Ratten erlangen das RT6 erst peripher [11]. Hierbei entwickeln die T-Zellen das RT6 entweder über eine Thy-1/RT6 doppelpositive oder direkt über eine von vornherein Thy-1 negative Population [12].

Nicht nur periphere T-Zellen tragen das RT6 Antigen. Es findet sich in ca. 10-fach höherem Umfang auf intraepithelialen Lymphozyten (IEL) des Darms [13,14], wobei neben T-Zellen mit α/β TCR und γ/δ TCR auch eine CD3 negative, RT6 positive Population nachweisbar ist. Diese Population wird, wegen deren Aktivität des TCR Rekombinase aktivierenden Gens, als Vorläufer einer Thymus unabhängigen T-Zellreihe betrachtet [15]. Auch junge, athymische Ratten weisen IEL auf, die in hohem Maße RT6 exprimieren [persönliche Mitteilung von J.Fangmann].

1.2. Der Polymorphismus des Alloantigens RT6

Der T-Zell Differenzierungsmarker RT6 stellt ein erstaunlich polymorphes Alloantigen-system dar. So existiert bei der Ratte ein RT6 Gen, welches neben den Genen für Hämoglobin und Tyrosinase der „linkage group“ auf Chromosom 1 zugehört [16], mit den zwei

allelen Varianten RT6a und RT6b, die für Proteine von 25kD-34kD kodieren [17,18,19,21].

Der Polymorphismus der RT6 Alloantigene ist kein rattenspezifisches Phänomen.

Auch in der Maus zeigt sich ein deutlicher Polymorphismus. Dort existieren jedoch zwei eng gekoppelte Gene Rt6-1 und Rt6-2 auf Chromosom 7, wie bei der Ratte in Nachbarschaft zum Hämoglobin- und Tyrosinase Gen [28].

Die RT6 Genprodukte der Ratte, RT6.1 und RT6.2, werden posttranslational modifiziert. Durch Abspaltung der N-terminalen Leadersequenz wird der Transport in das endoplasmatische Retikulum vermittelt. Die C-terminale, hydrophobe Signalsequenz wird ebenfalls abgespalten, um damit die Membranverankerung durch kovalente Bindung an Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI) zu ermöglichen [19,20]. Diese Bindung kann durch das Enzym phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C (PI-PLC) gespalten werden.

Während das RT6.1 entweder in nicht glykosylierter Form vorkommt oder über eine Glykosylierungsstelle in Position 40 der Aminosäuresequenz glykosyliert wird [21-23], findet beim RT6.2 keine Glykosylierung statt [19,17].

Wie in Abschnitt 1.5. ausführlich dargestellt, verfügen die RT6 Antigene über eine Enzymaktivität. Auch in dieser Funktion als T-Zell Oberflächenenzyme unterscheiden sich die beiden RT6 Proteine voneinander. So weist RT6.1 zwar eine NAD-Glykohydrolaseaktivität auf, eine ADPR-Transferaseaktivität ist aber nicht nachweisbar. RT6.2 hingegen zeigt beide Aktivitäten [24].

Die erwähnten Unterschiede zeigen und erklären sich aufgrund der Sequenzunterschiede im RT6 Alloantigensystem. Die Nukleotidsequenzen der RT6a und RT6b cDNA differieren in 17 Positionen. Dies führt zu 12 Unterschieden in der Aminosäuresequenz (=ca.5%). Die Aminosäureaustausche sind mehrheitlich nicht konservativ, d.h. sie bewirken eine Veränderung der chemischen Eigenschaften der jeweiligen Aminosäure. Nur einer der 12 Aminosäureaustausche ist konservativ [17,22,25].

Auch die Expression der Proteine RT6.1 und RT6.2 weist Unterschiede auf.

Insgesamt finden sich bei peripheren T-Zellen in 60% [26] bis 90% [3] RT6 positive Zellen. In Lewis Ratten, die nur das RT6a Allel besitzen, zeigt sich eine niedrigere RT6.1 Expression verglichen mit der RT6.2 Expression kongener RT6b tragender Lewis.6B Tiere gleichen Alters. Der Unterschied manifestiert sich in einer RT6/CD4 doppelpositiven T-Zellpopulation der Lewis.6B Ratte, die in der Lewis Ratte nicht vorkommt [27].

Die Untersuchung der F1-Tiere aus der Kreuzung der beiden Stämme zeigt neben RT6.1/RT6.2 doppelpositiven T-Zellen die Existenz einer RT6.2 positiven RT6.1 negativen Population. Diese Population ist zudem CD4 positiv und CD45RC negativ [27].

Der Expressionsunterschied ist prätranslational im Bereich des RT6 Gens selber (cis) begründet [27].

1.3. RT6 und Autoimmunprozesse

T-Zellen spielen aufgrund ihrer vielfältigen regulatorischen Funktionen bei der Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Autoimmunphänomenen.

Bei Versagen der Mechanismen der positiven und negativen Selektion in der T-Zellentwicklung entstehen potentiell autoreaktive T-Zellklone, die zu einer pathologischen Immunantwort führen können. Organspezifische Antigene, die nicht im Thymus präsentiert werden, stehen nicht für die negative Selektion zur Verfügung. Würden diese Antigene zusammen mit MHC-Molekülen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) präsentiert, käme es zur Proliferation und Differenzierung der T-Zelle und damit zur Immunantwort und Zerstörung körpereigener Zellen. Fehlen dagegen die kostimulierenden Signale der APC, kommt es zur Anergie d.h. zur Immunselbsttoleranz. Diese Anergisierung stellt somit eine Toleranzerzeugung für das betroffene organspezifische Antigen dar. Daneben gibt es Hinweise, daß zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz bestimmte T-Zellen regulatorisch auf eine autoaggressive Immunantwort einwirken und diese dadurch begrenzen [29].

In verschiedenen Modellen für Autoimmunerkrankungen wird die Existenz solcher regulatorischer T-Zellen bestätigt. Im BB-Rattenmodell für den insulinpflichtigen Diabetes mellitus (IDDM) trägt diese T-Zellpopulation den Differenzierungsmarker RT6 auf der Oberfläche [30,31]. In diesem Modell erkranken BB-DP (diabetes prone) Ratten zu 80%-100% zwischen dem 60. und 120. Lebensjahr an Diabetes mellitus, dessen klinisches Erscheinungsbild in vielen Eigenschaften dem juvenilen Diabetes mellitus Typ I des Menschen ähnlich ist [32].

BB Ratten weisen eine ausgeprägte T-Zell Lymphopenie auf, die durch das Fehlen der RT6 Positiven Zellpopulation charakterisiert werden kann [4,33,34,14]. Der zugrunde liegende Defekt ist hierbei nicht im RT6 Gen selbst, welches intakt aber abgeschaltet ist [18,23,35,27], sondern in einem noch unbekanntem „Lymphopeniegen“ (Lyp) auf Chromosom 4 lokalisiert [36-39].

Das Hinzukommen des MHC-Haplotyps RT1u [40-43] und das Fehlen des protektiven Allels des Gens IDDM3 [37] bei gestörter T-Zellreifung mit RT6 Verlust [4,18,12] führt dann zum Ausbruch der Krankheit.

Der diabetesresistente Stamm DR-BB hingegen exprimiert RT6 auf normalem Niveau und ist nicht lymphopenisch [44]. Entfernung der RT6 tragenden T-Zellen über monoklonale Antikörper vor dem 30. Lebensjahr führt bei jungen Ratten dieses Stammes zu

einer gehäuften Inzidenz von IDDM. Sie steigt von 1% auf über 50% vor dem 60. Lebensstag [44].

Die Übertragung von RT6 exprimierenden Milzzellen von DR-BB Ratten auf BB-DP Ratten verhindert die Erkrankung an IDDM [30,45].

Auch in einem anderen Modell für IDDM schützt die Übertragung von RT6 positiven und CD45RC negativen T-Zellen auf PVG.RT1u Ratten vor dem Ausbruch der Krankheit [29,31,46].

Die Verhinderung der Krankheitsmanifestation scheint dabei durch eine Regulation der veränderten Balance zwischen Th1 und Th2 Zellen und des damit veränderten Zytokinsekretionsmusters zugunsten der Th2 Zellen bewirkt zu werden [47-50,12].

1.4. Das RT6 Gen

Das RT6 Gen enthält 7 Introns und 8 Exons. Der längste kodierende Abschnitt, das 694 Basenpaare lange Exon 7, kodiert für das auf der T-Zelloberfläche exprimierte Protein. Exon 8 kodiert für die C-terminale Signalsequenz zur Membranverankerung über GPI und enthält die 3' untranslatierte Region (UTR). Die restlichen Exons beinhalten die 5' UTR sowie potentielle AUG Startcodons für den Translationsstart. Exon 5, das den N-terminalen Leader für den Transport in das endoplasmatische Retikulum enthält, und Exon 6 werden alternativ zueinander exprimiert. Sie überlappen um 3 Nukleotide, so daß die Splice-Donorstelle von Exon 5 der Splice-Akzeptorstelle von Exon 6 entspricht [51,52].

Die Mehrzahl der aus Milzzellen oder Hybridomzelllinien [17,53] gewonnenen Klone beginnen mit Exon 2. Sie weisen die Exonabfolge 2-5-7 auf. Alternatives Splicing am 5' Ende des Gens führt zu den Varianten 1-2-5-7, 1-2-6-7, 1-7 und 1-5-7 für die aus Milzzell-RNA gewonnenen Klone. Bei den aus der EpD3 T-T Hybridomzelllinie [17,53] stammenden Klone führt alternatives Splicing zu den Varianten 2-5-7, 2-6-7, 4-5-7-8 und 2-3-4-5-7 [51].

Die 3' Region des RT6 Gens zeigt zwei alternative Polyadenylierungsstellen, von denen die weiter 5' gelegene Stelle bevorzugt wird [54].

Das RT6 Gen besitzt zwei potentielle Transkriptionsstartstellen, TSS1 für den Start mit Exon 1, und TSS2 für den Start mit Exon 2. Die mit der Transkriptionsstartstelle 2 verbundene Promotorregion weist eine Reihe T-Zell typischer Transkriptionsfaktorbindungsstellen auf, im Gegensatz zu TSS1, bei der zwar die Kernpromotorelemente TATA und Inr sowie eine YY1 Bindungsstelle vorhanden sind, aber weitere vorhergesagte T-

Zell typische Aktivierungselemente fehlen. TSS2 stellt die Haupttranskriptionsstartstelle des RT6 Gens in Ratten Milzzellen dar [51,52].

Vor Exon 4 konnte bisher kein Promotor nachgewiesen werden, obwohl ein Klon aus der EpD3 T-T Hybridomzelllinie mit diesem Exon beginnt. Es finden sich 5' des Exons jedoch viele vorhergesagte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (2x NF- κ B, NF- κ B, GATA, Lyf-1, AP-2, TCF-1, SV40-Oct, Ets-1, NF-AT, AP-1). Diese Anhäufung von T-Zell typischen Transkriptionsfaktorbindungsstellen spricht für die Existenz einer T-Zell spezifischen Enhancerregion [51,52].

1.5. Die T-zellspezifische mono-ADP-Ribosyltransferase

RT6

Bis 1992 zum ersten Mal das Gen einer eukaryontischen mono-ADP-Ribosyltransferase (mADPRT) aus dem Skelettmuskel des Kaninchens kloniert wurde [55] fanden sich in den entsprechenden Datenbanken keine Proteine, die Verwandtschaft mit RT6 zeigten. Die neuklonierte Skelettmuskeltransferase des Kaninchen zeigte hingegen ausschließlich Homologie zur RT6 Sequenz [55]. Danach wurden aus verschiedenen Geweben von Maus und Mensch weitere mADPRT kloniert, die ebenfalls Verwandtschaft mit RT6 zeigten (siehe 1.6.).

Vor der Klonierung der ersten eukaryontischen mADPRT erregten vor allem prokaryontische mADPRT das Interesse der Wissenschaft, da sich der Wirkungsmechanismus einiger bakterieller Toxine durch die ADP-Ribosylierung von bestimmten Zielproteinen der Wirtszelle erklärt.

Das Diphtherietoxin sowie das verwandte Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* ADP-ribosylieren den Elongationsfaktor 2 an einem modifizierten Histidinrest (Diphtamid) und stören somit die Proteinbiosynthese der Zielzelle [58].

Das Cholera toxin sowie das hitzlabile Toxin von *E. coli* gehören zu einer anderen Gruppe von bakteriellen mADPRT. Sie katalysieren die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit eines G-Proteins ($G\alpha$), welches die Adenylatzyklase stimuliert, an einem Argininrest [58,59]. Das ebenfalls über ADP-Ribosylierung wirkende Pertussistoxin modifiziert hingegen inhibierende G-Proteine ($G_i\alpha$) an einem Cysteinrest [60].

Die der nächsten Gruppe zugehörigen Clostridium Exoenzyme modifizieren kleine G-Proteine (ρ) an Asparaginresten (C3 Exotoxin) oder Actin an Argininresten (C2 Exotoxin) [61-66].

Obwohl in ihrer Primärstruktur verschieden, weisen die unterschiedlichen Gruppen prokaryontischer mADPRT röntgenkristallographisch eine im Kernbereich hochkonservierte dreidimensionale Struktur auf [67-70].

Drei verschiedene Reaktionen sind im Zusammenhang mit dem Metabolismus von extrazellulärem NAD zu unterscheiden. Ausgehend von NAD findet dessen Spaltung zu ADP-Ribose (ADPR) und Nicotinamid statt. Die entstandene ADPR wird nun kovalent an eine bestimmte Aminosäure eines spezifischen Zielproteins gebunden (=mono-ADP-Ribosyltransferase-Aktivität). Durch diese posttranslationale Modifikation kann die Funktion des Zielproteins beeinflusst werden.

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, daß, vor allem bei Abwesenheit des Zielproteins, Wasser als Akzeptor dient. Hierbei wird letztlich NAD in Nicotinamid und ADPR gespalten. Man spricht dann von NAD-Glykohydrolase- oder kürzer NADase-Aktivität [71,72].

Die dritte Reaktion besteht in der Bildung von zyklischer ADPR (cADPR) durch ADPR-Zyklasen. Intrazellulär wirkt cADPR als second messenger und führt zur Erhöhung des intrazellulären Kalziums [73,74].

Diese oben beschriebenen Enzymaktivitäten wurden auch in diversen eukaryontischen Geweben nachgewiesen, bevor die ersten Gene eukaryontischer mADPRT kloniert wurden.

Tabelle 1.1.: Biochemisch charakterisierte mADPRT-Aktivitäten in tierischen Geweben

Gewebe	Spezies	Aminosäure	Aktivität	Lokalisierung
Erythrozyt	Mensch	Cystein	ADPRT Cys-ADPR-Hydr cADPR	ZP, M (innen)
	Rind		NADase	
	Truthahn	Arginin Arginin	ADPRT“A“ ADPRT“B“ Arg-ADPR-Hydr	
	Frosch	Arginin	ADPRT	
Thrombozyt	Mensch	Arginin	ADPRT	ZP
		Arginin	ADPRT	ZP
			ADPRT	ZP
		Cystein	ADPRT	
		NADase		M (außen)
Gewebe	Spezies	Aminosäure	Aktivität	Lokalisierung
Neutrophile	Mensch	Arginin	ADPRT Arg-ADPR-Hydr	
Heterophile	Huhn	Arginin	ADPRT	
		Arginin	ADPRT	

Knochenmark	Huhn	Arginin	ADPRT	
Skelettmuskel	Huhn	Arginin	ADPRT	M
	?	Arginin	ADPRT	
	Kaninchen	Arginin	ADPRT	M (außen, GPI)
		Arginin	ADPRT	
		Arginin	ADPRT	
Arginin	ADPRT			
Mensch	Arginin	ADPRT	M (außen, GPI)	
Frosch	Arginin	ADPRT		
Herzmuskel	Ratte u.a.	Arginin	ADPRT	M (außen, GPI)
	Frosch	Arginin	ADPRT	
Milzzellen	Rind		NADase	M (außen)
	Huhn	Arginin	ADPRT	M
Lymphome	Maus	Arginin	ADPRT	M
Thymozyt	Rind	Cystein?	ADPRT	M
Gehirn	Ratte	Asparagin?	ADPRT	ZP
	Ratte		ADPRT	
	Rind		ADPRT	
	Ratte		ADPRT	
Leber	Ratte	Diphtamid?	ADPRT	ZP
		Cystein	ADPRT	
	Arginin	ADPRT		
Frosch	Arginin	ADPRT		
Rind	Diphtamid	ADPRT		
Testis	Ratte	?	ADPRT	Kern
Niere	Ratte		NADase/ADPRT	
Corpus Luteum	Kaninchen	Arginin	ADPRT	M
Retina	Rind		ADPRT	
Fettzellen			ADPRT	M
Serum	Mensch		NADase/ADPRT ADPRT	
HL60-Zellen	Mensch		ADPRT	M
Schilddrüse	Mensch	?	ADPRT	M
Lunge	Frosch	Arginin	ADPRT	

ZP=zytoplasmatisch, M=Membran, GPI=GPI-verankert

(aus [12])

Dabei fanden sich funktionelle Ähnlichkeiten zu den oben beschriebenen bakteriellen-Toxinen.

Die Arginin-spezifische mADPRT aus Truthahnerythrozyten modifiziert analog zum Cholera-toxin Adenylatzyklase-stimulierende G-Proteine [75]. In Rinderleber zeigte sich analog zum Diphterietoxin und Exotoxin A eine Diphtamid-spezifische ADP-Ribosylierung von Elongationsfaktor 2 [76,77], die teilweise diesem selbst zugeordnet

wird [78]. Pertussis-toxinähnliche Aktivitäten finden sich in menschlichen Thrombozyten und Erythrozyten [79-81].

Der Nachweis der funktionellen Zugehörigkeit von RT6 zur Familie der NAD-metabolisierenden Enzyme gelang erst nach Entdeckung der Sequenzhomologie zur Skelettmuskeltransferase des Kaninchens. Es fand sich in einer mit RT6.2 cDNA transfizierten Ratten Mammacarcinomzelllinie eine NADase-Aktivität an der Zelloberfläche, die sich mittels PI-PLC von der Zelloberfläche abspalten ließ [82]. Weitergehende Enzymaktivitäten wurden dort nicht beobachtet.

Genauere Untersuchungen zeigten, daß sowohl RT6.1 als auch RT6.2 NADase-Aktivität besitzen, wobei nur RT6.2 die entstehende ADPR auf sich selbst überträgt. Die Eigenschaften der Automodifikation weisen auf eine kovalente, Arginin-spezifische AutoADP-Ribosylierung hin [24]. Weitere Akzeptormoleküle sind bisher noch nicht bekannt. RT6.1 besitzt die Fähigkeit zur Automodifikation nicht [24]. Auch ist eine ADPR-Zyklase-Aktivität für RT6 nicht nachweisbar [74,83].

1.6. RT6 Homologe anderer Spezies

Die Assoziation von RT6 mit bestimmten Autoimmunphänomenen (1.3.) und später die Entdeckung der Zugehörigkeit von RT6 zur Familie der mADPRT (1.5.) ließ die Frage nach RT6 Homologen in anderen Spezies als der Ratte aufkommen.

Als erstes fand sich das RT6 Homolog der Maus, genannt Rt6 [84]. Wie in Abschnitt 1.2. beschrieben lassen sich zwei Proteine, Rt6-1 und Rt6-2, unterscheiden. Sie werden jedoch durch zwei eng gekoppelte Gene auf Chromosom 7 in der Nähe der Gene für die β -Kette des Hämoglobins und der Tyrosinase kodiert [28].

In ihrer Aminosäuresequenz zeigen die beiden Maus Rt6 Proteine eine ähnliche Übereinstimmung zueinander, wie zu den RT6 Alloantigenen der Ratte, so daß die drei Gene entwicklungsgeschichtlich in etwa gleichweit voneinander entfernt scheinen [28,12].

Die Enzymaktivitäten der Rt6 Proteine der Maus unterscheiden sich von denen der Ratte deutlich.

So sind beide Maus Rt6 Proteine in der Lage artifizielle Zielproteine, wie die leichte Kette des monoklonalen Antikörpers M2, zu modifizieren. Eine Automodifikation findet nicht statt, und auch die NADase-Aktivität ist, verglichen mit der der Ratten RT6 Proteine, gering [85].

Im menschlichen Genom läßt sich ebenfalls ein RT6 homologes Gen, auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11, finden [86,87].

Es handelt sich jedoch um ein intronhaltiges Pseudogen. Es zeigt eine Homologie in der vorhergesagten Aminosäuresequenz über den gesamten kodierenden Bereich, jedoch ist das Leseraster durch drei vorzeitige Stopcodons unterbrochen [86]. Diese Inaktivierung betrifft die gesamte menschliche Spezies und Primaten wie Schimpansen, Orang Utan und Gorilla. Es finden sich keine weiteren Kopien im menschlichen Genom, und es kann auch keine Transkription des menschlichen RT6 nachgewiesen werden [86].

Im menschlichen Genom konnten neben dem inaktivierten RT6 (=ART 2) weitere Verwandte des RT6 aus der Familie der mADPRT gefunden werden:

die Skelettmuskel mADPRT (=ART 1) auf dem langen Arm des Chromosom 11 [56,88], sowie zwei weitere mADPRT Einzelkopiegene auf Chromosom 4 (=ART 3) bzw. Chromosom 12 (=ART 4) [89].

Die Expression von ART 3 und ART 4 ist ebenfalls gewebespezifisch. So wird ART 3 vornehmlich in Testis exprimiert, während ART 4 hauptsächlich in lymphatischen Organen exprimiert wird [89].

Die vorhergesagte Aminosäuresequenz von ART 3 und ART 4 zeigt Homologien zu RT6, so daß wichtige Strukturmerkmale wie Cysteinreste und für die enzymatische Funktion vermutlich wichtige Aminosäuren (Arginin, Glutamin) in allen mADPRT Genen des Menschen, sowie den Genen des RT6 von Ratte und Maus, der Skelettmuskeltransferase des Kaninchens [55] und der mADPRT des Hühnerknochenmarks [57] konserviert sind [89].

1.7. Ziel

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Anbetracht der vielen RT6 betreffenden offenen Fragen, rekombinant genügend lösliches RT6 Protein herzustellen, erste Funktionsuntersuchungen damit durchzuführen, um dadurch die Voraussetzung für weitergehende Untersuchungen wie z.B. genauere, quantitative Enzymassays, die Suche nach einem physiologischen Liganden, Immunisierungen oder röntgenkristallographische Analysen der räumlichen Struktur des Proteins zu schaffen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Lösungen und Reagenzien

Acrylamid/bis-Acrylamid

(30% Fertiglösung), Fa. BioRad, München

ADPR

Fa. Sigma, München

Agarose

MetaPhor™, Fa. Biozym, Hess. Oldendorf

Antibiotika

Ampicillin, Fa. Boehringer, Mannheim

Penicillin, Fa. Life Technologies, Eggenstein

Streptomycin, Fa. Life Technologies, Eggenstein

Tetracyclin, Fa. Boehringer, Mannheim

Antikörper

rabbit anti-hIgG-Fc, Fa. Dianova, Hamburg

rabbit anti-hIgG-Fc peroxidase, Fa. Dianova, Hamburg

rabbit anti-human IgG,IgM,IgA, Fa. Dianova, Hamburg

donkey anti-rabbit peroxidase, Fa. Amersham, Braunschweig

Streptavidin peroxidase, Fa. Amersham, Braunschweig

Antiseren

K5, K48 wurden durch wiederholte Immunisierungen eines Kaninchens mit einem denaturierten Fusionsprotein aus den 91 N-terminalen Aminosäuren des RT6.2 mit der E. coli β -Galactosidase (K5, K6) bzw. mit einem an Ovalbumin gekoppelten Peptid (Aminosäuren 48-62 von Rt6-1) (K48) hergestellt.

APS (Ammoniumpersulfat)

Fa. BioRad, München

Aqua ad iniectabilia

Fa. Braun, Melsungen

Aqua bidest/deion.

Aufbereitungsanlage des Labors

Aufreinigungsmatrix

Stratclean Resin™, Fa. Stratagene, Heidelberg

Bakterien

E. coli Stämme: NM 522, XL 1, XL 2 ultrakompetent, Fa. Stratagene,
Heidel- berg

MC 1061 P3, One-Shot INV™, Fa. Invitrogen, Schelp, Hol-
land

Bakterienlysispuffer

Fa. Qiagen, Hilden

Blocklösung

5-10% BSA in PBS oder TBS

Blotpuffer, Western Blot

Für 5 l: 56,2g Glycin, 12,1g Tris-base mit aqua deion. ad 3l auffüllen, mischen,
mit aqua deion. ad 4l und mit Methanol ad 5l.

BSA (bovine serum albumine, Fraktion V)

Fa. Boehringer, Mannheim

CIP (calf intestinal alkaline phosphatase)

Fa. Boehringer, Mannheim

COS7- Zellen

im eigenen Labor kultiviert

DNA-Aufreinigungsmatrix

Jetsorb™ Gel Extraction Kit, Fa. Genomed, Bad Oeynhausen

DNA-Ligase

T4 DNA-Ligase, Fa. Invitrogen, Schelp, Holland

DNA-Ligase Puffer

Fa. Invitrogen, Schelp, Holland

DNA-Molekulargewichtsmarker

λ DNA-Hind III/φ x-174 DNA-Hinc II Digest, Fa. Pharmacia, Freiburg

DNA-Präparationskits

SpinPrep™, MiniPrep™, MidiPrep™, MaxiPrep™, Fa. Qiagen, Hilden

Dünnschichtchromatographieplatte

Polyethylenimin(PEI)-Cellulose Chromatographieplatten, Fa. Merck, Darm-
stadt

Dynabeads™

Fa. Dynal, Hamburg

ECL™-Lösung

Fa. Amersham, Braunschweig

Elektrophoresepuffer

5x für SDS-PAGE: 72g Glycin, 15g Tris-base, 5g SDS mit aqua deion.
ad 1l, auf pH8,6 einstellen

10x Tricine- bzw. Trisglycinpuffer: Fa. Novex, San Diego CA, USA

Agarosegelelektrophorese: 1% TAE und 0,5% TBE

FCS (fetal calf serum)

Fa. Life Technologies, Eggenstein

Filme

ECL™ Filme, Fa. Amersham, Braunschweig

Kodak X-OMAT™, Fa. Eastman Kodak, Rochester NY, USA

Filterpapier

Fa. Schleicher&Schuell, Dassel

Histone

Fa. Sigma, München

Kulturmedien, Bakterien

LB-Medium: 5g Bactoyeast, 10g Bactotryptone, 10g NaCl, ad 1l mit aqua deion., auf pH 7,5 einstellen

SOC-Medium: 5g Bactoyeast, 20g Bactotryptone, 0,5g NaCl, 10ml 250mM KCl, 20ml 1M Glucose, 5ml 2M MgCl₂, ad 1l mit aqua deion.
auf pH 7 einstellen

Kulturmedium, Zellkultur

DMEM™, Fa. Life Technologies, Eggenstein

Optimem1™, Fa. Life Technologies, Eggenstein

Ladepuffer 6x, Agarosegelelektrophorese

0,25% Bromphenol blau, 0,25% Xylencyanol, 15% Ficoll 400 in H₂O

Ladepuffer, SDS-PAGE

Fa. Novex, San Diego CA, USA

Lipofectamine™

Fa. Life Technologies, Eggenstein

Membranen

Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membranen, Fa. Millipore, Bedford, USA

Nitrocellulose(NC)-Membranen, Fa. Schleicher&Schuell, Dassel

NaCl, 0,9%

Fa. Braun, Melsungen

NAD

Fa. Sigma, München

NADP

Fa. Sigma, München

Nicotinamid

Fa. Sigma, München

³²P-NAD⁺

Fa. Amersham, Braunschweig

PBS

Fa. Life Technologies, Eggenstein

PCR-Mix 65

90µl 10x PCR-Puffer, 15µl dNTP(10mM), 550µl aqua a.i.

PCR-Puffer (2x)

Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt

Petrischalen

Zellkultur: Nunclon™, Fa. Nalge Nunc, Wiesbaden

Falcon™, Fa. Becton Dickinson, Meylan Cedex, Frankreich

Bakterien: Fa. Greiner, Frickenhausen

Plasmide

pTA(pCRII)TM, pcDNA1TM, pcDNA1AmpTM, pcDNA3TM, Fa. Invitrogen,
Schelp, Holland

pBluescriptKS(pBS)TM, Fa. Stratagene, Heidelberg

pASK60TM, Fa. Biometra, Göttingen

pME18TM wurde freundlicherweise von R. Kastelein, DNAX Research Insti-
tute, Palo Alto CA, USA zur Verfügung gestellt

Polyacrylamidgele

Mengenangaben für 12% Trenngel (für 7,5% Trenngel in Klammern)

Trenngel: 6,7(4,85)ml aqua a.i., 5(2,5)ml 1,5M Tris pH8,8, 8(2,5)ml
Acrylamid/bis-Acrylamid, 200(100)µl SDS 10%, 10(5)µl
TEMED, 100(50)µl APS 10%

Sammelgel: 6,1ml aqua a.i., 2,5ml 0,5M Tris pH6,8, 1,3ml Acryl-
amid7bis-Acrylamid, 100µl SDS 10%, 10µl TEMED,
50µl APS 10%

10% und 12% Trisglycin-, 10% Tricine-Fertiggele, Fa. Novex, San Diego, USA

Polyarginin

Fa. Sigma, München

Primer

BFF AAG CTT ATG GCT TAC AGT TGC CAG CCG

BFR CTC GAG TGT TTG CTT TTC ATC AGG AGG
 CFF AAG CTT ATG ACA CTC AGA CTG CTA TTC
 CFR CTC GAG CTT AGG AGA CGT CTG AGC ATG
 CVA GAC ATG GCT CCM* AAT GCA TTT GAT G
 FFF CTC GAG CAA CTC TTT CAT CTA CAG AAG
 FFR TCT AGA TTA AAG CTT ATA TAA GCC AAA
 IGF CGT AGA GCC CAG ATC TTG TGA CAA AAC TC
 IGR CTA TGA TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GC
 RE GGA GAG ATC TAC GGC TCA GCA AG
 RFR CAA GAT CTG GGC TCT ACG TAG CTG TAT AAG CAA TTG
 TAG
 RR2 CTC GAG GCT GTA TAA GCA ATT GTA GTT
 SFR AGA AGG TCT CAG GCC CTG ACA GGG CCT TTG ATG CTA
 GAC
 SRR TTC TGC AGT GCT GTA TAA GCA ATT GTA GTT
 TFF AAG CTT ATG AAC CCA GTC ATC AGC ATC
 TFR CTC GAG ACA CTT GAC CAG CTT GTC TCT
 VA TTA AGC TTG ACG ATG CCA TCA AAT

* M=A oder T

Protamin

Fa. Sigma, München

Protein-G Sepharose

Protein G 4Fast Flow™, Fa. Pharmacia, Freiburg

Protein-G Sepharosesäulen

HiTrap™ Protein G 1ml, Fa. Pharmacia, Freiburg

Protein-Molekulargewichtsmarker

RainbowMarker™, ECL™-Marker, Fa. Amersham, Braunschweig

Protein Dye Reagent™

Fa. Stratagene, Heidelberg

Protein-Quantifizierungs Kit

Fa. Stratagene, Heidelberg

Puffer, Säulenchromatographie

Äquilibrieren: 20mM Natriumphosphat pH7, steril, für HiTrap™: 20mM Tris
pH7, steril

Eluieren: 0,1M Glycin pH2,7

Waschen: 20mM Natriumphosphat pH7, steril, für HiTrap™: 20mM Tris
pH7, steril

Neutralisation: 1M Tris pH9

Puffer E

100mM Tris pH 8, 1mM Diaminobiotin, 1mM EDTA, 0,02% NaN₃

Puffer P

100mM Tris pH8, 500mM Sucrose, 1mM EDTA, 0,02% NaN₃

Randomhexamers™

Fa. Pharmacia, Freiburg

Restriktionsenzyme

Bgl II, Hind III, Nsi I, Pst I, Xba I, Xho I, Fa. Life Technologies, Eggenstein

Bsa I, Fa. New England Biolabs, Schwalbach

Mun I, Fa. MBI Fermentas, St.Leon-Rot

Restriktionsenzym-puffer

One Phor All™, Fa. Pharmacia, Freiburg

React™, Fa. Life Technologies, Eggenstein

Fa. MBI Fermentas, St.Leon-Rot

Fa. New England Biolabs, Schwalbach

RT-PCR-Mix

60µl 10x PCR-Puffer, 45µl aqua a.i., 30µl 0,2M DTT, 15µl dNTP (je 10mM)

Reverse Transkriptase

Fa. Life Technologies, Eggenstein

Sequenase™ Sequenzierungskit

Fa. Amersham, Braunschweig

Silberlösung

13,5ml aqua a.i., 0,75ml 40% NaCitrat, 0,6ml 20% FeSO₄, 0,15ml 20% AgNO₃
(unter Mischen langsam hinzugeben)

6-Well Plates, Zellkultur

Nunclon™, Fa. Nalge Nunc, Wiesbaden

Sterilfilter

Fa. Millipore, Bedford, USA

TAE, Agarosegelelektrophoresepuffer

Fa. Life Technologies, Eggenstein

TBE, Agarosegelelektrophoresepuffer

Fa. Life Technologies, Eggenstein

TBS (Tris buffered saline)

8g NaCl, 0,38g KCl, 3g Tris-Base, 0,015g Phenolrot, ad 1l mit aqua deion., auf
pH 7,4 einstellen

Taq-Polymerase

Fa. Beckmann, Hamburg

TEMED (Tetramethylethyldiamin)

Fa. BioRad, München

Trypsin-EDTA

Fa. Life Technologies, Eggenstein

Tween 20™

Fa. USB, Cleveland, USA

Zelllinien

COS7 (Affennierenzelllinie), im eigenen Labor kultiviert

C58NT (T-Zelllinie, Ratte), im eigenen Labor kultiviert

Zellkulturflaschen

Nunclon™, Fa. Nalge Nunc, Wiesbaden

Falcon™, Fa. Becton Dickinson, Meylan Cedex, Frankreich

2.1.2. Geräte

Agarosegelelektrophoresekammern

Fa. Life Technologies, Eggenstein

Blotapparatur, klein

Fa. Novex, San Diego CA, USA

Fa. Schleicher&Schuell, Dassel

Blotapparatur, groß

Fa. Phase, Lübeck

Brutschränke

Fa. Heraeus, Hanau

Elektroporationsgerät

GenePulser™, Fa. BioRad, München

Photometer

Ultraspec 2000™, Fa. Pharmacia, Freiburg

Roller

Fa. Heraeus, Hanau

Schüttler

Celloshaker™, Fa. Renner, Darmstadt

SDS-PAGE Systeme

Protean™ Elektrophoresesystem, Fa. BioRad, München

Fertiggele: Fa. Novex, San Diego CA, USA

Fa. Schleicher&Schuell, Dassel

Slot Blot Apparatur

Fa. Stratagene, Heidelberg

Thermoblock

Thermostat 5320™, Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Thermomixer 5436™, Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Thermocycler, PCR

Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt

Fa. M.J. Research, Watertown MC, USA

Vakuumpumpe

Fa. Stratagene, Heidelberg

Wasserbad

Fa. Braun, Melsungen

Zentrifugen

Eppendorf 5415C™, Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Beckmann GS6KR™, Fa. Beckmann, München

Sorvall RC26Plus™, Fa. Sorvall-DuPont, Bad Homburg

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Klonierung

2.2.1.1. DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Reaktionsansatz besteht zu 10% aus 10x Puffer (z.B. React™ oder One Phor All™), einem entsprechenden Volumen aqua ad injectabilia und wird mit der DNA je nach Konzentration versetzt. Dieser Ansatz wird nach Zugabe von je 5-8 units der Restriktionsenzyme 1h bei 37°C auf dem Thermoblock inkubiert.

2.2.1.2. Agarosegelelektrophorese des Restriktionsverdau und Aufreinigung der DNA-Fragmente

Erst erfolgt die Herstellung eines 1-1,2% (bei kleinen Fragmenten 1,8%) Agarosegels durch Aufkochen der Agarose in dem entsprechendem Volumen 1% TAE-Puffer (oder 0,5% TBE-Puffer), dann das Gießen des Gels nach Hinzufügen von 1:10000 Ethidiumbromidlösung. Der Restriktionsansatz wird mit einer entsprechenden Menge Ficoll-

Ladepuffer (6x) versetzt und das Gel beladen. Zusätzlich wird ein DNA-Molekulargewichtsmarker geladen. Die angelegte Spannung beträgt bis zum Einlauf der Proben in das Gel 30mV und kann danach auf max. 10mV/cm Elektrodenabstand bei einem 5mm dicken Gel erhöht werden. Nach Identifizierung der gewünschten aufgetrennten DNA-Banden unter UV-Licht und Photographie werden die gewünschten Banden ausgeschnitten und mittels des Jetsorb™ DNA-Purification Kits nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

2.2.1.3. Dephosphorylierung des 5' Endes des Vektors

Zwecks Begrenzung der Religationsrate des Vektors wird dessen 5' Ende mittels CIP (calf intestinal alkaline phosphatase) dephosphoryliert. Dazu wird der Restriktionsansatz des Vektors mit 10% CIP-Puffer, 20% Tris-HCl und 1,5 units CIP versetzt, mit dem entsprechen dem Volumen aqua a.i. aufgefüllt, 1h bei 37°C und dann 20min bei 85°C auf dem Thermoblock inkubiert. Die Proteinreste werden dann mittels Strataclean-Resin™ nach Herstellerangaben entfernt.

2.2.1.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittene DNA des Plasmids, welches als zukünftiger Vektor dient, und des Inserts, welches die gewünschte zu exprimierende Information trägt, wird im Verhältnis von Vektor:Insert=1:2 gemischt, mit jeweils 10% des Reaktionsvolumens 10x Ligasepuffer, β -Mercaptoethanol versetzt, mit dem entsprechenden Volumen aqua a.i. aufgefüllt, DNA-Ligase zugegeben und 10-15h bei 12-16°C im Thermoblock inkubiert. Zur Kontrolle der Religationsrate des Vektors wird ein Ansatz ohne Insert ligiert.

2.2.1.5. Bakterientransformation

Die Bakterien werden langsam über ca. 10min auf Eis aufgetaut und evtl. aliquotiert. Es erfolgt die Zugabe von 1 μ l Ligationsansatz bzw. 1 μ l einer 1:100-1:1000 Verdünnung einer Plasmidpräparation, sowie 1-2 μ l 0,5M β -Mercaptoethanol. Nach vorsichtigem Mischen erfolgt 30min Inkubation auf Eis, 30sec bei 42°C im Wasserbad und 2min auf Eis. Dann werden 500 μ l vorgewärmtes SOC-Kulturmedium hinzugefügt und bei 37°C im Brutschrank für 1h auf einem Schüttler inkubiert. Danach werden 50-500 μ l dieser Kultur auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Kolonien werden mittels PCR auf ihren Insertgehalt überprüft bzw. es schließt sich bei einer Transformation einer Plasmidpräparation eine

erneute DNA-Präparation, z.B. SpinPrep™ nach Herstellerangaben, und diagnostischer Restriktionsenzymverdau an.

2.2.2. PCR

13µl Mix 65, je 2µl aqua a.i., Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 0,01µl Taq-Polymerase werden vermischt und mit Paraffinöl überschichtet. Die zu untersuchenden Bakterienkolonien werden aufgenommen, ein Abstrich angefertigt und der Rest in 10µl Bakterienlysispuffer lysiert. 1µl hiervon oder 1µl einer 1:100 DNA-Verdünnung werden zum PCR-Ansatz unter das Öl gegeben. Es folgt je nach Größe von Primern und DNA-Sequenz die PCR mit unterschiedlichen Programmen im Thermocycler. Die anschließende Agarosegelelektrophorese identifiziert die amplifizierten Fragmente. Wenn die untersuchten Bakterienkolonien inserthaltig sind, wird von ihnen eine Kultur in 5-10ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angelegt und danach eine DNA-Präparation, z.B. SpinPrep™, nach Herstellerangaben angefertigt.

2.2.3. RT-PCR

Für den Reaktionsansatz wurden 12µl RNA (ca. 0,1-1µg pro Ansatz) aus Lymphknoten-Lymphozyten von LEW b Ratten nach 24h Concanavalin A Stimulation bzw. 12µl RNA (50µg/µl) aus der Zelllinie DDI mit 2µl Randomhexamers™ vermischt, 5min bei 70°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. 15µl RT-Mix und 1µl Reverse Transkriptase kommen hinzu und werden 10min bei 24°C, 20min bei 42°C, 1min bei 95°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Hiernach schließt sich eine PCR mit 30 Zyklen von 30sec 96°C, 30sec 55°C und 90sec 72°C an. Das Ergebnis wird in einer Agarosegelelektrophorese (1,8%, 0,5% TBE) begutachtet.

2.2.4. Sequenzierung

Die radioaktive Sequenzierung der klonierten Expressionsplasmide wurde, unter der Verwendung des Sequenase™ Sequenzierungskits, freundlicherweise von K. Bredow nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5. Rekombinante Expression in COS7-Zellen

2.2.5.1. Kultivierung

Die in 10cm-Petrischalen adhären wachsenden COS7-Zellen werden von ihrem Kulturmedium befreit und mit 10ml calcium- und magnesiumfreien PBS gewaschen. 2ml vorgewärmtes Trypsin-EDTA werden hinzugegeben und für 2-5min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Durch leichtes Beklopfen kann der Ablösevorgang unterstützt werden. 6ml DMEM-Kulturmedium (+5%FCS und je 1% Glutamat, Pyruvat, Penicillin, Streptomycin) werden hinzugegeben und die Zellsuspension gemischt. Von dieser Mischung werden je 1ml in neue 10cm-Petrischalen gegeben, auf 10ml mit DMEM-Kulturmedium aufgefüllt und bei 37°C und 5% CO₂ bis zum konfluenten, adhären Wachstum inkubiert.

2.2.5.2. Transfektion

2.2.5.2.1. Transfektion per Liposomen

Am Tag vor der Transfektion werden die Zellen entsprechend obigem Verfahren in neue Kulturschalen (10cm-Petrischalen oder 6-Well-Plates) überführt. Die Zellzahl beträgt dabei ca. 2×10^5 pro Napf für die 6-Well-Plates und ca. 1×10^6 für die 10cm-Petrischalen. Pro Ansatz (für die 10cm-Petrischale) werden 10µg DNA mit 500µl Optimem1™ vermischt. 505µl einer 10+1 Mischung aus Optimem1™ und Lipofectamine™ werden hinzugegeben, vermischt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird mit 4ml Optimem1™ aufgefüllt. Hiervon werden 5ml auf die vorher mit 2×5 ml Optimem1™ gewaschenen zu transfizierenden Zellen gegeben. Nach 6h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ werden 5ml DMEM-Medium (mit 5%FCS und je1% Glutamat, Pyruvat, Penicillin, Streptomycin) dazugegeben und bis zur Ernte inkubiert.

Für die 6-Well-Plates gelten pro Napf 1/5 der oben angegebenen Mengen.

2.2.5.2. Transfektion per Elektroporation

Die Zellen werden mit Trypsin-EDTA abgelöst, abzentrifugiert und mit DMEM-Medium (ohne Zusätze) auf eine Konzentration von 1×10^7 /ml eingestellt. 0,3ml der Zellsuspension werden in 0,4cm-Elektroporationsküvetten gefüllt, mit 7,5-10µg DNA vermischt und 10min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgt mit 0,25-0,3kV und 960µF bei einer Pulsdauer von 30-44ms. Danach erfolgt eine 15min Inkubation auf Eis bevor die transfizierten Zellen in entsprechende Kulturbehälter überführt werden und bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren.

2.2.5.3. Ernte

Nach 7 (3-11) Tagen Wachstum und Produktion wird der Zellkulturüberstand abgenommen, abzentrifugiert, der daraus gewonnene Überstand steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt. Die verbleibenden Zellen werden entweder verworfen, oder es wird, je nach Zustand der Zellen, für eine zweite Produktionsphase neues Medium aufgefüllt.

2.2.6. Rekombinante Expression in E. coli

2.2.6.1. Transformation und Kultivierung

Entsprechend 2.2.1. werden E.coli NM522 mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert und auf Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin ausplattiert. Die über Nacht gewachsenen Kolonien werden in 5ml LB-Medium mit 200µg/ml Ampicillin über Nacht bei 30°C im Wasserbad geschüttelt. 200µl bzw. 2ml dieser Vorkultur werden in 10ml bzw. 100ml LB-Medium mit 200µg/ml Ampicillin bei Raumtemperatur unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,5 (550 nm) kultiviert. Jetzt erfolgt die Induktion der Expression mit 0,5mM-1mM IPTG und weiteres Wachstum für 20h.

2.2.6.2. Herstellung des Periplasmalysats

Die Herstellung des Periplasmalysats beginnt mit dem Abzentrifugieren der Kultur mit 4500g für 15min bei 4°C. Das Bakterienpellet wird mit 100µl bzw. 1ml eiskaltem Puffer P resuspendiert, in Eppendorfröhrchen überführt und 30min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation mit 14000upm für 15min bei 4°C in der Eppendorfzentrifuge erfolgt die Abnahme des periplasmatischen Überstands und Aufbewahrung desselben bei -20°C.

2.2.7. Fusionsproteinnachweis

2.2.7.1. Slot Blot

Eine Nitrocellulosemembran und zwei Filterpapiere werden auf die Größe der Blotapparatur zurechtgeschnitten und in die Apparatur eingebaut. Mittels Vakuumpumpe oder Wasserstrahlpumpe wird ein Vakuum erzeugt. Anschließend werden 100-500µl der Proben (Immunglobulinstandardverdünnungsreihe und COS-7 Zellkulturüberstände) aufgetragen und mit 100-500µl PBS gespült. Das Vakuum wird noch für einige Zeit belassen,

ohne daß jedoch die Membranen eintrocknen. Nach dem Auseinanderbau schließt sich die Immunodetektion an.

2.2.7.2. SDS-PAGE

Es werden selbstgemachte Gele sowie käuflich erworbene verwendet.

Vor der Herstellung des 7,5% oder 12% Gels wird das Elektrophoresesystem (Phase, Lübeck oder BioRad, München) nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Das System wird mit 1% Agarose abgedichtet bevor das Trenngel luftblasenfrei eingefüllt wird. Während der Polymerisationszeit wird das Trenngel mit Isobutanol vor dem Austrocknen geschützt. Nach Entfernung des Isobutanols wird das Sammelgel eingefüllt und der gewünschte Kamm für die Proben taschen eingesteckt. Nach der Polymerisation kann das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt, diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt, die Proben mit Ladepuffer in die Taschen geladen und der Strom angelegt werden. Die Proben werden vor dem Laden durch Erhitzen für 5min auf 95°C denaturiert, teilweise mit DTT (Dithiothreitol) oder β -Mercaptoethanol reduziert sowie teilweise (bei Verdacht auf Bildung von Inclusionbodies bei der prokaryontischen Expression) mit Ultraschall und 20% SDS+0,5M Tris pH6,8 vorbehandelt.

Bei den käuflich erworbenen Gelen werden 10% und 12% Tris-Glycin sowie 10% Tricine Gele der Fa. Novex mitsamt der Apparatur und Puffern nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.7.3. Western Blot

Nach ausreichender Auftrennung der Proben wird das SDS-Polyacrylamidgel vorsichtig aus der Apparatur genommen, das Sammelgel verworfen. Sechs Blätter Filterpapier werden auf Trenngelgröße zugeschnitten und im Blotpuffer äquilibriert. Je eine Nitrocellulose (NC)- und Polyvinylidendifluorid (PVDF) -Membran werden ebenso zugeschnitten. Die NC-Membran wird kurz in aqua deion., die PVDF-Membran in Methanol und dann beide im Blotpuffer äquilibriert. Das Trenngel wird kurz in den Blotpuffer gegeben. Die Blotapparatur (Phase, Lübeck für selbstgegossene Gele; Novex oder Schleicher&Schuell für käufliche Gele) wird von Kathode zur Anode wie folgt zusammengesetzt: 3x Filterpapier, NC-Membran, Trenngel, PVDF-Membran, 3x Filterpapier. Dabei ist auf Luftblasenfreiheit zu achten. Der Strom wird mit einer Stärke von 0,8mA/cm² Gelfläche 1min in Rich-

tung der NC-Membran („verkehrt“ gepolt) und 60min in Richtung der PVDF-Membran („richtig“ gepolt) angeschlossen.

Bei käuflich erworbenen Gelen wird die Blotapparatur der Fa. Novex (oder Schleicher&Schuell) mit den mitgelieferten Membranen und Puffern nach Herstellerangaben benutzt.

2.2.7.4. Silberfärbung

Die Nitrocellulosemembran wird mit aqua deion. äquilibrirt, mit der Silberlösung überschichtet und solange geschwenkt bis sichtbare Banden erscheinen. Dann wird sofort kräftig mit reichlich aqua deion. aus der Spritzflasche gespült, und die Membran zwischen zwei Filterblättern getrocknet.

2.2.7.5. Immunodetektion

Die nach dem Western Blot noch feuchte PVDF-Membran wird in die Blocklösung (5-10% BSA in PBS) gelegt, abgedeckt und bei Raumtemperatur für 30-60min geschwenkt. Danach folgt die Inkubation mit der Erstantikörperlösung (K5 1:600 oder rabbit anti-hIgG 1:3000 für eukaryontische Expression; K5 1:600 oder Streptavidin perox. 1:750 für prokaryontische Expression) bei 4°C über Nacht auf dem Roller. Es folgt 4x Waschen mit TBS+0,5% Tween20 (TBST) auf dem Schüttler und die Inkubation mit der Zweitantikörperlösung (donkey anti-rabbit perox. 1:1000-1:3000) für 1h bei 4°C auf dem Roller. Die Erst- und Zweitantikörper werden jeweils in TBS mit 1% BSA und 0,5% Tween 20 verdünnt. Nach erneutem 4x Waschen in TBST schließt sich die ECL™-Detektion an.

2.2.7.6. ECL-Detektion

Die nach dem letzten Waschen mit TBST noch feuchte, mit dem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper markierte PVDF-Membran des Western Blots wird mit einer 1:1 Mischung der Lösungen A und B des ECL™-Systems benetzt und für genau 1min inkubiert. Nach Abtropfen des Reagens wird die Membran in Frischhaltefolie gewickelt und auf einer schwarzen Pappe in eine Filmkassette gelegt. Die Belichtung der Röntgen- oder der ECL™-Filme erfolgt für 1sec-5min.

2.2.8. Quantifizierung der prokaryontischen Expression

Zunächst wird eine Proteinstandardlösung (0,5mg/ml) aus Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt, die so mit 0,15M NaCl auf ein Volumen von jeweils 100µl in Küvetten aufgefüllt wird, daß eine Verdünnungsreihe mit definierten Proteinkonzentrationen entsteht. Entsprechend werden auch Küvetten mit unterschiedlichen Mengen 1:10 verdünnten Periplasmalysats beschickt und mit NaCl auf 100µl aufgefüllt. Als Kontrolle dient Periplasmalysat von Bakterien, die mit dem Leervektor transformiert wurden. Es wird nun zu allen Küvetten 1ml Protein Dye Reagent™ gegeben, das, je nach Proteingehalt der Proben, eine Färbung hervorruft, die mit dem Photometer nach 5-10min Inkubationszeit bei 595nm gemessen wird. Die Extinktionen der Proteinstandardverdünnungsreihe werden gegen ihren jeweiligen Proteingehalt aufgetragen. Aus der so entstehenden Geraden werden die Proteingehalte der Periplasmalysatverdünnungen bestimmt und die Werte gemittelt.

2.2.9. Aufreinigung der Cos-7 Zellkulturüberstände

2.2.9.1 Protein-G Sepharose

Es wird Protein-G Sepharose 4Fast Flow™ verwendet. 30µl Protein-G Sepharose werden mit 500µl PBS oder TBS gewaschen, für 1min bei 14000upm abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. 100-200µl des zu reinigenden COS7 Zellkulturüberstandes werden hinzugegeben und für 1h bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Die Suspension wird für 1min bei 14000upm in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet der SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot zugeführt.

2.2.9.2. Chromatographie mit Protein-G Sepharosesäulen

Es werden entweder käuflich erworbene 1ml Protein-G Sepharosesäulen (HiTrap™, Pharmacia) oder selbst gegossene 3,5ml Säulen (Protein G 4Fast Flow™, Pharmacia) verwendet. Die Säulen werden mit 1 Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert und mit 5 Säulenvolumina Äquilibrierungspuffer äquilibriert bevor der aufzureinigende COS7 Zellkultur-überstand aufgetragen wird. Der Durchlauf (Flow through Fraktion) wird für Analysezwecke aufbewahrt. Die Säule wird nun mit 5 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen und danach mit 3 Säulenvolumina Elutionspuffer eluiert. Die Waschfraktionen werden für Analysezwecke aufbewahrt. Das Eluat wird in 6-12 0,5-1ml Portionen aufgefangen und sofort mit 30-60µl Tris pH9 neutralisiert.

2.2.10. Aufreinigung der Periplasmalysate

20µl mit Streptavidin gekoppelte Dynabeads™ werden mit 200µl TBS gewaschen, danach mit 10µl TBS und 10µl Periplasmalysat versetzt und für 1h bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und für Analysezwecke (SDS-PAGE und Western Blot) aufbewahrt. Die übriggebliebenen Dynabeads™ werden zweimal mit je 200µl TBS gewaschen bevor 20µl Elutionspuffer E dazugegeben werden. Nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur wird der Überstand abgenommen. Der Elutionsvorgang wird einmal wiederholt. Für Analysezwecke wird das übrige Pellet nun noch zweimal mit dem Elutionspuffer gewaschen und der SDS-PAGE/Western Blot zugeführt.

2.2.11. Analyse der enzymatischen Aktivität

2.2.11.1 Radioaktive Markierung

Für einen Ansatz wird die zu markierende Probe mit 2µCi $^{32}\text{P-NAD}^+$ und 5µM NAD versetzt und auf 50µl mit PBS (+Calcium/Magnesium) aufgefüllt. Dieser Ansatz wird für 30min bei 37°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. 10µl Strataclean Resin™ werden hinzugefügt und in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert. 1µl des Überstandes wird für die Dünnschichtchromatographie abgenommen, der Rest des Überstandes verworfen. Das Pellet wird 4x mit je 1ml PBS oder TBS gewaschen, jeweils bei 5000upm kurz abzentrifugiert und dann für die SDS-PAGE, Western Blot mit Immunodetektion und Autoradiographie in Ladepuffer+DTT bei -20°C aufbewahrt.

2.2.11.2. Dünnschichtchromatographie

1µl der Überstände der radioaktiven Markierung werden auf eine Polyethylenimin(PEI)-Cellulose Platte aufgetropft. Als Kontrollen dienen unmarkiertes NAD, ADPR sowie NAD/ $^{32}\text{P-NAD}^+$ -Gemische. Die Platte wird in 1M Essigsäure gestellt bis die Lauffront die Probenauftragsstellen ca. 3cm passiert hat. Jetzt wird soviel 3M LiCl hinzugefügt, das die Lösung 0,9M Essigsäure und 0,3M LiCl enthält. Wenn die Lauffront das Ende der Platte erreicht hat, wird sie herausgenommen, getrocknet, unter UV-Licht werden die Kontrollen markiert und die Platte der Autoradiographie zugeführt.

2.2.11.3. Autoradiographie

Nach der Immunodetektion und Entwicklung mit dem ECL™-System wird die PVDF-Membran mit schwarzer Pappe abgedeckt, um die Restfluoreszenz auszuschalten, in eine Filmkassette gelegt und ein Kodak X-OMAT™ Film für 1-7 Tage bei -70°C exponiert. Mit den Dünnschichtchromatographieplatten wird entsprechend verfahren.

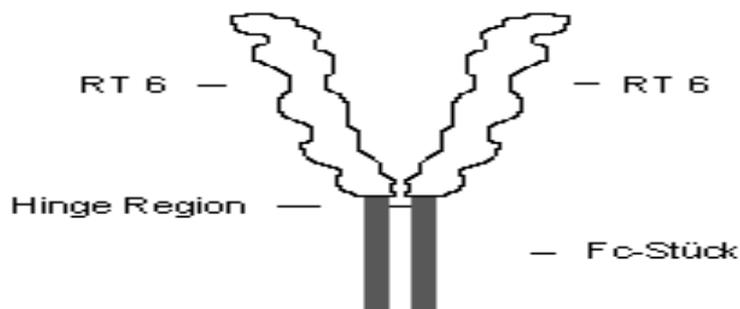
3. Ergebnisse

3.1. Expression rekombinanter RT6 Formen in eukaryontischen COS7-Zellen und Funktionsuntersuchung

3.1.1. Konstruktion einer RT6-Fc Chimäre

Ziel war die Konstruktion eines Fusionsproteins aus dem N-terminalen Teil des RT6 (RT6 Leadersequenz bis zum Anfang der GPI-Ankersequenz) und, anstelle des GPI-Ankers, dem Fc-Teil des humanen IgG1, das die Hinge-Region noch enthält. Das so konstruierte Fusionsprotein gleicht somit einem Immunglobulin der Klasse G, bei dem die Fab-Stücke (Antigenbindungsstellen) durch jeweils ein RT6 ohne GPI-Anker ersetzt sind.

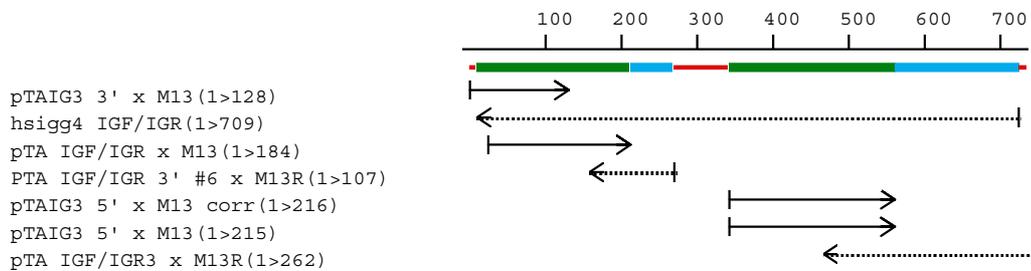
Abbildung 1: Schemazeichnung des RT6-Fc Fusionsproteins



Ausgehend von der DNA Sequenz des humanen IgG1 wurden geeignete Vorwärts- und Rückwärtsprimer hergestellt (IGF und IGR) mit denen dann mittels RT-PCR das gewünschte Fragment aus humaner B-Lymphozyten RNA hochamplifiziert wurde. Die so erhaltenen Genabschnitte wurden per Agarosegelelektrophorese auf die richtige Größe untersucht.

Die RT-PCR Produkte wurden mit dem Vektor pCR II™ ligiert. Kompetente E. Coli Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und positive, d.h. das Insert enthaltende, Klone zur DNA-Präparation gepickt. Es fanden sich zwei passende Klone, Ig3 und Ig6, von denen das Plasmid pCRII Ig3 weiter verwendet wurde.

Abbildung 2: Sequenzierungsstrategie pCRII Ig3



Die Nukleotidsequenz wurde mittels der oben angegebenen Primer von 3' und 5' ermittelt. Es blieb ein Rest von ca. 80 bp (270-350), der nicht erfaßt wurde. Die nachgewiesene Funktionalität der entstandenen Fusionsproteine läßt aber auch für die nicht sequenzierten 80 bp die korrekte Basenfolge vermuten.

Abbildung 3: Sequenz Ig3

Bgl II
|

CGTAGAGCCCAGATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGA 70

V E P R S C D K T H T C P P C P A P E L L G G

CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCACAT 140

P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T

GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT 210

C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V

GCATAATGCCAAGCAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGCGTCTCACC 280

H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T

GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC 350

V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A

Xma I
|

CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC 420

P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S

CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC 490

R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I

GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCG 560

A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S

ACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCGGGAACGTCTTCTC 630

D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S

Nsi I
|

ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA 700

C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

TGATCATAG 709

. S .

Der Bereich zwischen bp 270-350 wurde nicht sequenziert. Die hier angegebene Sequenz ist die aus der Datenbank erwartete.

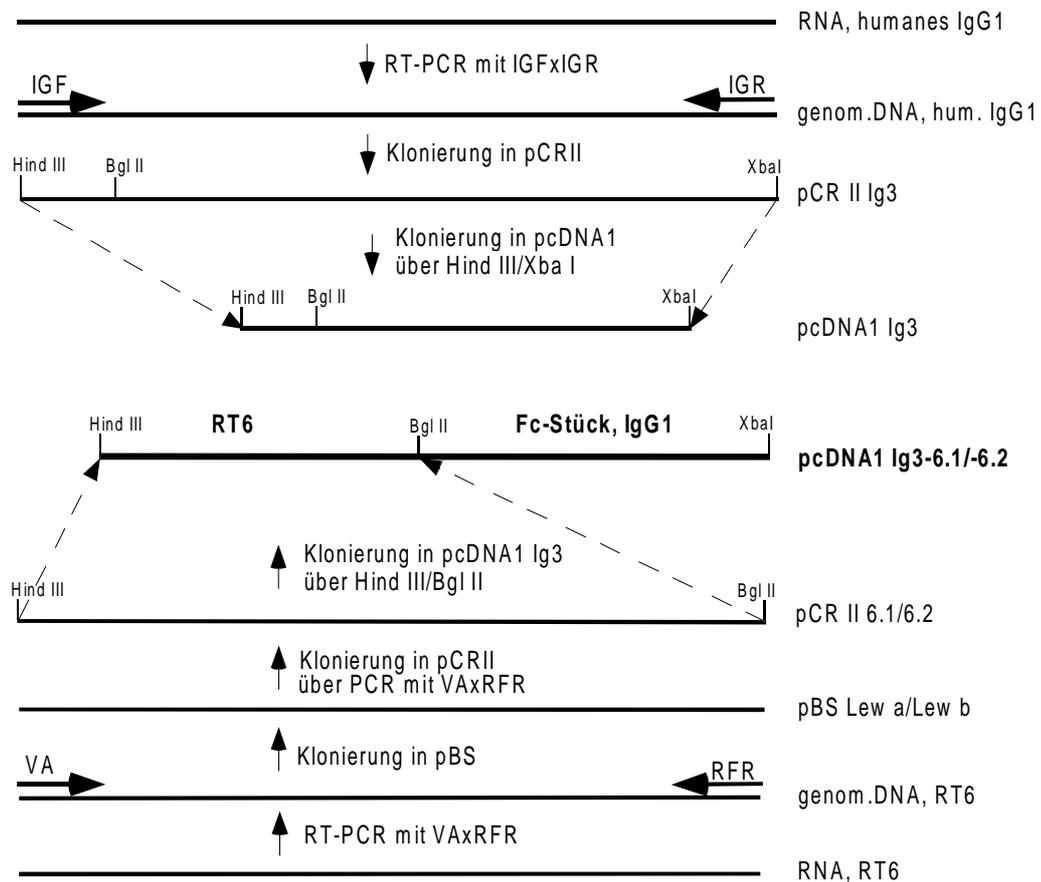
Dieses Plasmid mußte nun in das für eukaryontische Zellen geeignete Expressionsplasmid pcDNA1™ umklontiert werden.

Hierfür wurden das Plasmid pCRII Ig3 und der Expressionsvektor pcDNA1™ mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xba I verdaut. Die weitere Klonierung erfolgte ent-

sprechend 2.2.1. und 2.2.2.. So entstand der eukaryontische Expressionsvektor pcDNA1 Ig3, der das Fc-Stück des humanen IgG1 als Insert trägt.

Zwecks Einklonierung der beiden RT6 Allotypen wurde ein Restriktionsverdau des Plasmids pcDNA1 Ig3 sowie der Plasmide pCRII 6.1 (VA*RFR) und pCRII 6.2 (VA*RFR) mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bgl II durchgeführt. Die Plasmide pCRII 6.1 (VA*RFR) und pCRII 6.2 (VA*RFR) entstanden durch PCR Amplifikation mit den Primern VA und RFR aus den Plasmiden pBSLew a (VA*RE) und pBSLew b (VA*RE), welche ihrerseits durch RT-PCR Amplifikation aus RNA RT6a bzw. RT6b-exprimierender T-Lymphozyten hervorgingen. Die Klonierung erfolgte wiederum entsprechend 2.2.1. und 2.2.2..

Abbildung 4: Klonierungsstrategie RT6-Fc



Klonierungsstrategie RT6-Fc

Das Ergebnis waren die eukaryontischen Expressionsvektoren pcDNA1 Ig3-6.1 und pcDNA1 Ig3-6.2, die als Insert die Sequenz für ein Fusionsprotein aus RT 6 mit seinem Leader und dem Fc-Stück des humanen IgG1 enthält.

Eine Übersicht gibt das obige Schema zur Klonierungsstrategie des RT6-Fc Konstrukts (Abbildung 4).

3.1.2. Expression der Fusionsproteine

Nach mehrmaligem Passagieren wurden Cos7-Zellen mit den Plasmiden pcDNA1 Ig3-6.1, pcDNA1 Ig3-6.2 sowie den Kontrollplasmiden pME18 CD8Leader-Fc (=pME CD8L-Fc), pME18 CD40-Fc und pcDNA1Amp Fas-Fc, alle freundlicherweise von R. Kastelein, DNAX Research Institute, Palo Alto CA zur Verfügung gestellt, mittels Liposomen transfiziert. Von den Kontrollplasmiden kodierte pME CD8L-Fc für ein Fusionsprotein aus dem Leader des humanen CD8 und dem Fc-Stück des humanen IgG1, pME CD40-Fc für ein Fusionsprotein aus dem humanen CD40 und dem Fc-Stück des humanen IgG1 und pcDNA1Amp Fas-FC für ein Fusionsprotein aus dem Fas Antigen der Maus und dem Fc-Stück des Maus IgG2b. Die transfizierten COS7-Zellen wurden 7 (3-11) Tage in Kultur gehalten, danach erfolgte die Abnahme des Kulturüberstandes.

3.1.3. Nachweis der Fusionsproteine

Nach der Abnahme des Zellkulturüberstandes wurden die Fusionsproteine erstmals mittels Slot Blot nachgewiesen. Ein Beispiel gibt folgende Abbildung.

Abbildung 5: Fusionsproteinnachweis mittels Slot Blot

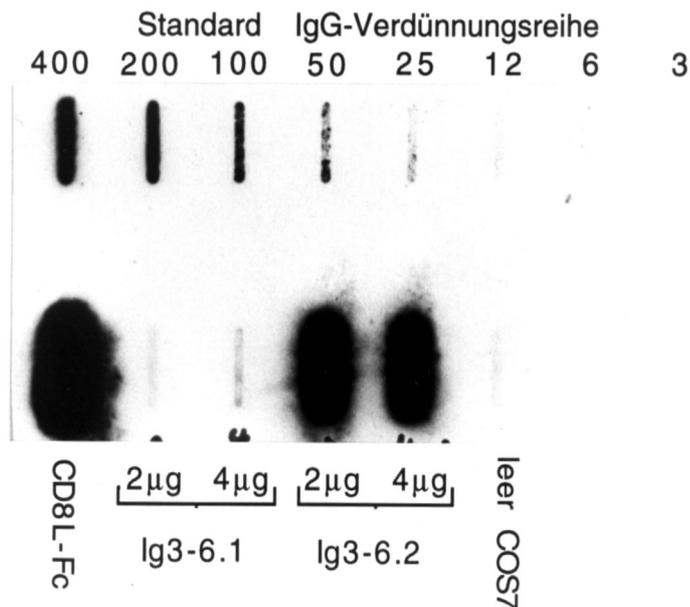


Abbildung 5

Cos7-Zellen wurden mit 2µg bzw. 4µg DNA der in 3.1.1. beschriebenen RT6-Konstrukte transfiziert. Als Kontrolle erfolgte eine Transfektion mit 2µg DNA des CD8Leader-Fc Konstrukts (3.1.2.) sowie ein untransfizierter Ansatz. Die Kultivierung erfolgte für 11d. Es wurden jeweils 100µl des Zellkulturüberstandes aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe (400ng/ml bis 3ng/ml) von humanem IgG (Standardimmunglobulin) aufgetragen. Die Detektion erfolgte durch einen mit Peroxidase konjugierten, gegen humanes IgG-Fc gerichteten Kaninchenantikörper (1:500). Entwickelt wurde mittels ECL™-System, die Exposition erfolgte für 2sec.

Man erkennt eine deutliche Reaktivität des Antikörpers mit den Überständen "CD8L-Fc", "Ig3-6.2" sowie der IgG-Verdünnungsreihe, während bei "Ig3-6.1" und dem untransfizierten Überstand keine Reaktivität zu erkennen ist. Dies läßt auf eine Expression der Fusionsproteine CD8L-Fc und RT6.2-Fc schließen, während offenbar kein RT6.1-Fc exprimiert wurde. Es zeigte sich außerdem kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Transfektionen mit 2µg Plasmid-DNA oder 4µg Plasmid-DNA, so daß ab dann nur noch mit 2µg Plasmid-DNA (pro Napf der 6-Well Plates, siehe 2.2.5.2.) transfiziert wurde. In weiteren Slot Blots von Zellkulturüberständen weiterer Transfektionen wurden diese Ergebnisse bestätigt und auch eine Expression für das Fusionsprotein CD40-Fc nachgewiesen.

Zur genaueren Analyse der Expression der Konstrukte wurden eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt.

Abbildung 6: Fusionsproteinnachweis, Western Blot

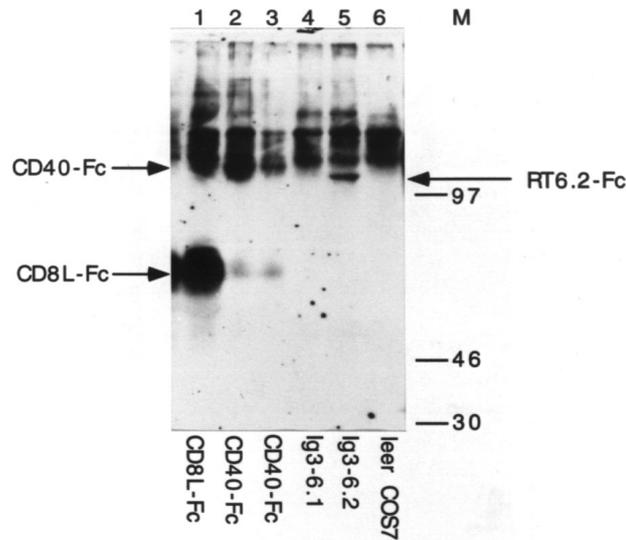


Abbildung 6

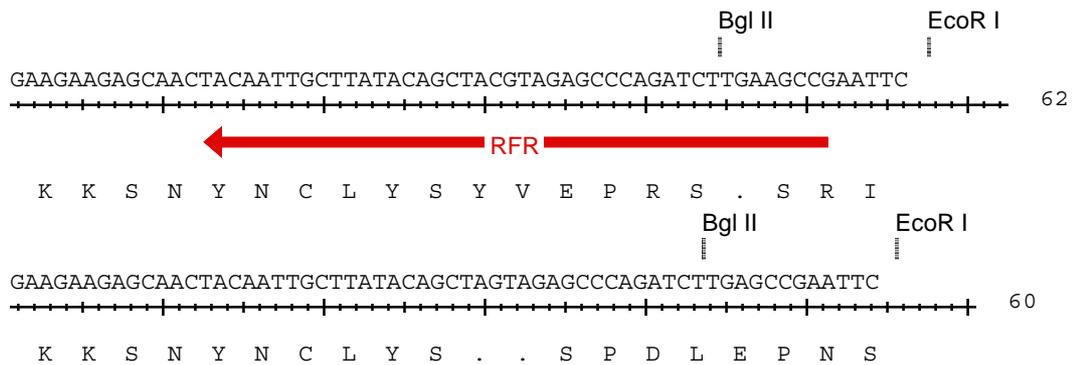
Cos7-Zellen wurden mit Plasmid-DNA der Konstrukte transfiziert und für 4d kultiviert. Als Leerkontrolle dient ein untransfizierter Ansatz. 25µl der Zellkulturüberstände wurden in der SDS-PAGE (7,5% Tris-Glycin Trenngel) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend im Western Blot dargestellt. Die Immunodetektion erfolgte in zwei Schritten: 1.AK: rabbit anti-human IgG,IgM,IgA (1:600); 2.AK: donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert(1:3000). Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, die Expositionszeit betrug 5sec. Die Positionen der detektierten Konstrukte sind durch Pfeile markiert und ein Molekulargewichtsmarker (in kD) wurde aufgetragen.

Man erkennt in der Spur 1 des CD8L-Fc Überstandes neben den höhermolekularen unspezifischen Banden, die sich auch im Überstand der nicht transfizierten Cos7-Zellen (Spur 6) finden, eine Fraktion, die in der Größe dem Fc-Stück entspricht. In den Spuren 2 und 3 des CD40-Fc Überstands zeigt sich knapp unterhalb der unspezifischen Banden eine Fraktion, deren Größe der eines Fusionsproteins CD40-Fc entspricht. Auch in der Spur 5 des Überstandes der RT6.2-Fc Transfektion ist eine von den übrigen unspezifischen Banden deutlich unterscheidbare Bande erkennbar. Sie liegt in der Höhe etwas unterhalb der dem CD40-Fc entsprechenden Bande, und entspricht damit der Größe für ein Fusionsprotein aus dem RT6, ohne Leader und GPI-Anker, mit dem Fc-Stück des humanen IgGI (siehe Abb. 1). In der Spur 4 für das RT6.1-Fc Fusionsproteins läßt sich außer der Unspezifität keine weitere Bande nachweisen, so daß sich auch hier die Ergebnisse der Slot Blots bestätigen und keine RT6.1-Fc Expression vorliegt. Den Grund hierfür zeigten Sequenzierungen der Expressionsplasmide. Bei der Sequenzierung des pcDNA1 Ig3-6.1 fand sich ein vorzeitiges Stopcodon (siehe 3.1.4.).

3.1.4. Sequenzierung der RT6-Fc Expressionsplasmide

Um Fehler in der Klonierung auszuschließen, bzw. häufig vorkommende Fehler bei der PCR/RT-PCR Amplifikation zu erkennen, wurden die Plasmide pCRII 6.1 und pCRII 6.2 sequenziert.

Abbildung 7: pCRII 6.1 und pCRII 6.2 Sequenzen



Oben: korrekte Sequenz bei pCRII 6.2.

Zusätzlich wurde der verwendete Rückwärtsprimer eingezeichnet.

Unten: 2 vorzeitige Stopcodons (..) am 3' Ende in pCRII 6.1.

Hierbei zeigte sich, daß sich in der pCRII 6.1 Sequenz am 3' Ende zwei Stopcodons befinden, so daß ein Übergang zur Fc-Sequenz und damit eine Detektion mit Antikörpern gegen das Fc-Stück unmöglich wäre. Darüberhinaus fanden sich sowohl in der pCRII 6.1 als auch in der pCRII 6.2 Sequenz weitere Punktmutationen, die bei nochmaliger Sequenzanalyse der Ausgangsplasmide pBSLew a und pBSLew b bereits in diesen Konstrukten gefunden wurden.

3.1.5. Korrektur der RT6-Fc Sequenzen

Um die korrekte RT6.1 Sequenz zu erhalten, wurde eine PCR aus genomischer DNA von Lewis (RT6.1) Ratten mit den Primern CVA und SRR durchgeführt, welche beide aus Exon 7 abgeleitet sind. Die Produkte wurden in den pCRII Vektor kloniert. Aus dem so entstandenen Plasmid pCRII Lew a (CVA*SRR) wurde mit den Restriktionsenzymen Nsi I und Mun I das RT6.1 Insert herausgeschnitten, und in den Vektor pBS Lew a (VA*RE) kloniert. Das entstandene Plasmid pBS LEW (VA*RE) enthielt nun die korrekte RT6.1 Sequenz. Es wurde nun mit Mun I und Xho I verdaut, und das Insert in den Vektor pCRII 6.2 (VA*RFR) kloniert. Das Insert des Produkts pCRII LEW (VA*RFR) wurde über die Restriktionsenzyme Hind III und Bgl II in den Vektor pcDNA1 Ig3-6.2 anstelle der

RT6.2 Sequenz einkloniert. Das Plasmid mit der nun korrekten Sequenz für ein Fusionsprotein aus RT6.1 und Fc-Stück des humanen IgG1 wurde pcDNA1 LEW-Fc genannt. Zur Sequenzkorrektur des RT6.2-Fc Konstrukts wurde das Plasmid pBS Lew b (VA*RE) benutzt. Es wurde ebenfalls mit Nsi I und Mun I verdaut, und das Insert in den Vektor pBS LEW (VA*RE) kloniert. Da sich der Aminosäureaustausch 5' der Nsi I Schnittstelle befand, enthielt das Nsi I/Mun I geschnittene Fragment, und damit das entstandene Plasmid, keinen Aminosäureaustausch mehr. Das Plasmid entsprach somit in seiner RT6.2 Sequenz der der DA Ratte und wurde folglich pBS DA (VA*RE) genannt. Es folgte entsprechend der Korrekturklonierung des RT6.1 ein Restriktionsverdau mit den Enzymen Mun I und Xho I, und die Klonierung des Inserts in den Vektor pCRII 6.2 (VA*RFR). Das Insert des Produkts pCRII DA (VA*RFR) wurde mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bgl II in den Vektor pcDNA1 Ig3-6.2 anstelle der RT6.2 Sequenz kloniert. Das Plasmid wurde pcDNA1 DA-Fc genannt. Eine Übersicht über die erfolgten Korrekturklonierungen geben die folgenden zwei Abbildungen.

Abbildung 8: Korrekturklonierung RT6.1-Fc

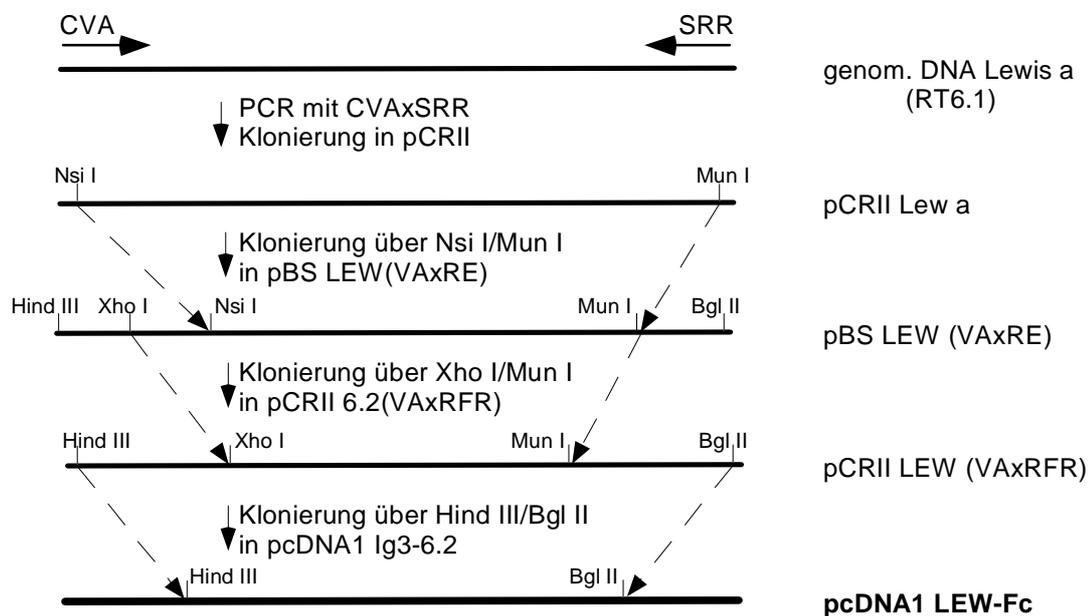
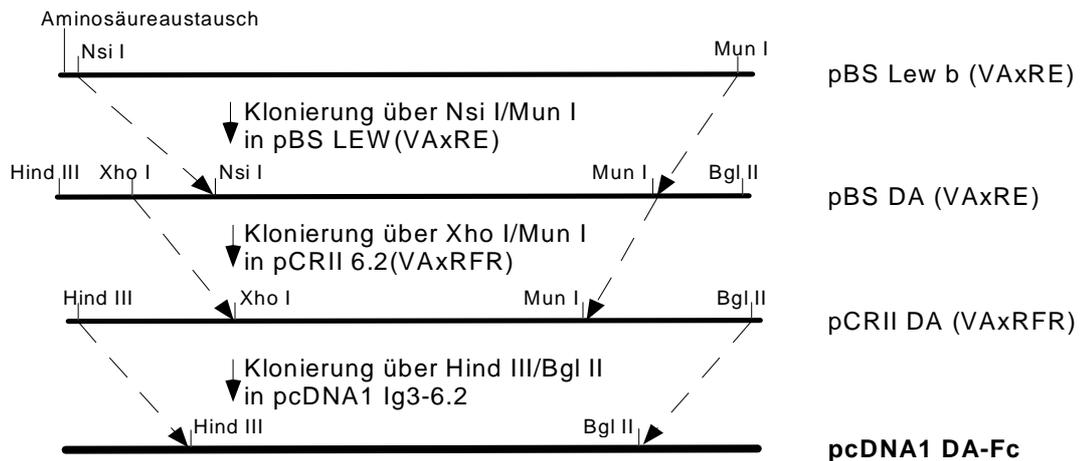


Abbildung 9: Korrekturklonierung RT6.2-Fc



Da mittlerweile mit dem Vektor pcDNA3™ ein Expressionsvektor mit verbesserten Eigenschaften, v.a. einer vereinfachten Selektion für die Vermehrung in Bakterien, zur Verfügung stand, wurden die Sequenzen beider RT6-Fc Chimären in diesen Vektor kloniert. Dazu wurde das Fc-Stück aus dem Plasmid pME18 CD40-Fc mit den Restriktionsenzymen Xba I und Xho I ausgeschnitten und in den ebenfalls mit Xho I und Xba I geschnittenen Leervektor pcDNA3™ kloniert. In dieses Plasmid, pcDNA3 Fc, konnte nun mit Hilfe der Restriktionsenzyme Hind III und Xho I das RT6 Insert der aus PCR von pBS LEW (VA*RE) bzw. pBS DA (VA*RE) mit den Primern VA und RR2 entstandenen Plasmide pCRII LEW (VA*RR2) und pCRII DA (VA*RR2) kloniert werden. Es entstanden hierdurch die Expressionsplasmide pcDNA3 Lew-Fc und pcDNA3 DA-Fc.

3.1.6. Konstruktion der Fusionsproteine Fas-Ligand-Fc, B7-Fc, CD28-Fc

Um für den späteren Einsatz der RT6-Fc Chimären in Immunfluoreszenzassays oder ähnlichen Funktionstests neben den bisherigen (Fas-Fc, CD8L-Fc, CD40-Fc) weitere Positiv- und Negativkontrollen sowie interessante Werkzeuge für weitere eigenständige immunologische Fragestellungen zu erhalten, wurden Expressionsplasmide für weitere Fusionsproteine konstruiert.

Zur Fusion mit dem Fc-Stück wurden der Fas-Ligand, das B7, das CD28 und das Thy-1 der Ratte ausgewählt. Geeignete Fragmente der entsprechenden Gene sollten durch RT-PCR aus Rattenlymphozyten bzw. der Zelllinie C58NT gewonnen werden.

Abbildung 10: Agarosegelelektrophoreseaufftrennung der RT-PCR Amplifikationen für Fas-Ligand, B7, CD28 und Thy-1

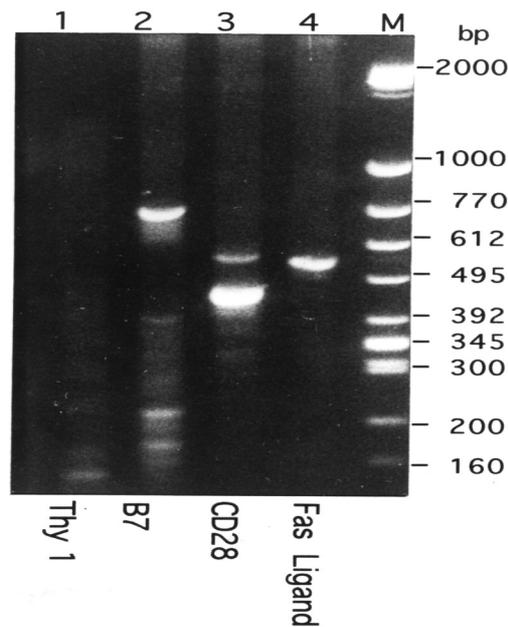


Abbildung 10

Für die RT-PCR Amplifikation des Thy-1 wurde RNA aus der Ratten T-Zelllinie C58NT benutzt. Die Amplifikationen des Fas-Ligand, B7 und CD28 erfolgten aus Lymphknoten Lymphozyten RNA von Lewis.6B Ratten. Vorgegangen wurde nach dem in 2.2.3. beschriebenen Protokoll. Die Primer waren für B7: BFF*BFR, für CD28: CFF*CFR, für Fas-Ligand: FFF*FFR und für Thy-1: TFF*TFR. Die Auftrennung erfolgte in der Agarosegelelektrophorese (1,8%, 0,5% TBE). Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in bp) aufgetragen.

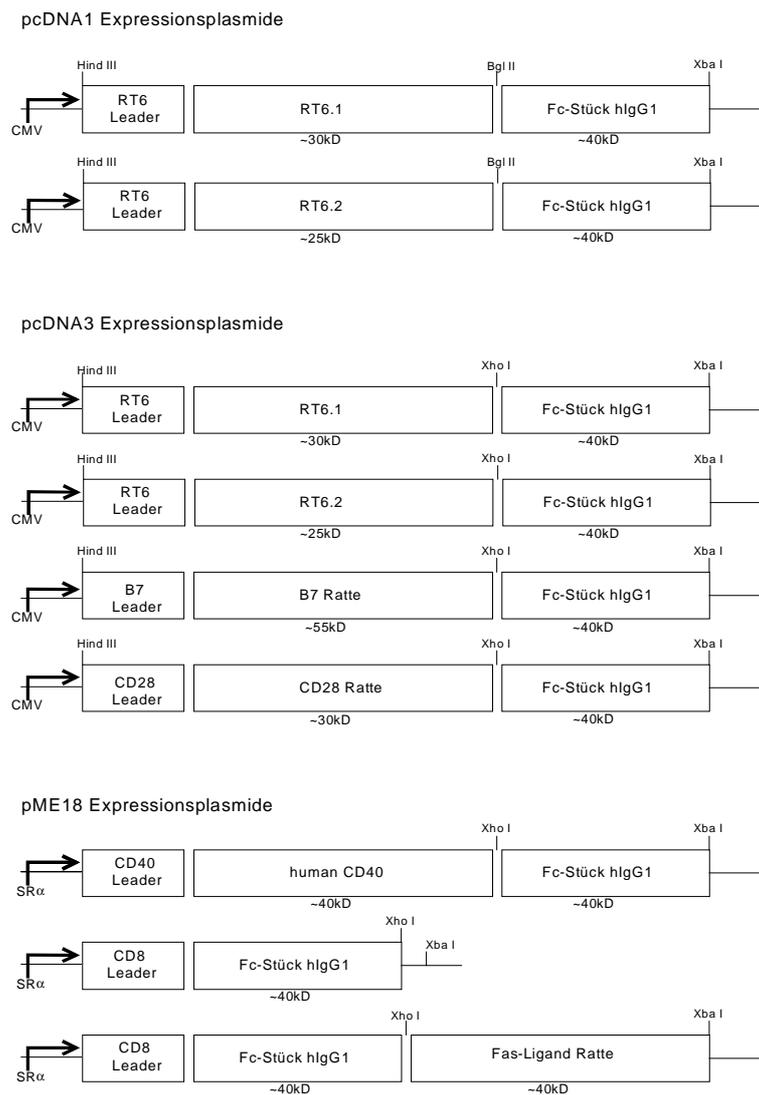
Die Abbildung 10 zeigt die Auftrennung der RT-PCR Produkte in einer Agarosegelelektrophorese. Man erkennt die für die DNA des Fas-Liganden, des B7 und des CD28 typischen Hauptbanden in erwarteter Größe, während die Bande in der Spur 1 des Thy-1 zu klein und schwach ist. Eine erneute RT-PCR einer anderen RNA-Präparation aus C58NT Zellen brachte das gleiche Ergebnis. Dies läßt darauf schließen, daß entweder die C58NT Zelllinie kein Thy1 exprimiert, die verwendeten Primer fehlerhaft waren oder die Bedingungen für die RT-PCR nicht stimmten. Das Thy-1 wurde nicht weiterverfolgt.

Nach der RT-PCR folgte die Klonierung in den pCRII™ Vektor, die Transformation kompetenter E. coli, das PCR-Screening nach positiven Klonen, die Übernachtskultur der inserthaltigen Kolonien und schließlich die DNA-Präparation. So entstanden die Plasmide pCRII FasL, pCRII B7 und pRII CD28. Diese Plasmide wurden nun mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xho I (B7 und CD28) bzw. Xba I und Xho I (Fas-Ligand) verdaut. Die Inserts B7 und CD28 wurden mit dem in 3.1.5. beschriebenen Plasmid pcDNA3 Fc ligiert. So entstanden die eukaryontischen Expressionsplasmide pcDNA3 B7-Fc und pcDNA3 CD28-Fc für Fusionsproteine aus dem B7 bzw. CD28 der Ratte und dem Fc-Stück des humanen IgG1. Für die Klonierung des Fas-Liganden als Klasse II Membranprotein wurde das Plasmid pME18 CD8L-Fc mit den Restriktionsenzymen Xba

I/Xho I verdaut und mit dem oben beschriebenen Fas-Ligand Insert ligiert. Das Ergebnis war das Expressionsplasmid pME18 FasL-Fc, kodierend für ein Fusionsprotein aus dem Fas-Liganden der Ratte und dem Fc-Stück des humanen IgG1.

Eine Übersicht über die konstruierten und verwendeten eukaryontischen Expressionsplasmide inklusive Restriktionsenzymschnittstellen, Promoter und erwarteter Proteingrößen gibt folgende Zeichnung.

Schemazeichnung eukaryontische Expressionsplasmide



3.1.7. Sequenzierung der Fusionsproteine Fas-Ligand-Fc, B7-Fc, CD28-Fc

Die Sequenzierung des Fas-Ligand-Fc zeigte für den bisher verwendeten Klon einen Fehler in der Aminosäuresequenz, während die Sequenzen des CD28-Fc und des B7-Fc korrekt waren.

3.1.8. Korrektur des Fas-Ligand-Fc Konstrukts

Da sich noch ein weiterer Klon des Fas-Liganden in Kultur befand, wurde dieser entsprechend dem ersten kloniert, und das Ergebnis der Klonierung pME FasL3-Fc genannt. Die Sequenzierung dieses Plasmids ergab eine Übereinstimmung mit den veröffentlichten Sequenzen für den Fas-Liganden.

3.1.9. Expression der korrekten Fusionsproteine

Nach mehrmaligem Passagieren von Cos7 Zellen, wurden diese mittels Liposomen oder per Elektroporation mit der DNA des entsprechenden Plasmids transfiziert, und der Überstand nach 7 Tagen Kultur geerntet.

3.1.10. Nachweis der korrekten Fusionsproteine

Der Nachweis der Expressionsprodukte aus den Konstrukten mit der korrekten Sequenz erfolgte über eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot.

Abbildung 11: Nachweis und Aufreinigungsversuch der Fas-Ligand1-Fc und B7-Fc Fusionsproteine

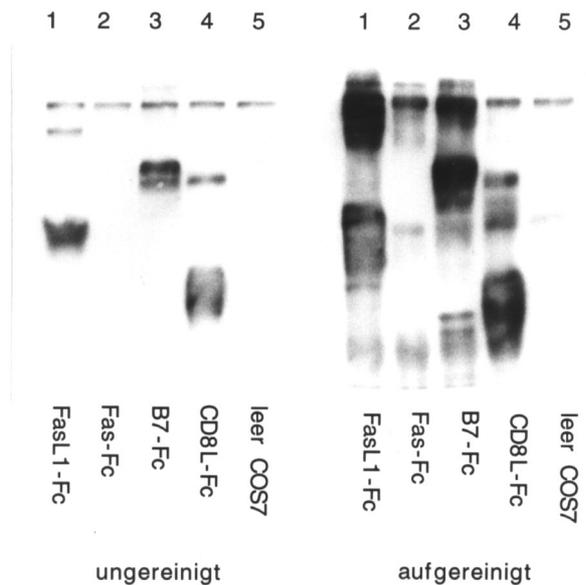


Abbildung 11

Cos7-Zellen wurden mit Plasmid DNA der Konstrukte transfiziert und für 7d kultiviert. Als Leerkontrolle dient ein untransfizierter Ansatz. Es wurden 25µl ungereinigte Überstände aufgetragen. Bei den aufgereinigten Proben wurden je 200µl Überstand mit 30µl Protein G Sepharose für 1h bei 4°C inkubiert, mit TBS gewaschen und das Pellet in Ladepuffer aufgenommen. Die Auftrennung erfolgte in 10% Tris-Glycin Trenngel unter reduzierenden Bedingungen. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper rabbit anti-hIgG-Fc (1:1000) und mit dem mit Peroxidase konjugierten 2.AK donkey anti-rabbit (1:3000). Entwickelt wurde mittels ECL™-System, die Expositionszeit betrug 1sec.

Man erkennt in den Spuren des FasL1-Fc Überstandes (Spur 1), des B7-Fc Überstandes (Spur 3) und des CD8L-Fc Überstandes (Spur 4) deutliche, sich von den unspezifischen Banden unterscheidende Banden, die auf eine Expression der genannten Fusionsproteine schließen lassen. Hierbei scheinen sowohl das Fas-Ligand1-Fc Protein als auch das CD8L-Fc Protein in zwei Fraktionen zu laufen, was eventuell auf eine unvollständige Reduktion schließen ließe. Die zweite, höhermolekulare Fraktion würde dann den jeweiligen Dimeren oder Polymeren entsprechen. Das Laufverhalten könnte jedoch auch durch unterschiedliche Glykosylierungen bedingt sein.

Die Spur des Fas-Fc Überstandes weist neben der auch in der Leerkontrolle vorkommenden Unspezifität keine weitere Bande auf, da das verwendete Detektionssystem gegen das Fc-Stück des humanen IgG1 gerichtet ist und damit Immunglobuline der Maus nicht erkennt.

Die andere Seite des Western Blots enthält die Spuren der selben Proben. Hier fand jedoch zusätzlich eine Inkubation mit Protein G Sepharose statt, mit dem Ziel einer Bindung der Fc-Stücke an das Protein G und damit einer Verstärkung der spezifischen Banden bzw. Aufreinigung der Proben. Es läßt sich zwar eine gewisse Verstärkung der spezi-

fischen Banden gegenüber den unaufgereinigten Proben zeigen, doch werden auch die Unspezifitäten konzentriert, so daß eine echte Aufreinigung nicht stattfindet.

Auch mit den RT6-Fc Fusionsproteinen erfolgte ein erster Aufreinigungsversuch.

Abbildung 12 : Nachweis und Aufreinigungsversuch der RT6-Fc Fusionsproteine

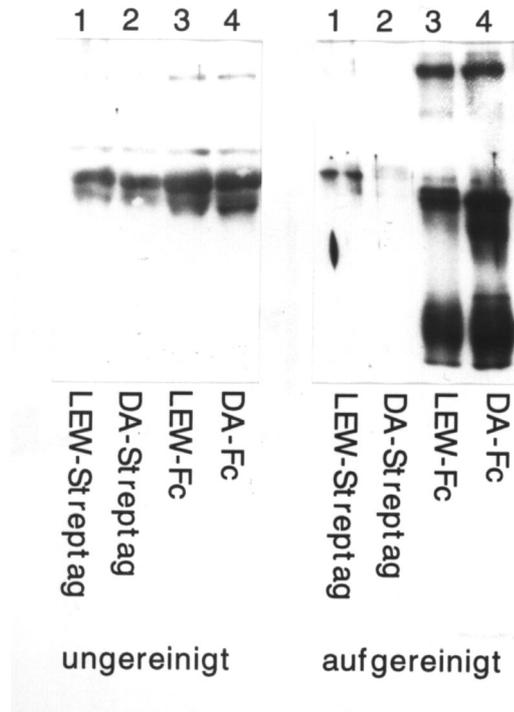


Abbildung 12

Cos7-Zellen wurden mit Plasmid DNA der Konstrukte transfiziert und für 7d kultiviert. Als Leerkontrolle dient ein untransfizierter Ansatz. Es wurden 25µl ungereinigte Überstände aufgetragen. Bei den aufgereinigten Proben wurden je 200µl Überstand mit 20µl Streptavidin Dynabeads (Spuren 1 und 2) bzw. 30µl Protein G Sepharose für 1h bei 4°C inkubiert, mit TBS gewaschen und das Pellet in Ladepuffer aufgenommen. Neben den beiden RT6-Fc Konstrukten (Spuren 3 und 4) wurden hier auch RT6-Streptag Konstrukte aufgetragen (Spuren 1 und 2), die jedoch nicht weiter verfolgt wurden. Die Auftrennung erfolgte in der SDS-PAGE (10% Tris-Glycin Trenngel) unter reduzierenden Bedingungen. Die Detektion erfolgte mit dem polyklonalen Antiserum K5(1:600) und dem mit Peroxidase konjugierten 2.AK donkey anti-rabbit (1:3000). Entwickelt wurde mittels ECL™-System, die Expositionszeit betrug 10sec.

Hier findet sich ein ähnliches Verhalten, wie es schon in der vorigen Abbildung zu sehen war. Die Hauptbanden im mittleren Bereich entsprechen den beiden RT6 Fusionsproteinen. Nach Inkubation mit Protein G Sepharose werden auch hier, neben den RT6-Fc spezifischen Banden, vor allem unspezifische Banden verstärkt. Den niedrigmolekularen Banden in Spur 3 und 4 der aufgereinigten RT6-Fc Proteine können auch vom Gesamtprotein abgespaltene Fragmente entsprechen.

Auch die Expressionsprodukte der anderen Konstrukte wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen.

Abbildung 13A: Fusionsproteinnachweis unter reduzierenden Bedingungen

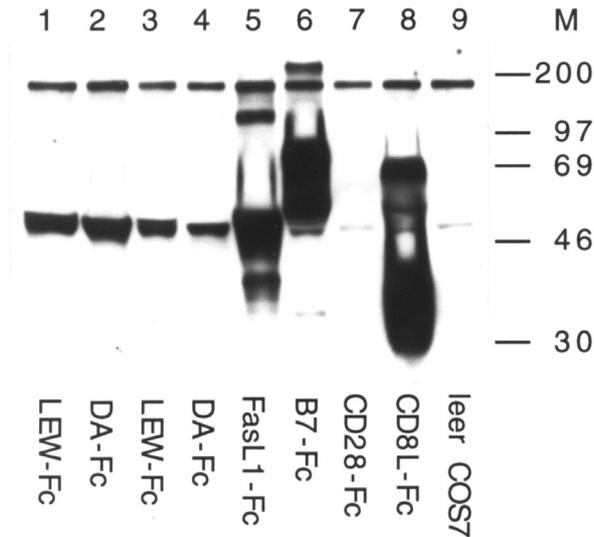
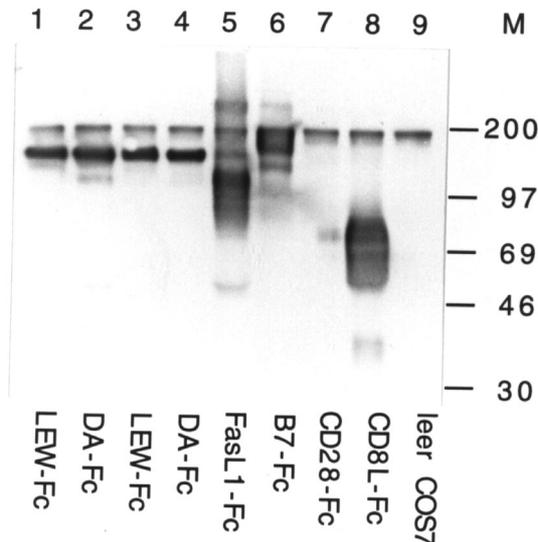


Abbildung 13B: Fusionsproteinnachweis unter nicht reduzierenden Bedingungen



Abbildungen 13A und B

Cos7-Zellen wurden mit Plasmid DNA der Konstrukte transfiziert und für 7d kultiviert. Als Leerkontrolle dient je ein untransfizierter Ansatz. Zusätzlich wurden Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Es wurden jeweils 10µl Zellkulturüberstand in der SDS-PAGE (10% Tris-Glycin Tenngel) unter reduzierenden Bedingungen (A) und unter nicht eduzierenden Bedingungen (B) aufgetrennt. Der Western Blot wurde mit den Antikörpern rabbit anti-hIgG-Fc (1:1000) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 10sec (13A) bzw. 1sec (13B).

In Abbildung 13A (reduzierende Bedingungen) erkennt man für die RT6 Fusionsproteine in den Spuren 1-4 das gleiche Verhalten wie in Abbildung 12. Auch hier zeigt sich die Expression durch das Auftreten einer Bande im mittleren Bereich bei ungefähr 50kD. Daneben findet sich ebenfalls eine unspezifische Bande in der Größe von ca. 200kD. Die Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Expressionsplasmiden pcDNA1 Lew/ pcDNA1 DA-Fc (Spuren 1 und 2) und pcDNA3 Lew/

pcDNA3 DA-Fc (Spuren 3 und 4). Der Vergleich mit der Leerkontrolle der Spur 9 läßt zwar Banden gleichen Molekulargewichts erkennen, jedoch zeigt das Verhältnis der Intensitäten der 50kD Banden zu den 200kD Banden die Spezifität der 50kD Bande in den Spuren der RT6 Fusionsproteine an. Während die 200kD Bande in allen Spuren die gleiche Intensität beibehält, ist die 50kD Bande nur in den RT6 enthaltenden Spuren deutlich stärker. Dies deutet auf ein zufälliges Zusammenfallen der allgemeinen Unspezifität bei 50kD und den spezifischen RT6-Fc Proteinen hin. In Abbildung 13B (nicht reduzierende Bedingungen) wird dies verdeutlicht. Die Unspezifitäten bei 50kD und bei 200kD bleiben, während die RT6 Fusionsproteine jetzt im hochmolekularen Bereich laufen. Ein Teil der 50kD Bande der RT6 Spuren dürfte monomeren RT6-Fc entsprechen.

Auch die Analyse der Fas-Ligand1-Fc Expression in Spur 5 zeigt das gleiche Bild wie in Abbildung 12. Unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 13A) läuft das Fusionsprotein in mehreren Fraktionen. Der Hauptteil ist ca. 50kD groß. Daneben existieren noch eine Fraktion von ca.150kD, eine von ca.40kD und eine von ca.35kD. Dies könnte durch unterschiedliche Glykosylierung der N-Glykosylierungsstellen durch die Cos-Zellen, durch Polymere der Fusionsproteine oder abgespaltene Fc-Stücke bedingt sein. Unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb. 13B) wandert das FasL1-Fc Protein in höhermolekularen Bereichen. Es zeigen sich mehrere Fraktionen zwischen 70kD und 200kD, wobei die 50kD Fraktion, ähnlich wie bei den RT6 Fusionsproteinen, erhalten bleibt.

Das B7-Fc Fusionsprotein wandert in Spur 6 unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 13A) als Hauptfraktion von ca. 75kD. Daneben existiert noch eine weitere in der Größe von >200kD, eine bei 35kD (möglicherweise dem Fc-Stück entsprechend) und eine bei ca.42kD. Unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb. 13B) verschiebt sich auch hier das Spektrum in Richtung des höhermolekularen Bereichs. Es werden jetzt Fraktionen zwischen 70kD und 200kD mit einer Hauptfraktion von ca.150kD beobachtet.

Das hier in Spur 8 mit aufgetragene CD8L-Fc zeigt ebenfalls eine deutliche Expression. Es migriert unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 13A) in zwei Hauptfraktionen, bei ca.36kD und ca. 70kD, was Monomer und Dimer entsprechen würde, mit einer Betonung des Monomers. Dies wird auch unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb. 13B) bestätigt, da hier die selben Banden erscheinen, nur daß das Verhältnis der Banden zueinander genau umgekehrt ist. Die Hauptfraktion ist hier das Dimer.

Eine Expression des CD28-Fc, die als Bande bei 70kD (reduzierend) bzw. 140kD (nicht reduzierend) in Spur 7 erwartet worden wäre, konnte nicht beobachtet werden.

Da es sich bei dem bisher nachgewiesenen FasL1-Fc um das Fusionsprotein mit der falschen Aminosäuresequenz handelte, erfolgte ein weiterer Nachweis der Fusionsproteine einschließlich des korrekten FasL3-Fc.

Abbildung 14 : Nachweis des korrekten Fas-Ligand-Fc Fusionsproteins

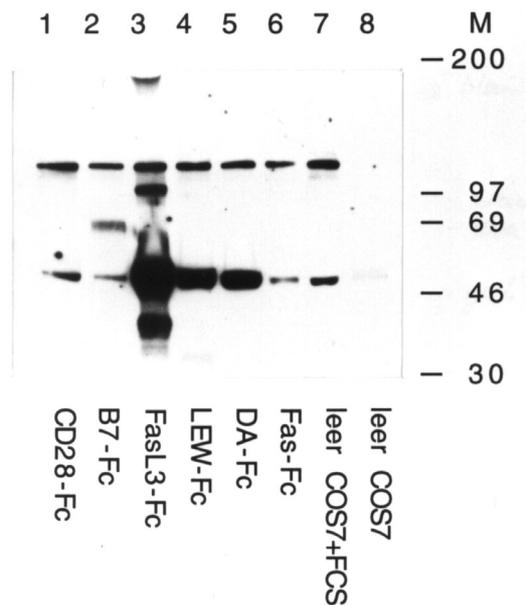


Abbildung 14

Cos7-Zellen wurden mit Plasmid DNA der Konstrukte transfiziert und für 7d kultiviert. Als Leerkontrollen dienten ein untransfizierter Ansatz in serumhaltigem (Spur 7) und serumfreiem (Spur 8) Medium. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Es wurden jeweils 10µl Zellkulturüberstand in der SDS-PAGE (10% Tris-Glycin Tenngel) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Western Blot wurde mit den Antikörpern rabbit anti-hIgG-Fc (1:1000) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 1min.

Man erkennt für die bisherigen Fusionsproteine die bereits beschriebenen Verhältnisse, wobei die B7-Fc Expression in Spur 2 hier schwächer erscheint. Auch hier läßt sich keine CD28-Fc Expression (Spur 1) nachweisen. Das korrekte FasL3-Fc Protein in Spur 3 zeigt das gleiche Verhalten wie das zuvor exprimierte FasL1-Fc in Abbildung 13A. Dies deutet darauf hin, daß der Fehler in der Aminosäuresquenz des FasL1-Fc keine Auswirkungen auf die Expression bzw. posttranslationalen Modifikationen hatte. Die RT6 Fusionsproteine in den Spuren 4 und 5 verhalten sich analog zu Abbildung 13A. Die zusätzlich mit aufgetragene Leerkontrolle in Spur 8, bestehend aus FCS freiem Überstand nicht transfizierter Cos Zellen, zeigt, daß zumindest die unspezifische 200kD Bande durch den Zusatz von fötalem Kälberserum zum Kulturmedium bedingt ist, und die unspezifische 50kD Bande zum Teil davon abhängig ist. Das Fas-Fc Protein in Spur 6 dient als weitere Leerkontrolle, da es vom eingesetzten Detektionssystem nicht erkannt wird.

3.1.11. Aufreinigung der Fusionsproteine

Nach dem Nachweis der Expressionsprodukte aller Konstrukte mit Ausnahme von CD28-Fc, erfolgte jetzt der Versuch ihrer Aufreinigung aus Cos7-Zellüberständen. Dies

geschah unter der Verwendung von Protein G Sepharose Säulen. Die Schritte der Aufreinigung wurden in SDS-PAGE und Western Blot verfolgt.

Abbildung 15 : Aufreinigung des CD8Leader-Fc Fusionsproteins

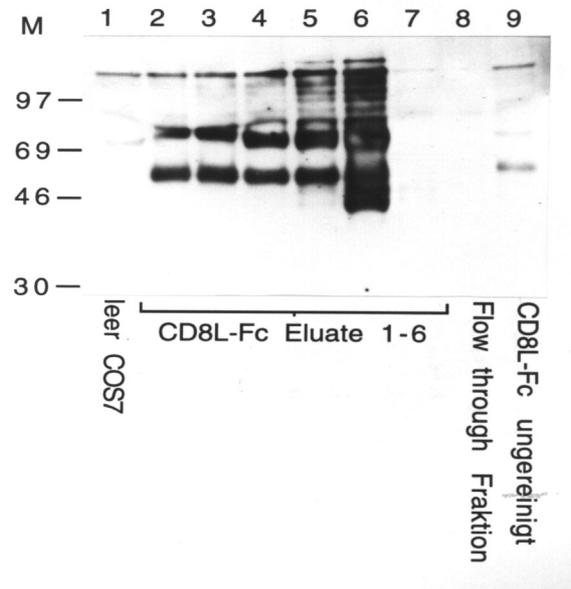


Abbildung 15

Cos7-Zellen wurden mit Plasmid DNA des CD8Leader-Fc Konstrukts transfiziert und für 10d kultiviert. 50ml Kulturüberstand wurden geerntet und auf eine vorher mit 20mM Tris pH7 äquilibrierte HiTrap™ Protein G Säule gegeben. Der Durchlauf (Flow-through) wurde aufgefangen. Nach ausgiebigem Waschen erfolgte die Elution mit 0,1M Glycin pH2,7. Die Proben wurden fraktioniert aufgefangen und mit 1M Tris pH9 neutralisiert. Je 10µl der Elutionsfraktionen sowie als Kontrollen je 10µl ungereinigter Überstand, Flow-through fraktion und untransfizierter Überstand wurden in der SDS-PAGE (10% Tricine Trenngel) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit den Antikörpern rabbit anti-hIgG-Fc (1:1000) und donkey anti-rabbit, Peroxidasekonjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 10sec.

Diese Abbildung zeigt die Aufreinigung von ca. 50ml Kulturüberstand. Man erkennt, wie es sich schon in Abbildung 11 und 12 andeutete, eine im Vergleich zur unaufgereinigten Probe deutliche Intensitätszunahme aller Banden ab Elutionsfraktion 2 (Spur 6), jedoch wird die unspezifische 50kD Bande verhältnismäßig stärker konzentriert als die anderen- besonders im Verhältnis zur spezifischen 36kD Bande. Die sogenannte Flow-through Fraktion in Spur 8 enthält kein nachweisbares Protein mehr, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Säule das gesamte Protein gebunden hat.

Um noch mehr Elutionsschritte durchführen und auch die Waschfraktionen auftragen zu können, wurde eine größere Säule und ein größeres SDS-Polyacrylamidgel (reduzierend) verwendet.

Abbildung 16 : Aufreinigung des CD8Leader-Fc Fusionsproteins

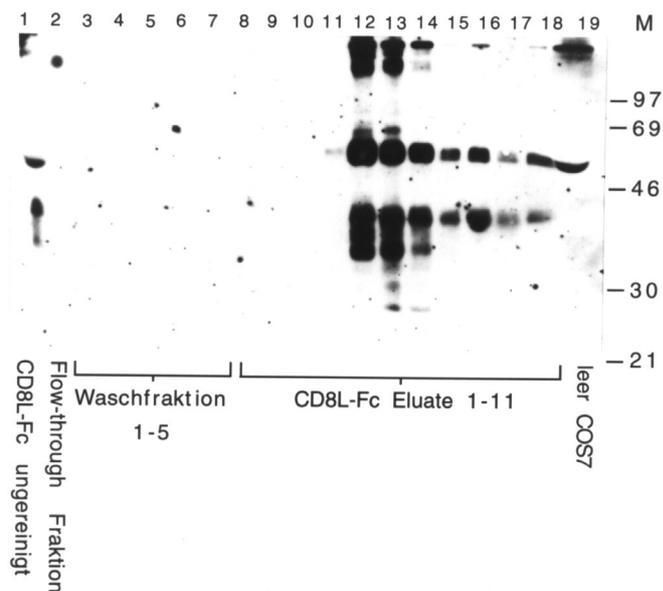


Abbildung 16

Cos7-Zellen wurden mit Plasmid DNA des CD8Leader-Fc Konstrukts transfiziert und für 10d kultiviert. 50ml Kulturüberstand wurden geerntet und auf eine vorher mit Natriumphosphat (20mM, pH7) äquilibrierte Protein G 4FastFlow™ Säule gegeben. Der Durchlauf (Flow-through) wurde aufgefangen. Nach ausgiebigem Waschen erfolgte die Elution mit 0,1M Glycin pH2,7. Die Proben wurden fraktioniert aufgefangen und mit 1M Tris pH9 neutralisiert. Die Waschfraktionen wurden ebenso aufgefangen. Je 25µl der Elutionsfraktionen sowie als Kontrollen je 25µl ungereinigter Überstand, Flow-through fraktion, Waschfraktionen und untransfizierter Überstand wurden in der SDS-PAGE (12% Tris-Glycine Trenngel) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit den Antikörpern rabbit anti-hIgG-Fc (1:1000) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 30sec.

Auch hier zeigt sich die, verglichen mit dem unaufgereinigten Kulturüberstand, stärkere Konzentrierung der unspezifischen Bande bei 50kD in den Eluaten 5-11 (Spur 12-18). Die Flow-through Fraktion in Spur 2 enthält wiederum kein Protein, und das an die Säule gebundene Protein läßt sich durch die Waschschrte (Spur3-7) nicht ablösen.

Auffällig sind die in den Elutionsfraktionen 5-7 (Spur 12-14) auftretenden Banden zwischen 25kD und 35kD. Es könnte sich hierbei am wahrscheinlichsten um Abbauprodukte von Proteinasen handeln.

Als nächstes wurde Kulturüberstand einer FasL1-Fc Transfektion mittels der größeren Säule aufgereinigt.

Abbildung 17 : Aufreinigung des Fas-Ligand-Fc Fusionsproteins

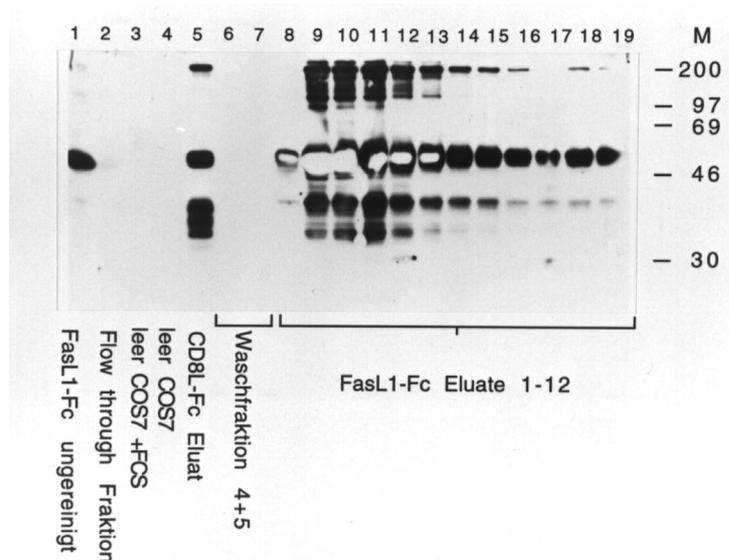


Abbildung 17

Cos7-Zellen wurden mit Plasmid DNA des FasL1-Fc Konstrukts transfiziert und für 10d kultiviert. 50ml Kulturüberstand wurden geerntet und auf eine vorher mit Natriumphosphat (20mM, pH7) äquilibrierte Protein G 4FastFlow™ Säule gegeben. Der Durchlauf (Flow-through) wurde aufgefangen. Nach ausgiebigem Waschen erfolgte die Elution mit 0,1M Glycin pH2,7. Die Proben wurden fraktioniert aufgefangen und mit 1M Tris pH9 neutralisiert. Die Waschfraktionen wurden ebenso aufgefangen. Je 20µl der Elutionsfraktionen sowie als Kontrollen je 20µl ungereinigter Überstand, Flow-through fraktion, Waschfraktionen, CD8L-Fc Eluat sowie je 10µl untransfizierter Überstand in serumfreiem und serumhaltigem Medium wurden in der SDS-PAGE (12% Tris-Glycine Trenngel) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit den Antikörpern rabbit anti-IgG-Fc (1:1000) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 2min.

Die Flow-through Fraktion in Spur 2 zeigt eine geringe Reaktivität, was auf eine leichte Überladung der Säule hinweist. Auch hier ließ sich kein Protein von der Säule waschen (Spur 6 und 7). Bei den Eluaten 2 bis 8 in den Spuren 9-15 erkennt man eine deutliche Intensitätszunahme der FasL1-Fc spezifischen Banden. Sowohl die Hauptbande bei 50kD als auch die weiteren Anteile bei ca. 150kD, 40kD und 35kD werden konzentriert. Die weißen Flecke innerhalb der 50 kD Bande sind als Überstrahlungsphänomen bei sehr großer Reaktivität zu werten, da sich dort zusätzlich die unspezifische 50kD Bande darstellt. Zum Vergleich sind noch die gleiche Menge CD8L-Fc Eluat in Spur 5 und unaufgereinigter, untransfizierter Cos Zellüberstand mit und ohne FCS in den Spuren 3 und 4 aufgetragen. In den Leerspuren stellen sich diesmal keine unspezifischen Banden dar. Die Aufreinigung des B7-Fc Proteins zeigt die folgende Abbildung.

Abbildung 18 : Aufreinigung des B7-Fc Fusionsproteins

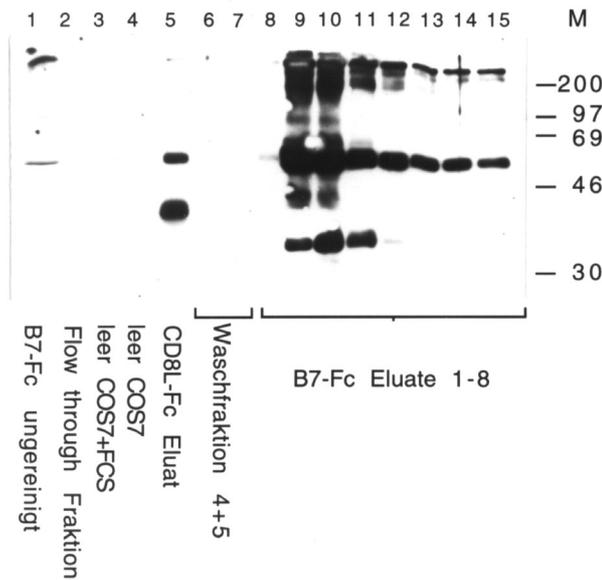


Abbildung 18

Cos7-Zellen wurden mit Plasmid DNA des B7-Fc Konstrukts transfiziert und für 10d kultiviert. 50ml Kulturüberstand wurden geerntet und auf eine vorher mit 20mM Tris pH7 äquilibrierte HiTrap™ Protein G Säule gegeben. Der Durchlauf (Flow-through) wurde aufgefangen. Nach ausgiebigem Waschen erfolgte die Elution mit 0,1M Glycin pH2,7. Die Proben wurden fraktioniert aufgefangen und mit 1M Tris pH9 neutralisiert. Je 20µl der Elutionsfraktionen sowie als Kontrollen je 20µl ungeringigter Überstand, Flow-through fraktion, Waschfraktionen, CD8L-Fc Eluat sowie je 10µl untransfizierter Überstand in serumfreiem und serumhaltigem Medium wurden in der SDS-PAGE (12% Tris-Glycine Trenngel) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit den Antikörpern rabbit anti-hIgG-Fc (1:1000) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 2min.

Die am selben Tag unter den selben Bedingungen durchgeführte Aufreinigung von B7-Fc Transfektionsüberstand ist hier zu sehen. Die Spur 1 des unaufgereinigten Kulturmediums zeigt, daß darin kaum B7-Fc enthalten war. Die für reduzierende Bedingungen typische 75kD Bande fehlt, auch die 35kD Bande ist nicht erkennbar. Lediglich die Bande >200kD tritt in Erscheinung. Demzufolge trat auch keine Überladung der Säule auf (Spur2). Die Waschfraktionen in den Spuren 6 und 7 blieben ebenso leer. Ab Eluat 2 in Spur 9 zeigt sich eine deutliche Intensitätszunahme der Banden. Besonders tritt die schon in der unaufgereinigten Probe deutliche 50kD Unspezifität hervor, aber es treten zudem die vorher unsichtbaren B7-Fc typischen Banden bei 75kD (ab Eluat 2 in Spur 9) und 35kD (Eluat 2 bis 4, Spur 9-11) auf. Die in Abbildung 13A nur schwach zu erkennende Bande bei ca. 42kD erscheint in Eluat 2 und 3 (Spur 9 und 10). Die Bande >200kD ist in Eluat 2 bis 5 (Spur 9-12) zu erkennen.

Diese bisherigen Aufreinigungsergebnisse sind in den Abbildungen 19A zusammengefaßt und durch eine Darstellung unter nicht reduzierenden Bedingungen (19B) ergänzt.

Abbildung 19A: Aufreinigung der Fusionsproteine FasL1-Fc, B7-Fc und CD8L-Fc unter reduz. Bedingungen

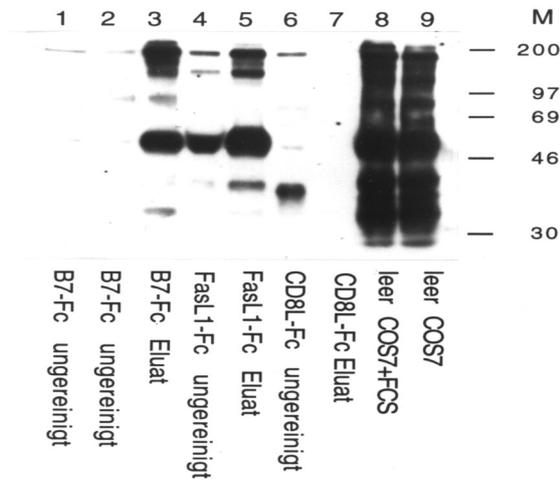
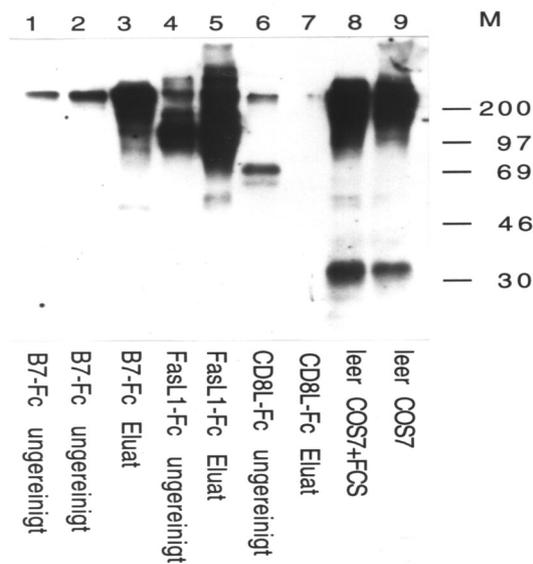


Abbildung 19B: Aufreinigung der Fusionsproteine FasL1-Fc, B7-Fc und CD8L-Fc unter nicht reduz. Bedingungen



Abbildungen 19A und 19B

Die in der SDS-PAGE (10% Tris-Glycin Trenngel) unter reduzierenden (19A) und nicht reduzierenden (19B) Bedingungen aufgetrennten Proben entsprechen denen der Abbildungen 15-18. Von den ungerinigten Überständen wurden jeweils 15µl und von den Eluaten 5µl aufgetragen. Als Leerkontrollen dienten je 200µl Überstand eines untransfizierten Ansatzes in serumhaltigem (Spur 8) und serumfreiem (Spur 9) Medium, die mit je 30µl Protein G gereinigt wurden. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit den Antikörpern rabbit anti-hIgG-Fc (1:1000) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 5sec

Für die B7-Fc Aufreinigung (Spur 1-3) unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 19A) erkennt man, daß sie vornehmlich die beiden unspezifischen Banden bei 50kD und

200kD betrifft, während die spezifische 75kD Bande verglichen mit der unaufgereinigten Probe in Spur 1 nahezu gleich stark erscheint. Zu berücksichtigen ist hierbei die 150kD Bande, die für eine unvollständige Reduktion spricht.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb. 19B) ergibt sich ein entsprechendes, wegen der Ballung im höhermolekularen Bereich, kaum von den Leerproben der Spuren 8 und 9 unterscheidbares Bild.

Das Bild der Aufreinigung des FasL1-Fc in den Spuren 4 und 5 unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 19A) wurde bereits in Abbildung 17 besprochen. Unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb. 19B) erkennt man, daß die Aufreinigung hier offenbar spezifischer war und weniger die unspezifischen Banden betraf, als das bei der B7-Fc Aufreinigung der Fall war.

Bei der Betrachtung der CD8L-Fc Spuren 6 und 7 fällt auf, daß kein CD8L-Fc Eluat nachweisbar ist. Dieses Phänomen, das später bei der RT6-Fc Aufreinigung erneut auftrat, blieb unerklärbar. Möglicherweise spielen hier proteolytische Abbauvorgänge oder Schwankungen des pH Wertes eine Rolle, die zur Degradierung des Proteins führten.

Die Behandlung der untransfizierten Cos7-Zellüberstände mit Protein G Sepharose zeigt, wieviel unspezifisches Protein des Mediums bzw. als Produkt der Zellen sich hierdurch binden und konzentrieren läßt und dadurch für Probleme bei der Aufreinigung der Fusionsproteine sorgt. Dabei scheint es zumindest in dieser Abbildung keinen Unterschied zu machen, ob FCS zum Medium dazu gegeben wurde oder nicht.

Da das bisher aufgereinigte FasL1-Fc dasjenige mit dem Fehler in der Aminosäuresequenz war, erfolgte nun die Aufreinigung von Kulturüberstand, der das korrekte Fusionsprotein enthielt. Die Aufreinigung erfolgte mittels der HiTrap™ Protein G Säule. Da die bisherige B7-Fc Aufreinigung unbefriedigend war, wurde sie ebenfalls mit der HiTrap™ Protein G Säule wiederholt. Die Auftrennung erfolgte für das FasL1-Fc unter nicht reduzierenden und für das B7-Fc unter reduzierenden Bedingungen, da sich dann die für die Fusionsproteine typischen Banden deutlicher von den unspezifischen unterscheiden lassen.

Abbildung 20A: Aufreinigung des korrekten FasL3-Fc Fusionsproteins

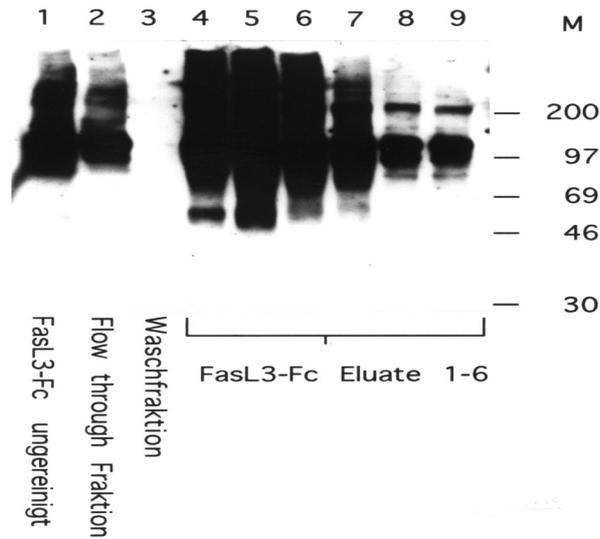
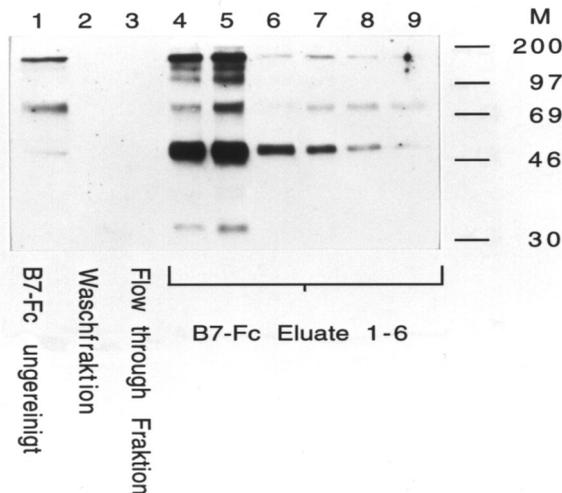


Abbildung 20B: Aufreinigung des B7-Fc Fusionsproteins



Abbildungen 20A und 20B

Cos7-Zellen wurden mit Plasmid DNA der FasL3-Fc (20A) und B7-Fc (20B) Konstrukte transfiziert und für 10d kultiviert. Je 50ml Kulturüberstand wurden geerntet und auf vorher mit 20mM Tris pH7 äquilibrierte HiTrap™ Protein G Säulen gegeben. Der Durchlauf (Flow-through) wurde aufgefangen. Nach ausgiebigem Waschen erfolgte die Elution mit 0,1M Glycin pH2,7. Die Proben wurden fraktioniert aufgefangen und mit 1M Tris pH9 neutralisiert. Je 5µl der Elutionsfraktionen sowie als Kontrollen 10µl (FasL-Fc 5µl) ungereinigter Überstand, 10µl Flow-through fraktion und 10µl Waschfraktion wurden in der SDS-PAGE (10% Tris-Glycine Trenngel) unter nicht reduzierenden (20A) und reduzierenden (20B) Bedingungen aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit den Antikörpern rabbit anti-hIgG-Fc (1:1000) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 5sec.

Das korrekte FasL3-Fc (Abb. 20A) läßt sich gut aufreinigen und zeigt das gleiche Verhalten wie das bisherige FasL1-Fc. Das Auftauchen von Protein in der Flow-through Fraktion (Spur 2) deutet auf eine Überladung der Säule hin.

Die erneute B7-Fc Aufreinigung (Abb. 20B) zeigt trotz anderer Säule und neuer Transfektion kein besseres Ergebnis als bisher. Der Hauptteil des aufgereinigten Proteins be-

steht aus der unspezifischen 50kD Bande, während die spezifische 75kD Bande selbst unter Berücksichtigung der 150kD Fraktion nur unwesentlich stärker ist als im unaufgereinigten Überstand.

Die Aufreinigung der RT6-Fc Fusionsproteine erfolgte ebenfalls mit der HiTrap™ Protein G Säule.

Abbildung 21A: Aufreinigung des RT6.1-Fc Fusionsproteins

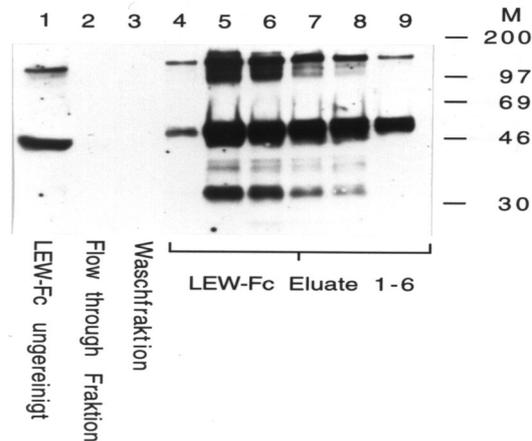
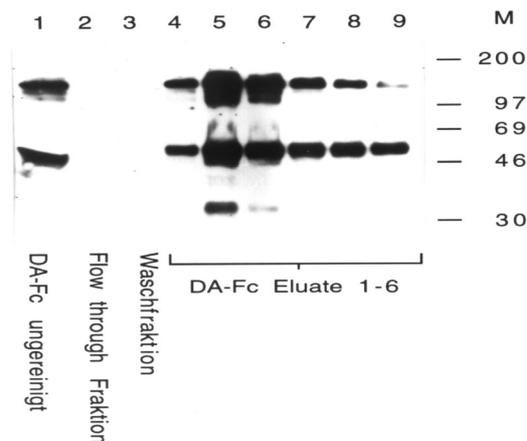


Abbildung 21B: Aufreinigung des RT6.2-Fc Fusionsproteins



Abbildungen 21A und 21B

Cos7-Zellen wurden mit Plasmid DNA der Lew-Fc (21A) und DA-Fc (21B) Konstrukte transfiziert und für 10d kultiviert. Je 50ml Kulturüberstand wurden geerntet und auf vorher mit 20mM Tris pH7 äquilibrierte HiTrap™ Protein G Säulen gegeben. Der Durchlauf (Flow-through) wurde aufgefangen. Nach ausgiebigem Waschen erfolgte die Elution mit 0,1M Glycin pH2,7. Die Proben wurden fraktioniert aufgefangen und mit 1M Tris pH9 neutralisiert. Je 5µl der Elutionsfraktionen sowie als Kontrollen 10µl unaufgereinigter Überstand (Spur 1), 10µl Flow-through fraktion (Spur 2) und 10µl Waschraktion (Spur 3) wurden in der SDS-PAGE (10% Tris-Glycine Trenngel) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit den Antikörpern rabbit anti-hIgG-Fc (1:1000) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 15sec.

Bei der Aufreinigung der RT6-Fc Fusionsproteine fällt die Anreicherung der 50kD Bande auf. Diese ist in den Eluaten 2 bis 5 (Spuren 5-8 in Abb. 21A) für Lew-Fc und in den Eluaten 2 und 3 (Spur 5 und 6 in Abb. 21B) für DA-Fc besonders deutlich. Da auch die

als unspezifisch anzusehende 200kD Bande verstärkt wird, ist davon auszugehen, daß auch in dieser Aufreinigung zumindest ein Teil der 50kD Bande der Unspezifität zuzurechnen ist. Wie bereits in den Abbildungen 18 bis 20 bei der Aufreinigung der B7-Fc Fusionsproteine zu sehen war, erscheinen auch hier, besonders bei den Lew-Fc Eluaten, Banden mit dem gleichen Muster in der Größe zwischen ca. 35KD bis ca.42KD. Hierbei könnte es sich wiederum um Abbauprodukte von Proteinasen oder um abgespaltene Fc-Stücke handeln.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nur die Aufreinigungen des FasL-Fc und des CD8L-Fc Fusionsproteins befriedigende Ergebnisse gebracht haben. Bei den RT6-Fc Aufreinigungen war die Anreicherung nicht so stark, außerdem erschwerte die Größengleichheit der spezifischen und unspezifischen Banden die Interpretation. Die B7-Fc Aufreinigung betraf dagegen die unspezifischen Banden zu einem größeren Teil als die spezifischen, so daß hier von einer Aufreinigung im eigentlichen Sinne nicht gesprochen werden konnte.

Allgemeine Schwierigkeit bei der Aufreinigung war, daß das verwendete Protein G offenbar nicht spezifisch genug die Fc-Stücke aus dem Medium band, sondern eine zum Teil höhere Affinität zu unspezifischen Bestandteilen des Mediums oder Syntheseprodukten der Cos7-Zellen besaß. Die Herkunft dieser unspezifischen Bestandteile konnte letztlich nicht geklärt werden. Inwieweit allerdings diese Unspezifität einen störenden Einfluß beim Einsatz der Konstrukte hat, ist ebenso fraglich.

3.1.12. Funktionsuntersuchung der Fusionsproteine

Mit den aufgereinigten RT6-Fc Fusionsproteinen wurde zwecks Analyse der NADase- und ADPR-Transferase-Aktivitäten ein Enzymassay (siehe 2.2.11.) durchgeführt. Als Vergleich dienten unaufgereinigte Cos7-Zellkulturüberstände sowie RT6 haltige Periplasmalysate der ab 3.1.2. beschriebenen prokaryontischen RT6 Expression.

Zum Nachweis der NADase-Aktivität wurde nach Markierung der Proben mit je 10 μ Ci 32 P-NAD $^{+}$ und Bindung aller Proteine an eine Matrix (Strataclean Resin TM) der Reaktionsüberstand in einer Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Bei Vorhandensein von NADase-Aktivität dürfte sich im Reaktionsüberstand kein oder nur wenig NAD nachweisen lassen, sondern stattdessen das Produkt der Reaktion ADPR.

Abbildung 22: Untersuchung der NADase Aktivität der RT6-Fc Fusionsproteine

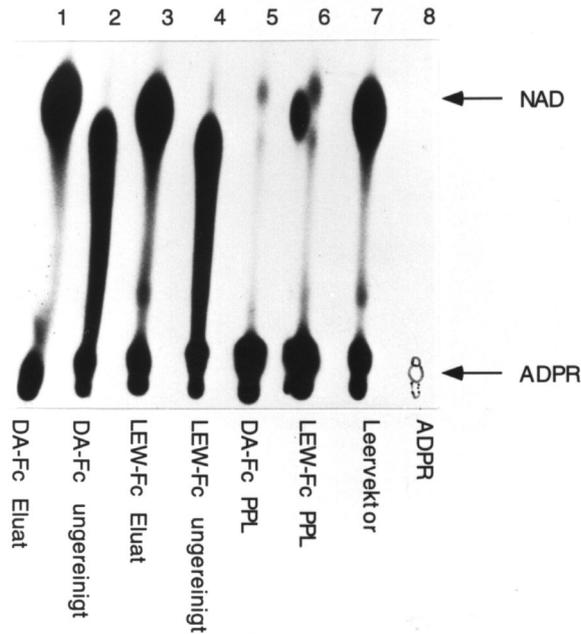


Abbildung 22

Je $\frac{1}{2}\mu\text{l}$ RT6- und pask60 Leervektor-Periplasmalysate, sowie je $30\mu\text{l}$ ungereinigte RT6-Fc Überstände und je $15\mu\text{l}$ RT6-Fc Eluate wurden mit PBS(+Ca/Mg) auf $50\mu\text{l}$ aufgefüllt und mit je $10\mu\text{Ci}$ ^{32}P -NAD⁺ für 30min bei 37°C inkubiert. Nach der Proteinfällung mit je $10\mu\text{l}$ Strataclean ResinTM wurde je $1\mu\text{l}$ Überstand abgenommen und zusammen mit den Markern NAD und ADPR auf eine PEI-Dünnschichtchromatographieplatte getropft. Nach Trocknung der Proben erfolgte der Lauf zunächst in 1M Essigsäure und in 0,9M Essigsäure und 0,3M LiCl, wenn die Lauffront 3cm die Probenauftragstelle passiert hat. Nach Trocknen der Platte erfolgte die Exposition für 18h bei -80°C . Die Position von NAD und ADPR ist durch Pfeile markiert.

Man erkennt anhand des Vergleichs mit den Markern NAD und ADPR, daß bei den beiden RT6 Periplasmalysaten Lew-PPL und DA-PPL (siehe auch 3.2.) in Spur 5 und 6 ein gegenüber der Leerkontrolle pask 60 PPL (Periplasmalysat mit Leervektor transformierter Bakterien) in Spur 7 vermehrter Umsatz von NAD zu ADPR stattgefunden hat.

Bei den unaufgereinigten RT6-Fc Überständen in Spur 2 und 4 erkennt man ebenfalls einen Abbau des NAD. Es findet sich aber kein vermehrter Umsatz zu ADPR, vielmehr deutet das Bild auf einen Abbau des NAD zu AMP hin.

Die aufgereinigten RT6-Fc Überstände in Spur 1 und 3 zeigen keinerlei Unterschied bezüglich des NAD Umsatzes zur Leerkontrolle.

Die Auftrennung der an die Matrix gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot erklärt das Fehlen von NAD Umsatz bei den aufgereinigten RT 6-Fc Fusionsproteinen.

Abbildung 23: Proteinnachweis

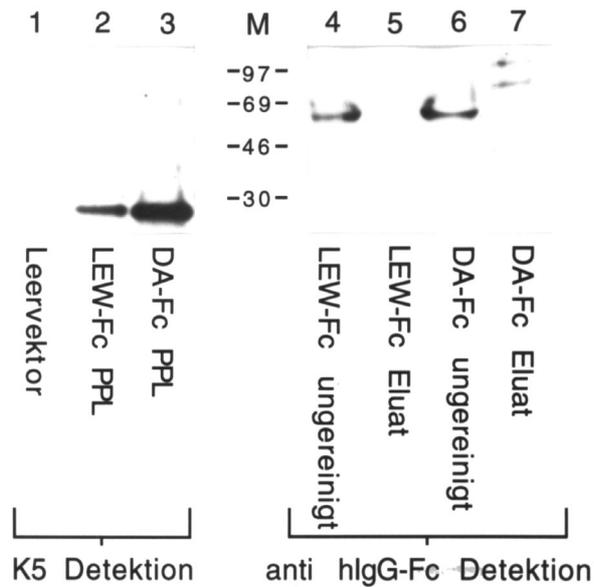


Abbildung 23

Die in Abbildung 22 beschriebenen Proteinfällungen wurden je dreimal mit PBS gewaschen und in Lade-puffer aufgenommen. Die Auftrennung in der SDS-PAGE (10% Tricine Trenngel) erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit den Erstantikörpern K5 (1:600, Spur 1-3) und rabbit anti-hIgG-Fc (1:1000, Spur 4-7) und dem Zweitantikörper donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 10sec.

In der Spur 5 des Lew-Fc Eluats läßt sich kein Protein nachweisen. In der Spur 7 des DA-Fc Eluats taucht eine bis dahin unbekannte Doppelbande auf, RT6 spezifische Banden fehlen auch hier. Diese Beobachtung ähnelt der in Abbildung 19 beim CD8L-Fc beschriebenen.

Die Spuren 2 und 3 der bakteriell hergestellten RT6 Proteine weisen die für sie typischen Banden auf. In der Leerspur 1 läßt sich erwartungsgemäß kein Protein nachweisen.

Die für das RT6.2 bekannte Auto-ADPribosylierung wurde anhand der Autoradiographie des Western Blots überprüft.

Abbildung 24: ADP-Ribosyltransferaseaktivität der RT6-Fc Fusionsproteine

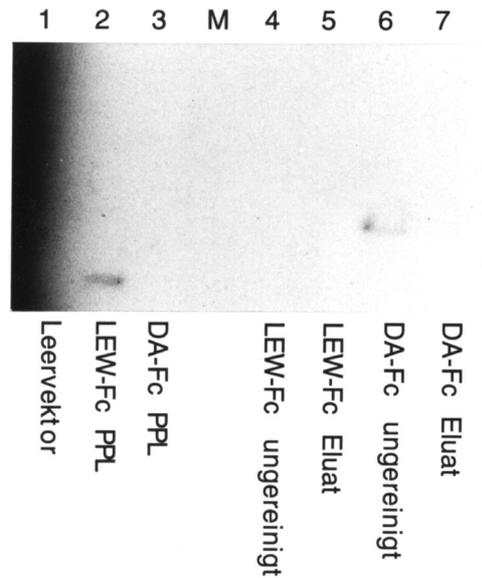


Abbildung 24

Der in Abbildung 23 beschriebene Western Blot wurde zwecks Ausschaltung der Restlumineszenz mit schwarzer Pappe abgedeckt und für 7d bei -80°C exponiert.

Die in der Spur 6 des unaufgereinigten DA-Fc Fusionsproteins erkennbare Bande ist mit der entsprechenden Bande der Immunodetektion in Abbildung 23 deckungsgleich. Dies spricht für die oben beschriebene Selbstmodifikation des RT6.2 im unaufgereinigten Zellkulturüberstand. Bei dem aufgereinigten DA-Fc Eluat in Spur 7 ist keine Bande zu erkennen. Hier findet also auch keine Automodifikation statt.

Die weiterhin erkennbare Bande in Spur 2 ist mit der des Lew-PPL aus Abbildung 23 deckungsgleich. Dies ist nur durch eine Verwechslung der Proben Lew-PPL und DA-PPL beim Laden des SDS-Polyacrylamidgels zu erklären, da bisher keine derart deutlichen Auto-ADP-ribosylierungen von RT6.1 beobachtet wurden, und die hier aufgetragenen Periplasmalysate mehrfach das schon beschriebene Verhalten der RT6.2 Modifikation zeigten, ohne daß sich eine signifikante Automodifikation des RT6.1 gezeigt hätte.

3.2. Expression rekombinanter RT6 Formen in prokaryontischen Systemen und Funktionsuntersuchung

3.2.1. Konstruktion der prokaryontischen Expressionsplasmide

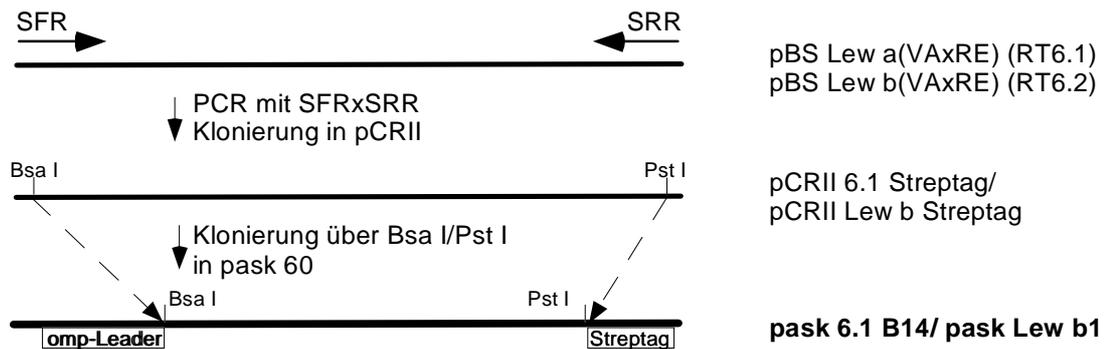
Ziel war die Konstruktion eines Plasmids, das die Expression von RT6 als sezerniertes, lösliches Protein in *E. coli* ermöglichte. Hierzu wurde das StreptagTM-System (Biometra, Göttingen) mit dem Expressionsplasmid pask 60TM ausgewählt. Dabei wird die entsprechende cDNA N-terminal mit einem künstlichen omp-Leader (outer membrane protein) versehen. Dieser Leader dirigiert den Transport des Proteins in den periplasmatischen Spalt des Bakteriums, aus dem es dann präpariert werden kann. Zusätzlich wird C-terminal eine Sequenz von 10 Aminosäuren angehängt (Streptag), die von Streptavidin erkannt und gebunden wird und somit dem Nachweis bzw. der Aufreinigung dienen kann. Die Expression unterliegt in diesem System der Kontrolle durch einen Promotor, der die Induktion der Synthese mittels des Galaktoseanalogons IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid) erlaubt. In Abwesenheit von IPTG erfolgt somit lediglich eine basale Expression.

Es wurde nun eine PCR von den in 3.1.1. und 3.1.5. beschriebenen Plasmiden pBS Lew a (VA*RE) und pBS Lew b (VA*RE) mit fusiogenen Primern (SFR und SRR), die in die RT6 Sequenz die Restriktionsenzymstellen Bsa I (N-terminal) und Pst I (C-terminal) einfügen, durchgeführt. Die Produkte wurden in den pCRIITM Vektor kloniert. Nach Transformation kompetenter *E. coli* und DNA-Präparation der positiven Klone wurde die RT6-Streptag Sequenz über einen Bsa I/Pst I Restriktionsverdau in den ebenso verdauten pask 60TM Vektor kloniert.

Das Ergebnis waren die Expressionsplasmide pask 6.1 B14 und pask Lew b1.

Eine Übersicht gibt die folgende Abbildung.

Abbildung 25A: Klonierungsstrategie RT6-Streptag



3.2.2. Korrektur der RT6 Sequenzen

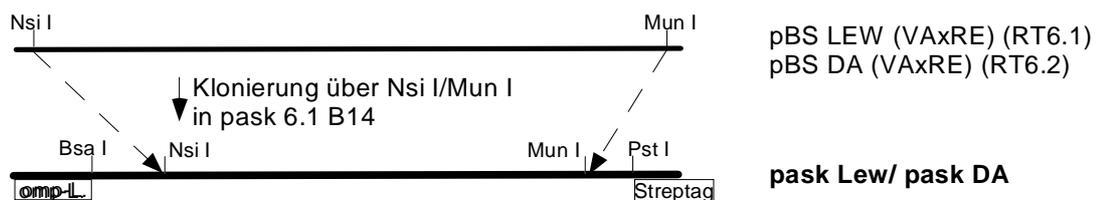
Da sich mittlerweile herausgestellt hatte, daß die für die Konstruktion verwendeten Plasmide mehrere Fehler in ihrer Aminosäuresequenz aufwiesen, erfolgte die Korrekturklonierung der RT6 Sequenzen analog zu 3.1.5..

Ausgangsmaterial für die endgültige Form der Expressionsplasmide waren die aus 3.1.5. bekannten pBS LEW (VA*RE) und pBS DA (VA*RE). Die in ihnen enthaltenen korrekten RT6 Inserts wurden über einen Nsi I/Mun I Restriktionsverdau anstelle der RT6.1 Sequenz in das ebenfalls mit Nsi I/Mun I geschnittene pask 6.1 B14 kloniert.

Das Ergebnis waren die prokaryontischen Expressionsplasmide pask Lew und pask DA.

Eine Übersicht gibt folgende Abbildung.

Abbildung 25B: Korrekturklonierung RT6-Streptag



3.2.3. Expression der RT6-Streptag Proteine

Die Expression erfolgte analog des in 2.2.6. beschriebenen Protokolls.

Nach der Transformation der NM 522 E. coli (anfangs wurde die Expression mit XL-1 E. coli versucht; es stellte sich jedoch heraus, daß der Stamm NM522 eine wesentlich höhere Expression ermöglichte) mit den beiden RT6 Streptag Expressionsplasmiden sowie Kontrollplasmiden wurde eine Übernachtkultur jeweils einer Kolonie angelegt und bei 37°C bzw. später bei 30°C kultiviert. Die niedrigere Temperatur sollte die Bildung von Einschlußkörperchen verhindern. Bei diesen Einschlußkörperchen handelt es sich um

präparierbare Aggregate des denaturierten rekombinanten Proteins, deren Entstehung bei höheren Kultur- und Induktionstemperaturen begünstigt werden. Die Induktion mit IPTG erfolgte deshalb bei Raumtemperatur.

Die Kultivierung und Induktion erfolgte in Vorversuchen in Anwesenheit von 100µg/ml Ampicillin dessen Konzentration im weiteren zwecks Erhöhung des Selektionsdruckes auf 200µg/ml verdoppelt wurde. Hiermit sollte einem Abbau des Antibiotikums entgegengetreten und ein Überwachsen der Kultur mit nicht plasmidtragenden Bakterien verhindert werden. Nach der Ernte der Bakterien durch Zentrifugation wurden die exprimierten Proteine über einen osmotischen Schock aus dem Periplasmaraum des Bakteriums lysiert.

3.2.4. Nachweis der RT6-Streptag Proteine

Der Nachweis der RT6-Streptag Proteine erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot.

Da es in ersten Versuchen nicht gelang im hergestellten Periplasmapreparat Proteine gewünschter Größe nachzuweisen, wurde zunächst auf die Periplasmapräparation verzichtet. Stattdessen wurde versucht, die Proteine im Gesamtbakterienlysat nachzuweisen. Um eventuelle Einschlusskörperchen mitzuerfassen wurden die Bakterienpellets zusätzlich mit SDS versetzt und mit DTT reduziert. Anschließend wurden die Proben mit Ultraschall homogenisiert. Dadurch wurde die Bakterien DNA "zerkleinert" und damit das Beladen des Polyacrylamidgels erleichtert.

Abbildung 26: Nachweis der RT6-Streptag Proteine im Gesamtbakterienlysat

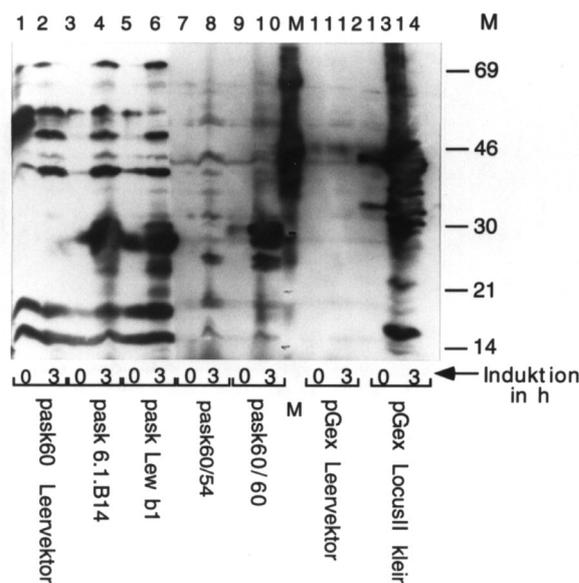


Abbildung 26

NM 522 E. coli wurden mit Plasmid DNA der Ratten RT6-Streptag Konstrukte 6.1.B14 und Lew b1 (Spur 3-6), mit Maus Rt6-Streptag Konstrukte (Spur 7-10), mit Maus Rt6-GST (Glutathion-S-Transferase) Kon-

strukten (Spur 11-14) sowie den entsprechenden Leervektorplasmiden transformiert und entsprechend 2.2.6. kultiviert. Nach Induktion mit 1mM IPTG erfolgten 3h Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proben vor Induktion (0h) und nach Induktion (3h) wurden abzentrifugiert, das Pellet in 25µl Ladepuffer aufgenommen, mit 10µl SDS 20%, 6,5µl 0,5M Tris pH 6,8 und 5µl 1M DTT versetzt und nach Ultraschallhomogenisation in der SDS-PAGE (12% Tris-Glycin Trenngel) aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit den polyklonalen Antiseren K5 (Spur 1-6, 1:600) und K48 (Spur 7-14, 1:2000) als Erstantikörper und mit dem Zweitantikörper donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 15sec.

Neben Gesamtbakterienlysaten der Leervektor- (Spur 1 und 2) und der RT6-Streptag Expression (Spuren 3-6) sind zur Kontrolle noch Gesamtbakterienlysate zweier Maus Rt6-Streptag Konstrukte, pask 60/60 und pask 60/54 (Spuren 7-10), sowie eines Glutathion-S-Transferase (GST) getagten MausRt 6 (Spur 13 und 14) und dessen Leervektors (Spur 11 und 12) aufgetragen worden. Die Maus Rt6-Streptag und Maus Rt6-GST Konstrukte wurden freundlicherweise von K. Bredehorst und A. Damaske aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Man erkennt in den RT6-Streptag Spuren 3-6, neben den in allen Spuren gleichermaßen auftretenden Banden, im Bereich von 30kD prominente Banden. Sie entsprechen der erwarteten Größe der RT6-Streptag Proteine. Sie sind besonders deutlich nach 3h Induktionsdauer aber auch schon vor der Induktion sichtbar, so daß bereits vor der Induktion eine gewisse basale Expression der RT6-Streptag Proteine vorlag.

Bei den Maus Rt6-Streptag Proteinen sieht man für das pask 60/60 in Spur 9-10 ein ähnliches Verhalten wie für die Ratten RT6-Streptag Proteine. Es tritt ebenfalls eine deutliche Bande bei 30kD neu auf, wobei ebenso eine basale Expression vor Induktion erkennbar ist. Ob die darunter befindliche Doppelbande spezifisch ist, läßt sich hier nicht klären. Das pask 60/54 in Spur 7-8 zeigt eine ähnlich Doppelbande, läßt aber deutlicher ausgeprägte Banden vermissen. Eine spezifische Expression erscheint deshalb fraglich.

Das Maus Rt6-GST Protein in Spur 13-14 dagegen läßt sich im Bakterienlysat nachweisen. Im Vergleich zum Leervektor (Spur 11-12) tauchen zwei neue Banden auf, die vor Induktion besonders gut zu erkennen sind. Die kleinere Bande bei ca. 35KD entspricht vermutlich dem Rt6 ohne GST-Schwanz, während die 46KD Bande dem kompletten Fusionsprotein entsprechen würde. Nach Induktion sind diese Banden wegen der gleichzeitigen starken Expression bakterieller Proteine schlechter zu erkennen.

Um sicher zu gehen, daß es sich bei den nachgewiesenen tatsächlich um spezifische Banden handelte, wurde eine weitere Immunodetektion durchgeführt. Dabei wurde mit Peroxidase gekoppeltes Streptavidin eingesetzt, welches an die 10 C-terminalen Aminosäuren der Streptag Fusionsproteine bindet.

Abbildung 27: Nachweis der RT6-Streptag Proteine im Gesamtbakterienlysat

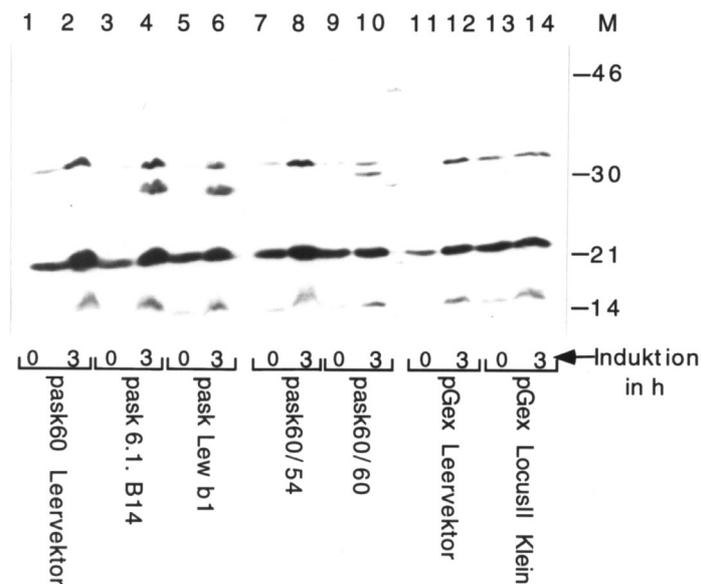


Abbildung 27

Die Proben, deren Gewinnung, Behandlung und Auftrennung entsprechen Abbildung 26. Die Immunodetektion erfolgte mit Streptavidin, Peroxidase konjugiert (1:750), die Entwicklung mittels ECL™-System. Exponiert wurde für 5sec.

Man erkennt neben der schon in den Vorversuchen beobachteten Hauptreaktivität des Streptavidins bei ca. 21kD die in Abbildung 26 beschriebenen Banden der RT6-Streptag Proteine etwas unterhalb von 30kD (Spur 4 und 6). Auch beim pask 60/60 in Spur 10 zeigt sich wie zuvor dieselbe Bande etwas größer als 30kD. Man erkennt zudem, daß die vorher aufgetretene Doppelbande hier nicht mehr erscheint und damit nicht spezifisch zu sein scheint. Gleiches gilt für die Doppelbande der K48 Detektion des pask 60/54. Hier treten keine von der Leervektorexpression in Spur 1-2 unterscheidbaren Banden neu auf, so daß davon auszugehen ist, daß keine spezifische Expression vorlag.

Bei dem Rt6-GST Protein in Spur 13-14 war keine spezifische Reaktivität zu erwarten, da Streptavidin nicht an den GST-Schwanz bindet.

Nachdem nun im Gesamtbakterienlysat die RT6-Streptag Proteine nachgewiesen worden waren, wurde jetzt zusätzlich das Periplasmalysat untersucht. Dabei wurde gleichzeitig dem Einfluß der Induktion auf die Expression nachgegangen.

Abbildung 28: Einfluß der Induktionsbedingungen auf die RT6.2-Streptag Expression im Gesamtbakterienlysat

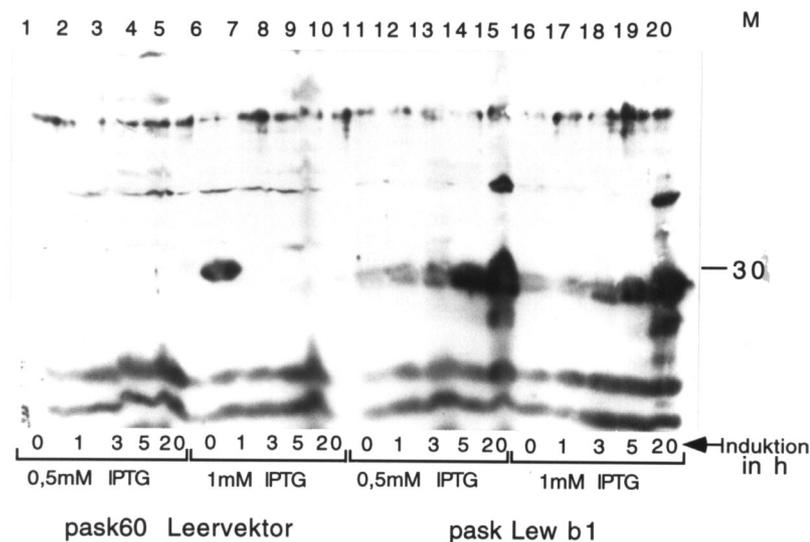


Abbildung 28

NM522 E. coli wurden mit Plasmid DNA des RT6.2-Streptag Konstrukts (Spur 11-20) und des Leervektors (Spur 1-10) transformiert und entsprechend 2.2.6. kultiviert. Nach Induktion mit 0,5mM (Spur 1-5, 11-15) bzw. 1mM IPTG (Spur 6-10, 16-20) erfolgte eine weitere Inkubation für 20h bei Raumtemperatur. Proben wurden vor (0h) Induktion und 1h, 3h, 5h und 20h nach Induktion abgenommen. Die Proben wurden entsprechend Abbildung 26 behandelt und in der SDS-PAGE (12% Tris-Glycin Tennel) aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) in Spur 6 aufgetragen. Der Western Blot wurde mit dem polyclonalen Antiserum K5 (1:600) als Erstantikörper und mit dem Zweitantikörper donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 1sec.

Hier sind zunächst die Gesamtbakterienlysate aufgetrennt worden. Verglichen wurde die Expression des Leervektors mit der des RT6.2-Streptag Proteins vor (0h) bzw. 1h, 3h, 5h und 20h nach Induktion mit 1mM und 0,5mM IPTG.

Man erkennt, wie schon in Abbildung 27, die Expression des RT6.2-Streptag Proteins knapp unterhalb von 30kD in den Spuren 11-20. Mit Zunahme der Induktionsdauer steigt

auch die Expressionsrate an. Dabei scheint der Einfluß der IPTG Konzentration unerheblich zu sein, es zeigt sich kein Unterschied zwischen 0,5mM und 1mM IPTG.

In die Spur 6 des Leervektors vor Induktion mit 1mM IPTG wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker (RainbowMarker™, Amersham) aufgetragen, dessen 30kD Protein (Carboanhydrase) mit dem Detektionssystem reagiert.

Abbildung 29: Nachweis des RT6.2-Streptag Proteins im Periplasmalysat und Einfluß der Induktionsbedingungen auf die Expression

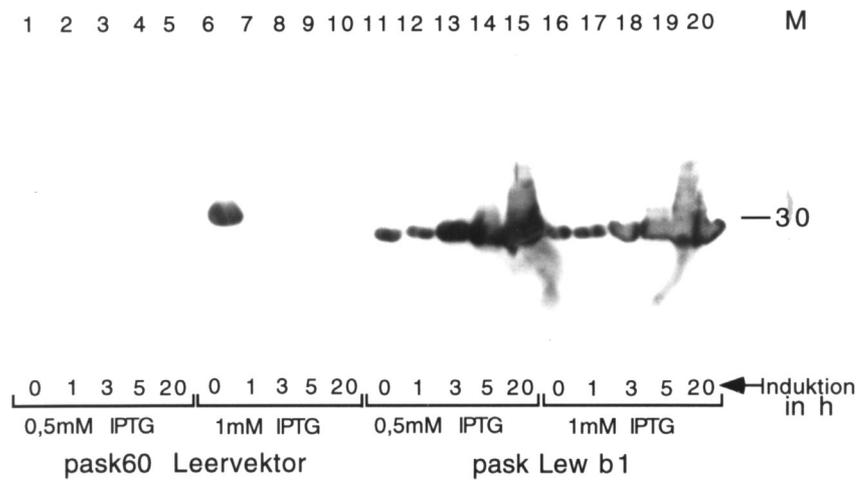


Abbildung 29

Transformation, Kultivierung, Induktion und weitere Inkubation entsprechen Abbildung 28. Bei den zu den entsprechenden Zeitpunkten gewonnenen Proben wurde über einen osmotischen Schock der Periplasmaraum aufgeschlossen und der periplasmatische Überstand durch Zentrifugation geerntet (siehe 2.2.6.2.). Die Auftrennung von je 20µl Periplasmalysat in der SDS-PAGE (12% Tris-Glycin Trenngel) erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) in Spur 6 aufgetragen. Der Western Blot wurde mit dem polyklonalen Antiserum K5 (1:600) als Erstantikörper und mit dem Zweitantikörper donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 1sec.

Hier sind entsprechend Abbildung 28 die Periplasmalysate aufgetragen worden. Auch hier befindet sich in der Leervektorspur 6 vor Induktion mit 1mM IPTG der Molekulargewichtsmarker.

Durch die Präparation des Periplasmalysats ist eine deutliche Aufreinigung zu erkennen. Die vorher erkennbare unspezifische Reaktivität des Detektionssystems tritt kaum mehr auf. Die Intensität der spezifischen Banden entspricht der in Abbildung 28, was darauf deutet, daß es sich bei der Hauptmenge des sezernierten Proteins um das RT6.2-Streptag Protein handelt. Die Sekretion des RT6.2-Streptag Proteins in den Periplasmaraum

nimmt, wie die Gesamtexpression, mit zunehmender Induktionsdauer zu und erreicht nach 20h ein Maximum.

Um dem Aufreinigungseffekt nachzugehen und auch Mengenverhältnisse abschätzen zu können wurden Silberfärbungen zur Gesamtproteindarstellung vorgenommen.

Abbildung 30: Gesamtproteindarstellung im Periplasmalysat

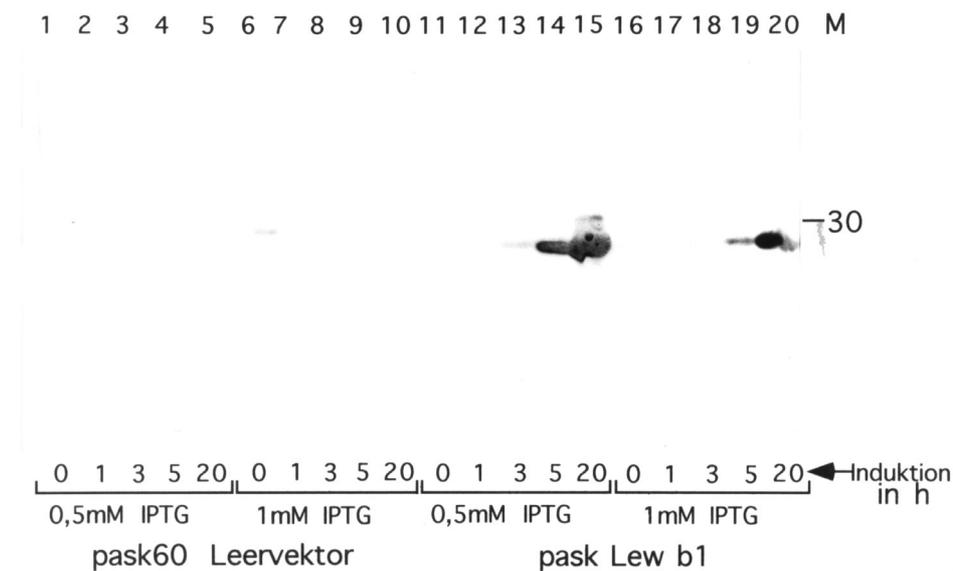


Abbildung 30

Entsprechend 2.2.7.4. wurde von der Nitrocellulosemembran des Western Blots aus Abbildung 29 eine Silberfärbung vorgenommen. Die Probenverteilung entspricht demzufolge Abbildung 29.

Hier werden die für Abbildung 29 gemachten Vermutungen bestätigt. Es zeigen sich Banden, die mit denen der Immunodetektion in Abbildung 29 deckungsgleich sind. Außer dem RT6.2-Streptag Protein befindet sich kein quantitativ bedeutendes Protein im periplasmatischen Raum der Bakterien. Es erscheint hier die Induktion mit 0,5mM IPTG etwas effektiver, wobei das Maximum der Expression auch hier jeweils nach 20h liegt.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß das RT6.2-Streptag Protein von den Bakterien produziert und zum größten Teil in den Periplasmaraum sezerniert wird, wo es den quantitativen Hauptteil bildet. Die Herstellung des Periplasmalysats stellt hier somit eine effektive Aufreinigung dar.

Im folgenden wurden die obigen Ergebnisse für die anderen, bisher nur im Gesamtbakterienlysat nachgewiesenen, Streptag Proteine überprüft.

Abbildung 31: Nachweis der RT6-Streptag Proteine im Periplasmalysat

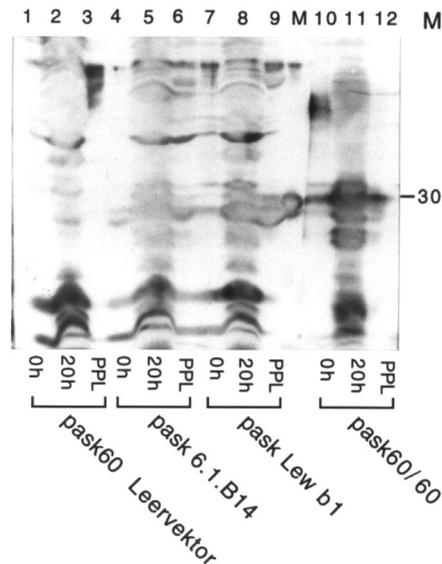


Abbildung 31

NM 522 E. coli wurden mit Plasmid DNA der Ratten RT6-Streptag Konstrukte 6.1.B14 (Spur 4-6) und Lew b1 (Spur 7-9), des Maus Rt6-Streptag Konstrukts 60/60 (Spur 10-12) sowie dem entsprechenden Leervektorplasmid transformiert und entsprechend 2.2.6. kultiviert. Nach Induktion mit 1mM IPTG erfolgten 20h Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proben vor Induktion (0h) und nach Induktion (20h) wurden abzentrifugiert, das Pellet wie in Abbildung 26 beschrieben behandelt. Zudem erfolgte die Präparation des Periplasmalysats (PPL) nach 2.2.6.2.. Die Gesamtbakterienlysate und je 20µl PPL wurden in der SDS-PAGE (12% Tris-Glycin Trenngel) aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit den polyklonalen Antiseren K5 (Spur 1-9, 1:600) und K48 (Spur 10-12, 1:2000) als Erstantikörper und mit dem Zweitantikörper donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) immunodetektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 2sec.

Im Vergleich zum RT6.2 -Streptag Protein in den Spuren 7-9 zeigt sich beim RT6.1-Streptag Protein in den Spuren 4-6 eine etwas geringere Expression im Gesamtbakterienlysate. Auch die Sekretion in den Periplasmaraum scheint etwas schwächer zu sein. Es erscheinen somit neben dem RT6.1-Streptag Protein in Spur 6 mehr unspezifische Proteine als beim RT6.2-Streptag PPL in Spur 9, so daß ein geringerer Aufreinigungseffekt vorhanden ist. In Bezug auf diesen Punkt ist auch die Periplasmapräparation des RT6.2 Proteins nicht so befriedigend wie in Abbildung 29 und 30.

Die Verhältnisse beim Maus Rt6 Protein (Spuren 10-12) lassen sich mit denen des RT6.2-Streptag Proteins vergleichen. Die Expression des 30kD großen Proteins ist deutlich, und die Anreicherung im Periplasmalysat gut, wenngleich insgesamt nicht so stark wie beim RT6.2-Streptag Protein.

Die korrigierten RT6-Streptag Proteine wurden in der folgenden Abbildung untersucht.

Abbildung 32: Nachweis der korrekten RT6-Streptag Proteine im Periplasmalysat und Ausmaß ihrer Sekretion in den Periplasmaraum

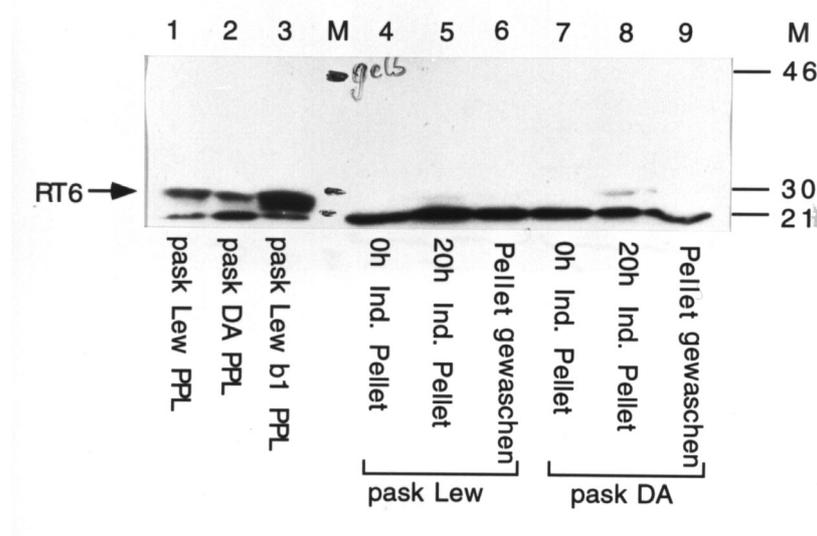


Abbildung 32

Die Transformation der NM522 E. coli mit den Plasmiden pask Lew (RT6.1-Streptag) und pask DA (RT6.2-Streptag) sowie die weitere Kultivierung und Gewinnung der beiden Periplasmalysate (Spur 1 und 2) entspricht 2.2.6.. Zum Vergleich dient das Lew b1 PPL (Spur 3) aus Abbildung 29. Vor Induktion (0h) und nach 20h wurden auch Gesamtbakterienlysate hergestellt (Spur 4,5,7,8), auch wurde nach Abnahme der Periplasmalysate der gewaschene Bakterienrest untersucht (Spur 6,9). Die Pellets wurden wie in Abbildung 26 beschrieben behandelt und zusammen mit je 20µl PPL in der SDS-PAGE (10% Tricin Trenngel) aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit Streptavidin, Peroxidase konjugiert (1:750) immunodetektiert, mittels ECL™-System entwickelt und für 30sec exponiert. Die Position der RT6-Streptag Proteine ist durch einen Pfeil markiert.

Hier wurden die sequenzkorrigierten Periplasmalysate, Lew PPL und DA PPL in Spur 1 und 2, mit der bisher besten Periplasmapräparation in Spur 3, Lew b1 PPL (siehe Abbildung 29), verglichen. Außerdem wurden die Gesamtbakterienlysate der korrekten RT6-Streptag Proteine vor Induktion, nach 20h Induktion sowie das gewaschene Gesamtbakterienlysate nach 20h Induktion und Abnahme des Periplasmalysats aufgetragen.

Bei der Betrachtung der Periplasmalysate zeigt sich auch für die korrigierten RT6-Streptag Proteine eine Sekretion in den Periplasmaraum und damit eine Expression, erkennbar an der Bande knapp unterhalb 30kD. Die geringere Reaktivität der neuen Periplasmalysate deutet auf einen geringeren Proteingehalt hin.

Die Analyse der Gesamtbakterienlysate läßt, neben der unspezifischen 21kD Reaktivität, bei den ungewaschenen 20h Pellets in Spur 5 und 8 den RT6-Streptag Proteinen entsprechende Banden erkennen. Nach Abnahme des Periplasmalysats und Waschen sind sie in Spur 6 und 9 nicht mehr zu sehen. Hieraus kann geschlossen werden, daß ein Großteil des Proteins in den Periplasmaraum sezerniert wird.

3.2.5. Quantifizierung der Expression

Die Quantifizierung der Expression erfolgte durch eine Proteinbestimmung nach dem in 2.2.8. beschriebenen Protokoll am Beispiel des Lew b1 Periplasmalysats.

Abbildung 33: Proteingehalt des RT6.2-Streptag Periplasmalysats

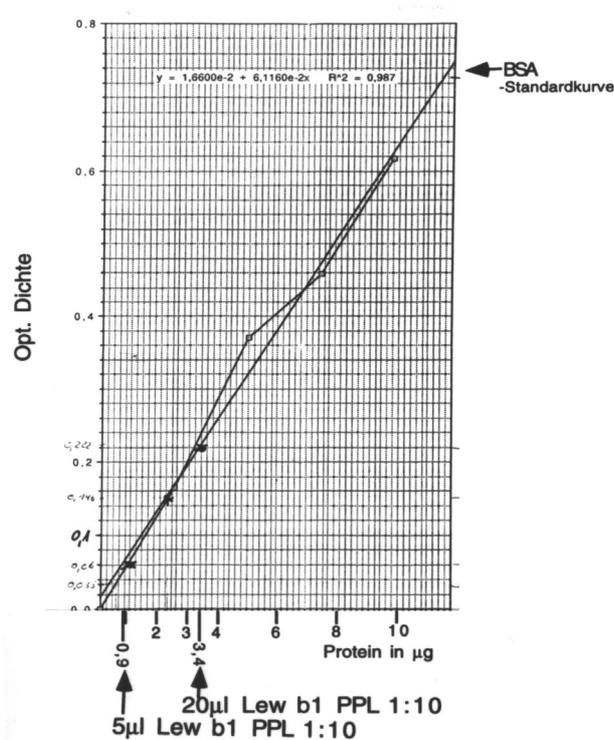


Abbildung 33

Mittels definierter Mengen bovines Serumalbumins (BSA) wurde eine Standardkurve erstellt, bei der die Extinktion gegen den Proteingehalt aufgetragen wurde. Die Extinktion für 20µl und 5µl je 1:10 verdünntes Lew b1 Periplasmalysat wurde bestimmt, aus der Standardkurve deren Gesamtproteingehalt abgelesen und gemittelt. Ebenso wurde mit dem Periplasmalysat des Leervektors verfahren.

20µl 1:10 verdünntes Lew b1 Periplasmalysat entsprechen 3,4µg also 1,7µg/µl Gesamtprotein. 5µl 1:10 verdünntes Lew b1 Periplasmalysat entsprechen 0,9µg also 1,8 µg/µl Gesamtprotein. Das ergab im Mittel 1,75µg/µl. Für den Leervektor ergaben sich im Mittel 0,12µg/µl.

Die Analyse des Proteingehaltes der Periplasmalysate mittels SDS-PAGE und Silberfärbung hatte gezeigt, daß das RT6-Streptag Fusionsprotein ca. 50-90% des Proteingehaltes

im Periplasmalysat ausmacht (Abbildungen 29-32). Demnach beträgt die RT6-Streptag Konzentration in den Lysaten ca. 0,8-1,6µg/µl.

3.2.6. Aufreinigung der Periplasmalysate

Obwohl die Präparation des Periplasmalysats für sich, wie oben gezeigt, schon eine deutliche Aufreinigung darstellt, wurde eine spezifische Aufreinigung mittels einer Streptavidin-Matrix versucht. Bei dieser Matrix handelt es sich um magnetische Partikel, an die Strept- avidin gebunden sind (Streptavidin Dynabeads™). Die Elution von der Matrix erfolgt mit einem Diaminobiotin haltigen Puffer, da dessen Affinität zum Streptavidin höher ist als die des Streptag und somit das Streptag Protein aus der Bindung mit dem Streptavidin verdrängt.

Abbildung 34: Aufreinigung der RT6-Streptag Periplasmalysate

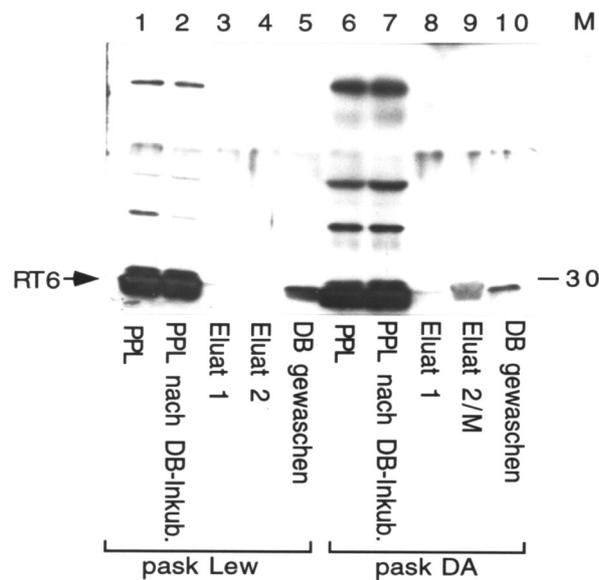


Abbildung 34

Es wurden je 10µl der RT6-Streptag Periplasmalysate mit je 20µl Streptavidin Dynabeads™ für 1h bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde aufbewahrt. Die Matrix wurde mit TBS gewaschen und die gebundenen Proteine mit Puffer E in zwei Schritten eluiert. Die übrig gebliebene Matrix wurde noch zweimal mit dem Elutionspuffer gewaschen (Spur 5 und 10) und wie die zwei Eluate (Spur 4,5,8,9) und der Überstand nach Inkubation (Spur 2 und 7) in der SDS-PAGE aufgetrennt. In Spur 9 wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Der Western Blot wurde mit K5 (1:600) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) detektiert und im ECL™-System für 2sec exponiert. Die Position der RT6-Streptag Proteine ist durch einen Pfeil markiert.

In dieser Abbildung zeigt sich ein insgesamt unbefriedigendes Aufreinigungsergebnis. Es ist kein Unterschied zwischen den unaufgereinigten Periplasmalysaten in Spur 2 und 6 und den Überständen nach Inkubation mit der Streptavidinmatrix in Spur 3 und 7 zu erkennen. Im ersten Elutionsschritt läßt sich nur wenig Protein ablösen, beim DA Peri-

plasmalysat im zweiten Schritt (Spur 9) etwas mehr. Die Analyse der übriggebliebenen, mehrfach eluierten Matrix (Spur 5 und 10) zeigt eine persistierende Bindung der RT6-Streptag Proteine.

Hieraus ergibt sich, daß, zumindest bei Verwendung dieser Matrix, die Bindung an die Matrix unzureichend ist. Darüber hinaus läßt sich das Wenige, was gebunden wurde nur schlecht wieder eluieren. Zwar enthielten die Eluate weniger verschiedene Proteine als die Periplasmalysate, doch von einer Aufreinigung, besonders im Sinne einer Konzentrierung, kann nicht gesprochen werden. Da die hergestellten Periplasmalysate an sich schon sehr rein waren, und die RT6-Streptag Proteine die bei weitem vorherrschenden Proteine waren, wurde auf weitere Aufreinigungsversuche verzichtet.

Spätere Experimente mit den hier hergestellten Periplasmalysaten durch Jens Schröder ergaben, daß die RT6-Streptag Proteine durch einen natives RT6 erkennenden monoklonalen Antikörper präzipitiert und damit aufgereinigt werden konnten. Dies zeigt, daß die RT6-Streptag Proteine im Periplasmaraum der Bakterien richtig gefaltet vorliegen, und gibt einen Hinweis auf ihre Funktionalität.

3.2.7. Funktionsuntersuchungen

In ersten Versuchen wurden die schon vom nativen RT6 bekannten enzymatischen Aktivitäten untersucht.

Zum Nachweis der NADase-Aktivität wurde nach Markierung der Proben mit $^{32}\text{P-NAD}^+$ und Bindung aller Proteine an eine Matrix (Strataclean ResinTM) der Reaktionsüberstand in einer Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Bei Vorhandensein von NADase-Aktivität dürfte sich im Reaktionsüberstand kein oder nur wenig NAD nachweisen lassen, sondern stattdessen das Produkt der Reaktion ADPR.

Die Proteinfällung wurde in der SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert, und die Automodifikation des RT6.2 in der Autoradiographie des Western Blots nachgewiesen (siehe auch 2.2.11. und 3.1.12.).

Abbildung 35: Untersuchung der NADase Aktivität der RT6-Streptag Proteine

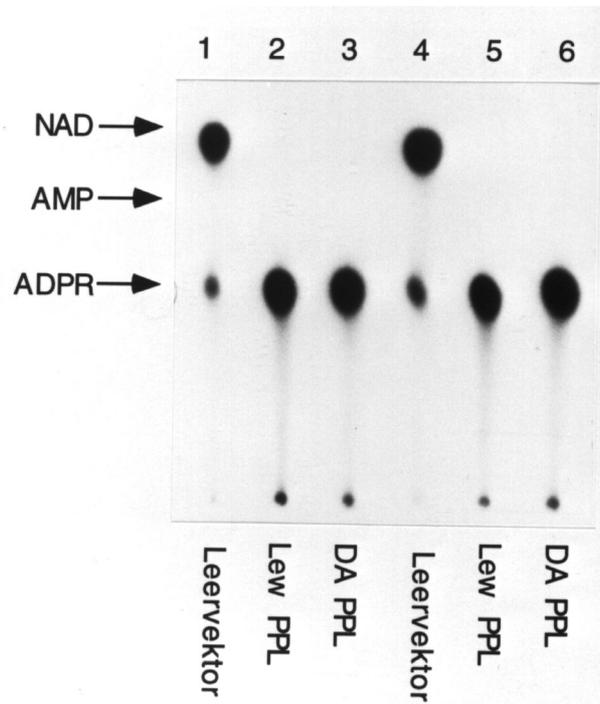


Abbildung 35

Je 2µl Periplasmalysat des pask60 Leervektors und der beiden RT6-Streptag wurden mit je 10µCi ^{32}P -NAD⁺ für 30min bei 37°C inkubiert. Nach der Proteinfällung mit je 10µl Strataclean Resin™ wurde je 1µl Überstand abgenommen und zusammen mit den Markern NAD, AMP und ADPR auf eine PEI - Dünnschichtchromatographieplatte getropft. Nach Trocknung der Proben erfolgte der Lauf zunächst in 1M Essigsäure und in 0,9M Essigsäure und 0,3M LiCl, wenn die Lauffront 3cm die Probenauftragstelle passiert hat. Nach Trocknen der Platte erfolgte die Exposition für 18h bei -80°C. Die Position von NAD, AMP und ADPR ist durch Pfeile markiert.

Es wird erkennbar, daß beim Leervektor Periplasmalysat in Spur 1 und 4 außer einem geringen spontanen Zerfall des NAD zu ADPR kein zusätzlicher, enzymatischer Umsatz stattfand. Dagegen findet sich bei den RT6-Streptag Periplasmalysaten in den Spuren 2,3,5 und 6 kein NAD im Reaktionsgemisch. Das NAD wurde hier vollständig zu ADPR umgesetzt. Somit zeigen sowohl das RT6.1-Streptag als auch das RT6.2-Streptag Protein die vom nativen RT6 bekannte NADase-Aktivität.

Abbildung 36: Proteinnachweis

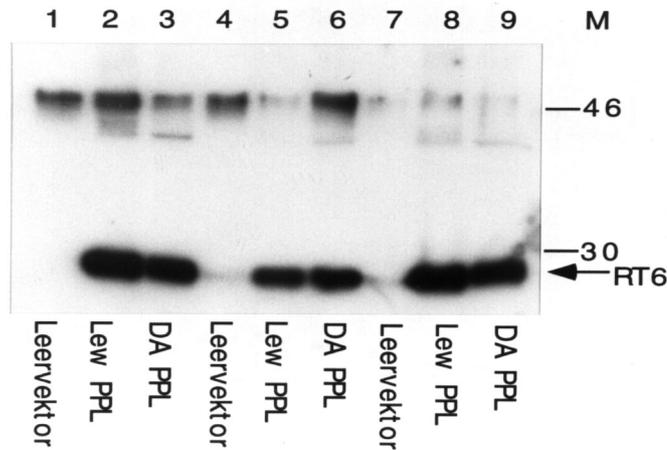


Abbildung 36

Die in Abbildung 35 beschriebenen Proteinfällungen wurden je dreimal mit PBS gewaschen und in Lade-puffer aufgenommen. Die Auftrennung in der SDS-PAGE (10% Tricine Trenngel) erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit K5 (1:600) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) detektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 1sec. Die Position der RT6-Streptag Proteine ist durch einen Pfeil markiert.

In der Immunodetektion des Western Blots der gefällten Proteine sieht man die schon bekannte Auftrennung der Periplasmalysate mit der für die RT6-Streptag Proteine spezifischen Bande knapp unterhalb von 30kD.

Abbildung 37: ADP-Ribosyltransferaseaktivität der RT6-Streptag Proteine

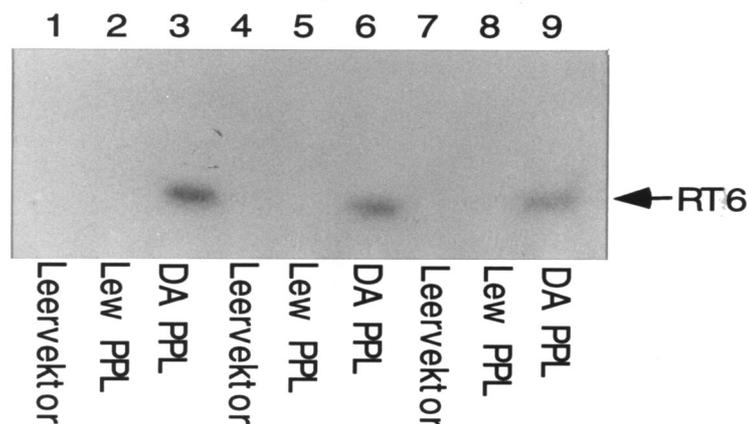


Abbildung 37

Der in Abbildung 36 beschriebene Western Blot wurde zwecks Ausschaltung der Restlumineszenz mit schwarzer Pappe abgedeckt und für 3d bei -80°C exponiert.

In der Autoradiographie des Western Blots aus Abbildung 36 erscheint in den Spuren 3,6 und 9 eine Bande, die mit der des RT6.2 Streptag aus der Auftrennung des DA Periplas-

malysats in Abbildung 36 deckungsgleich ist. Hier fand also eine Modifikation des RT6.2 statt. Es ist deshalb davon auszugehen, daß sich das RT6.2-Streptag Protein, wie vom nativen RT6.2 bekannt, mit der aus der NAD Spaltung entstandenen ADPR selbst modifiziert. Ob dies in einem Schritt geschieht, oder ob es sich dabei um zwei getrennte Aktivitäten handelt, läßt sich hierdurch nicht entscheiden. Eine signifikante Automodifikation des rekombinanten RT6.1 erfolgte nicht.

Im Weiteren wurde untersucht, ob neben dem RT6.2 noch zusätzliche Akzeptormoleküle oder Akzeptorproteine für die ADPR bestehen.

Hierzu wurden die Periplasmalysate zusätzlich mit den potentiellen, weil argininreichen externen Akzeptoren Histone, Protamin, Polyarginin sowie mit BSA inkubiert. Um den Einbau zu erleichtern und die NADase-Aktivität abzusättigen, wurde zusätzlich unmarkiertes NAD zugesetzt. Um den spontanen Zerfall des NAD zu ADPR sichtbar zu machen, wurde neben NAD und ADPR als weiterer Marker das eingesetzte NAD/³²P-NAD⁺ Gemisch (Spur 1 in Abb. 38A und C) aufgetragen.

Abbildung 38A: Einfluß von Histonen auf die NADase Aktivität der RT6-Streptag

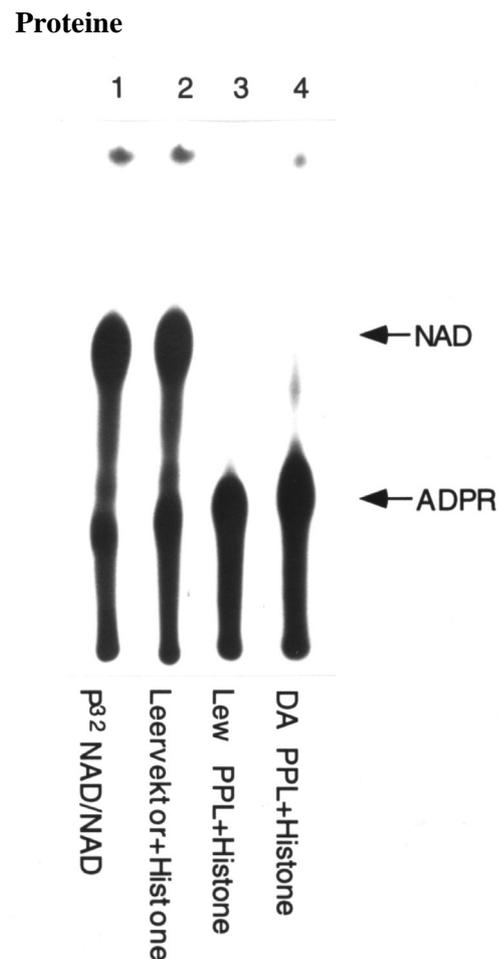


Abbildung 38B: Einfluß von Polyarginin auf die NADase Aktivität der RT6-Streptag

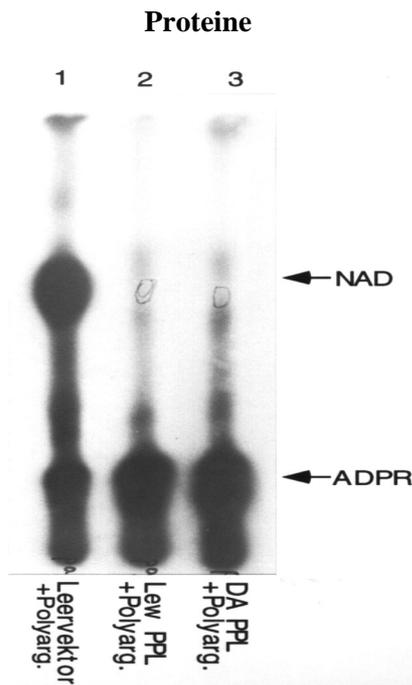
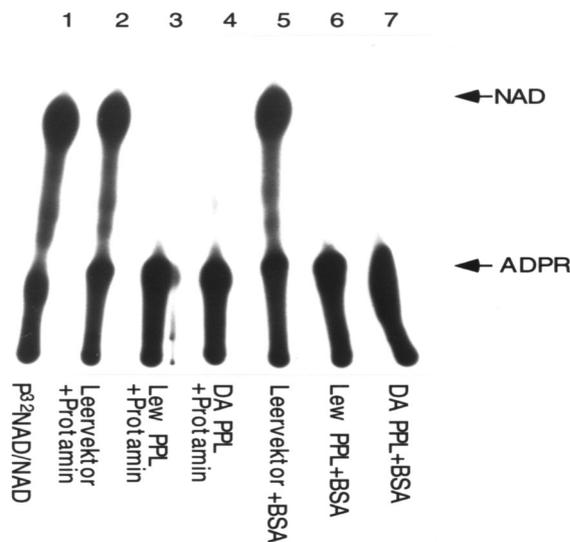


Abbildung 38C: Einfluß von Protamin und BSA auf die NADase Aktivität der RT6-Streptag Proteine



Abbildungen 38A, 38B und 38C

Je 1µl Periplasmalysat des Leervektors und der RT6-Streptag Proteine wurden mit je 10µg/ml der Akzeptoren Histone (38A), Polyarginin (38B), Protamin und BSA (38C), je 2µCi $^{32}\text{P-NAD}^+$ und je 5µM NAD versetzt, mit PBS (+Ca/Mg) auf 50µl aufgefüllt und für 30min bei 37°C inkubiert. Nach der Proteinfällung mit je 10µl Strataclean ResinTM wurde je 1µl Überstand abgenommen und zusammen mit den Markern NAD und ADPR auf eine PEI-Dünnschichtchromatographieplatte getropft. Zusätzlich wurde als weiterer Marker das eingesezte NAD/ $^{32}\text{P-NAD}$ Gemisch aufgetragen. Nach Trocknung der Proben erfolgte der Lauf zunächst in 1M Essigsäure und in 0,9M Essigsäure und 0,3M LiCl, wenn die Lauffront 3cm die Probenauftragstelle passiert hat. Nach Trocknen der Platte erfolgte die Exposition für 18h bei -80°C. Die Positionen von NAD und ADPR sind durch Pfeile markiert.

Es zeigt sich keinerlei Beeinflussung der NADase-Aktivität der RT6-Streptag Proteine durch die zugesetzten potentiellen Akzeptoren.

Abbildung 39: Proteinnachweis

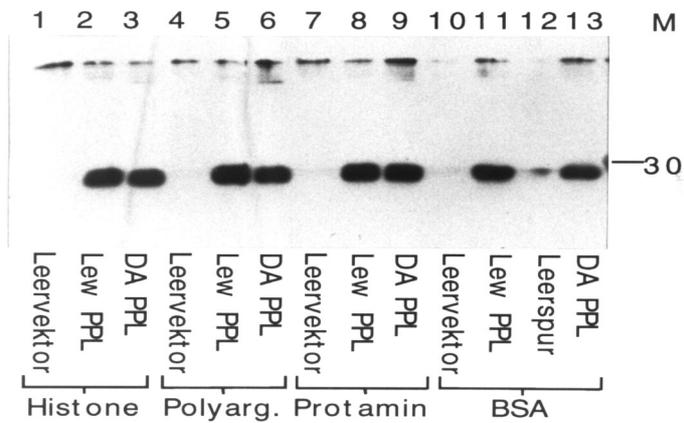


Abbildung 39

Die in Abbildung 38 beschriebenen Proteinfällungen wurden je viermal mit PBS gewaschen und in Lade-puffer aufgenommen. Die Auftrennung in der SDS-PAGE (12% Tris-Glycine Trenngel) erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit K5 (1:600) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) detektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECL™-System, exponiert wurde für 2sec.

Die K5 Immunodetektion des Western Blots läßt die RT6-Streptag Proteine als deutliche Bande knapp unterhalb 30kD erkennen.

Zur Klärung der Frage ob neben der AutoADP-Ribosylierung des RT6.2-Streptag Proteine eine Modifikation der zugesetzten potentiellen Akzeptoren stattfand wurde eine Autoradiographie des Western Blots angefertigt.

Abbildung 40: Einfluß von Histonen, Polyarginin, Protamin und BSA auf die ADP-Ribosyltransferase Aktivität des RT6.2-Streptag Proteins

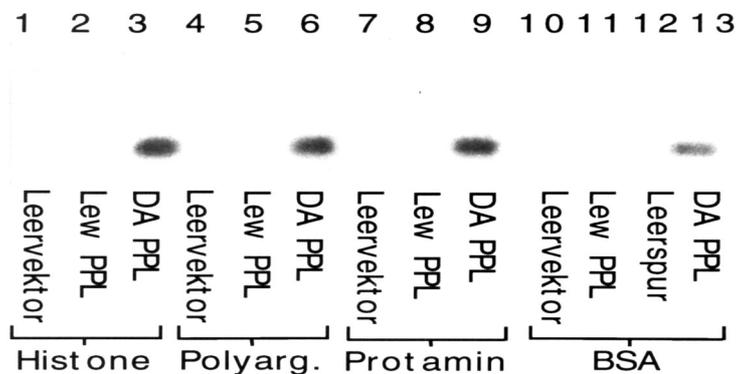


Abbildung 40

Der in Abbildung 39 beschriebene Western Blot wurde zwecks Ausschaltung der Restlumineszenz mit schwarzer Pappe abgedeckt und für 2d bei -80°C exponiert.

In der Autoradiographie des Western Blots aus Abbildung 39 erscheinen lediglich Banden, die jeweils mit denen der RT6.2-Streptag Proteine in Abbildung 39 deckungsgleich sind. Außer der bereits bekannten Automodifikation des RT6.2-Streptag fand also keine weitere ADP-Ribosylierung der zugesetzten Substanzen statt.

Da die Ursache für die fehlende Markierung möglicherweise in einem nicht optimalen Enzym/Substrat Verhältnis begründet lag, wurde ein erneuter Versuch mit einer höheren Konzentration Histone als Akzeptor und einer Verdünnungsreihe der Periplasmalysate als Enzym durchgeführt.

Abbildung 41: Proteinnachweis

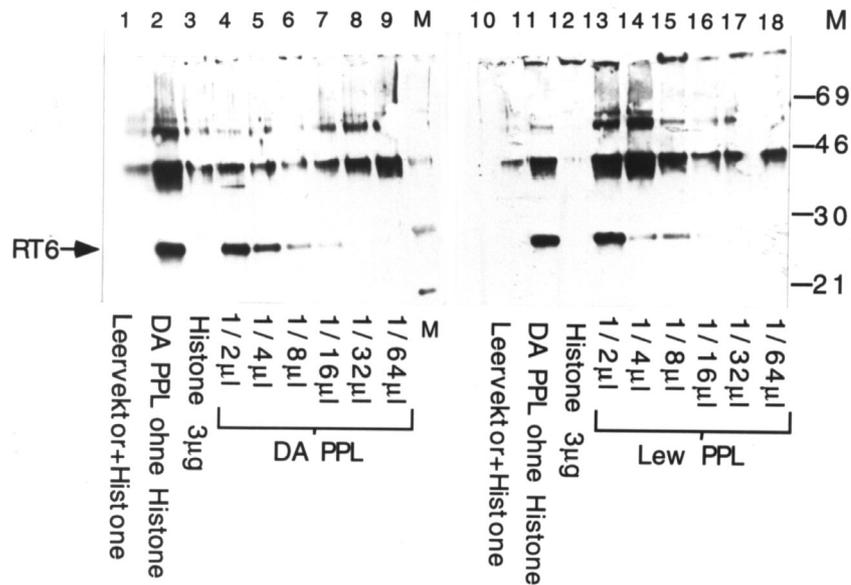


Abbildung 41

Die Proben einer exponentiellen Verdünnungsreihe (1/2μl-1/64μl) der beiden RT6-Streptag Periplasmalysate wurden mit je 100μg/ml Histone, je 2μCi $^{32}\text{P-NAD}^+$ und je 5μM NAD versetzt, mit PBS (+Ca/Mg) auf 50μl aufgefüllt und für 30min bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen dienten 1/2μl Leervektor PPL+ 100μg/ml Histone, 1/2μl DA PPL ohne Histone sowie 3μg Histone pur. Es folgte die Proteinfällung mit je 10μl Strataclean ResinTM. Die Pellets wurden je viermal mit PBS gewaschen und in Ladepuffer aufgenommen. Die Auftrennung in der SDS-PAGE (10% Tricine Trenngel) erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (in kD) aufgetragen. Der Western Blot wurde mit K5 (1:600) und donkey anti-rabbit, Peroxidase konjugiert (1:3000) detektiert. Die Entwicklung erfolgte mittels ECLTM-System, exponiert wurde für 30sec. Die Position der RT6-Streptag Proteine ist durch einen Pfeil markiert.

In der Immunodetektion des Western Blots ist die zunehmende Verdünnung der RT6-Streptag Proteine als schwächer werdende Banden unterhalb 30kD (Spuren 4-9 und 13-18) zu erkennen.

Die Analyse der ADP-Ribosyltransferase-Aktivität des RT6.2-Streptag Proteins erfolgte anhand der Autoradiographie des Western Blots. Außerdem wurde untersucht ob unter diesen, gegenüber Abbildung 40 veränderten, Verhältnissen eine Modifikation der Histone als Akzeptor der ADPR stattfindet.

Abbildung 42: Einfluß von Histonen auf die ADP-Ribosyltransferase Aktivität und Bedeutung der RT6.2-Streptag Proteinkonzentration für die Automodifikation

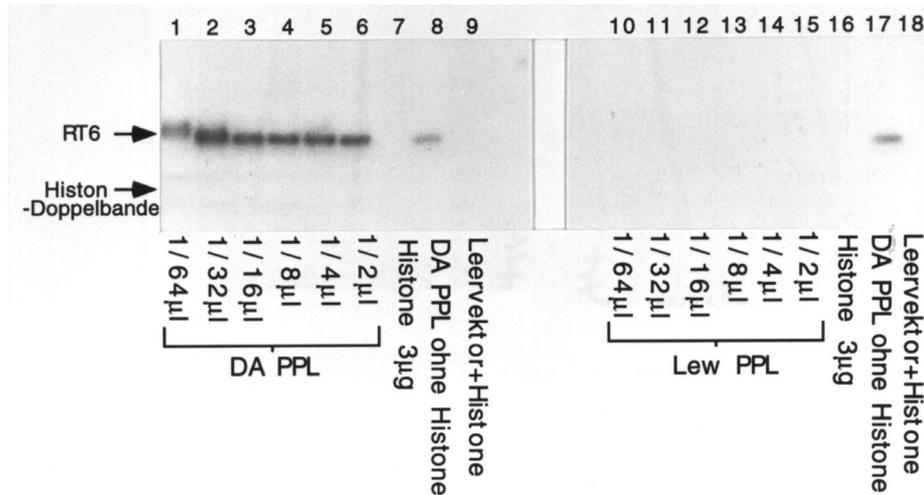


Abbildung 42

Der in Abbildung 41 beschriebene Western Blot wurde zwecks Ausschaltung der Restlumineszenz mit schwarzer Pappe abgedeckt und für 3d bei -80°C exponiert. Die Positionen der RT6.2-Streptag Proteine sowie einer Histon-Doppelbande sind durch Pfeile markiert.

Die Autoradiographie zeigt auf der Seite der Lew Periplasmalysate neben der Automodifikation der DA Periplasmalysat Kontrolle (ohne Histonzusatz) eine sehr schwache, hier kaum erkennbare Markierung einer niedermolekularen Doppelbande, die auch die Leerkontrolle betrifft. Es dürfte sich demnach hier um eine unspezifische, d.h. nicht durch die rekombinanten RT6 Proteine vermittelte Markierung der zugesetzten Histone handeln.

Auf der Seite der DA Periplasmalysate ist diese Markierung der Doppelbande ebenfalls vorhanden. Auch hier ist die Leerkontrolle mit betroffen. Die Intensität der Markierung nimmt jedoch, anders als bei den Lew Periplasmalysaten, mit zunehmender Verdünnung des DA Periplasmalysats parallel zur Selbstmarkierung der DA Bande zu, um ebenso wie die Selbstmarkierung, bei Einsatz von 1/32 µl Periplasmalysat ein Maximum zu erreichen.

Diese Modifikation der Histone erreicht wie die Selbstmarkierung bei Einsatz von 1/32 µl DA PPL ein Maximum, weil hier wahrscheinlich das günstigste Enzym/Substrat Verhältnis für die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität, die möglicherweise in Konkurrenz zur NADase-Aktivität steht, vorliegt.

Auffällig ist weiterhin die bei Einsatz von 1/64µl DA PPL im Vergleich zu 1/32µl Zunahme des Molekulargewichts der DA-Streptag Proteine, während die Doppelbande unverändert bleibt und auch die übrigen Banden der Immunodetektion in Abbildung 41 keine Veränderung der Größe zeigen (Die Größenzunahme der DA Streptag Proteine in der Immunodetektion ist wegen der Verdünnung nicht zu sehen.). Dies läßt sich am ehesten dadurch erklären, daß bei Einsatz von 1/64µl DA PPL ein besonders günstiges Enzym-Substrat Verhältnis besteht und dieses den Einbau von mehr als einem Molekül ADPR bewirkt, so daß das Molekulargewicht zunimmt.

Weitere Versuche zur Markierung komplexer Proteine aus Zellkulturüberständen brachten außer einer nicht enzymatischen Markierung von BSA durch freie ADPR keine Ergebnisse.

Um die Automodifikation und damit die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität näher zu charakterisieren, wurde die Bindung der ADPR an das RT6.2-Streptag Protein untersucht.

Hierzu wurden DA Periplasmalysate mit $^{32}\text{P-NAD}^+$ inkubiert und anschließend eine Proteinfällung vorgenommen. Die entstandenen Pellets wurden mit verschiedenen Reagenzien versetzt, die unterschiedliche Bindungen spalten. Die Pellets wurden dann in einer SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert, die Überstände für die Dünnschichtchromatographie aufbewahrt.

Abbildung 43: Einfluß von Reagenzien auf die ADPR-Bindung an RT6.2-Streptag

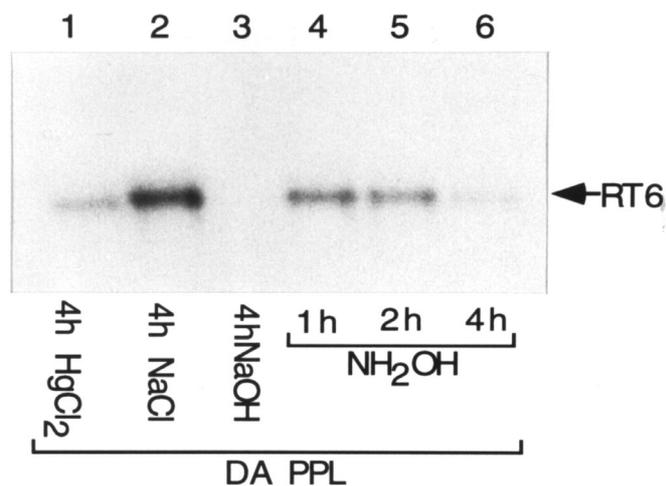


Abbildung 43

Je 1/10µl DA PPL wurden mit je 3µCi $^{32}\text{P-NAD}^+$ versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Nach der Proteinfällung mit je 15µl Strataclean Resin™ und viermaligem Waschen mit PBS wurden die Ansätze 1. mit 20µl 10mM HgCl₂ für 4h, 2. mit 20µl 1M NaCl für 4h, 3. mit 20µl 100mM NaOH für 4h, 4. mit 20µl 1M NH₂OH pH7 für 1h, 5. mit 20µl 1M NH₂OH pH7 für 2h und 6. mit 20µl 1M NH₂OH pH7 für 4h bei 37°C inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und die Pellets gewaschen. Die Auftrennung in der SDS-PAGE (10% Tricine Trenngel) erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Der Western Blot wurde getrocknet, abgedeckt und bei -80°C für 7h exponiert. Die Position des RT6.2-Streptag Proteins ist durch einen Pfeil markiert.

Die 4h Behandlung mit 10mM HgCl₂ in Spur 1 zeigt gegenüber der Kontrolle mit 4h 1M NaCl Inkubation (Spur 2) einen gewissen Verlust von radioaktivem Einbau. Behandlung mit 100mM NaOH in Spur 3 spaltet die Markierung vollständig ab. Die Inkubation mit 1M neutralem Hydroxylamin (Spuren 4-6), welches spezifisch über Arginin gebundene ADPR abspaltet, ergibt einen mit der Inkubationszeit zunehmenden, nach 4h fast kompletten Verlust der Radioaktivität.

Abbildung 44: Nachweis von ADPR als Abspaltprodukt nach Inkubation mit Hydroxylamin

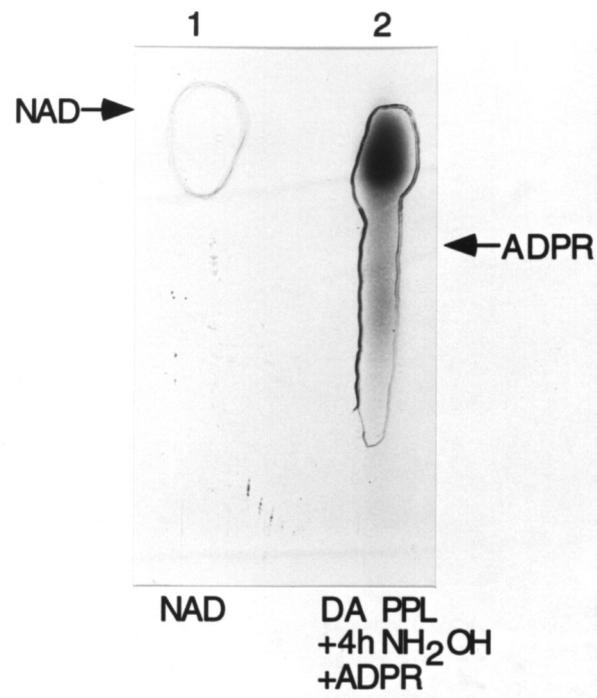


Abbildung 44

Der in Abbildung 43 beschriebene Überstand nach 4h Inkubation mit 1M NH₂OH pH7 wurde zusammen mit dem Marker NAD auf eine PEI- Dünnschichtchromatographieplatte getropft. Zusätzlich wurde als weiterer Marker ADPR zum 4h-Überstand gegeben. Nach Trocknung der Proben erfolgte der Lauf zunächst in 1M Essigsäure und in 0,9M Essigsäure und 0,3M LiCl, wenn die Lauffront 3cm die Probenauftragstelle passiert hat. Nach Trocknen der Platte erfolgte die Exposition für 18h bei -80°C. Die Position von NAD und ADPR ist durch Pfeile bzw. Umrandungen markiert.

Die Dünnschichtchromatographie des Überstandes nach 4h Inkubation mit 1M neutralem Hydroxylamin zeigt, daß es sich bei der abgespaltenen Radioaktivität um ADPR handelt, da das Auftrennungsverhalten genau der der mitaufgetragenen nicht radioaktiven ADPR entspricht (in Abb. 44 durch Pfeil und Umrandung gekennzeichnet).

Obwohl die Immunodetektion des Western Blots, die zeigen müßte, daß der Verlust an Radioaktivität nicht mit einem Verlust an Protein einherging, nicht gelang, deuten die Ergebnisse darauf hin, daß es sich bei der Automodifikation des RT6.2-Streptag Proteins um eine kovalente, argininspezifische Bindung von ADPR handelt, da Hydroxylamin

eben diese Bindungen spezifisch spaltet. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, daß die RT6.2 Aminosäuresequenz zwei Arginine in Position 61 und 184 enthält, die in der entsprechenden Sequenz des RT6.1, welches nicht signifikant zur Automodifikation fähig ist, nicht enthalten sind.

Um die NADase-Aktivität des rekombinanten RT6 weiter zu untersuchen, wurde der Einfluß von NADP als konkurrierendes Substrat und von Nicotinamid als hemmendes Endprodukt auf diese Enzymfunktion betrachtet.

Es wurde hierfür jeweils eine logarithmische Verdünnungsreihe von NADP und Nicotinamid mit konstanten Mengen von DA Periplasmalysat und Histonen unter Zusatz von $^{32}\text{P-NAD}^+$ inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie des Western Blots der SDS-PAGE.

Abbildung 45A: Einfluß von NADP auf die NADase Aktivität des RT6.2-Streptag

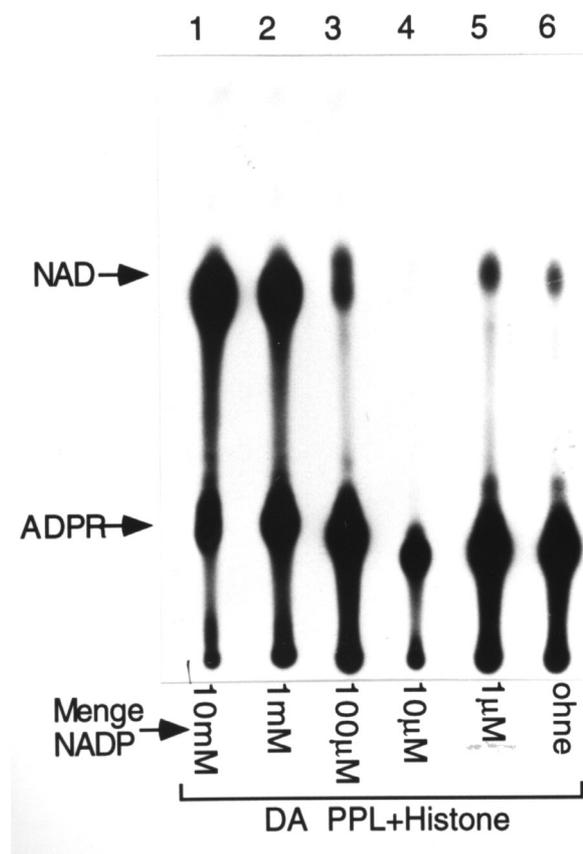
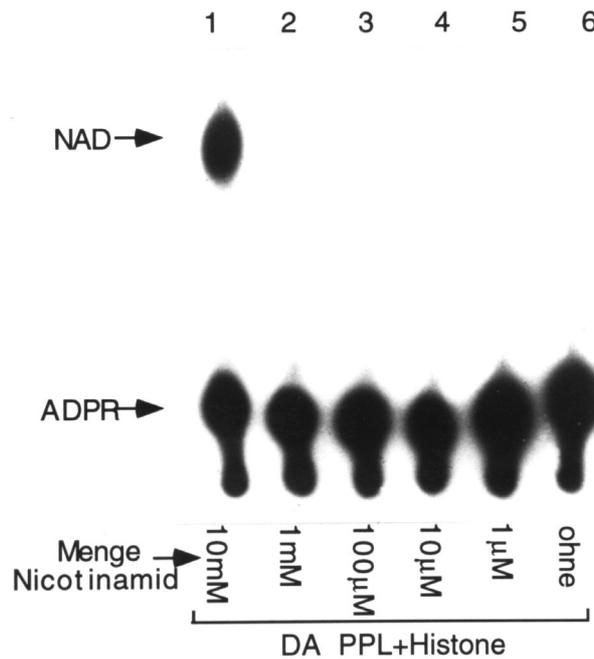


Abbildung 45B: Einfluß von Nicotinamid auf die NADaseaktivität des RT6.2-Streptag



Abbildungen 45A und 45B

Es wurde je eine logarithmische Verdünnungsreihe (10mM-1µM und 0) von NADP (45A) und Nicotinamid (45B) hergestellt. Jeder Ansatz wurde mit 1/8µl DA PPL, 100µg/ml Histone und 2,5µCi $^{32}\text{P-NAD}^+$ versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Nach der Proteinfällung mit je 10µl Strataclean ResinTM wurde je 1µl Überstand abgenommen und zusammen mit den Markern NAD und ADPR auf eine PEI-Dünnschichtchromatographieplatte getropft. Nach Trocknung der Proben erfolgte der Lauf zunächst in 1M Essigsäure und in 0,9M Essigsäure und 0,3M LiCl, wenn die Lauffront 3cm die Probenauftragstelle passiert hat. Nach Trocknen der Platte erfolgte die Exposition für 18h bei -80°C. Die Position von NAD und ADPR ist durch Pfeile markiert.

Hier zeigt sich, daß erst bei einer Konzentration von 10mM Nicotinamid eine sichtbare Hemmung der NADase-Aktivität eintritt (Abb. 45B, Spur 1).

NADP hemmt dagegen bereits in einer Konzentration von 100µM (Abb. 45A, Spur 3). Die 10µM NADP Spur 4 fällt hier aus dem Rahmen. Vermutlich aufgrund eines Pipetierfehlers wurde hier weniger $^{32}\text{P-NAD}^+$ eingesetzt.

Abbildung 46: Einfluß von NADP und Nicotinamid auf die ADPR-Transferaseaktivität des RT6.2-Streptag

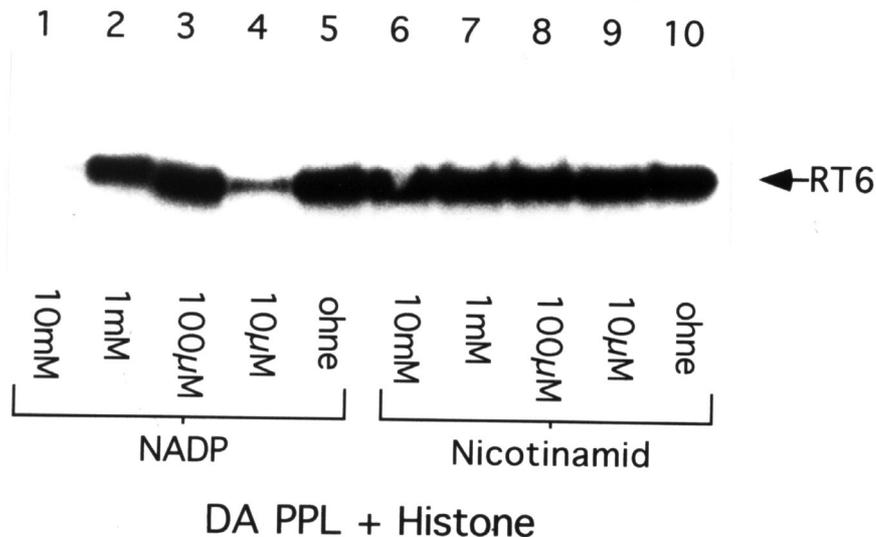


Abbildung 46

Die in Abbildung 45A und 45B beschriebenen Proteinfällungen wurden in Ladepuffer aufgenommen und in der SDS-PAGE (10% Tricine Trenngel) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Western Blot wurde getrocknet, abgedeckt und bei -80°C für 1d exponiert. Die Position des RT6.2-Streptag Konstrukts ist durch einen Pfeil markiert.

Bei der Betrachtung der Autoradiographie fällt auf, daß bei einer die NADase hemmenden Konzentration von 10mM Nicotinamid (Spur 6) keine sichtbare Beeinflussung der Automodifikation und damit der ADP-Ribosyltransferase erfolgt. Dies deutet darauf hin, daß NADase und ADP-Ribosyltransferase zwei voneinander getrennte Aktivitäten darstellen.

Der Einsatz von NADP dagegen zeigt Einfluß auf die Automodifikation des RT6.2-Streptag Proteins.

Der Einbau von Radioaktivität bleibt, wiederum abgesehen von der 10µM NADP Spur 4, bis zu einer Konzentration von 100µM NADP unverändert. Darüber liegende Konzentrationen von NADP schwächen den Einbau von Radioaktivität, erhöhen aber parallel dazu das Molekulargewicht des RT6.2. Dieser Effekt trat schon in Abbildung 42 bei größerer Verdünnung des DA Periplasmalysats und gleichbleibender NAD Konzentration auf.

Auch hier muß die Erklärung im Verhältnis von Enzym zu Substrat gesucht werden.

In diesem Versuch scheint NADP die NADase Aktivität zu hemmen, ohne die ADP-Ribosyltransferase Aktivität in gleicher Weise zu beeinflussen. Auch dies deutet darauf, daß NADase und ADP-Ribosyltransferase Aktivitäten des rekombinanten RT6.2 getrennte Vorgänge darstellen.

Ein signifikanter Unterschied in der ohnehin schwachen Markierung der Histone zwischen den verschiedenen Spuren zeigte sich nicht.

Zusammenfassend sprechen die hier gefundenen Ergebnisse dafür, daß die beiden rekombinanten Ratten RT6-Streptag Proteine eine potente NAD(Glycohydrol)ase-Aktivität besitzen, und bisher nur das RT6.2-Streptag Protein eine signifikante argininspezifische ADP-Ribosyltransferase-Aktivität in Form einer Automodifikation zeigt. Weitere potente Akzeptoren konnten nicht gefunden werden.

Weiterhin deuten die Untersuchungen darauf, daß NADase und ADP-Ribosyltransferase Aktivitäten des rekombinanten RT6.2 getrennte Reaktionen mit unterschiedlicher Kinetik darstellen.

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, Systeme zu etablieren, die eine rekombinante Herstellung von löslichem RT6 ermöglichen, um weitergehende Untersuchungen, als es mit membrangebundenem oder nativem Protein möglich wäre, zu erlauben.

Rekombinante Produktion bedeutet die Expression des gewünschten Proteins in biologischen Systemen, d.h. eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen, die dieses Protein normalerweise nicht synthetisieren. Hierzu wird die kodierende DNA (cDNA) mittels eines Expressionsvektors (Plasmid) in die entsprechenden Produktionszellen eingeschleust. Dieser Vorgang wird bei eukaryontischen Zellen Transfektion und bei prokaryontischen Transformation genannt. Die neben der cDNA des gewünschten Proteins enthaltenen DNA Sequenzen für Promotoren, Leader und Antibiotikaresistenz bestimmen die Produktions- und Detektionsbedingungen.

Diese gegenüber der nativen Expression optimierten Bedingungen stellen die Vorteile der rekombinanten Expression dar. Sie ermöglichen nicht nur die Produktion in großen Mengen für biochemische und Funktionsanalysen, Immunisierungen oder Röntgenstrukturanalysen, sondern bieten auch die Möglichkeit zur gezielten Veränderung der Struktur des Proteins durch in vitro Mutagenese.

Prinzipiell kann die Expression in prokaryontischen Zellen (Bakterien), oder eukaryontischen Zellen (verschiedene Zelllinien, Hefen, Insektenzellen) erfolgen. Beide Systeme bieten Vor- und Nachteile. Vorteile der Expression in Bakterien sind die größeren Mengen an Protein, die hergestellt werden können und die einfache Handhabung des Systems. Nachteile liegen im Entstehen von unlöslichen Proteinaggregaten (Einschlußkörperchen) und im Fehlen von für eukaryontische Proteine typischen posttranslationalen Modifikationen. Diese werden hingegen von eukaryontischen Zellen ausgeführt. Dies ist besonders für die Funktionsuntersuchung in vivo wichtig, da es hier auf die größtmögliche Übereinstimmung mit dem nativen Protein ankommt.

Um die Vorteile beider Verfahren zu nutzen, wurden sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Expressionssysteme etabliert.

Für die eukaryontische Expression wurde ein Konstrukt, welches für RT6 als Fusionsprotein mit dem Fc-Stück des humanen IgG1 kodiert, hergestellt. Ein solches Protein würde, da die C-terminale GPI-Membranverankerung des RT6 durch das Fc-Stück ersetzt wird, löslich produziert und anhand des Fc-Stücks detektiert und aufgereinigt werden können. Diese Art der Konstruktion ist ein schon mehrfach erfolgreich praktiziertes Verfahren zur Expression rekombinanter T- und B-Zell Oberflächenantigene. So wurden z.B. auf diese Weise Immunglobulininfusionsproteine des CD22 [90], CD27 [91], CD40 [92], CD44 Mutanten [93] und des $\gamma\delta$ T-Zellrezeptors [94] exprimiert, deren Funktion untersucht und korrespondierende Liganden gefunden.

Um für entsprechende Versuche mit den RT6 Immunglobulininfusionsproteinen über erprobte Kontrollen zu verfügen, wurden Fusionsproteine gleicher Konstruktionsart ausgewählt. Plasmide mit chimären Genen für Fusionsproteine aus dem Leader des humanen CD8 mit dem Fc-Stück des humanen IgG1, aus dem humanen CD40 mit dem Fc-Stück des humanen IgG1 und aus dem Maus Fas Antigen und dem Fc-Stück des Maus IgG2b standen bereits in unserem Labor zur Verfügung.

Die Konstruktion der Fusionsproteine für CD28 und B7 geschah in Anlehnung an [95] und [96], die für den Fas-Ligand in Anlehnung an [97] durch Amplifikation aus Rattenlymphknotenlymphozyten RNA und Herstellung chimäre Gene für Fusionsproteine mit dem humanen Fc-Stück des IgG1. Die Amplifikation für den Ratten T-Zell Differenzierungsmarker Thy-1 aus der Ratten T-Zelllinie C58NT schlug fehl (3.1.6).

Ein weiterer Grund für die Wahl dieser Proteine für die Konstruktion von Fusionsproteinen bestand darin, daß im Rattensystem zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit keine gegen ihre Liganden gerichtete Antikörper existierten. Somit würden entsprechende Fusionsproteine als Antikörperersatz dienen.

B7 und CD28 stellen korrespondierende Oberflächenantigene auf B- bzw. T-Zellen dar und spielen eine Rolle in der Regulation der Immunantwort. Die Interaktion von CD28 mit B7 vermittelt die interzelluläre Adhäsion von T-Zellen und aktivierten B-Zellen mit der Folge einer Kostimulation von T-Zellen, meßbar durch gesteigerte IL-2 Sekretion und Proliferation der T-Zellen [98].

Fas-Antigen und Fas-Ligand stellen ein weiteres korrespondierendes System dar. Sie gehören der Tumornekrosefaktor/Tumornekrosefaktorrezeptor Familie an. Das Typ II Transmembranprotein Fas-Ligand induziert Apoptose in Fas exprimierenden Zielzellen [97]. Es liegt im Gegensatz zu Typ I Transmembranproteinen mit seinem C-terminalen Anteil extrazellulär und N-terminal intrazellulär. Diese Besonderheit macht eine andere Klonierungsstrategie nötig und die rekombinante Expression schwierig.

Zur Tumornekrosefaktor/Tumornekrosefaktorrezeptor Familie gehört auch das CD40 Antigen dessen durch seinen natürlichen Liganden oder anti CD40 Antikörpern zu einer B-Zell Proliferation und Immunglobulinproduktion führt [92].

Als transientes Expressionssystem für die beschriebenen Fusionsproteine wurde die von Affennierenzellen abstammende Zelllinie COS7 (CV1 Origin SV40) [99] gewählt. Sie ist leicht kultivierbar, ermöglicht eine hohe Expressionsrate, ist gut transfizierbar und ist deshalb gut zur Produktion von rekombinanten Proteinen geeignet. Aufgrund der Expression des SV40 T Antigens ermöglicht sie die episomale Vermehrung von Plasmiden, die das SV40 Ori, ein vom SV40 Virus abstammender Replikationsstartpunkt, tragen. Zur Aufnahme der zu transfizierenden cDNA geeignete Plasmide sind pcDNA1™ und pcDNA3™(Invitrogen) sowie pME18 für die Expression des Typ II Transmembranpro-

teins Fas-Ligand. Sie enthalten neben dem SV40 Ori eine vom Cytomegalievirus abstammende Promotor/Enhancerregion und liegen in den transfizierten COS7 Zellen in hoher Kopienanzahl vor. Sie ermöglichen so die Produktion von bis zu 1µg/ml löslichen Proteins [100].

Auf diese Weise gelang die Konstruktion, Klonierung und Expression von Immunglobulinfusionsproteinen für RT6, Fas-Ligand und B7 der Ratte, sowie des humanen CD40 und des humanen Fc-Stücks ohne Fusionspartner (CD8 Leader-Fc). Der Nachweis einer CD28-Fc Fusionsproteinexpression konnte trotz erfolgreicher Klonierung nicht erbracht werden (3.1.10).

Die sich anschließende Aufreinigung der hergestellten Fusionsproteine bereitete große Schwierigkeiten. Es wurde versucht, die Fc-Stücke der Fusionsproteine durch Affinitätsäulenchromatographie über Protein G Sepharose zu binden, und sie nach erfolgter Bindung mittels einer Verschiebung des pH-Wertes wieder zu lösen. Dadurch sollte neben einer Reinigung abgenommener, rekombinante Fusionsproteine enthaltender Kulturüberstände auch eine Konzentrierung der Fusionsproteine erreicht werden.

Von den rekombinant hergestellten Proteinen ließen sich nur der Fas Ligand und das humane Fc-Stück ohne Fusionspartner (CD8 Leader-Fc) befriedigend aufreinigen. Die Schwierigkeiten bestanden darin, daß zu einem großen Teil eine Anreicherung von unspezifischen Proteinen, besonders um 50kD Molekülgröße unter reduzierenden Bedingungen, stattfand. Dies betraf besonders die Aufreinigungsversuche der RT6- und B7-Fusionsproteine. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, daß das verwendete Protein G zu bestimmten Bestandteilen des Serums, des Kulturmediums oder zu bestimmten Syntheseprodukten der Cos7 Zellen eine höhere Affinität besaß, als zu den Fc-Stücken der Fusionsproteine.

Die Verwendung von serumfreien Kulturmedium schaffte keine sicher reproduzierbare Lösung des Problems, so daß Serumbestandteile wahrscheinlich nur ein Teil des Problems darstellen. Auch die Benutzung industriell hergestellter Säulen mit rekombinantem Protein G ohne Bindungsstellen für Albumin (Protein G 4 Fast Flow™, Pharmacia) reduzierte nicht die Konzentration der als unspezifisch angesehenen Proteine, deren Herkunft letztlich nicht geklärt werden konnte. Die kleineren, immer wieder auftauchenden Proteine von 35kD-42kD Größe könnten dagegen abgespaltenen Fc-Stücken entsprechen.

Es ist vorstellbar, daß die unbefriedigende Aufreinigung der Proteine nicht an der mangelnden Bindung an die Säule lag, sondern an den Elutionsbedingungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht optimiert wurden.

Ein weiteres Problem ergab sich dadurch, daß einige Zeit nach erfolgter Aufreinigung kein CD8L-Fc bzw. RT6-Fc Protein in den entsprechenden Eluaten mehr nachweisbar

war. Diese mangelnde Stabilität der Eluate könnte durch die Anwesenheit von Proteasen oder durch ungenügende Neutralisierung der sauren Eluatfraktion erklärt werden.

Für funktionelle Untersuchungen der Fusionsproteine wurden wegen obiger Schwierigkeiten hauptsächlich unaufgeklärte Kulturüberstände verwendet. Erste Bindungsassays, Versuche zur Lymphozytenstimulation oder Apoptoseinduktion mit den Fusionsproteinen für B7 und Fas-Ligand blieben ohne signifikante Ergebnisse. Dies erklärt sich zum Teil dadurch, daß Antikörper gegen die physiologischen Liganden nicht zur Verfügung standen, und daher entsprechende Positivkontrollen beim Einsatz der Kontrollkonstrukte unmöglich wurden.

Für die RT6 Fusionsproteine bedeutete dies, daß die Suche nach einem physiologischen Liganden mangels geeigneter Kontrollmöglichkeiten immens erschwert wurde. Da zudem im Laufe dieser Arbeit die Entdeckung der Zugehörigkeit des RT6 zur Familie der mono-ADP-Ribosyltransferasen erfolgte [55,82,24], und die damit verbundene Analyse seiner Enzymaktivität zunehmend an Bedeutung gewann, trat die Ligandensuche bis auf weiteres in den Hintergrund.

Nichtsdestotrotz stellen die RT6 Immunglobulininfusionsproteine, wie auch die als Kontrollkonstrukte gedachten Fas-Ligand-, B7- und CD28 Immunglobulininfusionsproteine, wertvolle Instrumente für weitere Untersuchungen immunologischer Prozesse wie z.B. B- und T-Zell Interaktion, Lymphozytenaktivierung oder Apoptosevorgängen dar, zumal entsprechende Antikörper nicht vorhanden sind. Darüberhinaus erlauben sie, die Suche nach einem physiologischen RT6 Liganden in späteren Arbeiten wieder aufzunehmen.

Aus der Entdeckung der Enzymfunktion des RT6 erwachsen neue Möglichkeiten der Funktionsuntersuchung der RT6 Fusionsproteine. In entsprechenden Enzymassays konnten in dieser Arbeit die vom nativen RT6.1 bekannte NADase Aktivität und die vom nativen RT6.2 bekannte Auto-ADP-Ribosylierung [24] auch für die hier rekombinant hergestellten RT6 Immunglobulininfusionsproteine nachgewiesen werden.

Um die enzymatische Aktivität der RT6 Proteine besser untersuchen zu können, wurde durch diese Arbeit ein prokaryontisches System zur Produktion großer Mengen an RT6 Protein etabliert. Genauere Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von Proteinen werden durch die Verfügbarkeit größerer Mengen des Enzyms wesentlich erleichtert. Zwar gelang in dieser Arbeit, die enzymatische Aktivität der eukaryontisch hergestellten RT6 Immunglobulininfusionsproteine nachzuweisen (s. 3.1.12., Abbildungen 22-24), doch sind auf diese Weise nur schwerlich größere Mengen des Proteins für weitergehende Analysen gewinnbar. Deshalb wurde ein auf E. coli basierendes, prokaryontisches Expressionssystem etabliert, welches eine hohe Ausbeute mit einer einfachen Handhabung kombiniert.

Ein generelles Problem bei der Verwendung bakterieller Expressionssysteme ist, neben dem Ausbleiben posttranslationaler Modifikationen, die Tatsache, daß die Ausbildung von Disulfidbrücken zur Bildung der für die Funktion wichtigen korrekten Tertiärstruktur des Proteins durch die im Bakterienzytoplasma vorherrschenden, reduzierenden Bedingungen erschwert wird. Außerdem reagieren viele Bakterien auf die Produktion sehr großer Mengen Fremdproteins mit der Bildung von Aggregaten denaturierter, biologisch inaktiver Formen des Proteins, sog. Einschlußkörperchen (inclusion bodies), aus denen die rekombinanten Proteine nur schwer präparierbar sind.

Um diese Probleme weitestgehend zu umgehen, wurde für die RT6 Expression das StreptagTM-System (Biometra) gewählt [101]. Hierbei wird durch die Vorschaltung eines bakteriellen Leaders für das omp-Protein A (outer membrane protein A) vor die cDNA Sequenz der Transport des gewünschten Proteins in den periplasmatischen Spalt des Bakteriums vermittelt. Hier herrschen, anders als im Zytoplasma des Bakteriums, oxidative Bedingungen ähnlich denen im endoplasmatischen Retikulum eukaryontischer Zellen vor, so daß die Ausbildung von Disulfidbrücken und damit der korrekten Tertiärstruktur des rekombinanten Proteins ermöglicht wird. Ein weiterer Vorteil der Produktion in den periplasmatischen Spalt stellt die schonende Präparation der Proteine dar. So kann über einen milden osmotischen Schock der Periplasmaraum eröffnet werden, ohne das gesamte Bakterium zu zerstören. Dadurch ist es möglich, mittels Zentrifugation den Inhalt des Periplasmarumes, in dem sich hauptsächlich das rekombinante Protein befindet, von dem Rest des Bakteriums mit seinen eigenen Proteinen zu trennen. Die Herstellung und Gewinnung des rekombinanten Proteins stellt damit an sich gleichzeitig ein gutes Aufreinigungsverfahren dar.

Ein weiteres Merkmal des Streptag Systems ist ein synthetisches Peptid aus 10 Aminosäuren (Streptag), das C-terminal an das herzustellende Protein gekoppelt wird. Im Falle des RT6 wurde die für die GPI-Membranverankerung verantwortliche Signalsequenz durch dieses Peptid ausgetauscht. Da der Streptag, ähnlich wie Biotin, von Streptavidin gebunden wird, ist durch ihn eine Detektion, und auch eine weitere Aufreinigung des rekombinanten RT6 möglich. Da die Bindungsaffinität von Streptavidin zum Streptag geringer ist als zu Biotin oder Diaminobiotin, können diese Substanzen zur Elution eingesetzt werden und damit aggressive Verfahren wie Absenkung des pH-Wertes vermieden werden.

Der für das Streptag System geeignete Expressionsvektor pASK 60TM(Biometra) enthält den Promotor des lac-Operons. Die Zugabe von Galaktose oder Analoga wie IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid) bewirkt eine Anschaltung der Transkriptionseinheit und damit eine über die basale Expression weit hinausgehende Expression.

Die hohe Expressionsrate nach Induktion kann zur Bildung von Einschlusskörperchen führen. Aus diesem Grund mußten die Kultivationsbedingungen sorgfältig optimiert werden.

Um die Bildung von Einschlusskörperchen, die trotz Sekretion des RT6 Streptag Fusionsproteins in den Periplasmaraum auftreten kann, zu minimieren, wurden die Bakterien bei 30°C kultiviert. Die Induktion und die Kultivierung nach der Induktion erfolgte aus dem gleichen Grund bei Raumtemperatur, da niedrigere Temperaturen mit einer kleineren Rate an Einschlusskörperchenbildung einhergehen [102].

Weitere Optimierungen der Expressionsbedingungen betrafen den verwendeten E. coli Stamm und die Antibiotikakonzentration in der Kultur. So erwies sich die Verwendung von NM522 Bakterien bei einer Antibiotikakonzentration von 200µg/ml Ampicillin als optimal. Durch die Erhöhung der Antibiotikakonzentration wurde der Selektionsdruck auf die Bakterien vergrößert, einem Abbau des Antibiotikums während der bis zu 20 Stunden betragenden Expression entgegengewirkt und damit ein Überwuchern der Kultur mit nicht plasmidtragenden Bakterien verhindert.

Auf diese Weise gelang die Konstruktion und die Expression von RT6.1- und RT6.2 Streptag Fusionsproteinen. Die Ausbeute mit ca. 1,6µg/µl war dabei so hoch und die gewonnenen Periplasmapräparationen so rein, daß auf eine weitere Aufreinigung und Konzentrierung verzichtet werden konnte, zumal erste dahingehende Versuche unbefriedigend verliefen.

Im folgenden wurde die enzymatische Aktivität der hergestellten rekombinanten RT6 Streptag Fusionsproteine untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl das RT6.1 Streptag Konstrukt als auch das RT6.2 Streptag Fusionsprotein die den nativen RT6 Proteinen entsprechenden Enzymaktivitäten [24] aufweisen. So zeigen beide Fusionsproteine eine NADase Aktivität, während nur das RT6.2 Streptag Konstrukt die Fähigkeit zur Auto-ADP-Ribosylierung aufweist. Spätere von J. Schröder durchgeführte Versuche mit den hier beschriebenen rekombinant hergestellten RT6 Streptag Fusionsproteinen ergaben, daß diese durch monoklonale Antikörper gegen natives RT6 präzipitiert und aufgereinigt werden können. Dies bedeutet einen weiteren Hinweis auf die korrekte Tertiärstruktur und damit Funktionalität der RT6 Streptag Proteine.

Weitere Akzeptoren für den Transfer der ADPR, neben RT6.2 selbst, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht ausgemacht werden. Eine Modifikation von Histonen oder der leichten Kette des M2 Antikörpers, wie sie z.B. für die Maus Rt6 Proteine nachgewiesen ist [104, 85] konnte durch die rekombinanten Ratten RT6 Proteine nicht bewirkt werden. Es wurde auch keine Modifikation anderer argininreicher Akzeptoren wie Protamin, Polyarginin oder von Rinder Serumalbumin festgestellt.

Der Prozeß der Automodifikation des RT6.2 Streptag Proteins konnte genauer charakterisiert werden. Es ergab sich eine Abspaltbarkeit der ADPR durch Hydroxylamin, welches spezifisch Arginin-ADPR Bindungen löst [105], bei weitgehender Stabilität gegenüber Quecksilberchlorid, das Thiolbindungen angreift [105]. Dies entspricht ebenfalls den bereits für das native RT6 beschriebenen Charakteristika der Automodifikation des RT6.2 [24]. Im Gegensatz zu den Befunden von Maehama et al. (1995) [106] konnte keine Automodifikation des RT6.1, weder der eukaryontisch noch der prokaryontisch exprimierten RT6.1 Konstrukte, nachgewiesen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen RT6-Streptag Konstrukte wurden in späteren Experimenten verwendet, um zu zeigen, daß die Automodifikation des RT6.2 nicht, wie zunächst angenommen, durch zwei Argininreste (R61 und R184), welche in der RT6.1 Sequenz nicht vorkommen, sondern durch Unterschiede in den enzymatischen Eigenschaften der RT6 Proteine bedingt ist (Haag, 1996 in [12]). So wurde durch in vitro Mutageneseexperimente der C-Terminus des RT6.2 als maßgeblich für die enzymatische Aktivität bestimmt, und ein sich selbst modifizierendes Protein, das sich in nur drei Aminosäureresten, von denen keiner Arginin war, von RT6.1 unterscheidet, erzeugt [12]. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß die ADP-Ribosylierung nicht nur mit einer einzigen ADPR-Einheit, sondern mit bis zu fünf ADPR Molekülen geschehen kann [12]. Diese Beobachtung läßt sich mit der in dieser Arbeit gemachten Beobachtung einer Änderung des Molekulargewichts des RT6.2 Streptag Proteins bei variierenden Enzym - Substrat Verhältnissen vereinbaren. Da sich bei den entsprechenden Versuchen zur Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch NAD und Nicotinamid ein unterschiedliches Verhalten der NADase und Auto-ADP-Ribosylierung ergab, deutet dies zusätzlich auf eine getrennte Funktion dieser beiden Enzymaktivitäten des RT6.

Diese Arbeit beleuchtet nur einen kleinen Teil der Eigenschaften und Funktionen des RT6, bei deren Aufklärung man noch vor vielen Rätseln steht. So ist beispielsweise unklar, woher das RT6 in vivo NAD als Substrat für seine Enzymaktivität bekommt. Man kann darüber spekulieren, ob im Rahmen von Entzündungsprozessen oder Zelluntergang das vornehmlich intrazellulär vorkommende NAD freigesetzt und damit dem Ektoenzym RT6 zugänglich gemacht wird, oder ob RT6, wie manche bakterielle ADPR-Transferasen [58], nach Bindung an Rezeptoren bzw. Liganden internalisiert wird, um dann über ADP-Ribosylierung von bisher unbekanntem Zielproteinen regulative Funktionen auszuüben. Denkbar sind auch durch alternatives Splicing [51,52] entstehende intrazelluläre RT6 Proteine.

Interessant sind in diesem Zusammenhang Beobachtungen von Dennert et al. [107], die eine Herunterregulation des zytotoxischen Potentials und eine Proliferationshemmung aktivierter zytotoxischer T-Zellen der Maus durch eine GPI-verankerte, argininspezifische

sche ADPR-Transferase auf deren Oberfläche nachweisen konnten. Möglicherweise handelt es sich hierbei um das Mauthomolog Rt6.

Auch für die Ratte wurde eine teilweise Hemmung der Proliferation von T-Zellen nach Zugabe von NAD gezeigt [104]. Dabei wurde auf der Oberfläche der untersuchten T-Zellen nur RT6.2 ADP-ribosyliert.

Darüberhinaus scheint RT6 eine Wirkung als Aktivierungsantigen zu haben. Eine durch Antikörperbrückenbildung erreichte Quervernetzung von RT6 auf T-Zellen in Gegenwart des Phorbolesters PMA führt zu einer vermehrten Expression von IL-2 Rezeptoren und daraufhin zu einer vermehrten Proliferation [109,108]. RT6 ist mit intrazellulären Tyrosin-Proteinkinasen der src Familie assoziiert. Rigby et al schlossen, daß RT6 als Teil eines aus mehreren Untereinheiten bestehenden Rezeptors an einem Aktivierungssignalweg für eine regulatorische T-Zellpopulation beteiligt ist und somit eine immunmodulierende Funktion ausübt.

Es erscheint somit denkbar, daß RT6 als Teil eines Signalübertragungsweges an der Regulation der Immunantwort beteiligt ist. Dies könnte insbesondere bei Geschehen mit vermehrter extrazellulärer NAD Konzentration wie beispielsweise Entzündungen oder vermehrtem Zelltod der Fall sein.

Um solche Hypothesen zu untersuchen, wäre es wünschenswert, physiologische Zielproteine neben RT6.2 selbst, sowie den physiologischen Liganden des potentiellen Rezeptors RT6 zu finden.

Über die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche hinaus bieten sich deshalb durch die Möglichkeit der einfachen, rekombinanten Produktion großer Mengen funktionell aktiver RT6 und durch die Etablierung funktionabler Expressionssysteme vielfältige Wege der weiteren Erforschung der Bedeutung des RT6 und seiner Rolle im Immunsystem. Desweiteren sind mit den eukaryontisch exprimierten Kontrollkonstrukten (Fas-Ligand und B7) Werkzeuge geschaffen worden, die eine weitere Erforschung interessanter immunologischer Mechanismen ermöglichen, und somit zu deren Klärung beitragen können.

5. Zusammenfassung

RT6 ist ein 25 kD -34 kD großes Membranprotein auf peripheren und intraepithelialen T-Lymphozyten der Ratte, bei der es zuerst beschrieben wurde. Es liegt bei der Ratte als ein Einzelgen vor, von dem zwei allele Varianten, RT6a und RT6b, bekannt sind. Die Gen-

produkte heißen entsprechend RT6.1 und RT6.2. Beide Genprodukte sind durch kovalente Bindung an Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert. Während das RT6.1 glykosyliert wird, findet eine Glykosylierung des RT6.2 nicht statt.

Defekte der RT6 Expression sind in Maus- und Rattenmodellen für Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematoses und insulinpflichtiger Diabetes mellitus mit erhöhter Erkrankungsanfälligkeit assoziiert. Ein kausaler Zusammenhang konnte bisher nicht gezeigt werden.

Das RT6 gehört zur Familie der ADP-Ribosyltransferasen und zeigt damit Ähnlichkeit zu bestimmten bakteriellen Toxinen, z.B. Cholera toxin und Diphtherietoxin. Wie diese besitzt das RT6 eine NAD-spaltende Aktivität, bei der NAD in Nicotinamid und ADP-Ribose gespalten wird. Darüberhinaus ist RT6.2 in der Lage, ADPR auf sich selbst zu transferieren (Automodifikation). Ob noch weitere Zielmoleküle bestehen ist derzeit unbekannt.

Das RT6 Gen des Menschen ist inaktiv, da es, wie auch die RT6 Gene von Primaten, drei vorzeitige Stopcodons aufweist, die eine Proteinsynthese unmöglich machen. Bei weitergehenden Untersuchungen fanden sich jedoch weitere zum RT6 verwandte Gene im menschlichen Genom.

Zur Aufklärung der Funktion von RT6 ist es nötig, genügend lösliches Protein als Untersuchungsmaterial zu gewinnen, um damit z.B. Enzymassays durchzuführen oder einen möglicherweise vorhandenen Liganden des RT6 zu suchen.

Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit RT6 Immunglobulin- und Streptag Fusionsproteine konstruiert sowie pro- und eukaryontische Systeme zur Expression der rekombinanten RT6 Proteine etabliert.

Die in diesen Expressionssystemen hergestellten Fusionsproteine erwiesen sich als funktionell, da für rekombinante RT6.1 und RT6.2 Proteine eine NADase Aktivität und für das rekombinante RT6.2 Protein zusätzlich eine argininspezifische Auto-ADP-Ribosylierung nachgewiesen werden konnte.

Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche sind wertvolle Instrumente geschaffen worden, die die weitere Untersuchung der Rolle des RT6 im Immunsystem erleichtern.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Expressionssysteme bieten für die Zukunft eine einfache Möglichkeit zur rekombinanten Herstellung weiterer Proteine, und die eukaryontisch hergestellten Immunglobulin-Fusionsproteine (Fas-Ligand und B7) ermöglichen die Erforschung weiterer interessanter immunologischer Phänomene.

6. Literaturverzeichnis

1. Riede, U.-N., Schaefer, H.-E. (1993). Allgemeine und spezielle Pathologie, Thieme Verlag.
2. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (1993). Immunology, Mosby-Year Book Europe.
3. Thiele, H.G., Koch, F., Kashan, A. (1987). Postnatal distribution profiles of Thy-1+ and RT6+ cells in peripheral lymph nodes of DA rats. Transplant. Proc. 19:3157-60.

4. Haag, F., Nolte, F., Lernmark, A., Simrell, C., Thiele, H.G. (1993). Analysis of T cell surface marker profiles during the postnatal ontogeny of normal and diabetes prone rats. *Transplant. Proc.* 25:2831-32.
5. Dianzani, U., Luqman, M., Rojo, J., Yagi, J., Baron, J.L., Woods, A., Janeway, C.J. Bottomly, K. (1990). Molecular associations on the T cell surface correlate with the immunological memory. *Europ. J. Immunology* 20:2249-57.
6. Novak, T.J., Farber, D., Leitenberg, D., Hong, S.C., Johnson, P., Bottomly, K. (1994). Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity* 1:109-119.
7. Hunt, H.D., Lubaroff, D.M. (1987). Changes in membrane antigen phenotype of T cells during lectin activation. *Transplant. Proc.* 19:3179-80.
8. Thiele, H.G. (1988). Rat Thy-1 antigen and its relation to RT6. In *Cell surface antigen Thy-1. Immunology, Neurology and Therapeutic Applications*, A.E. Reif, M. Schlesinger, ed. 149-170. New York: Marcel Dekker.
9. Lubaroff, D.M., Rasmussen, G.T., Hunt, H.D. (1989). The RT6 T cell antigen: its role in the identification of functional subsets and in T cell activation. *Transpl. Proc.* 21:3251-54.
10. Hunt, H.D., Lubaroff, D.M. (1992). Identification of functional T cell subsets and surface antigen changes during activation as they relate to RT6. *Cell Immunology* 143:194-211.
11. Hosseinzadeh, H., Goldschneider, I. (1993). Recent Thymic Emigrants in the Rat Express a Unique Antigenic Phenotype and Undergo Post-Thymic Maturation in Peripheral Tissues. *J. Immunol.* 150:1670-79.
12. Haag, F. (1996). Der T-Zell-Differenzierungsmarker RT6: ein polymorphes System GPI-verankerter Oberflächenenzyme mit Verwandtschaft zu bakteriellen ADP-ribosylierenden Toxinen. *Habilitationsschrift, Med. Universitätsklinik Hamburg Eppendorf.*
13. Fangmann, J., Schwinzer, R., Winkler, M., Wonigeit, K. (1990). Expression of RT6 alloantigens and the T-cell receptor on intestinal intraepithelial lymphocytes of the rat. *Transpl. Proc.* 22:2543-44.
14. Fangmann, J., Schwinzer, R., Hedrich, H.J., Kloting, I., Wonigeit, K. (1991). Diabetes-prone BB rats express the RT6 alloantigen on intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 21:2011-15.
15. Guy-Grand, D., Vassali, P. (1993). Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr. Op. Immunol.* 5:247-252.
16. Butcher, G.W., Clarke, S., Tucker, E.M. (1979). Close linkage of peripheral T-lymphocyte antigen A (PtaA) to the hemoglobin variant Hbb on linkage groupe I of the rat. *Transpl. Proc.* 11:1629-30.
17. Koch, F., Haag, F., Kashan, A., Thiele, H.G. (1990). Primary structure of rat RT6.2, a nonglycosylated phosphatidylinositol-linked surface marker of postthymic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:964-967.
18. Thiele, H-G., Koch, F., Haag, F., Wurst, W. (1989). Evidence for normal thymic export of lymphocytes and an intact RT6a gene in RT6 deficient diabetes prone BB-rats. *Thymus* 14:137-143.
19. Thiele, H.G., Koch, F., Hamann, A., Arndt, R. (1986). Biochemical characterization of the T-cell alloantigen RT6.2. *Immunol.* 59:195-201.
20. Koch, F., Thiele, H.G., Low, M. (1986). Release of the rat T cell alloantigen RT6.2 from cell membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Exp. Med.* 164:1338-43.
21. Koch, F., Kashan, A., Thiele, H.G. (1988). The rat T-cell differentiation marker RT6.1 is more polymorphic than its alloantigenic counterpart RT6.2. *Immunol.* 65:259-265.
22. Haag, F., Koch, F., Thiele, H.G. (1990). Polymorphism between rat T-cell alloantigens RT6.1 and RT6.2 is based on multiple amino acid substitutions. *Transpl. Proc.* 22:2541-42.

23. Crisa, L., Greiner, D., Mordes, J. P., MacDonald, R., Handler, E., Czech, M., Rossini, A. (1990). Biochemical studies of RT6 alloantigens in BB/Wor and normal rats. Evidence for intact unexpressed RT6a structural gene in diabetes-prone BB rats. *Diabetes* 39:1279-88.
24. Haag, F., Andresen, V., Karsten, S., Koch-Nolte, F., Thiele, H.G. (1995). Both allelic forms of rat T cell differentiation marker RT6 display nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-glycohydrolase activity, yet only RT6.2 is capable of automodification upon incubation with NAD. *Eur. J. Immunol.* 25:2355-61.
25. Haag, F., Koch, F., Thiele, H.G. (1990). Nucleotide and deduced amino acid sequence of the rat T-cell alloantigen RT6.1. *Nucleic Acids Res.* 18:1047.
26. Mojic, C., Greiner, D., Medlock, E., Komschlies, K., Goldschneider, I. (1988). Characterization of RT6 bearing rat lymphocytes - ontogeny of the RT6+ subset. *Cell. Immunol.* 114:336-346.
27. Thiele, H.G., Haag, F., Nolte, F. (1993). Asymmetric Expression of RT6.1 and RT6.2 Alloantigens in (RT6a x RT6b)F1 Rats is Due to a Pretranslational Mechanism. *Transpl. Proc.* 25:2786-88.
28. Prochazka, M., Gaskins, H., Leiter, E., Koch-Nolte, F., Haag, F., Thiele, H.G. (1991). Chromosomal location, DNA polymorphism, and expression of Rt-6, the mouse homologue of rat T-lymphocyte differentiation marker RT6. *Immunogenetics* 33:152-156.
29. Mason, D., Fowell, D. (1992). T-cell subsets in autoimmunity. *Curr. Op. Immunol.* 4:728-732.
30. Burstein, D., Mordes, J., Greiner, D., Stein, D., Nakamura, N., Handler, E., Rossini, A. (1989). Prevention of diabetes in BB/Wor rat by single transfusion of spleen cells. Parameters that effect degree of protection. *Diabetes* 38:24-30.
31. Fowell, D., Mason, D. (1993). Evidence that the T cell Repertoire of Normal Rats Contains Cells with the Potential to Cause Diabetes. Characterization of the CD4+ T Cell Subset that Inhibits this Autoimmune Potential. *J. Exp. Med.* 177:627-636.
32. Rossini, A., Mordes, J., Like, A. (1985). Immunology of Insulin-dependent Diabetes mellitus. *Ann. Rev. Immunol.* 3:289-320.
33. Greiner, D., Handler, E., Nakanko, K., Mordes, J., Rossini, A. (1986). Absence of the RT6 T cell subset in diabetes-prone BB/W rats. *J. Immunol.* 136:148-151.
34. Crisa, L., Sarkar, D., Waite, D., Haag, F., Koch-Nolte, F., Rajan, T., Mordes, J., Handler, E., Thiele, H.G., Rossini, A., Greiner, D. (1993). A RT6a Gene is Transcribed and Translated in Lymphopenic Diabetes-Prone BB Rats. *Diabetes* 42:688-695.
35. Angelillo, M., Greiner, D., Mordes, J., Handler, E., Nakamura, N., McKeever, U., Rossini, A. (1988). Absence of RT6+ T cells in diabetes-prone biobreeding/Worcester rats is due to genetic and cell developmental defects. *J. Immunol.* 141:4146-51.
36. Markholst, H., Eastman, S., Wilson, D., Andreasen, B., Lernmark, A. (1991). Diabetes segregates as a single locus in crosses between inbred BB rats prone or resistant to diabetes. *J. Exp. Med.* 174:297-300.
37. Jacob, H., Petterson, A., Wilson, D., Mao, Y., Lernmark, A., Lander, E. (1992). Genetic dissection of autoimmune type I diabetes in the BB rat. *Nature Genetics* 2:56-60.
38. Hornum, L., Jackerott, M., Markholst, H. (1995). The rat T-cell lymphopenia resistance gene (Lyp) maps between D4Mit6 and Npy on RN04. *Mamm. Genome* 6:371-372.
39. Fuks, A., Colle, E., Guttman, R. (1995). Recombinant haplotype bearing the lymphopenia gene of the BB rat. *Exp. Clin. Immunogen.* 12:48-52.
40. Colle, E., Fuks, A., Poussier, P., Edouard, P., Guttman, R. (1992). Polygenic nature of spontaneous diabetes in the rat. Permissive MHC haplotype and presence of the lymphopenic trait of the BB rat are not sufficient to produce susceptibility. *Diabetes* 41:1617-23.
41. Colle, E., Guttman, R., Seemayer, T. (1981). Spontaneous diabetes mellitus syndrome in the rat. Association with the major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* 134:1234 ff.

42. Colle, E., Guttman, R., Fuks, A. (1986). Insulin-Dependent Diabetes Mellitus is Associated with Genes that Map to the Right of the Class I RT1.A Locus of the Major Histocompatibility Complex of the Rat. *Diabetes* 35:454-458.
43. Fuks, A., Ono, S., Colle, E., Guttman, R. (1990). A single dose of the MHC-linked susceptibility determinant associated with the RT1u haplotype is permissive for insulin-dependent diabetes mellitus in the BB rat. *Exp. Clin. Immunogen.* 7:162-169.
44. Greiner, D., Mordes, J., Handler, E., Angelillo, M., Nakamura, N., Rossini, A. (1987). Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester (BB/W) rats. *J. Exp. Med.* 166:461-475.
45. Rossini, A., Faustmann, D., Woda, B., Like, A., Szymanski, I., Mordes, J. (1984). Lymphocyte transfusions prevent diabetes in the Bio-Breeding/Worcester (BB/W) rat. *J. Clin. Invest.* 74:39-46.
46. Powrie, F., Mason, D. (1990). Ox-22 high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the Ox-22 low subset. *J. Exp. Med.* 172:1701-08.
47. Charlton, B., Lafferty, K. (1995). The Th1/Th2 balance in autoimmunity. *Curr. Op. Immunol.* 7:793-798.
48. Leonard, J., Waldburger, K., Goldmann, S. (1995). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J. Exp. Med.* 181:381-386.
49. Trembleau, S., Penna, G., Bosi, E., Mortara, A., Gately, M., Adorini, L. (1995). Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J. Exp. Med.* 181:817-821.
50. Germann, T., Szeliga, J., Hess, H., Storkel, S., Podlaski, F., Gately, M., Schmitt, E., Rude, E. (1995). Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4823-27.
51. Haag, F., Nolte, F., Hollmann, C., Thiele, H.G. (1993). Analysis of the Gene for the Rat T Cell Alloantigen RT6: Evidence for Alternative Splicing in the 5' Region. *Transpl. Proc.* 25:2884-85.
52. Haag, F., Kuhlenbäumer, G., Koch-Nolte, F., Wingender, E., Thiele, H.G. (1996). Structure of the gene encoding for the rat T cell ecto-ADP-ribosyltransferase RT6.2. *J. Immunol.* 157: 2022-30.
53. Koch, F., Haag, F., Kasha, A., Thiele, H.G. (1989). Construction of a rat T-cell hybridoma cDNA expression library and isolation of a cDNA clone for the rat T-cell differentiation marker RT6.2. *Immunol.* 67:344-350.
54. Birnstiel, M., Busslinger, M., Strub, K. (1985). Transcription termination and 3' processing: the end is in site! *Cell* 41:349-359.
55. Zolkiewska, A., Nightingale, M., Moss, J. (1992). Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11352-356.
56. Okazaki, I., Zolkiewska, A., Nightingale, M., Moss, J. (1994). Immunological and structural conservation of mammalian skeletal muscle glycosylphosphatidylinositol-linked ADP-ribosyltransferases. *Biochem.* 33:12828-836.
57. Tsuchiya, M., Hara, N., Yamada, K., Osago, H., Shimoyama, M. (1994). Cloning and expression of cDNA for arginine-specific ADP-ribosyltransferase from chicken bone marrow cells. *J. Biol. Chem.* 269:27451-457.
58. Ueda, K., Hayaishi, O. (1985). ADP-ribosylation. *Ann. Rev. Biochem.* 54:73-100.
59. Moss, J., Vaughan, M. (1977). Mechanism of action of cholera antigen. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity with arginine as an acceptor. *J. Biol. Chem.* 252:2455-57.
60. Moss, J., Stanley, S., Burns, D., Hsia, J., Yost, D., Myers, G., Hewlett, E. (1983). Activation of thiol of the latent NAD glycohydrolase and ADP-ribosyltransferase activities of Bordetella pertussis toxin (islet-activating protein). *J. Biol. Chem.* 258:11879-882.
61. Aktories, K., Ankenbauer, T., Schering, B., Jakobs, K. (1986). ADP-ribosylation of platelet actin by Botulinum C2 toxin. *Eur. J. Biochem.* 161:155-162.

62. Aktories, K., Barmann, M., Ohishi, I., Tsuyama, S., Jakobs, K., Habermann, E. (1986). Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature* 322:390-392.
63. Aktories, K., Just, I., Rosenthal, W. (1988). Different types of ADP-ribose protein bonds formed by Botulinum C2 toxin, Botulinum ADP-ribosyltransferase C3 and Pertussis toxin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 156:361-367.
64. Aktories, K., Braun, U., Rosener, S., Just, I., Hall, A. (1989). The rho gene product expressed in *E. coli* is a substrate of Botulinum ADP-ribosyltransferase C3. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 158:209-213.
65. Just, I., Mohr, C., Schallehn, G., Menard, L., Didsbury, J., Vandekerckhove, J., Aktories, K. (1992). Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by *Clostridium limosum*. *J. Biol. Chem.* 267:10274-280.
66. Nemoto, Y., Namba, T., Teru, U., Ushikubi, F., Morii, N., Narumiya, S. (1992). A rho gene product in human blood platelets. Identification of the platelet substrate for botulinum C3 ADP-ribosyltransferase as rhoA protein. *J. Biol. Chem.* 267:20916-920.
67. Choe, S., Bennet, M., Fujii, G., Curmi, P., Kantardjieff, K., Collier, R., Eisenberg, D. (1992). The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 357:216-222.
68. Allured, V., Collier, R., Carrol, S., McKay, D. (1986). Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0 Angstrom resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1320-24.
69. Sixma, T., Pronk, S., Kalk, K., Wartna, E., van Zanten, B., Witholt, B., Hol, W. (1991). Crystal structure of cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* 351:371-377.
70. Stein, P., Boodhoo, A., Armstrong, G., Cockle, S., Klein, M., Read, R. (1994). The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* 2:45-57.
71. Antoine, R., Tallett, A., van Heyningen, S., Loch, C. (1993). Evidence for a catalytic role of glutamic acid 129 in the NAD-glycohydrolase activity of the pertussis toxin S1 subunit. *J. Biol. Chem.* 268:24149-155.
72. Kim, H., Jacobsen, E., Jacobsen, M. (1994). NAD Glycohydrolases: A possible function in calcium homeostasis. *Mol. Cell. Biochem.* 138:237-243.
73. Lee, H., Walseth, T., Bratt, G., Hayes, R., Clapper, D. (1989). Structural determination of a cyclic metabolite of NAD⁺ with intracellular Ca²⁺ -mobilizing activity. *J. Biol. Chem.* 264:1608-15.
74. Guse, A., da Silva, C., Emmrich, F., Ashamu, G., Potter, B., Mayr, G. (1995). Characterization of cyclic adenosine diphosphate-ribose-induced Ca²⁺ release in T lymphocyte cell lines. *J. Immunol.* 155:3353-59.
75. Watkins, P., Kanaho, Y., Moss, J. (1987). Inhibition of the GTPase activity of transducin by an NAD⁺:arginine ADP-ribosyltransferase from turkey erythrocytes. *Biochem. J.* 248:749-54.
76. Iglewski, W., Lee, H., Muller, P. (1984). ADP-ribosyltransferase from beef liver which ADP-ribosylates elongation factor 2. *Febs. Lett.* 173:113-118.
77. Lee, H., Iglewski, W. (1984). Cellular ADP-ribosyltransferase with the same mechanism of action as diphtheria toxin and *Pseudomonas* toxin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2703-07.
78. Sayhan, O., Ozdemirli, M., Nurten, R., Bermek, E. (1986). On the nature of cellular ADP-ribosyltransferase from rat liver specific for elongation factor 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139:1210-14.
79. Tanuma, S., Kawashima, K., Endo, H. (1987). An NAD:cysteine ADP-ribosyltransferase is present in human erythrocytes. *J. Biochem. Tokyo* 101:821-824.
80. Tanuma, S., Kawashima, K., Endo, H. (1988). Eucaryotic mono(ADP-ribosyl)transferase that ADP-ribosylates GTP-binding regulatory Gi protein. *J. Biol. Chem.* 263:5485-89.
81. Tanuma, S., Endo, H. (1989). Mono(ADP-ribosyl)ation of Gi by eucaryotic cysteine-specific mono(ADP-ribosyl)transferase attenuates inhibition of adenylatecyclase by epinephrine. *Biochem. Biophys. Acta* 1010:246-249.

82. Takada, T., Iida, K., Moss, J. (1994). Expression of NAD glycohydrolase activity by rat mammary adenocarcinoma cells transformed with rat T cell alloantigen RT 6.2. *J. Biol. Chem.* 269:9420-23
83. Graeff, R., Walseth, T., Fryxell, K., Branton, W., Lee, H. (1994). Enzymatic synthesis and characterizations of cyclic GDP-ribose. A procedure for distinguishing enzymes with ADP-ribosyl cyclase activity. *J. Biol. Chem.* 269:30260-67.
84. Koch, F., Haag, F., Thiele, H.-G. (1990). Nucleotide and deduced amino acid sequence of the mouse homologue of the rat T cell differentiation marker RT6. *Nucl. Acids Res.* 18:3636.
85. Koch-Nolte, F., Petersen, D., Balasubramanian, S., Haag, F., Kahlke, D., Willer, T., Kastelein, R., Bazan, F., Thiele, H.-G. (1996). Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADP-ribosyl)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. *J. Biol. Chem.* 271:7686-93.
86. Haag, F., Koch-Nolte, F., Kühl, M., Lorenzen, S., Thiele, H.-G. (1994). Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *J. Mol. Biol.* 243:537-46.
87. Koch-Nolte, F., Haag, F., Kühl, M., van Heyningen, V., Hoovers, J., Grzeschik, K., Singh, S., Thiele, H.-G. (1993). Assignment of the human RT6 gene to 11q13 by PCR screening of somatic cell hybrids and in situ hybridization. *Genomics* 18:404-406.
88. Koch-Nolte, F., Kühl, M., Haag, F., Cetkovic-Cvrlje, M., Leiter, E., Thiele, H.-G. (1996). Assignment of the human and mouse genes for muscle ecto-mono-ADP-ribosyltransferase to a conserved linkage group on human chromosome 11p15 and mouse chromosome 7. *Genomics* 36:215-216.
89. Koch-Nolte, F., Haag, F., Braren, R., Kühl, M., Gierisch, R., Balasubramanian, S., Bazan, F., Thiele, H.-G. (1997). Two novel human mono(ADP-ribosyl)transferases related to bacterial toxins from the public database of expressed sequence tags. *Genomics* 39:370-376.
90. Arrufo, A., Kanner, S., Sgroi, D., Ledbetter, J., Stamenkovich, I. (1992). CD22-Mediated Stimulation of T Cells Regulates T-Cell Receptor/CD3-Induced Signaling. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 89:10242-246
91. Goodwin, R., Alderson, M., Smith, C., Armitage, R., Vandenbos, T., Jerzy, R., Tough, T., Schoenborn, M., Davis-Smith, T., Hennen, K. et al. (1993). Molecular and Biological Characterization of a Ligand for CD27 Defines a New Family of Cytokines with Homology to Tumor Necrosis Factor. *Cell* 73:447-456
92. Armitage, R., Fanslow, W., Strockbine, L., Sato, T., Clifford, K., Macduff, B., Anderson, D., Gimpel, S., Davis-Smith, T., Maliszewski, C. et al. (1992). Molecular and Biological Characterization of a Murine Ligand for CD40. *Nature* 357:80-82
93. Peach, R., Hollenbaugh, D., Stamenkovich, I., Arrufo, A. (1993). Identification of Hyaluronic Acid Binding Sites in the Extracellular Domain of CD44. *J. Cell Biol.* 122:257-264
94. Eilat, D., Kikuchi, G., Coligan, J., Shevach E. (1992). Secretion of a Soluble Chimeric $\gamma\delta$ T-Cell Receptor-Immunglobulin Heterodimer. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 89:6871-75
95. Arrufo, A., Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 84:8573
96. Freeman, G., Freedman, A., Segil, J., Lee, G., Whitman, J., Nadler, L. (1989). B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J. Immunol.* 143:2714
97. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S. (1993). Molecular Cloning and Expression of the Fas Ligand, a Novel Member of the Tumor Necrosis Factor Family. *Cell* 75:1169-78
98. Linsley, P., Brady, W., Grosmaire, L., Arrufo, A., Damle, N., Ledbetter, J. (1991). Binding of the B Cell Activation Antigen B7 to CD28 Costimulates T cell Proliferation and Interleukin 2 mRNA Accumulation. *J. Exp. Med.* 173:721-730
99. Gluzman, Y. (1981). SV40-Transformed Simian Cells Support the Replication of Early SV40-Mutants. *Cell* 23:175-182

100. Edwards, C., Arrufo, A. (1993). Current applications of COS cell based transient expression systems. *Curr. Op. Biotech.* 4:558-563
101. Schmidt, T. and Skerra, A. (1994). One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the „Strep tag“ and immobilized recombinant core streptavidin. *J. Chromatogr. A.* 676:337-345
102. Shibui, T., Nagahari, K. (1992). Secretion of a Functional Fab Fragment in *Escherichia coli* and the Influence of Culture Conditions. *Appl. Microbiol. Biotech.* 37:352-357
103. Olins, P., Lee, S. (1993). Recent advantages in heterologous gene expression in *Escherichia coli*. *Curr. Op. Biotech.* 4:520-525
104. Rigby, M., Bortell, R., Stevens, L., Moss, J., Kanaitzuka, T., Shigeta, H., Mordes, J., Greiner, D., Rossini, A. (1996). Rat RT6.2 and Mouse Rt6 Locus 1 Are NAD⁺:Arginine ADP Ribosyltransferases with Auto-ADP Ribosylation Activity. *J. Immunol.* 156:4259-65
105. Cerveantes-Laurean, D., Minter, D., Jacobsen, E., Jacobsen, L. (1993). Protein glycation by ADP-ribose: studies of model conjugates. *Biochem.* 32:1528-1534
106. Maehama, T., Nishina, H., Hoshino, S., Kanaho, Y., Katada, T. (1995). NAD⁺ dependent ADP-ribosylation of T lymphocyte alloantigen RT6.1 reversibly proceeding in intact rat lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 270:22747-751
107. Wang, J., Nemoto, E., Kots, A., Kaslow, H., Dennert, G. (1994). Regulation of cytotoxic T cells by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) correlates with cell surface GPI-anchored arginine ADP-ribosyltransferase. *J. Immunol.* 153:4048-58
108. Rigby, M., Bortell, R., Greiner, D., Czech, M., Klarlund, J., Mordes, J., Rossini, A. (1996). The Rat T-Cell Surface Protein RT6 Is Associated With src Family Tyrosine Kinases and Generates an Activation Signal. *Diabetes* 45:1419-1426
109. Wonigeit, K., Schwinzer, R. (1987). Polyclonal activation of rat T lymphocytes by RT6 alloantisera. *Transpl. Proc.* 19: 296

7. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn PD Dr. Friedrich Haag, der mich in allen Belangen hervorragend unterstützte, stets ein offenes Ohr für auftretende Probleme und damit einen maßgeblichen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit hatte.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Heinz- Günter Thiele und Herrn Prof. Dr. Friedrich Nolte für die wertvollen Anregungen und kritischen Anmerkungen im Rahmen meiner Arbeit danken.

Frau Katharina Bredow, Frau Cornelia Lischke, Frau Sandra Bauschus und der ganzen Arbeitsgruppe danke ich für die technische Hilfe, Ratschläge und Unterstützung während meiner Arbeit im Labor.

Ohne die oben genannten wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Schließlich und nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie und insbesondere meiner Freundin Frau Frauke Lütt für die persönliche Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit danken.

8. Lebenslauf

Name:	Stefan Karsten
Adresse:	Krochmannstraße 46, 22299 Hamburg
Tel.:	040/5116771
Geburtstag:	07.08.1970 in Braunschweig
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

1976-1980	Grundschule
1980-1989	Gymnasium
Mai 1989	Abitur

Wehrdienst

Jun.1989- Aug.1990	Bundeswehr
--------------------	------------

Studium

1991-1998	Studium der Medizin, Universität Hamburg
März 1993	Physikum
März 1994	1. Staatsexamen
März 1997	2. Staatsexamen
Apr.1997-Apr.1998	Praktisches Jahr: Innere Medizin: AK Wandsbek, Hamburg und UCSD, San Diego, USA Orthopädie: AK Barmbek, Hamburg Chirurgie: Reg.Spital Burgdorf, Schweiz und AK Wandsbek, Hamburg
Mai 1998	3. Staatsexamen

Beruf

seit Oktober 1998 Arzt im Praktikum, AK Wandsbek, I. Medizin, CA Prof.Dr. Sill, Hamburg

Veröffentlichungen

- "Both allelic forms of the rat T cell differentiation marker RT 6 display nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-glycohydrolase activity, yet only RT 6.2 is capable of automodification upon incubation with NAD⁺." F.Haag, V.Andresen, **S.Karsten**, F.Koch-Nolte, H.-G.Thiele(1995). Eur. J. Immunol. 25:2355-2361
- "Characterization of the NAD-metabolizing activity of rat T cell differentiation antigen RT 6." F.Haag, **S.Karsten**, V.Andresen, J.Schröder, F.Koch-Nolte, H.-G.Thiele (1995). Immunobiol. 194:334-335.
- "Expression and comparative analysis of recombinant rat and mouse RT6 T cell mono(ADPribosyl)transferases in E.coli." **S.Karsten**, J.Schröder, C. da Silva, A.Guse, D.Kahlke, A. Gerber, H.-G.Thiele, F.Koch-Nolte, F.Haag (1997). Adv. Exp. Med. Biol. 419:175-180.
- "The rat T-cell differentiation alloantigens RT6.1 and RT6.2 are NAD-metabolizing ecto-enzymes that differ in their enzymatic activities." F.Haag, F.Koch-Nolte, V. Andresen, **S.Karsten**, J.Schröder, H.-G.Thiele (1997). Transpl. Proc. 29:1699-1700
- "Recombinant production of the RT6 T-cell ADP-ribosyltransferases and characterization of their enzymatic activity." J.Schröder, **S.Karsten**, F.Haag, F.Koch-Nolte, C. Schulze, H.-G.Thiele (1996). 12.Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Jena.

9. 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.