

Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik
des Universitäts-Krankenhaus Eppendorf
aus der Abteilung für Klinische Chemie
Direktor: Prof. Dr. C. Wagener

Isolierung und Identifikation CGM1a – assoziierter Proteine aus Granulozyten

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Thomas Streichert
aus Johannesburg, Südafrika

Hamburg, 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am 8. Februar 2000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. C. Wagener

Korreferent: ---

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....1

EINLEITUNG.....4

DAS IMMUNSYSTEM.....4

DER NEUTROPHILE GRANULOZYT..... 6

DIE CEA-FAMILIE UND DER CD66-CLUSTER..... 7

CGM1..... 13

ZIELE DER ARBEIT16

MATERIAL UND METHODEN.....18

MATERIALIEN UND BEZUGSQUELLEN18

ANTIKÖRPER (AK)..... 18

ENZYME..... 18

CHEMIKALIEN 18

CHROMATOGRAPHIE- UND FILTERMATERIAL SOWIE VERBRAUCHSMATERIALIEN 21

GERÄTE 22

ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN24

STERILISIERUNG DER ARBEITSMATERIALIEN 24

RADIOAKTIVITÄTSMESSUNGEN 24

QUANTIFIZIERUNG VON γ -³²P -AKTIVITÄT AUF SDS-PAGE-GELEN 24

EDV 24

EXPRESSIONSSYSTEM FÜR CGM1A_{cyt}.....25

KULTIVIERUNG VON E. COLI STÄMMEN 25

PROTEINEXPRESSION (LARGE SCALE CULTURE - 6L) 26

KONTROLLE DER EXPRESSIONSLOKALISATION 26

VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER LYSEMETHODEN 27

IMMUNOLOGISCHE UND PROTEINCHEMISCHE ARBEITSMETHODEN28

ANALYTISCHE SDS-POLYACRYLAMID-GEL-ELEKTROPHORESE..... 28

WESTERN-BLOT 31

DOT-BLOT 32

SLOT-BLOT..... 32

PROTEINFÄRBUNGEN 32

1

SILBERFÄRBUNG	33
IMMUNCHEMISCHE FÄRBUNGEN	34
CHROMATOGRAPHISCHE PROTEINAUFREINIGUNG	37
PROTEINKONZENTRATIONSMESSUNGEN	41
PROTEIN-SEQUENZIERUNG.....	42
PHOSPHORYLIERUNGSREAKTIONEN	42
PHOSPHOTYROSIN-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	49
KINASE-ASSAYS.....	50
PHOSPHATASE-ASSAYS.....	53
GRANULOZYTENMEMBRAN-PRÄPARATION	55
ISOLIERUNG CGM1A _{CYT} -ASSOZIIERTER PROTEINE.....	56
HERSTELLUNG EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS GEGEN CGM1A _{CYT}	59
ELISA	62
UMPUFFERUNG: DIALYSE, ULTRAFILTRATION	63
PROTEINAUFKONZENTRATION: ULTRAFILTRATION, VAKUUMVERDAMPFER.....	63
MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN	64
NORTHERN-BLOT	64
<u>ERGEBNISSE.....</u>	<u>65</u>
HERSTELLUNG UND AUFREINIGUNG VON CGM1A_{CYT}.....	65
EXPRESSION VON CGM1A _{CYT} IN E. COLI	66
LYSEMETHODEN.....	66
AUFREINIGUNG	68
HERSTELLUNG EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS GEGEN CGM1A_{CYT}.....	75
IMMUNISIERUNG	76
SCREENING UND VERMEHRUNG DER HYBRIDOMAZELLEN	76
KLONIERUNG UND SUBTYPENBESTIMMUNG	77
NACHWEIS VON CGM1A IN GRANULOZYTEN MIT MAB TS1	78
FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN DER ZYTOPLASMATISCHEN DOMÄNE	79
<i>IN VITRO</i> PHOSPHORYLIERUNG DER TYROSIN-RESTE	79
<i>IN VITRO</i> PHOSPHORYLIERUNG DER SERIN-/ THREONIN-RESTE.....	86
AUFREINIGUNG VON TYROSIN-PHOSPHORYLIERTEM CGM1A _{CYT}	87
ISOLIERUNG ASSOZIIERTER PROTEINE	88
FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN GEWONNENER PROTEINE.....	94
ERGEBNISSE DER KINASE-ASSAYS.....	95
RESULTATE DER PHOSPHATASE-ASSAYS.....	98

PHOSPHORYLIERUNG ASSOZIIERTER PROTEINE	99
ÜBERPRÜFUNG VON GRANULOZYTENEXTRAKTEN AUF PHOSPHORYLIERBARE PROTEINE	99
ÜBERPRÜFUNG ASSOZIIERTER PROTEINE AUF PHOSPHORYLIERBARKEIT	100
IDENTIFIKATION DER AUFGEREINIGTEN PROTEINE	102
UNTERSUCHUNG DES EXPRESSIONSMUSTERS VON CGM1A_{cyt}.....	103
<u>DISKUSSION.....</u>	<u>105</u>
<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>126</u>
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>127</u>
<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>128</u>
<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>138</u>
<u>CURRICULUM VITAE.....</u>	<u>139</u>

EINLEITUNG

DAS IMMUNSYSTEM

“Wir leben in einer prinzipiell feindlichen Welt, umgeben von einem beunruhigend breiten Spektrum infektiöser Mikroorganismen unterschiedlichster Gestalt, Größe, Struktur und Funktion. Sie würden sich nur allzugern in unserem Körper einnisten und vermehren [...]” [M. Roitt, 1995].

Nicht nur Mikroorganismen beanspruchen das Immunsystem, auch unbelebte Substanzen und Moleküle aus unserer Umwelt, die nicht-mikrobiellen Ursprungs sind, fordern die Abwehrleistung des Immunsystems. Darüber hinaus unterliegen auch körpereigene Zellen der ständigen Kontrolle dieses Systems. Um diesen sehr verschiedenartigen Ansprüchen gerecht zu werden, hat der Körper eine Auswahl von Strategien entwickelt, wobei er nicht nur zwischen “eigen” und “fremd” unterscheiden muß, sondern auch zwischen “gefährlich” und “ungefährlich”.

Grob kann man das Immunsystem in zwei Teilbereiche gliedern:

- Zum einen die “natürliche oder angeborene”, nicht auf einen spezifischen Reiz erworbene, daher auch unspezifische Resistenz. Sie ist durch wiederholte Begegnung mit dem Antigen nicht steigerbar, garantiert aber eine Art Basisabwehrleistung, bevor die mit Verzögerung einsetzende spezifische Immunantwort wirksam wird.
- Zum anderen die durch Immunisierung (Antigenkontakt) erworbene, spezifische Immunität. Sie ist durch den wiederholten Kontakt mit dem Antigen steigerbar und bewirkt eine immunologische Gedächtnisreaktion.

Diese beiden Bereiche lassen sich wiederum jeweils in einen humoralen und einen zellulären Bestandteil untergliedern.

Der humorale Anteil ist in löslicher, freier Form im Plasma und Interzellularraum vorhanden. Hierzu gehören als Träger der natürlichen Resistenz die Faktoren des Komplementsystems und eine große Zahl sezernierter Proteine aus Zellen des Immunsystems, wie z.B. Interleukine und Interferone. Als humorale Träger der erworbenen, spezifischen Immunität wirken die Antikörper.

Der zelluläre Teil, d.h. die verschiedenen Zellen des Immunsystems, läßt sich wie die Natürlichen-Killer-Zellen, die phagozytierenden Makrophagen und Granulozyten entweder eher unspezifischen Aufgaben zuordnen oder ist mit spezifischeren Aufgaben betraut wie die T- und B-Lymphozyten.

Die Aufnahme und Verdauung von Fremdkörpern erfolgt durch zwei prinzipiell verschiedene Zelltypen, die I. Metschnikow um die Jahrhundertwende als Mikro- und Makrophagen beschrieb [Mims, 1993].

Während - stark vereinfacht - die neutrophilen Granulozyten („Mikrophagen“) die hauptsächliche Verteidigung gegen pyogene Bakterien darstellen, liegt die Funktion der Makrophagen in der Bekämpfung von Bakterien, Viren und Protozoen.

Wie in Abbildung 1 zu sehen, kommt es im Falle einer lokalen Infektion zu einer Erschlaffung der Arteriolenwände und somit zu einem erhöhten Blutfluß, die Kapillaren weiten sich, und die gleichzeitige Kontraktion der Endothelzellen ermöglicht den Austritt von Plasma-proteinen. Die Fließgeschwindigkeit der Granulozyten nimmt unter dem Einfluß von Chemotaxinen ab, und Oberflächenproteine, die sie nun ausbilden, veranlassen sie, sich der Kapillarwand zu nähern (Margination/Rolling) und durch die Lücken in das interstitielle Gewebe auszutreten (Diapedese). Sie wandern dann gegen das Konzentrationsgefälle der chemotaktischen Faktoren, bis sie den Mikroorganismus erreichen.

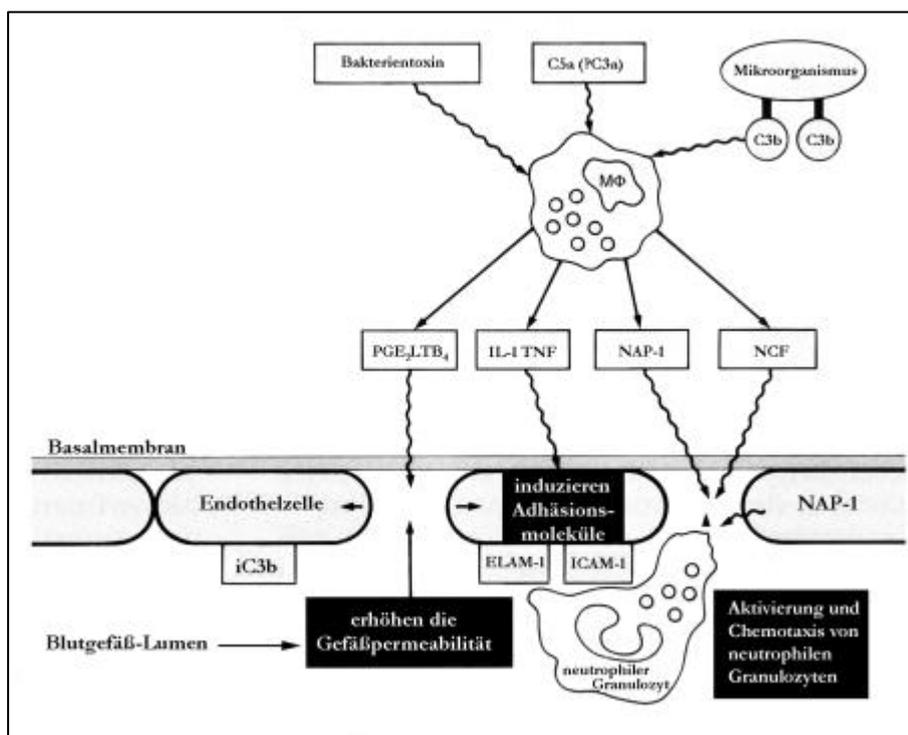


Abbildung 1: Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten [Roitt, 1995] (Abkürzungen: NAP-1: Neutrophilen aktivierendes Peptid; NCF: Neutrophilen Chemotaktischer Faktor; PGE₂: Prostaglandin E₂; LTB₄: Leukotrien-B₄; IL-1: Interleukin 1; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; ELAM-1: Endothelzellen-Leukozyten-Adhäsionsmolekül; ICAM-1: interzelluläres Adhäsionsmolekül)

Die Abfolge von Kapillarerweiterung (Rubor), Austritt von Plasmaproteinen und Flüssigkeit (Ödembildung) und die Ansammlung von neutrophilen Granulozyten wird als akute Entzündungsreaktion bezeichnet

DER NEUTROPHILE GRANULOZYT

Die neutrophilen Granulozyten stellen über 90 % der zirkulierenden Granulozyten und haben einen Durchmesser von 10-20 µm. Der neutrophile oder polymorphkernige Granulozyt stammt, wie die anderen Immunzellen auch, von der hämatopoetischen Stammzelle ab. Diese Stammzelle bildet die sogenannte CFU-GEMM (colony forming unit), aus der Granulozyten (G), Erythrozyten (E), Monozyten (M) und Megakaryozyten (M) entstehen.

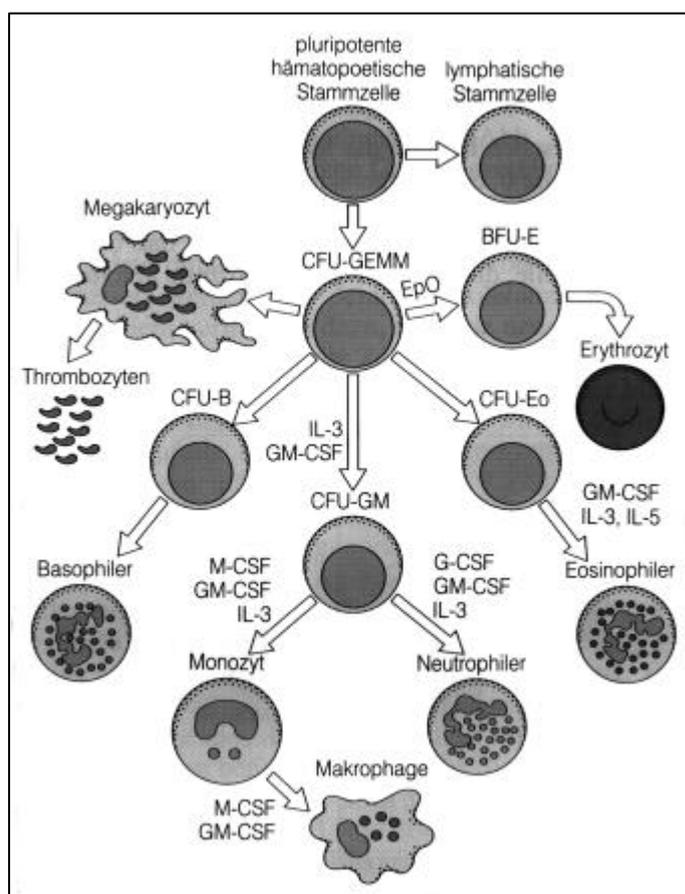


Abbildung 2: Entwicklung der Granulozyten und Monozyten [Roitt, 1995]

Deren weitere Entwicklung zu reifen Zellen erfolgt unter dem Einfluß von stimulierenden Faktoren (CSF: colony stimulating factors), sowie mehrerer Interleukine, u.a. IL-1, IL-3, IL-4, IL-5 und IL-6 (siehe Abbildung 2). Diese Faktoren entstammen hauptsächlich den Stromazellen des Knochenmarkes; sie werden jedoch auch durch reife Formen differenzierter

myeloischer und lymphatischer Zellen gebildet. Andere Zytokine (z.B. TGF β) wirken regulierend auf die Hämatopoese.

Oberflächenmarker von Granulozyten

Obwohl man nur schwer die funktionelle Aktivität der einzelnen Stadien auf dem Weg zum reifen Granulozyten erfassen kann, darf man doch annehmen, daß nur die reifen Formen über das volle funktionelle Potential und die entsprechenden Oberflächeneigenschaften verfügen. Auf der Oberfläche der reifen Form des Granulozyten werden die folgenden Marker von über 90% der Zellen exprimiert: CD11a (=LFA-1=Integrin α L, Adhäsion), CD11b (=CR3=Integrin α M, Adhärenz, Chemotaxis), CD11c (Komplement-Rezeptor), CD13 (Aminopeptidase N), CD15 (=Lewis^X, Zell Adhäsion), CD15s (=Sialyl Lewis^X, Ligand für Selektine), CD18 (=Integrin β 2, Leukozyten-Adhäsion), CD24 (=HSA), CD31 (=PECAM-1, Adhäsion), CD32 (=Fc γ II, IgG-Rezeptor), CD35 (=CR1, Komplement-Rezeptor), CD43 (Adhäsion), CD44 (Adhäsion), CD45 (zytoplasmatische Tyrosin-Phosphatase), CD46 (=MCP, Komplement-Kofaktor), CD47 (Adhäsion), CD50 (=ICAM-3, LFA-1 Ligand), CD53 (Signaltransduktion), CD54 (=ICAM-1, Adhäsion), CD55, CD58 (=LFA-3, Ligand für CD2), CD59 (=Protectin, Komplement-Inhibitor), CD62L (=L-Selectin, Homing), CD65, CD65s, CD66a,b,c,d (s.u.), CD87, CD89 (=IgA FcR, Phagozytose), CD97 (Adhäsion), CD101, CD148 (Tyrosin-Phosphatase) und CD157 [zusammengefasst aus Kishimoto, 1997].

DIE CEA-FAMILIE UND DER CD66-CLUSTER

Der CD66-Cluster (CEACAM-Gruppe) ist eine Gruppe von Proteinen, die durch die Antigenität gegenüber CD66-Antikörpern (mAb CD66) gekennzeichnet ist. Die mAb CD66 erkennen CEACAM1 (= BGP, Biliary Glycoprotein, CD66a), CEACAM8 (= CGM6, CEA Gene Member, CD66b), CEACAM6 (= NCA, Non-Specific-Crossreacting Antigen, CD66c), CEACAM 3(CGM1, CEA gene member 1, CD66d), CEACAM5 (= CEA, Carcino Embryonic Antigen, CD66e) und PSG1 (Pregnancy Specific Glycoprotein, CD66f) [Watt et al., 1994; Skubitz et al., 1995; Kishimoto, 1997]. Im folgenden werden die klassischen Abkürzungen, die in Klammern angegeben sind, verwendet.

Die CEA-Superfamilie kann man in zwei große Untergruppen einteilen: Zum einen die membrangebundenen CEA-Familienmitglieder und zum anderen die sezernierten PSG-Familienmitglieder. Innerhalb der Untergruppen ist die Ähnlichkeit auf der DNA-Ebene ca. 70-90%, zwischen den Untergruppen liegt der Wert nur bei ca. 50-60% [Thompson et al., 1995]. Die Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Genverwandtschaft der CEA-Familie.

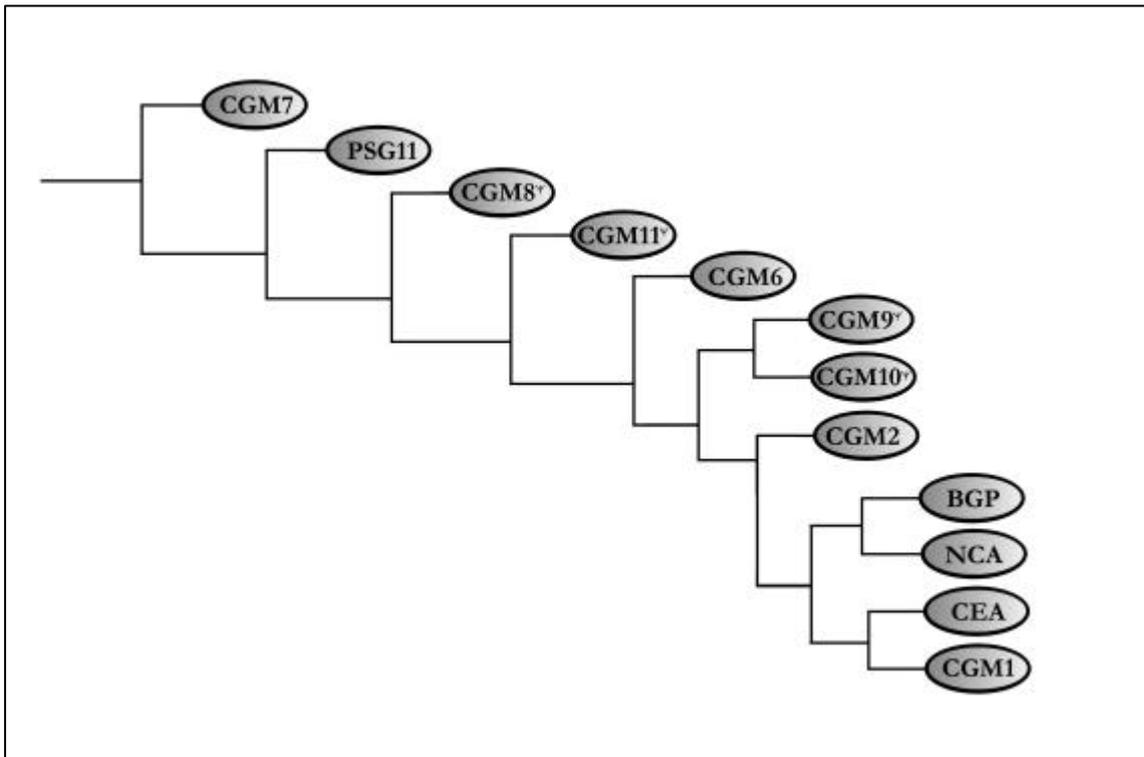


Abbildung 3: Genverwandtschaft der CEA-Familie, Ausschnitt (Abkürzungen im Text, y: Pseudogen) [Khan et al., 1992]

In dieser Familie wurden mindestens 29 unterschiedliche CEA-verwandte cDNAs oder Gene identifiziert. Diese liegen alle benachbart auf dem langen Arm des Chromosoms 19 (19q13.1-3) [Thompson et al., 1991; Brandriff et al., 1992; Thompson et al., 1992; Watt et al., 1994; Thompson et al., 1995; Ding et al., 1996].

Die Abbildung 4 zeigt die Gen-Kartierung mittels *in situ* Hybridisierung.

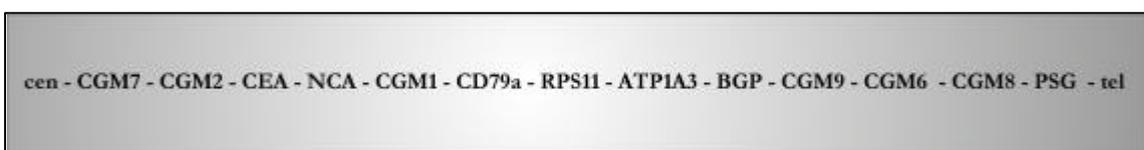


Abbildung 4: Gen-Reihenfolge der CEA-Familie [Brandriff et al., 1992; Thompson et al., 1992; Hashimoto et al., 1994]

Die abgebildete Region umspannt etwa einen Bereich von 1,1-1,2 Mb.

Die genomische Struktur zeigt eine deutliche Korrelation zwischen den Domänen und der Exon-Struktur, wie man sie von anderen Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie bereits kennt [Thompson et al., 1989; Thompson et al., 1991; Thompson et al., 1995].

Die Molekulargewichte dieser Genprodukte liegen bei

- ~140-180 kD für CD66a (BGP),
- ~95-100 kD für CD66b (CGM6),
- ~90 kD für CD66c (NCA),
- ~35 kD für CD66d (CGM1),
- ~180 kD für CD66e (CEA) und
- ~54-72 kD für CD66f (PSG1) [Skubitz et al., 1997b].

Zu der CEA-Familie gehören CEA, die klassischen NCAs (NCA-50/90), die biliären Glykoproteine (BGPs) und weitere aktive Gene, denen die temporären Namen CEA Gene Family Member (CGM) 1, 2, 6, 7 und 8 gegeben wurden. Für einige dieser Gene sind Polyadenylierungen oder Splice-Varianten bekannt, zusammen mit den unterschiedlichen post-translationalen Modifikationen (z.B. Glykosylierungen von NCA-50/90) ergibt sich eine Vielzahl möglicher Produkte [Khan et al., 1992; Thompson et al., 1995].

Zusätzlich wurden noch drei weitere Gene nachgewiesen, CGM9, 10 und 11, wobei es sich hier wahrscheinlich um Pseudogene handelt [Khan et al., 1992].

Domänenstruktur der CEA-Familie

Die CEA-verwandten Proteine sind - soweit beschrieben - Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie [Paxton, 1987; Watt et al., 1994]. Sie besitzen eine Struktur, die aus einem kurzen, hydrophoben Leader-Peptid, einer IgV-artigen N-terminalen Domäne und einer variablen Anzahl (oder keiner) IgC-artiger Domänen besteht [Thompson et al., 1991].

Bei den IgC-artigen Domänen kann man zwei getrennte Einheiten A und B unterscheiden, jede enthält Cysteine, die die Ausbildung einer Sekundär- und Tertiärstruktur ermöglichen, welche diese Einheiten als immunglobulinartige C2-Domänen kennzeichnet [Boehm et al., 1996].

Die membrangebundenen Mitglieder der CEA-Familie sind entweder über eine Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) - Gruppe in der Membran verankert, die post-translational die Membran-Domäne ersetzt, oder sie sind transmembranär mit verschiedenen zytoplasmatischen Domänen angelegt [Watt et al., 1994; Thompson et al., 1995].

Die Abbildung 5 zeigt die Domänenstruktur der CEA-Familie.

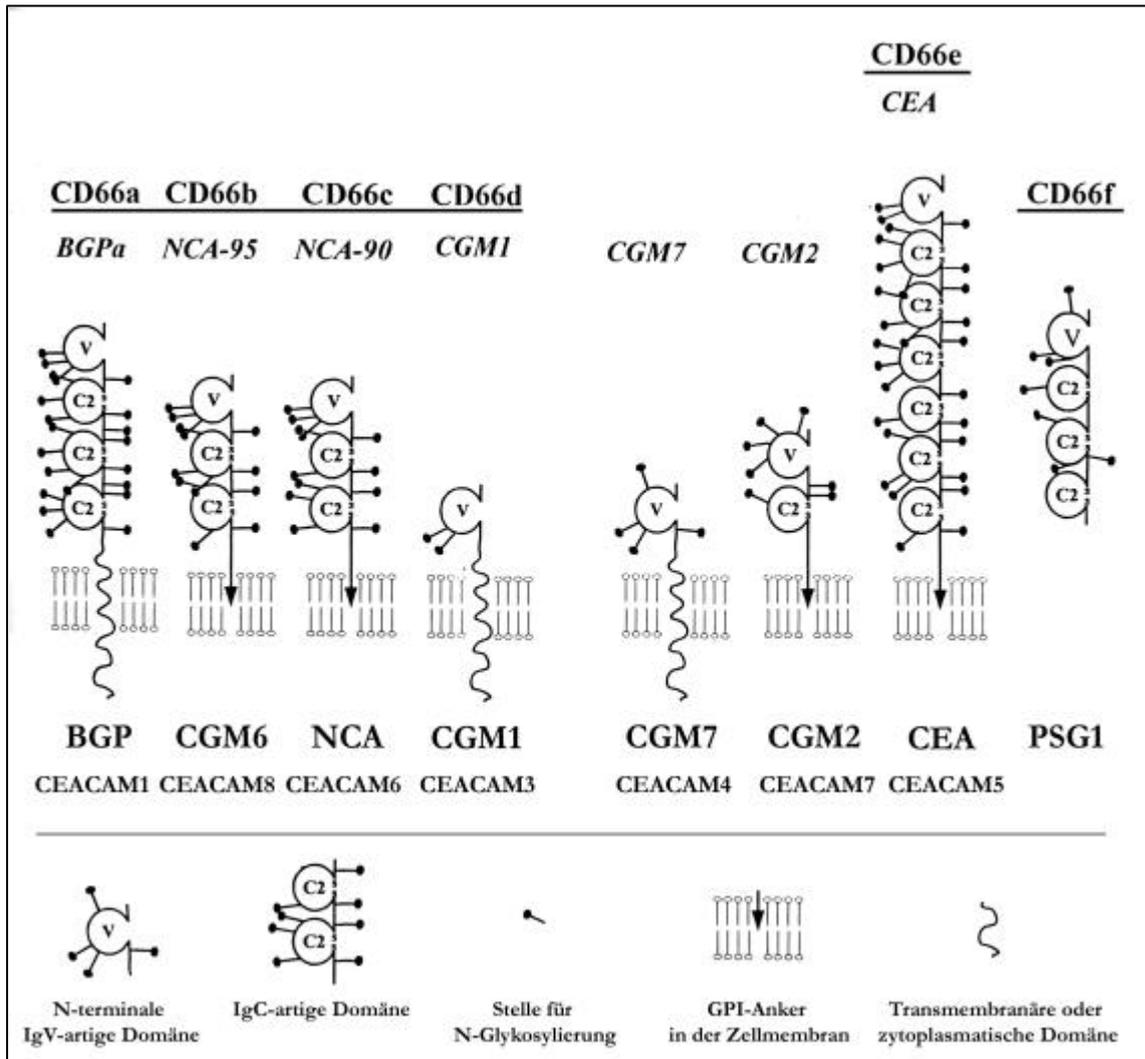


Abbildung 5: Schematische Darstellung der CEA-Familie (Abkürzungen soweit nicht im Text: V: Variable Region, C: Konstante Region) [Skubitz, 1997b]

Zu den GPI-verankerten Proteinen gehören CEA, CGM2, NCA-50/90 und NCA-95. Die transmembranären Mitglieder sind BGP, CGM7 und CGM1a. Im Blut zirkulierendes CEA wurde wahrscheinlich durch Phospholipasen von der GPI-Gruppe getrennt, da man diese GPI-Gruppe bei der löslichen Form von CEA nicht nachweisen kann.

Wie man der Abbildung 5 entnehmen kann, sind die meisten Mitglieder der Familie hochglykosiliert.

Expression von CEA-Familienmitgliedern

Die Expression von CEA-Familienmitgliedern wurde durch Studien mit Antikörpern, *in situ* Hybridisierungen und RT/PCR-Assays untersucht [Thompson et al., 1993; Thompson et al., 1995]. Dabei wurden verschiedene Normalgewebe und Tumore analysiert.

Tabelle 1: Expressionsmuster der CEA-Gen-Familie [Thompson et al., 1995; Godfraind et al., 1995; Metze et al., 1996; Prall et al., 1996]

Gen	Größe der mRNA in kB	Protein	Gewebe oder Zellen
CEA	3,5; 3,0	CEA	Gastrointestinaltrakt, ekkrine Schweißdrüsen, Lungenepithel, Hoden, Kolonpolypen, Adenokarzinome des Kolons (~100%), muzinöse Karzinome des Ovars (~100%), weniger in Karzinomen anderer epithelialer Herkunft (Brust, Lunge, Pankreas, Magen)
BGP	3,9; 3,7; 2,2; 1,8	BGP-I	normale Hepatozyten, Kolonmukosa, Leukozyten, Endothelien und Epithelien herabreguliert in hepatozellulären und Kolon-Karzinomen Talg- und Schweißdrüsen der Haut
NCA	2,5	NCA-50/90	meist mit CEA koexprimiert, weniger in Kolonmukosa und Polypen, zusätzlich in Granulozyten
CGM1	~1,3	CGM1	Neutrophile Granulozyten, bei CML auf Leukozyten
CGM6	2,2	NCA-95	Granulozyten
CGM7	~1,3	?	periphere Leukozyten
CGM2	2,5	?	Kolonmukosa, herabreguliert in Adenokarzinomen des Kolons und muzinösen Karzinomen des Ovars
PSGs	1,7-2,5	PSG β 1/SP1	Plazenta (10/11 PSGs), submandibuläre Speicheldrüsen, fetale Leber (10/11 PSGs), hydatiforme Mole, Chorionkarzinome, Brusttumoren

Tabelle 1 faßt die bekannten Daten zusammen. Normalerweise findet sich CEA im Hoden [Beatty et al., 1986], in Epithelien des Gastrointestinal-Traktes [Nap et al., 1988], der Lungen [Kim et al., 1992] und in ekkrinen Schweißdrüsen [Tezuka et al., 1989]. Granulozyten exprimieren, wie oben genannt, eine Vielzahl von CEA-Familienmitgliedern. Dazu gehören CGM1, CGM6, BGP und wahrscheinlich CGM7 [Berling et al., 1990; Kuroki et al., 1991; Stoffel et al., 1993].

CGM2-Transkripte hat man in normaler Kolon-Mukosa und in Kolon-Karzinomen sowie in muzinösen Karzinomen des Ovars, aber nicht auf Leukozyten finden können [Thompson et al., 1995].

Funktion von Mitgliedern der CEA-Familie

Die Zuordnung der CEA-Familie als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie gab erste Hinweise auf deren Funktion: Soweit bekannt haben alle immunglobulinartigen Moleküle die Fähigkeit, mit anderen Molekülen in Wechselwirkung zu treten. Die enthaltenen C2-Strukturen sind häufig mit Zelladhäsionsvorgängen verbunden. *In vitro* Experimente mit CEA-transfizierten Zellen und den entsprechenden spezifischen Antikörpern im Vergleich mit nicht-transfizierten Zellen zeigten sowohl für CEA als auch für NCA-50/90 und verschiedene BGPs adhäsive Eigenschaften, die zu heterophilen und homophilen Interaktionen führten [Benchimol, 1989].

Diese Adhäsivfunktion ist nur schwer *in vivo* nachzuvollziehen, vorstellbar wäre jedoch eine Rolle bei der Tumorentstehung, wo eine Metastasierung durch Anheftung erleichtert werden könnte [Hostetter, 1990]. Für CD66-Mitglieder, die man u.a. auf Granulozyten findet, könnten diese Adhäsionsvorgänge bei Entzündungen wichtig sein ("homing", siehe Abbildung 1, S. 5) [Kuijpers et al., 1993]. Dabei kommt es, wie in der Abbildung 1 zu sehen, zu einer Margination der Granulozyten. Sie wird u.a. durch Adhäsion von Mitgliedern des CD66-Clusters an E-Selektin auf den Endothelzellen der Blutgefäße vermittelt (über Sialyl Le^x-Epitope). Diese Interaktion triggert dann die Aktivierung von α_2 -Integrinen auf Granulozyten, was zu ihrer festen Bindung an die Endothelzellen führt [Öbrink, 1997]. Eine weitere mögliche Funktion von CEA und NCA-90 könnte die Bindung von verschiedenen Bakterienstämmen darstellen [Leusch, 1991]. Diese Interaktionen finden zwischen Lektinen von bakteriellen Fimbrien und den Carbohydraten von CEA und NCA-90 statt. Solch eine Funktion wäre denkbar im Darm, um bakterielle Besiedlung zu ermöglichen und durch CEA-Abscherung zu kontrollieren. Damit könnte das Wachstum pathogener Bakterien verhindert bzw. eingeschränkt werden. Granulozyten könnten sich diese Art von Funktionen bei der Phagozytose von Bakterien zunutze machen.

CEA wurde außerdem als akzessorisches Molekül bei der Kollagen Typ I-Bindung beschrieben, eine Eigenschaft, die eine Rolle bei der Migration von Tumorzellen spielen könnte. Des weiteren wurde für CD66a eine Rolle in der Regulation von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen, so kann ein BGP-spezifischer Antikörper die Bindung des Fc-Rezeptors und β_2 -Integrins an Fibrinogen verstärken [Stocks et al., 1996].

In jüngster Zeit wurde über CGM1a im Zusammenhang mit der Bindung von Bakterien an Neutrophile berichtet. *Neisseria gonorrhoeae* exprimieren phasen-abhängig sogenannte Opa-Proteine (Opacity), über die sie an Neutrophile binden und die Internalisierung stimulieren. Dabei fanden Chen et al., daß diese Adhärenz deutlich verstärkt werden konnte, wenn die Neutrophilen präaktiviert waren. Dies interpretierten sie als Hinweis auf eine Speicherung der Opa-bindenden Komponenten in sekundären Granula, aus denen sie im Bedarfsfalle mobilisiert werden. Chen et al. konnten zeigen, daß diese Komponente ein Protein der Größe von etwa 30 kD war. Aufgrund der Vermutung, daß dieses Protein CGM1a sein könnte, führten sie Bindungsstudien an CGM1a-transfizierten HeLa-Zellen durch und fanden eine Bindung der Opa⁺-Bakterien an diese und eine anschließende Phagozytose, die mit einem CGM1a-Antikörper blockiert werden konnte [Chen et al., 1996].

CGM1

Das in dieser Arbeit untersuchte Molekül ist CGM1a bzw. die zytoplasmatische Domäne dieses Proteins. CGM1 findet sich auf neutrophilen Granulozyten; das Expressionsniveau ist niedrig [Kuijpers et al., 1993]. Granulozytäre Vorläuferzellen enthalten, verglichen mit den reifen Zellen, etwas größere Mengen an CEA-artiger mRNA [Berling et al., 1990].

Deshalb wurden in der Arbeit von Nagel et al. zur Gewinnung von RNA und Herstellung von cDNA weiße Blutzellen eines CML-Patienten verwendet und zwei unterschiedliche cDNAs isoliert [Nagel et al., 1993].

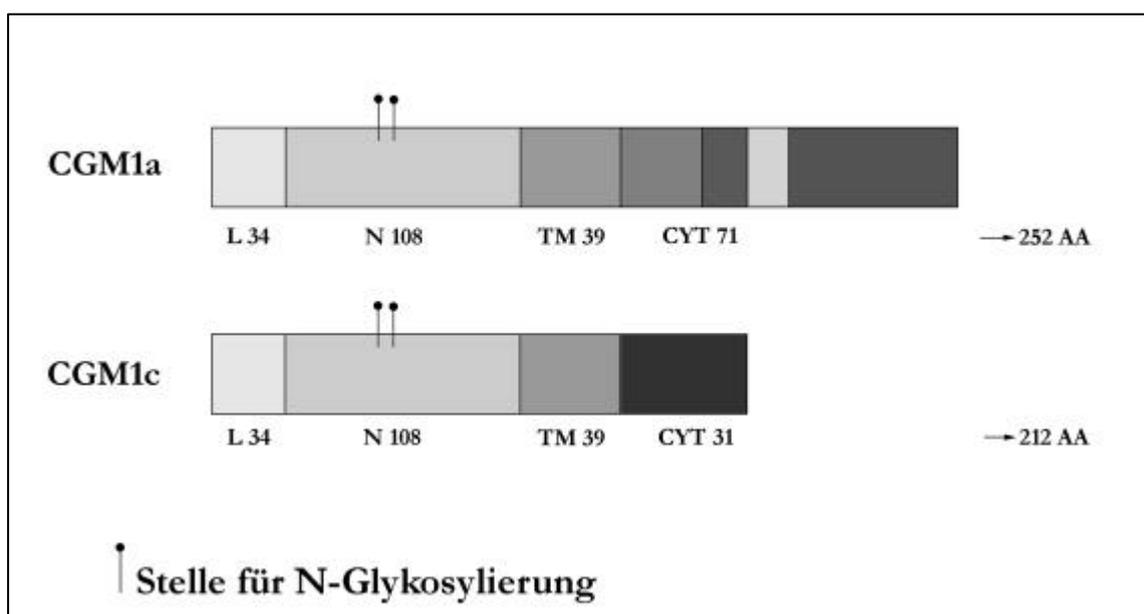


Abbildung 6: Struktur der Domänen von CGM1a und CGM1c [Nagel et al., 1993], (Abkürzungen soweit nicht im Text: AA: Aminosäuren)

Die längere cDNA (CGM1a) besteht aus einer nicht-kodierenden Region von 54 bp, einem 756 bp großen Open-Reading-Frame und einer 317 bp langen nicht-translatierten Region. Sie kodiert ein mögliches Präprotein von 252 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 27077 Dalton.

Der Vergleich der deduzierten Aminosäure-Sequenz mit anderen Mitgliedern der CEA-Familie zeigt (siehe Abbildung 6), daß das Transkript aus einem 34 AS großen Leader-Peptid (L), einer 108 AS langen Ig-V-artigen Domäne, einem möglichen transmembranären Anteil von 39 AS und einer zytoplasmatischen Domäne von 71 AS besteht. IgC-artige Domänen, die man in den meisten anderen Mitgliedern der CEA-Familie findet, fehlen hier [Nagel et al., 1993].

Die Sequenz der kürzeren cDNA (CGM1c, 1022 bp) zeigt zwei Deletionen von 53 und 52 bp. Das transkribierte Protein hat ein Molekulargewicht von 22780 Dalton und ist, bis auf die zytoplasmatische Domäne, identisch zu CGM1a. Die zytoplasmatische Domäne von CGM1c besteht nur aus 31 AS und hat aufgrund der Deletionen eine unterschiedliche Sequenz. Die CGM1a-Sequenz ist, abgesehen von sieben Nukleotid-Unterschieden, die gleiche, die Kuroki et al. als W264 beschrieben haben. Eine zweite von ihm beschriebene CGM1-Variante W282 (CGM1b) besitzt eine IgC-artige, aber keine transmembranäre oder zytoplasmatische Domäne, wahrscheinlich handelt es sich hier um eine sezernierte Variante [Kuroki et al., 1991].

Funktionelle Motive in CGM1a_{cyt}

Die Abbildung 7 zeigt die Aminosäuren-Sequenz von CGM1a mit möglichen Konsensus-Motiven für verschiedene Kinasen.

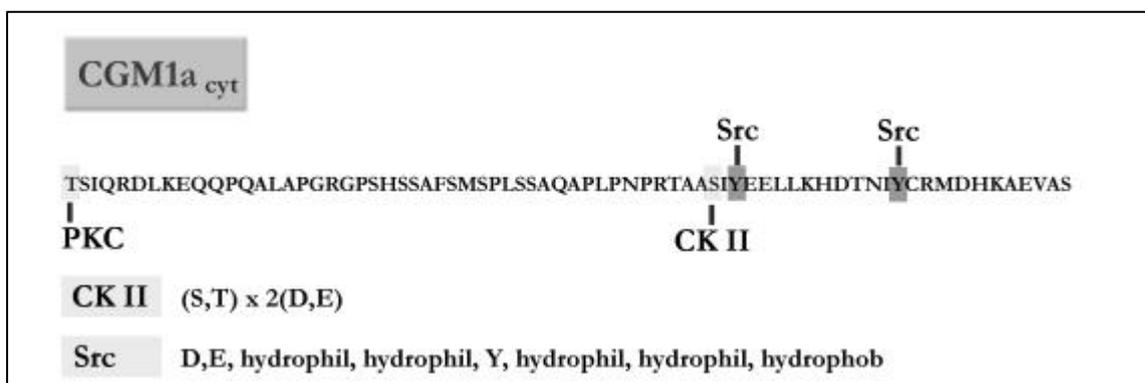


Abbildung 7: Sequenz von CGM1a mit möglichen Konsensus-Motiven (siehe Kästen) für die Casein-Kinase (CK II), die Protein-Kinase C (PKC) und die Src-Kinase (Src)

Es gibt mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen in der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a und c. In beiden existieren Serin- und Threonin-Reste, Tyrosine finden sich aber nur

in CGM1a. Diese liegen an Position 230 und 241 in einem Sequenzkontext ("YX₂LX₇YX₂M"), der einer Konsensus-Sequenz ähnelt ("YLYL"), welche man in den zytoplasmatischen Domänen von Proteinen findet, die als Signaltransduktionsmoleküle bekannt sind [Keegan und Paul, 1992; Isakov, 1998]. Gleichzeitig liegen diese Tyrosin-Reste in einer ITAM-Konsensus-Sequenz (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) und stellen eine Bindungsstelle für SH2-Domänen (Src Homology) dar.

In beiden zytoplasmatischen Domänen von CGM1 liegt das Thr179 in einer Konsensus-Sequenz für Protein-Kinase-C-Phosphorylierungen [Woodgett et al., 1986], und eine Casein-Kinase-II-Phosphorylierungsstelle kann für CGM1a am Ser228 vorhergesagt werden [Pinna, 1990].

Zusätzlich finden sich zwei mögliche N-Glykosylierungsstellen an hochkonservierten Stellen der N-terminalen Domäne [Neumaier et al., 1988; Nagel et al., 1993].

CGM1 erfüllt damit eine Vielzahl von Kriterien, die für das Protein eine Rolle als Rezeptormolekül oder als Schaltstelle in einem Signalweg nahelegen.

Expressionsmuster von CGM1

CGM1a-mRNA konnte in normalen Granulozyten und Leukozyten von CML-Patienten detektiert werden, CGM1c-mRNA hingegen nur in den Leukozyten eines einzigen CML-Patienten. Es wurden außerdem Tumoren aller drei Keimzell-Linien sowie eine Reihe von Normalgeweben untersucht: CGM1 konnte weder in Adenokarzinomen des Pankreas, der Lunge, der Niere, des Magens und des Kolons oder in drei muzinösen Karzinomen des Ovars, einem groß und einem kleinzelligen Karzinom der Lunge, einem squamösen Karzinom der Gallenblase und Lunge, einem hepatozellulären Karzinom, einem Osteosarkom, einem Sarkom des Ovars, einem Teratom, einem Melanom, einem Hodenkarzinom, noch in normalem Gewebe der Milz, der Plazenta und Kolonmukosa nachgewiesen werden. Der Nachweis von CGM1a mit kreuzreaktiven CD66-Antikörpern (mAb Tu2 und mAb 73) in der Durchfluß-Zytometrie zeigte eine sehr geringe Expression von CGM1 auf reifen Granulozyten [Nagel et al., 1993].

Weitere Untersuchungen zeigten, daß CGM1 nicht auf Akuten-Lymphatischen-Leukämie- oder B-Zell-Linien nachweisbar war [Hananberg et al., 1994].

ZIELE DER ARBEIT

Die Arbeit zielte darauf ab, mögliche Bindungspartner von CGM1a zu isolieren und gegebenenfalls zu identifizieren. Dazu war zunächst die Herstellung und Aufreinigung von CGM1a_{cyt} notwendig. Mit der aufgereinigten zytoplasmatischen Domäne sollten in Analogie zu den von Brümmer et al. für CD66a erhobenen Daten [Brümmer et al., 1995] *in vitro* Untersuchungen zur Phosphorylierbarkeit - entsprechend der beschriebenen Konsensus-Motive- erfolgen. Überprüft werden sollte die

- Phosphorylierbarkeit mit Tyrosin-Kinasen und die Kinetik dieser Reaktion, die
- differentielle Phosphorylierbarkeit durch Tyrosin-Kinasen der Src-Familie und die
- Phosphorylierbarkeit mit Serin-/ Threonin-Kinasen,

um dann mit den unterschiedlichen Zuständen der Domäne nach assoziierten Proteinen in Granulozytenextrakten zu suchen, die mit der zytoplasmatischen Domäne im Sinne eines Signaltransduktionsweges in Wechselwirkung treten könnten.

Hier sollten die möglichen Bindungspartner entweder durch

- ihre Funktion (Kinase- bzw. Phosphatase-Aktivität) oder aber
- durch Sequenzierung direkt identifiziert werden.

Ausgehend von den bekannten Daten sollte mittels mRNA-Analysen das

- Expressionsmuster von CGM1a_{cyt} näher untersucht werden.

Der letzte Schritt sollte die

- Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen CGM1a_{cyt} sein, um ein Werkzeug für die weitere Erhebung von *in vitro* Daten zu bekommen.

Zudem ergibt sich mit einem gegen die zytoplasmatische Domäne gerichteten Antikörper die Möglichkeit, die Daten *in vivo* nachvollziehen zu können.

Die Abbildung 8 gibt schematisch den Ablauf der Experimente wieder.

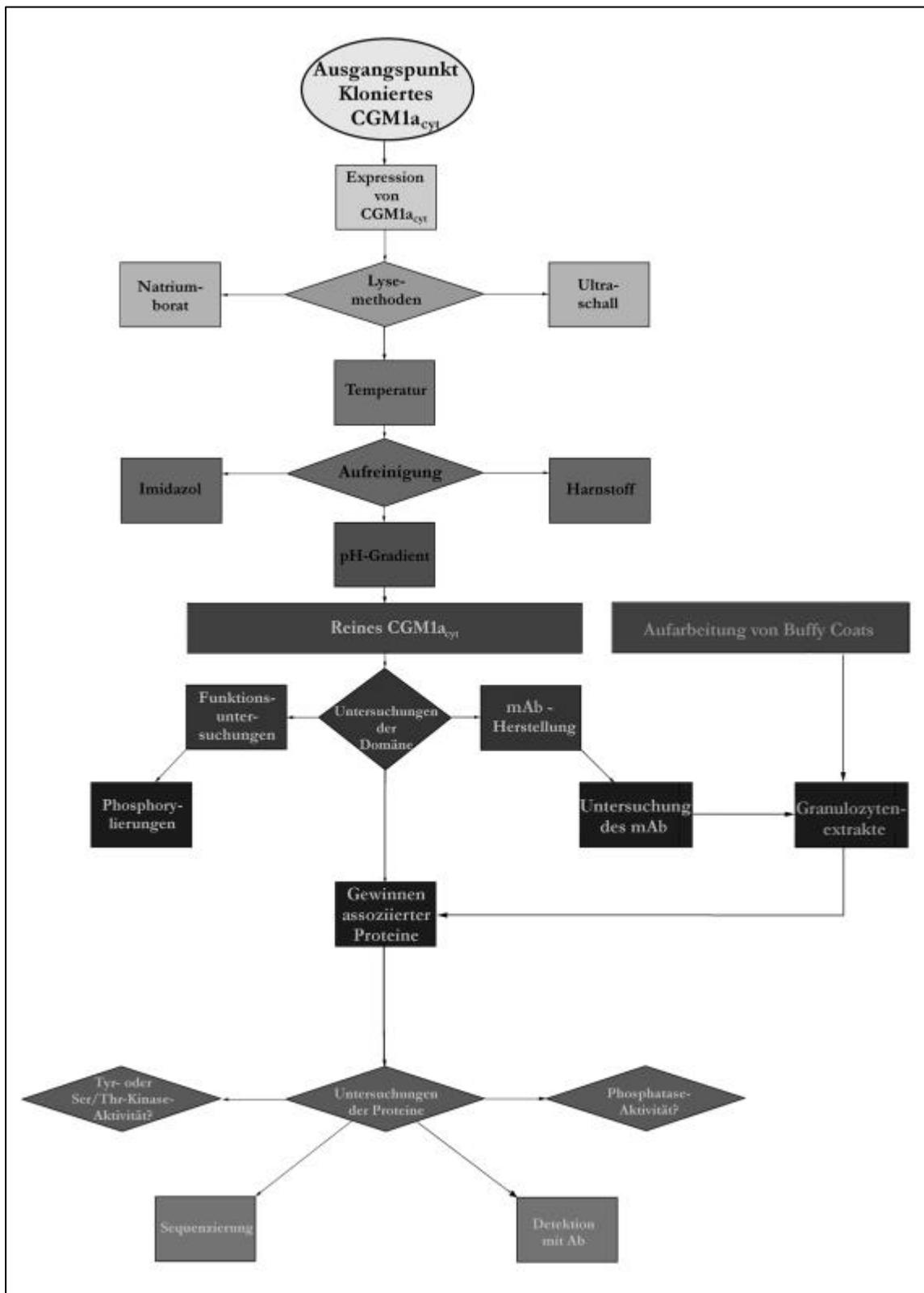


Abbildung 8: Schematischer Arbeitsablauf der Experimente

MATERIAL UND METHODEN**MATERIALIEN UND BEZUGSQUELLEN****ANTIKÖRPER (AK)**

Produkt	Firma
anti P-Tyr Antikörper	ICN
goat-anti-mouse-Ak, AP-konjugiert	Dianova
PY-20-anti P-Tyr Antikörper	ICN
rabbit-anti-mouse Ak-POD-konjugiert	DAKO
anti-mouse-Ak POD konjugiert (ret. 1047523)	Boehringer Mannheim

ENZYME

Produkt	Firma
Casein-Kinase I (CK-I)	Biomol und Promega
Casein-Kinase II (CK-II)	Promega
Casein Hammersten (2242)	Merck
c-Src-Kinase (p60 ^{c-Src})	Upstate Biotechnology Incorporated
Fyn-Kinase	Upstate Biotechnology Incorporated
Lck-Kinase (p56 ^{Lck})	Upstate Biotechnology Incorporated
Lyn-Kinase (p56 ^{Lyn})	Upstate Biotechnology Incorporated
Protein-Kinase C (PKC)	Biomol
PTP 1B	Dianova
PTP 1C	Dianova

CHEMIKALIEN

Produkt	Firma
2-Mercaptoethanol	Sigma
γ - ³² P-ATP	NEN Life Science Products
6-Amino-n-Hexan-Säure	Merck
ABTS	Boehringer Mannheim
Acrylamid	Bio Rad

Alpha-Casein	Sigma
Ammoniumsulfat	Sigma
Ammoniumchlorid	Merck
Ampicillin Natriumsalz	Sigma
APS (Ammoniumpersulfat)	Bio Rad
ATP	Gibco/BRL
Bacto-Tryptone	Difco Laboratories
Bacto-Yeast Extract	Difco Laboratories
Benzamidin	Merck
Beta-Casein	Sigma
Bisacrylamid	Biorad
Blocking Reagent	Boehringer Mannheim
Brij 35	Sigma
Brilliant Blue G-colloidal Concentrate	Sigma
Bromphenolblau	Merck
BSA	Behring
Buffy-Coats	Blutspendedienst des UKE
CaCl ₂	Merck
CDP-Star	Boehringer Mannheim
Coomassie Brilliant Colloidal Blue G250	Biorad
CSPD	Boehringer Mannheim
DAB-Tbl	Sigma
Diacylglycerol	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
EDTA	Merck
EGTA	Sigma
Eisessig	Apotheke / Riedel de Haen
EMERALD	Dianova
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ficoll	Pharmacia
Formaldehyd	Merck
Gelatine	Merck
Glycerin	Merck
β-Glycerol-Phosphat	Sigma
Glycin	Merck
H ₂ O ₂	Merck
Harnstoff	Biomol
HCl	Merck
HEPES	Sigma

High-Range-Marker	Sigma
Imidazol	Merck
IPTG	Merck
K ₃ PO ₄	Merck
Kaliumhydrogencarbonat	Merck
Kanamycin Monosulfat USP	ICN Biochemicals
Kemptide	Biomol
Kinase-Substrate-Peptide Bi-KVEKIGEGTYGVVYK-amid	Boehringer Mannheim
KOH	Merck
Low-Range-Marker	Promega
Magermilchpulver	Uelzena
MES	Sigma
Methanol	Apotheke / Riedel de Haen
Mg-Acetat	Merck
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄	Merck
MnCl ₂	Merck
Na ₂ CO ₃	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
Na ₃ VO ₄	Merck
NaCl	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaHCO ₃	Merck
NaOH	Merck
Naphtolblau	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumborat	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumfluorid	Merck
Natriumpyrophosphat	Merck
NatriumThiosulfat	Merck
NaVO ₃	Merck
n-Butanol	Merck
NiSO ₄	Merck
NP-40	Sigma
OPD-Substrat	Sigma
PBS Dulbecco`s	Gibco BRL
Phenylphosphat	Merck

Phosphorsäure	Merck
PMSF	Sigma
Proteinstandard low range	Gibco/BRL
SDS	Sigma
Serva Blau	Serva
Silbernitrat	Merck
Sucrose	Serva
Temed	Bio Rad
Thimerosal (T-5125)	Sigma
TMB	Sigma
Tricine	Serva
Tris-HCl	ICN
Triton X-100	Merck
Tween 20	Merck
Zitronensäure	Merck
ZnCl ₂	Merck

CHROMATOGRAPHIE- UND FILTERMATERIAL SOWIE VERBRAUCHSMATERIALIEN

Material	Firma
50 ml Röhrchen	Nunc
Autoklavierbeutel	Wilke und Witzel
Bottle-Top-Filter	Nalgene
Centiprep 3, 10, 30	Amicon
Centricon 30, SR3	Amicon
Combitips 5 ml	Eppendorf
Dialysemembran 3	Wilke und Witzel
Dialysemembran Type 36	Biomol
Einmal-Pipetten 5, 10, 25 ml	Lager
EMD-650-S	Merck
Gel Blotting Paper (GB 002)	Schleicher & Schuell
Gel-Kämme 10, 16	Biometra
Glasplatte mit schrägem / geradem Schliff	Biometra
gravity-flow Säulen	Biorad
Hyperfilm MP 18x24 (Röntgenfilm)	Amersham
Immobilon-P Transfer Membranes (Western-Blot, 0.45µm Poren)	Millipore
Klebefolie für Mikrotiterplatten	Wilke und Witzel
Kulturkolben 2000 ml	Conrad & Co

Küvetten	Wilke und Witzel
Microcon 3	Amicon
Mikrotiterplatte, 96 Well	Biozym
Ni-NTA	Qiagen
PCR-Tubes, 0,5 ml	Biozym
Petrischalen	Falcon
Petrischalen 145 mm	Nunc
Protran Nitrocellulose (0.45 µm)	Schleicher & Schuell
P-Tyr Agarose	Oncogene
P-Tyr-Affinity-System	Dianova
Safe Lock 0,5, 1,5, 2 ml	Eppendorf
Safeseal-Tips 10, 100, 1000 µl	Biozym
SFCA 0.45 (Filter 0.45 µm)	Sartorius
Silikonabdichtung	Biometra
Spin columns	Qiagen
Sterilfiltrationsgerät 0,2 / 0,45 µm	Nalgene
Tubes 25 ml, 50 ml	Falcon
Tyrosin-Kinase Assay Kit	Boehringer Mannheim
Ultrafree-15 (Centrifugal filter device, Biomax 5)	Millipore
Vernichtungsbeutel	Hellma
Wägeschälchen	Wilke und Witzel

GERÄTE

Produkt	Firma
Aminosilane Küvetten	Fisons
Certomat MV (Vortex)	B. Braun Biotech Int.
Econo-System und Zubehör	ECONO
Elektrophoresekammer	Biometra
ELISA-Inkubator / ThermoStar	BMG
ELISA-Reader	SLT Austria
ELISA-Washer / WeWash4	Denley
E-Phor Powerpack P24	Biometra
Fast-Blot B33	Biometra
Filmkassette	3M
FPLC und Zubehör	Pharmacia
Gefriertruhe (-70 °C)	Kryotec
Gelkamm	Biometra
Glasmaterialien	Allgemeiner Laborbestand

Glasplatten für Gele	Biometra
Heizblock / Dri-BlockDB1	Techne
HPLC und Zubehör	Merck
Hybridisierofen	GFL, Burgwedel
Inkubator B 5042 E	Heraeus
Intesifying Screens	NEN Dupont, Bad Homburg
Mikrotiterplatten-Photometer (SF-Plus)	SLT, Crailsheim
Miniautoklav	Tecnomara, Fernwald
Orbital Shaker Incubator	TEQ
PCR-Cycler / Mini Cycler	MJ Research
PH-Meter	Beckmann
Phosphoimager bas2000-355	Fuji/ BAS1
Picofuge	Stratagene
Power-Supply EPS300	Pharmacia
RC5C Zentrifuge	Sorvall Instruments Du Pont
REAX 2 / Überkopfschüttler	Heidolph
Referenzpipetten	Eppendorf
Rocking Plattform	Gerhard
Roto Silenta /KS	Hettich, Tuttlingen
Safe Lock 0,5, 1,5, 2 ml	Eppendorf
Slot-Blot-Kammer	Biometra
Sonorex Supra RK102H	Bandolin/MSE
Speed-Vac (Vakuumentrifuge)	Savant, USA
Strahlungshandmeßgerät (LB 1210 B)	Berthold, München
Szintillationszähler (Tricarb)	Canberra Packard, Frankfurt
Ultraschallbad	Sonorex
Ultrazentrifuge Beckmann L2 65B	Beckmann, München
UV-160 Spectrophotometer	Shimadzu
Vakuumpumpe	Vacubrand, Wertheim
Wasserbad	GFL

ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN

STERILISIERUNG DER ARBEITSMATERIALIEN

Gegenstände aus Polypropylen (Eppendorf-Tubes, Pipettenspitzen) wurden im Autoklav in feuchter Hitze bei 121 °C und 2 bar für 4 T autoklaviert. Flüssige Substanzen (LB-Medium, Puffer) wurden ebenfalls so behandelt, allerdings mit längerer Zeit (6 T), temperatur-empfindliche Lösungen wurden mit 0,2 µm Filtern sterilfiltriert.

Glasgeräte wurden mit trockener Hitze für 16 h bei 180 °C im Memmert-Ofen sterilisiert.

RADIOAKTIVITÄTSMESSUNGEN

Zur Messung von γ -³²P wurden 5-10 µl Probe in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold) in die entsprechenden Messgefäße pipettiert und im P-Kanal des Packard-Tricarb-Szintillationsmessgerätes gemessen. Die Zählrate (cpm) wurde einmal über einen Zeitraum von 2 min ermittelt. Zur Abschätzung von Aktivitäten am Arbeitsplatz diente ein Handstrahlungsmessgerät (Berthold (LB 1210 B)).

QUANTIFIZIERUNG VON $\mathbf{g}^{32}\mathbf{P}$ -AKTIVITÄT AUF SDS-PAGE-GELEN

Um die Aktivität in den Gelen grob abzuschätzen, wurde mit dem Handmessgerät in 2 cm Abstand gemessen.

Die genauere Bestimmung, z.B. die Quantifizierung einzelner Banden, erfolgte durch Messung am Phosphoimager.

EDV

Die direkte Datenerfassung erfolgte mit einem PC unter Windows 3.11 und Word für Windows 6.0, die Weiterverarbeitung mit einem PC unter Win 95, sowie Office 97 (Textverarbeitung und Tabellenkalkulation). Die Grafiken wurden mit Corel 7.0 und Photoshop 4.2 bearbeitet. Zur Analyse numerischer Daten wurde Origin 3.0 verwendet.

Um Protein-Sequenzen auszuwerten, wurden im Internet folgende zur Verfügung stehende Programme und Datenbanken verwendet:

DNA Sequence Translation:

<http://alces.med.umn.edu/cuse.html>

Genetic Resources Core Facility:

<http://grcf.med.jhu.edu/>

Pedro's BioMolecular Research Tool

http://www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html

The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

EXPRESSIONSSYSTEM FÜR CGM1_{CYT}

Zur Gewinnung ausreichender Mengen der zytoplasmatischen Domäne wurde ein Expressionssystem der Firma Qiagen verwendet.

Proteinsequenz von pQE31+CGM1-insert																						
Frame 1	Met	Arg	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Thr	Asp	Pro	Thr	Ser	Ile	Gln	Arg	Asp	Leu		
	ATG	AGA	GGA	TCT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	ACG	GAT	CCA	ACC	AGC	ATC	CAG	CGT	GAC	CTC		
			9			18			27			36			45			54				
	Lys	Glu	Gln	Gln	Pro	Gln	Ala	Leu	Ala	Pro	Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	His	Ser	Ser	Ala	Phe	Ser	Met
	AAG	GAG	CAG	CAG	CCC	CAA	GCC	CTT	GCC	CGT	GGT	CCC	TCC	CAC	AGC	TCT	GCC	TTC	TCG	ATG		
			69			78			87			96			105			114			123	
	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Ala	Gln	Ala	Pro	Leu	Pro	Asn	Pro	Arg	Thr	Ala	Ala	Ser	Ile	Tyr	Glu	Glu
	TOC	OCT	CTC	TCC	ACT	GCC	CAG	GCC	CCC	CTA	CCC	AAC	CCC	AGG	ACA	GCA	GCT	TCC	ATC	TAT	GAG	GAA
			135			144			153			162			171			180			189	
	Leu	Leu	Lys	His	Asp	Thr	Asn	Ile	Tyr	Cys	Arg	Met	Asp	His	Lys	Ala	Glu	Val	Ala	Ser		
	TTG	CTA	AAA	CAT	GAC	ACA	AAC	ATT	TAC	TGC	CGG	ATG	GAC	CAC	AAA	GCA	GAA	GTG	GCT	TCT	TAG	
			201			210			219			228			237			246			255	

Abbildung 9: Expressionskonstrukt

Die Abbildung 9 gibt die Sequenz des entsprechenden Expressionskonstrukts wieder. Der verwendete Vektor war pQE31 (siehe Abbildung 12) und der Escherichia coli-Stamm (E. coli) SG13009.

KULTIVIERUNG VON E. COLI STÄMMEN

Einzelkolonien für die Anzucht von Reinkulturen wurden durch Ausstrich auf Agar-Platten gewonnen. Nach Inkubation bei 37 °C wurden die Platten bei 4 °C aufbewahrt. Mit den einzeln gepickten Bakterien eines Verdünnungsausstrichs wurden 20 ml LB-Medium beimpft und über Nacht bei 37 °C und 190 rpm auf einem Rotationsschüttler inkubiert.

Größere Ansätze (500 ml) wurden mit 2 ml Übernacht-Vorkultur beimpft und wie oben inkubiert (siehe auch Large-Scale).

Zur Lagerung wurden Glycerolkulturen folgendermaßen angelegt: In zuvor autoklavierte Schraubdeckelgläser wurde Übernacht-Kultur in 16 % steriles Glycerol pipettiert, geschüttelt und bei -70 °C gelagert.

PROTEINEXPRESSION (LARGE SCALE CULTURE - 6L)

Vorbereitend wurden 1 l Erlenmeyerkolben (mit Schikanen), 100 ml Erlenmeyerkolben und ein 500 ml Meßzylinder autoklaviert. Das LB-Medium wurde wie oben beschrieben angesetzt und sterilisiert. Als Vorkultur wurden jeweils 60 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin in sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben über Nacht bei den oben genannten Bedingungen mit dem entsprechenden Klon (hier Klon 3) beimpft und inkubiert. Die Hauptkultur wurde in sechs 1 l Schikane-Kolben mit gleichen Antibiotika-Konzentrationen angesetzt und mit jeweils 20 ml angeimpft (entspricht 1:50 Beimpfung).

Die Kulturen konnten nun zu den genannten Bedingungen mit Kontrolle der Bakteriendichte wachsen, bis die optische Dichte (OD) bei 600 nm zwischen 0.7 und 0.9 lag, gemessen gegen einfach LB (üblicherweise nach etwa 3.5 h). Dann wurde der *lac*-Promotor mit 2 mM IPTG induziert und für weitere 5 h inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4000 U/min für 10 min (Sorvall, Rotor Code 10) zentrifugiert und das Pellet entweder sofort eingefroren oder in Sonication-Puffer (10 ml) aufgenommen und dann eingefroren. Die Pellets wurden bei -70 °C gelagert. Die Überstände wurden zurück in die Erlenmeyerkolben gefüllt und autoklaviert.

KONTROLLE DER EXPRESSIONSLOKALISATION

Zunächst wurde eine 100 ml Kultur wie oben beschrieben angesetzt und vor der Induktion ein

1 ml Aliquot (nicht-induzierte Kontrolle) abgenommen, zentrifugiert und mit Probenpuffer versetzt. Bevor die Kultur endgültig abzentrifugiert wurde, wurde eine zweite Probe (induzierte Kontrolle) abgenommen und wie die erste behandelt.

Die Kultur wurde dann in zwei Aliquote geteilt und mit 4000 xg abzentrifugiert.

Kontrolle auf zytoplasmatische Lokalisation

Das oben gewonnene Pellet wurde in 5 ml Sonication-Puffer resuspendiert, auf Trockeneis eingefroren und in kaltem Wasser wieder aufgetaut. Anschließend wurde das Pellet vorsichtig mit dem Ultraschallgerät (Sonorex Supra) behandelt und mit 10000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und auf Eis aufbewahrt (Rohextrakt A: lösliches Protein). Das Pellet wurde wiederum in 5 ml Sonication-Puffer resuspendiert (Rohextrakt B: unlösliches Protein).

Kontrolle auf periplasmatische Lokalisation

Das zweite oben gewonnene Pellet wurde in 10 ml 30 mM Tris-HCl, 20 % Sucrose bei pH 8.0 resuspendiert, dann 1 mM EDTA zugegeben und bei Raumtemperatur für 5-10 min auf dem Überkopfschüttler inkubiert und mit 8000 xg bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml eiskaltem 5 mM MgSO₄ wieder aufgenommen.

Die Suspension wurde nun für 10 min auf dem Schüttler in Eiswasser gerührt und mit 8000 xg bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand ist das osmotische Schock-Fluid (Rohextrakt C: Periplasmatisches Extrakt).

Abschließend wurden die Proben mit einer SDS-PAGE unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Konzentrationen in den Rohextrakten untersucht.

VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER LYSEMETHODEN

Es wurden vier Methoden der Lyse mit jeweils 750 µl Pellet ausprobiert, das entsprach in diesem Falle 1.7 g Feuchtgewicht.

Die unterschiedliche Qualität der Lysate wurde optisch und mittels SDS-PAGE untersucht.

Lyse der Bakterien im Wasserbad

Die Pellets wurden von -70 °C bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 3 ml Sonication-Puffer/g Pellet (Puffer siehe S. 28) versetzt und ausgiebig gemischt. Dann wurde die Probe bei 100 °C 5 min im Wasserbad gekocht, abzentrifugiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Lyse der Bakterien mit Harnstoff

Die Pellets wurden von -70 °C bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 3 ml Lyse-Puffer/g Pellet versetzt, kurz gemischt und für 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler gerührt, wie oben abzentrifugiert und aufbewahrt.

Puffer:

LYSE-PUFFER:

- 8 M Harnstoff, 0.1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris, auf pH 8.0 mit NaOH.

Lyse der Bakterien mit Ultraschall

Die Pellets wurden von -70 °C bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 3 ml Sonication-Puffer/g Pellet versetzt und ausgiebig gemischt. Nun wurde die Probe auf Eis mit Ultraschall

(ca. 300 W) für jeweils 1 min mit folgenden 2 min Pause behandelt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Puffer:

SONICATION-PUFFER:

- 50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, pH mit NaOH auf 7,8

Lyse der Bakterien mit Natriumborat

Die Pellets wurden von -70 °C bei Raumtemperatur aufgetaut, dann mit 3 ml Natriumborat-Puffer /g Pellet versetzt, ausgiebig gemischt und für 2 h im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Dann wurde das EDTA mit 1 mM ZnCl_2 entfernt und das Zell-Lysat wie oben von den Bakterienresten befreit und aufbewahrt [Lindner et al., 1992].

Puffer:

NATRIUMBORAT-PUFFER:

- 150 mM Natrium Borat, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

**IMMUNOLOGISCHE UND PROTEINCHEMISCHE
ARBEITSMETHODEN****ANALYTISCHE SDS-POLYACRYLAMID-GEL-ELEKTROPHORESE**

Mittels der SDS-PAGE können Proteingemische ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden.

SDS-PAGE

Zur Auftrennung wurden zweiphasige (Sammel- und Trenngel) 7,5%-(w/v) oder 17,5%-(w/v) Gele benutzt. Zunächst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen (8 x 8 x 0,1 cm), mit n-Butanol überschichtet und bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Dann wurden das Butanol und das entstandene Kondensationswasser entfernt, das Sammelgel aufgegossen und der entsprechende Gelkamm eingebracht [Laemmli, 1970].

Tabelle 2: Pipettierschema: SDS – Polyacrylamidgel [modifiziert nach Fischer et al., 1991]

Trenngel (6 ml, 1Gel)					
Acrylamid – Konzentration	7.5 %	10 %	12.5 %	15 %	17.5 %
30 % Acrylamid/ 0.8 Bisacrylamid (ml)	1.5	2	2.5	3	3.5
1.88 M Tris-HCl pH 8.8 (ml)	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
0.5 % SDS (ml)	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
H ₂ O (ml)	2.1	1.6	1.1	0.6	0.1
10 % APS (µl)	30	30	30	30	30
Temed (µl)	5	5	5	5	5

Bereich der linearen Auftrennung (kD)	39-94	16-68	Mediär- Bereich	12-34	2,5-31
---------------------------------------	-------	-------	--------------------	-------	--------

Sammelgel 5 % (w/v) (2 ml, 1 Gel)	
30 % Acrylamid/ 0.8 Bisacrylamid (ml)	0.33
0.625 M Tris-HCl pH 6.8 (ml)	0.4
0.5 % SDS (ml)	0.4
H ₂ O (ml)	0.87
10 % APS (µl)	10
Temed (µl)	2

Kathoden- und Anodenpuffer waren hier identisch.

Die Proteinproben wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei mindestens 75 °C denaturiert und direkt auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte mit 10 mA, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, und dann mit 20 mA, bis die Bromphenolblaufront das Gel gerade verlassen hatte.

Puffer:

KATHODEN-UND ANODENPUFFER:

- 14,4 g Glycin, 3,0 g Tris, 1,0 g SDS auf 1l dH₂O

5-FACH LAUFPUFFER

- 15 % β-Mercaptoethanol, 15% SDS, 1,5 % Bromphenolblau, 50 % Glycerol

Als Marker wurden bei 7,5 %-SDS-Gelen High-Range-Marker (HR) und bei 17,5 %-SDS-Gelen Low-Range-Marker (LR) eingesetzt.

Die benutzten Marker setzten sich aus den in der Tabelle angegebenen lyophilisierten Referenzproteinen zusammen:

Tabelle 3: High-Range-Marker (Firma Sigma), 6H-SDS: 29 – 205 kD:

Molekulargewicht (Da)	Referenzprotein
205000	Myosin aus Kaninchenmuskel
116000	β -Galactosidase aus E. coli
97400	Phosphorylase B aus Kaninchenmuskel
66000	Albumin aus Hühnereiweiß
45000	Rinder-Serum-Albumin
29000	Carboanhydratase aus Rindererythrozyten

Tabelle 4: Low-Range-Marker (Firma Promega): 2,5 – 31 kD

Molekulargewicht (Da)	Referenzprotein
31000	Carboanhydrase
20400/ 19700	Trypsininhibitor aus der Sojabohne
16900	Myoglobin aus Pferdeherzen
14400	Lysozym
8100	Myoglobin Fragment 1
2500	Myosin aus Kaninchenmuskel

Tricin-System

Für spezielle Anforderungen wurden dreiphasige Gele gegossen. Die verwendete Elektrophoreseapparatur sowie die Durchführung der Elektrophorese waren prinzipiell dieselbe wie in dem vorangegangenen System. Der Unterschied bestand darin, daß Trenn- und Spacergel gemeinsam polymerisierten. In die abgedichtete Glaskammer wurde zuerst Trenngel bis zu einer Höhe von etwa 4,5 cm eingefüllt und mit ca. 1,5 cm Spacergel überschichtet. Trenn- und Spacergel wurden mit dH₂O abgedeckt und für ca. 1 h auspolymerisiert. Nach Aushärten des Gels wurde das Wasser durch das Sammelgel ersetzt. Die Auftrennung war etwas zeitintensiver als bei dem oben beschriebenen System.

Tabelle 5: Pipettierschema für ein Minigel (8 x 8 x 0,1 cm)

	Trenngel	Spacergel	Sammelgel
48 % Acrylamid / 1,5 % Bisacrylamid (ml)	3,333	1,017	0,333
Gelpuffer (ml)	3,333	1,7	1,033
Glycerin (g)	1,333	-	-
dH ₂ O (ml)	2,166	2,32	2,8
APS 10% (µl)	33,33	16,7	33,33
TEMED (µl)	3,33	1,67	3,33

Die Marker wurden wie oben angegeben verwendet.

Puffer:

GELPUFFER:

- 3 M Tris-HCl, 0,3 % SDS, bei pH 8,45

EINFACH PROBENPUFFER FÜR TRICIN-SYSTEM

- 4 % SDS, 12 % Glycerin, 50 mM Tris-HCl, 2 % β -Mercaptoethanol, 0,01 % Serva Blue, pH 6,8

KATHODENPUFFER:

- 0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1 % SDS, bei pH 8,25

ANODENPUFFER:

- 0,2 M Tris-HCl, bei pH 8,9

WESTERN-BLOT

Die mittels SDS –PAGE aufgetrennten Proteine konnten für weitere Untersuchungen durch Western-Blot auf verschiedene Membranen (Nitrocellulose, PVDF) geblottet werden [Towbin et al., 1979].

Hierzu wurde ein Semi-Dry-Elektroblotting-Verfahren verwendet. Die Abbildung 10 zeigt den Blotaufbau. Die Filterpapiere wurden etwa 10 min zuvor mit den entsprechenden Puffern angefeuchtet und dann blasenfrei übereinandergeschichtet.

Der Transfer erfolgte unter Kühlung mit 250 mA für 45 min bis 1 h in Biometra Blotkammern.

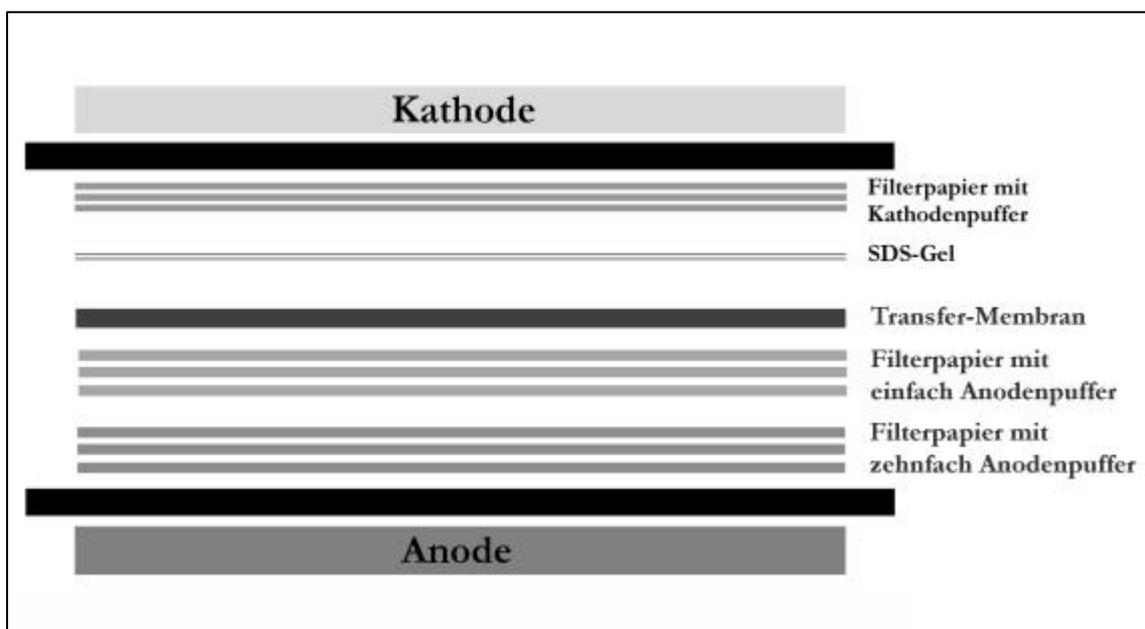


Abbildung 10: Blotaufbau

Anschließend wurde das SDS-Gel mit der Silberfärbung gegengefärbt, um den Transfer der Proteine zu kontrollieren.

Puffer:

ZEHNFACH ANODENPUFFER:

- 0,3 M Tris, 10 % Methanol, pH 10,4

EINFACH ANODENPUFFER:

- 25 mM Tris, 10 % Methanol, pH 10,4

KATHODENPUFFER:

- 25mM Tris, 6-Amino-n-Hexan-Säure, 10 % Methanol, pH 9,4

DOT-BLOT

Beim Dot-Blot-Verfahren wurde das zu untersuchende Protein direkt in einem Puffer (meist PBS) auf die Blot-Membran getropft und getrocknet. Anschließend konnte die Membran in den gleichen Verfahren behandelt werden wie die Elektro-Blot-Membran.

SLOT-BLOT

Der Slot-Blot wurde mit einer Slot-Blot-Kammer durchgeführt, wobei hier die aufgetropfte Proteinlösung mittels Unterdruck auf die Membran gezogen wurde. Der Vorteil dieser Methode liegt in dem gleichbleibenden Auftrag der Probe und der hohen Fixierung auf der Blot-Membran. Im folgenden wurde die Membran genauso behandelt wie die Elektro-Blot-Membran.

PROTEINFÄRBUNGEN

Die Visualisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte durch eine Anfärbung mit Silbernitrat oder mit Coomassie Blue.

Coomassie-Färbung

Die Detektionsgrenze der Coomassie-Färbung liegt bei etwa 0,3-1 µg pro Bande [Wilson, 1983]. Das anzufärbende Gel wurde über Nacht in einer kombinierten Färb- und Fixierlösung auf einem Rotationsschüttler inkubiert, überschüssige Farbe dann mit Entfärbelösung entfernt bis die Banden gut sichtbar waren.

Aufbewahrt wurden die Gele in 20%iger Ethanollösung.

Alternativ wurde folgendes Schnellverfahren der Firma Sigma angewendet:

Tabelle 6 : Coomassie-Schnellfärbungs-Schema

Arbeitsschritt	Lösung	Inkubationsdauer
Fixierung	7 % Eisessig 40 % Methanol 53 % dH ₂ O (v/v)	60 min
Färbung	1x Brilliant Blue G-Colloidal- working-solution 20 % Methanol (v/v)	60-120 min
Entfärbung	10 % Eisessig 25 % Methanol 65 % dH ₂ O	1 min
Waschen	25 % Methanol 75 % dH ₂ O	wenige Minuten
Waschen	25 % Methanol 75 % dH ₂ O (v/v)	
Lagerung	25 % Ammonium Sulfat	mehrere Wochen

Lösungen:

FÄRBE- UND FIXIERLÖSUNG:

- 45 % (v/v) Methanol, 9 % (v/v) Eisessig, 0,1 % (w/v) Serva Blau

ENTFÄRBELOESUNG

- 7 % (v/v) Eisessig, in dH₂O

SILBERFÄRBUNG

Die Sensitivität der Silberfärbung ist höher als die der Coomassie-Färbung, so kann man Proteinmengen ab einer Konzentration von 2-5 ng Protein pro Bande nachweisen [Wilson, 1993].

Zur Färbung sind die jeweils angegebenen Schritte durchzuführen.

Tabelle 7 : Schema der Silberfärbung

Arbeitsschritt	Lösung	Inkubationsdauer
Fixieren	50 % Methanol 10 % Essigsäure	30 min
Fixieren und Quellen	5 % Methanol 7,5 % Essigsäure	10 min
Waschen	dH ₂ O	5 min
Waschen	dH ₂ O	5 min
Sensitivieren	0,02 % Natrium-Thiosulfat	1 min

Waschen	dH ₂ O	1 min
Waschen	dH ₂ O	5 min
Färben	0,2 % Silbernitrat 1 mM Formaldehyd	30 min
Waschen	dH ₂ O	1 min
Waschen	dH ₂ O	1 min
Entwickeln	6 % Natriumcarbonat 6 mM Formaldehyd	bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden
Abstoppen	2,3 M Zitronensäure	-----
Waschen	dH ₂ O	5 min
Lagerung	20 % Ethanol	-----

Das Inkubationsvolumen betrug mit Ausnahme von Schritt 12 100 ml. Zum Stoppen der Entwicklung genügte ein Volumen von ca. 5 ml.

IMMUNCHEMISCHE FÄRBUNGEN

DAB-Färbung

Das Prinzip der Färbung beruht auf dem Umsatz eines Substrates (3,3-Diaminobenzamidin, DAB) durch ein Antikörper-gekoppeltes Enzym (Peroxidase).

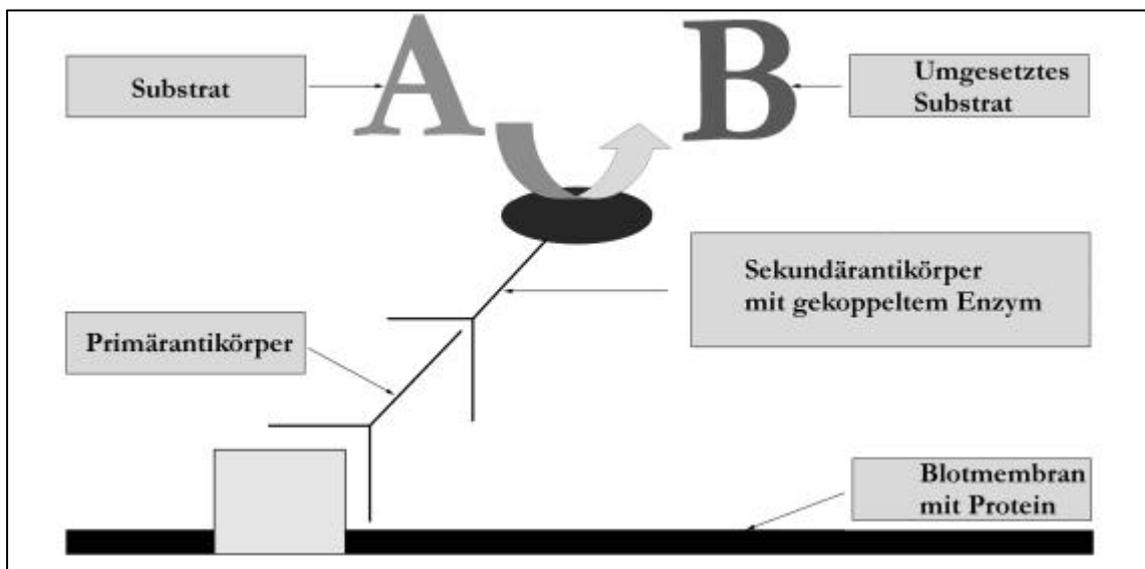


Abbildung 11: Schema der Immunchemischen Färbungen

Das auf die Membran geblottete Protein wurde für 2 h in Blockier-Lösung (5 % BSA in PBS) auf dem Rotationsschüttler inkubiert, um freie Valenzen abzudecken. Dann wurde mit dem Primärantikörper (mouse-Ab, Konzentration war abhängig von dem verwendeten Antikörper)

in PBS (mind. 0,1 ml / cm²) mindestens für 2 h, meist jedoch über Nacht bei 4 °C am Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde zweimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen und der Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist (rabbit-anti-mouse Ab-POD, 1:2000 in PBS), zugesetzt und für 1 h am Überkopfschüttler bei Raumtemperatur gebunden. Die Detektion erfolgte dann durch Zugabe der Peroxidase-Substrat-Lösung (1 Tablette DAB, 12 µl H₂O₂, 15 ml TBS). Die Banden wurden nach wenigen Minuten sichtbar. Die Reaktion wurde mit dH₂O gestoppt und die Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

Chemilumineszenz

Das Funktionsprinzip ist ähnlich zu dem der DAB-Färbung; nur wird hier durch das gekoppelte Enzym in einer Chemilumineszenzreaktion Licht emittiert, welches dann mit Filmen detektiert werden kann.

CSPD:

(3-(4-Methoxy Spiro{1,2-Dioxetan-3,2-(5-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]Decan-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz))

Die Membran wurde direkt nach dem Blot für 30 min mit 50 % Isopropanol (in dH₂O) gewaschen, dann zweimal kurz mit dH₂O gespült und für 15 min in TBS geschwenkt. Die freien Bindungsstellen wurden mit Blockierlösung I (10 % (w/v) BSA in TBS) über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler abgedeckt, dann mit Puffer GT (0,1 % Gelatine, 0,1 % Tween 20 in TBS) dreimal kurz gewaschen und für 1 h in diesem geschwenkt. Nun wurde mit dem Primärantikörper (mouse-Ab in Puffer GT, Konzentration auch hier abhängig von dem verwendeten Antikörper) wie bei der DAB-Färbung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Puffer GT und zweimaligem Schwenken in demselben für jeweils 30 min wurde der Sekundärantikörper (goat-anti-mouse-Ab, AP-konjugiert) in einer Konzentration von 1:1000 in Puffer GT auf die Membran gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde der Blot zweimal mit Waschlösung (0,05 % Tween 20 in PBS) behandelt und für 1 h darin geschwenkt. Danach wurde der Blot für 1 h mit Blockierlösung II (5 % Magermilchpulver, 0,05 % Tween 20 in PBS) abgedeckt, zweimal mit Waschlösung gewaschen und 15 min in derselben geschwenkt und zweimal für 15 min in Assay-Puffer (50 mM Na₂CO₃, 50 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, pH 9,5) äquilibriert.

Die Chemilumineszenzreaktion erfolgte für 5 min in 10 ml Assay-Puffer, dem 700 µl EMERALD (Enhancer) und 70 µl CSPD-Substrat zugesetzt wurden. Dann wurde die Membran abgetropft und luftblasenfrei zwischen Klarsichtfolien gelegt, um sie in einer

Filmkassette mit Verstärkerfolie einem (Röntgen-)Film zu exponieren. Die Expositionszeiten betragen 0,5 bis 30 min, dann wurden die Filme entwickelt.

CDP-STAR:

(2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2-(5-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1.^{3.7}]Decan-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz))

Das Vorgehen war identisch bis zum Schritt der Äquilibrierung. Hier wurde mit dem Detektionspuffer (0,1 M Tris -HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) äquilibriert. Dann wurde CDP-Star (Boehringer Mannheim) 1:100 in 5 ml Detektionspuffer gelöst und in einer kleinen Petrischale für 5 min inkubiert. Danach war das Prozedere weiterhin wie oben beschrieben.

Die Expositionszeit konnte allerdings mit CDP-Star deutlich kürzer gewählt werden.

Amidoschwarzfärbung

Mit Amidoschwarz können Proteine nicht-selektiv angefärbt werden, es wurde hier benutzt, um Standardmarker-Banden auf der Blot-Membran sichtbar zu machen. Die Membran wurde für etwa 5 min mit der Färbelösung auf dem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung behandelt, bis die Banden deutlich zu erkennen waren. Zur Lagerung wurde die Membran zwischen Filterpapier getrocknet.

Lösungen:

FÄRBELOESUNG:

- 0,02 % Naphtolblau, 40 % Methanol, 10 % Eisessig in dH₂O

ENTFÄRBELOESUNG:

- 20 % Methanol, 5 % Eisessig in dH₂O

CHROMATOGRAPHISCHE PROTEINAUFREINIGUNG

Unter Chromatographie versteht man die Auftrennung von Probengemischen zwischen einer festen und mobilen Phase, hier war die feste Phase, bestehend aus einer kugelförmigen Matrix, im Normalfall in eine Säule gepackt. Das Proteingemisch wurde dann über diese Matrix geschickt, selektiv gebunden, gewaschen und desorbiert.

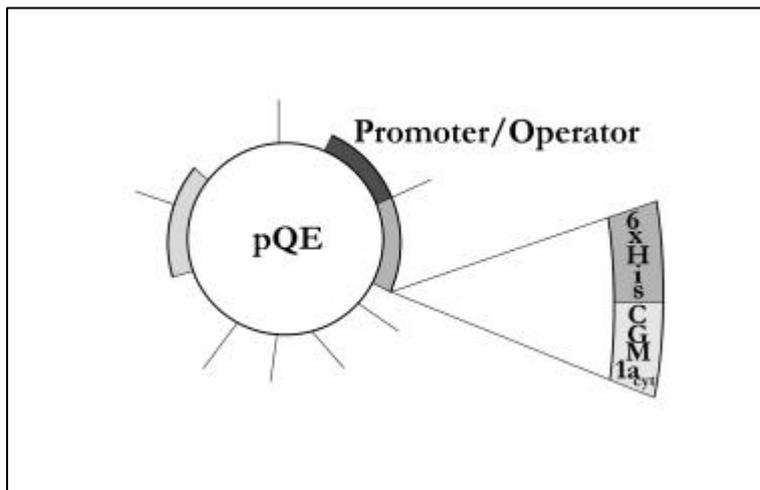


Abbildung 12: Aufbau des $CGM1a_{yt}$ -Konstrukts (vereinfacht, Abkürzung: His: Histidin)

Es wurden verschiedene Methoden der Aufreinigung untersucht.

Als maßgebliche Rahmenbedingung war das klonierte Teilstück, wie in Abbildung 12 zu sehen, mit einem N-terminalen 6xHis-Tag ausgerüstet.

Deshalb wurde als Aufreinigungsmethode eine Affinitätschromatographie mit einer Metall-Chelat-Agarosematrix (IMAC) verwendet [Gentz et al., 1989; Abate et al., 1990; Bush et al., 1991; Lindner et al., 1992; Baier et al., 1994; Kempf et al., 1995].

Als Variablen des Systems wurden

- die Art der Agarose (Ni-NTA, Qiagen / EMD-650-S, Merck) [Hochuli, 1987],
- das bindende Zentral-Ion (Ni / Zn) [Hochuli, 1990; Casey et al., 1995],
- die Säulengröße [Hochuli, 1988],
- das Bindungsverfahren (Batch-Binding, Column-Binding), sowie
- die Wasch- und Elutionsbedingungen [Hengen, 1995]

verändert und untersucht, wobei anfänglich bei Raumtemperatur gearbeitet, die jedoch zugunsten der höheren Stabilität des Proteingemisches bei 4 °C auf diese Umgebungstemperatur gesenkt wurde.

So wurde bei Ni-NTA mit Säulen der Firma Pharmacia gearbeitet, in die unterschiedliche Mengen an Agarose gefüllt wurden. Im Falle des EMD-Komplexes wurde eine fertig gepackte Säule der Firma Merck verwendet.

Die Abbildung 13 zeigt die Unterschiede der verwendeten Materialien.

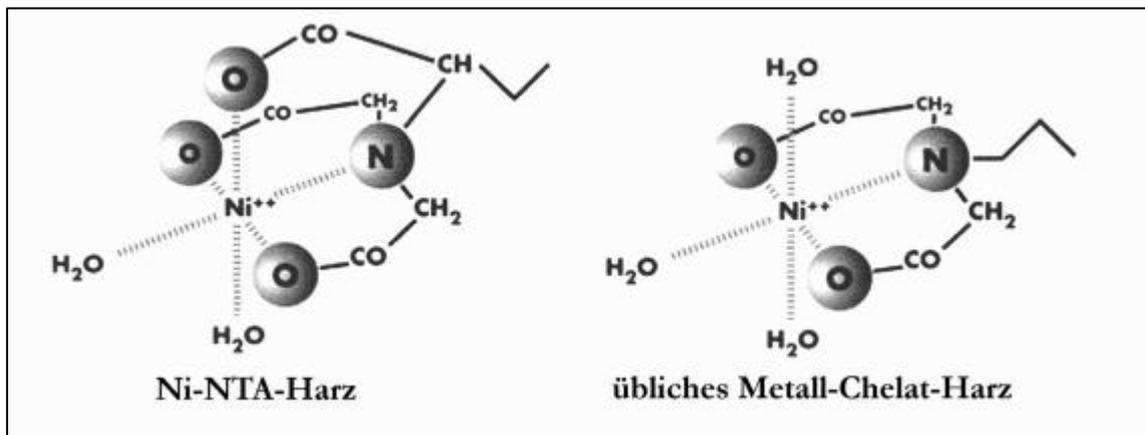


Abbildung 13: Aufbau der Ni-NTA im Gegensatz zu klassischen Materialien

Die hauptsächlich verwendeten Elutionspuffer waren

- Sonication-Puffer mit einem pH-Gradienten,
- Harnstoff-Lösung mit einem Salz-Gradienten (denaturierend) und
- Imidazol mit einem Konzentrationsgradienten (nativ).

Diesen Puffersystemen liegen unterschiedliche Elutionsprinzipien zugrunde:

Der Sonication-Puffer eluiert über eine Reduktion des pH-Wertes während des Gradienten.

Die Histidinreste werden deprotoniert und dissoziieren von dem Zentralion.

Bei dem Harnstoff-Puffer wird das gebundene Protein über einen steigenden Salzgehalt aus der Bindung gelöst. Bei dem Imidazolgradienten wird über die molekulare Ähnlichkeit (siehe Abbildung 14) von Histidin und Imidazol kompetitiv eluiert.

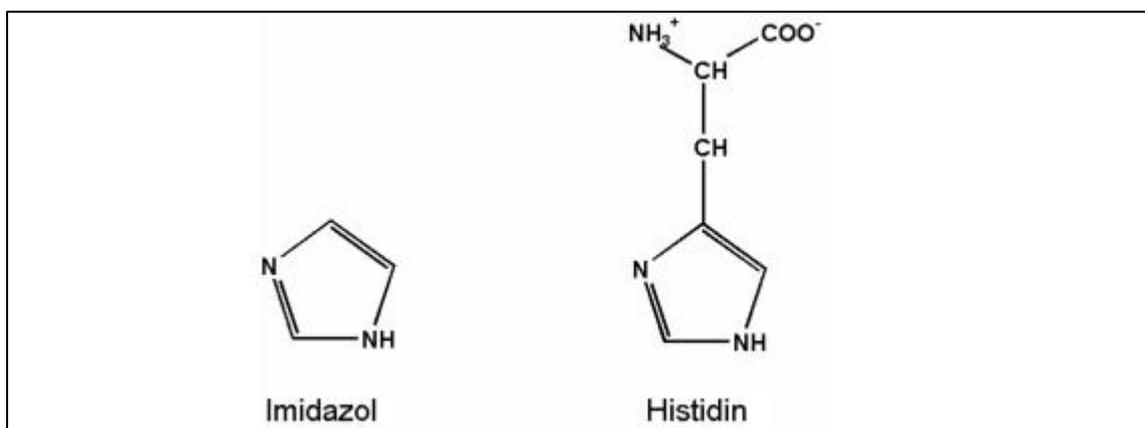


Abbildung 14: Struktur von Imidazol und Histidin

Als chromatographische Geräte wurden das Econo-System, eine Pharmacia-FPLC und eine HPLC von Merck eingesetzt. Die Ergebnisse von FPLC und HPLC waren vergleichbar, während Läufe am Econo-System deutlich geringere Qualität aufwiesen, deshalb im folgenden nur die Beschreibung der Programme an FPLC bzw. HPLC.

Die Vorbereitung des Säulenmaterials erfolgte laut Herstellerangaben, äquilibriert wurde mit dem jeweiligen Waschpuffer.

Gebunden wurde das Protein entweder im Batch-Binding-Verfahren, wobei das Zellextrakt direkt auf die Agarose gegeben und für 2-12 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert wurde, oder mittels eines Loops, mit dem das Zellextrakt mit 0,2 ml /min über die Säule geschickt wurde (Column-Binding).

Die Säule wurde anschließend von Hand so befüllt, daß ein gleichmäßiges Gelbett entstand. Sämtliche Puffer wurden mit 0.45 µm Milipore-Filter filtriert und 5 min im Ultraschallbad entgast. Bei dem HPLC-Betrieb konnte die Entgasung wegfallen, da ein Entgasungsgerät vorgeschaltet war.

Die Elutionsprogramme waren so gestaltet, daß nach dem Waschen (gewaschen wurde mit dem Dreifachen des Säulenvolumens) die Baseline sicher erreicht wurde, dann folgte ein langsam ansteigender Elutionsgradient (Elutionsvolumen entsprach dem vierfachen Säulenvolumen), der dann für eine Weile auf dem Maximalniveau (zweifaches Säulenvolumen) gehalten wurde und schließlich nochmals ein kurzes Nachwaschen der Säule mit dem Waschpuffer (zweifaches Säulenvolumen), um das Säulenmaterial nicht durch den niedrigen pH-Wert oder die hohe Salzkonzentration unbrauchbar zu machen. Danach wurde die Säule gemäß den Herstellerangaben entweder von Hand oder maschinell mit Strip-Puffer entladen (Herausspülen der Zentralionen), ausreichend mit dH₂O gewaschen und anschließend wieder mit dem Metallion beladen (100 mM Lösungen von ZnCl₂ oder NiSO₄). Bei der von Qiagen vertriebenen Ni-NTA wurde nach viermaligem Benutzen des Materials eine Regeneration nach dem Herstellerprotokoll vorgenommen.

Elution mit Sonication-Puffer (pH-Gradient)

NI-NTA

Die Menge des verwendeten Ni-NTA betrug 20 ml, durch Kompression derselben ergab sich nach dem Packen ein um etwa 1/3 geringeres Gelbett. Zunächst wurde die Ni-NTA bei Raumtemperatur gewaschen und äquilibriert, indem das Material in ein 50 ml Röhrchen (Falcon) pipettiert und mit Sonication-Puffer aufgefüllt wurde. Dann wurde gut gemischt und bei nicht mehr als 800 U/min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Danach wurde das Zellextrakt von 1,5 l Kultur direkt auf die Ni-NTA gegeben und auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C für 2-24 h inkubiert. Anschließend wurde das Material in die Säule gegossen und gewartet, bis sich die Ni-NTA gesetzt hatte. Der Durchlauf wurde aufbewahrt und später mit auf das SDS-Gel aufgetragen, um die Bindung zu kontrollieren. Dann wurde mit einer Perfusorspritze Waschpuffer über die Säule gezogen, bis das Material eine kompakte Form annahm und blasenfrei war. Nun wurde der zweite Stempel aufgeschraubt und fixiert. Die so gepackte Säule wurde jetzt an die FPLC angeschlossen und der Lauf gestartet. Die Fraktionsgröße betrug 4 ml, gesammelt wurde erst ab dem Beginn des Gradienten.

EMD-650-S

Hier wurde die Säule mit dem Dreifachen des Säulenvolumens mit Sonication-Puffer an der HPLC mit 0,8 ml / min äquilibriert und dann das Zellextrakt über einen Loop (Pharmacia) mit 0,2 ml /min aufgetragen, das Auftragen wurde bis zu dreimal wiederholt.

Dann wurde das Elutionsprogramm gestartet.

Elution mit einem Harnstoffgradienten und kompetitive Elution mit Imidazol

Das Vorgehen für die Elution mit einem Harnstoffgradienten oder steigender Imidazol-Konzentration war mit Ni-NTA bzw. EMD-650-S analog zu dem oben beschriebenen Verfahren mit Sonication-Puffer.

SPIN COLUMNS (NI-NTA)

Die Spin Columns wurden mit Waschpuffer (Puffer B) dreimal äquilibriert und nach jeder Beladung (2 ml) mit 2000 U / min zentrifugiert. Dann wurde das Proteingemisch fünfmal über die Säule geschickt und mit dem Elutionspuffer (Puffer B + steigende Imidazolgehalte) das gebundene Protein mittels Step-Gradienten desorbiert.

Arbeitsschritt:	Imidazolgehalt
Waschung mit jeweils 2 ml (3x)	Puffer B ohne Imidazol
Step-Gradient	Puffer B mit 20 mM Imidazol
	Puffer B mit 30 mM Imidazol
	Puffer B mit 40 mM Imidazol
	Puffer B mit 50 mM Imidazol
	Puffer B mit 75 mM Imidazol
	Puffer B mit 100 mM Imidazol
	Puffer B mit 150 mM Imidazol
	Puffer B mit 200 mM Imidazol

Puffer:

WASCHPUFFER:

- 50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, pH 7,8

ELUTIONSPUFFER (B):

- 50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, 20 – 200 mM Imidazol, pH 7,8

GRAVITY-FLOW SÄULEN (NI-NTA)

Es wurde im Kühlraum bei 4 °C gearbeitet und die Fraktionen von Hand gesammelt.

Zunächst wurden 6 ml 50 % Ni-NTA dreimal in Sonication-Puffer gewaschen, im Batch-Binding-Verfahren gebunden und in die Biorad Säule gefüllt, dann wurde der Durchlauf (ungebundenes Protein) gewonnen und ansonsten genauso verfahren wie bei den Spin Columns angegeben.

Lediglich die Puffermenge betrug für jeden Arbeitsschritt 4 ml, so daß dementsprechend auch 4 ml Fraktionen gesammelt wurden.

PROTEINKONZENTRATIONSMESSUNGEN

Zum Einsatz kamen die klassische Bestimmung nach Bradford [Bradford, 1976], die modifizierte Messung nach Bradford als Micro-Assay der Firma Bio-Rad und die direkte Absorptionsmessung.

Klassische Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Meßbereich dieser Methode liegt zwischen 10-100 µg/ml.

100 µl Probenvolumen wurde mit 1 ml Coomassie Brilliant Blue Solution versetzt, gut geschüttelt und bei Raumtemperatur für 2 min stehen gelassen. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe in 0,15 M NaCl. Gemessen wurde in 1 cm Plastikkuvetten bei 595 nm am Photometer [Bradford, 1976].

Lösungen:

COOMASSIE BRILLIANT BLUE SOLUTION (1 L):

- 100 mg Coomassie Brilliant Colloidal Blue G250, 50 ml 95 % Ethanol, 100 ml 85 % Phosphorsäure, auf 1000 ml mit dH₂O

Micro-Assay

Mit diesem Ansatz können Proteinkonzentrationen von etwa 1-25 µg / ml erfaßt werden.

Das Meßprinzip ist identisch zu dem zuvor beschriebenen. Ausgeführt wurde der Assay in einer Mikrotiterplatte mit typischerweise 100 µl Meßvolumen. Dabei wurde die Farbstofflösung (Biorad) mit der Probe 1:4 versetzt, kurz geschüttelt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Standard wurde wie oben angesetzt. Gemessen wurde die Absorption bei 595 nm an einem ELISA-Reader.

Absorptionsmessung

Als schnellste aber ungenaueste Methode diente die direkte Messung der Absorption von Proteinen bei 280 nm. Gemessen wurde entweder am Photometer oder begleitend zur Chromatographie an den geräteeigenen Durchflussphotometern mit angeschlossenen Schreibern.

PROTEIN-SEQUENZIERUNG

Bei der Sequenzanalyse nach Pehr Edman reagiert die N-terminale (d.h. außenstehende, nicht gebundene) Aminogruppe mit Phenylisothiocyanat, wodurch die Peptidkette schrittweise um eine Aminosäure verkürzt wird; in einer Apparatur (»Sequenator«) kann die Aminosäuresequenz von Polypeptiden automatisch bestimmt werden.

Die Proben wurden hierzu zunächst aufkonzentriert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dann wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Coomassie sichtbar gemacht. Die zu sequenzierenden Banden wurden jetzt aus der Membran herausgeschnitten. Mit diesen Proben wurde schließlich die Sequenzierreaktion begonnen. Der letzte Schritt wurde von dem Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH, Herr Dr. Buck) durchgeführt.

PHOSPHORYLIERUNGSREAKTIONEN

Tyrosin-Kinasen

Es wurde versucht, die Phosphorylierungsmotive, die CGM1a_{cyt} aufweist, enzymatisch zu phosphorylieren. Dazu wurden verschiedene Methoden verglichen. Die dabei verwendeten Puffer unterschieden sich recht deutlich voneinander, deshalb wurde abschließend ein Vergleich der unterschiedlichen Kinasen mit einem Universalpuffer durchgeführt. Die verwendeten Kinasen waren kommerziell erhältlich und wurden in aufgereinigter Form erworben.

Die Reaktionspuffer wurden nach dem Ansetzen alle sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt. Um das Natrium-Orthovanadat (Na_3VO_4) zu lösen, mußte man es zunächst aktivieren: Dazu wurde eine 10 mM Na_3VO_4 -Lösung hergestellt und der pH auf 10,0 eingestellt, so daß die Lösung eine gelbliche Farbe bekam. Dann wurde die Lösung kurz erhitzt, bis sie wieder klar wurde. Bei Raumtemperatur wurde die Lösung gekühlt, der pH erneut auf 10,0 eingestellt und erhitzt, bis die Lösung wiederum klar wurde. Diese Prozedur mußte etwa dreimal wiederholt werden, bis der pH-Wert stabil und die Lösung klar blieb, dann konnte sie aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden. Die Phosphorylierungsreaktion wurde immer durch Zugabe von Probenpuffer gestoppt und die Proben dann mit SDS-PAGE und anschließender Färbung untersucht. Bei Verwendung von radioaktivem ATP wurde das Gel einem Röntgenfilm ausgesetzt, bei kaltem ATP wurde das Gel geblottet und die Phosphorylierung mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper (PY-20) nachgewiesen. Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Kinasen wurden die eingebauten Aktivitäten am Phosphoimager untersucht und die Banden gegeneinander quantifiziert.

SRC- KINASE

Verwendet wurde die rekombinant hergestellte humane c-Src-Kinase ($\text{p60}^{\text{c-Src}}$) der Firma Upstate Biotechnology Incorporated mit einer spezifischen Aktivität von 900000 unit / mg. Gearbeitet wurde zum einen mit den vom Hersteller vorgegebenen Puffern und zum anderen mit einem Puffersystem der Firma Oncogene. Die Reaktionsbedingungen und Inkubationszeiten waren ähnlich.

Tabelle 8: Pipettierschema

	Positiv	Kontrolle
Reaktionspuffer	10 µl	14 µl
CGM1 _{act}	10 µl (15 µg)	10 µl
ATP-MIX	10 µl	10 µl
Src-Kinase	4 µl (12U)	---

Inkubiert wurde bei Raumtemperatur für 30 min (bis max. 3 h).

Puffer:

REAKTIONSPUFFER:

- 100 mM Tris-HCl, 25 mM MnCl_2 , 2 mM EGTA, 0,2 mM Na_3VO_4 ,

ATP-MIX:

- 0,5 mM cold ATP, 75 mM MnCl_2 , Zugabe von $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$ 1:10, pH 7,2, 125 mM Mg-Acetat

Protokoll:

Zunächst wurde die CGM1a_{cyt}-Probe in Kinase-Assay-Puffer umgepuffert und aufkonzentriert. Dann wurde bei 37 °C für 30 min bis zu mehreren Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Probenpuffer gestoppt.

Tabelle 9: Pipettierschema

	Positivansatz	Kontrolle
CGM1a _{cyt}	5 µl	5 µl
Kinase-Dilutionspuffer	9,5 µl	10 µl
Kinase-Assay-Puffer	5 µl	5 µl
Src-Kinase	0,5 µl	---
ATP-Mix	10 µl	10 µl

Puffer:

KINASE-ASSAY-PUFFER:

- 50 mM HEPES, 0,1 mg EDTA, 0,015 % Brij 35, pH 7,5

KINASE-DILUTIONSPUFFER:

- Kinase-Assay-Puffer, 0,1 mg/ml BSA, 0,2 % Mercaptoethanol

ATP-MIX:

- Kinase-Assay-Puffer, 0,15 mM ATP, 30 mM MgCl₂, Zugabe von γ -³²P-ATP 1:10

UNTERSUCHUNG DER ENZYMKINETIK VON SRC-KINASE BEI DER PHOSPHORYLIERUNG VON CGM1A_{CYT}

Um der Kinetik der Phosphorylierungsreaktion näherzukommen, wurde ein Ansatz gewählt, der die Reaktionspuffer des Oncogene Protokolls und den ATP-Mix gemäß Upstate Biotechnology Incorporated enthielt. Die Substratprobe CGM1a_{cyt} wurde in Kinase-Assay-Puffer umgepuffert und dann der Ansatz wie in der Tabelle 10 beschrieben gewählt.

Tabelle 10: Reaktionsansatz

	Positiv	Negativ
Kinase-Assay-Puffer	50 µl	10 µl
Kinase-Dilutionspuffer	95 µl	20 µl
Src-Kinase	5 µl	-
Substrat: CGM	50 µl	10 µl
ATP-Mix	100 µl	20 µl
Gesamtansatz	300 µl	60 µl

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im PCR-Cycler für 12 h, danach wurde auf 0 °C heruntergekühlt.

Nach 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 12 h wurden jeweils 40 µl aus dem Reaktionsgefäß entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl Einfach-Probenpuffer beendet.

Das Ergebnis wurde auf zwei 17,5 %-SDS-Gelen kontrolliert, das erste Gel wurde mit Silber gefärbt (aufgetragen 20 µl Probe, 1,5 µl Low-Range-Standard (LR)), das zweite Gel geblottet (aufgetragen 20 µl Probe, 3 µl LR) und die Phosphorylierung auf dem Blot mit PY-20 kontrolliert. Dabei wurde für 45 min bei 250 V geblottet, die P-Tyr-Detektion erfolgte nach einer Blockierung mit 2 % BSA in PBS für 1 h. Dann wurde mit PBS für 1 min gewaschen, mit PY-20 1:500 in PBS verdünnt über Nacht bei 4 °C inkubiert, wiederum für 1 min mit PBS gewaschen und mit einem Peroxidase-konjugiertem rab-anti-mouse-Ab, 1:1000 in PBS, für 1 h inkubiert. Ein nochmaliger Waschschrift folgte mit PBS für 1 min und anschließender DAB-Färbung. Dabei wurden 25 ml DAB-Substrat mit einer Tablette DAB und 15 µl 30 % H₂O₂ unter Lichtabschluß gemischt und auf die Blot-Membran gegeben. Nach etwa 5 min wurden die Banden sichtbar. Die Membran wurde mit dH₂O gewaschen und zwischen Filterpapieren getrocknet.

LYN- KINASE

Bei der benutzten Lyn-Kinase (p56^{Lyn}) handelte es sich um eine partiell aufgereinigte Kinase, die aus Membranen von Rindermilzen gewonnen wurde (Bezugsquelle: Upstate Biotechnology Incorporated). Der Ansatz war wie unten beschrieben, inkubiert wurde bei 30 °C für 30 min.

Puffer:

ASSAY-PUFFER

- 250 mM Tris-HCl, 125 mM MgCl₂, 25 mM MnCl₂, 0,25 mM Na₃VO₄, pH 7,0

DILUTIONSPUFFER

- 200 mM HEPES, 10 % (v/v) Glycerol, 0,1 % NP-40, pH 7,0

γ-³²P-ATP-MIX

- 0,5 mM ATP, Zugabe von γ-³²P-ATP 1:10

LCK-KINASE

Die Lck-Kinase (p6^{Lck}) war ebenfalls eine partiell aufgereinigte Kinase und wurde aus Membranen von Rinder-Thymusgewebe gewonnen (Bezugsquelle: Upstate Biotechnology Incorporated). Der Ansatz war wie unten beschrieben, inkubiert wurde bei 30 °C für 30 min.

Puffer:

ASSAY-DILUTIONSPUFFER

- 100 mM Tris-HCl, 25 mM β -Glycerol-Phosphat, 5 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,2

DILUTIONSPUFFER

- 200 mM HEPES, 10 % (v/v) Glycerol, 0,1 % NP-40, pH 7,0

 γ -³²P-ATP-MIX

- 0,5 mM ATP, 75 mM MnCl₂, Zugabe von γ -³²P-ATP 1:10

FYN- KINASE

Die Fyn-Kinase wurde ebenso wie die Lck-Kinase aus Rinder-Thymus gewonnen und partiell aufgereinigt verwendet (Bezugsquelle: Upstate Biotechnology Incorporated).

Der Ansatz war wie unten beschrieben, inkubiert wurde bei 30 °C für 30 min.

Puffer:

REAKTIONSPUFFER:

- 100 mM Tris-HCl, 125 mM MgCl₂, 25 mM MnCl₂, 2 mM EGTA, 0,25 mM Na₃VO₄, 2 mM Dithiothreitol, pH 7,2

ATP-MIX:

- 0,5 mM ATP, 75 mM MnCl₂, Zugabe von γ -³²P-ATP 1:10

Tabelle 11: Phosphorylierungsansatz

	Src	Lyn	Lck	Fyn
Reaktionstemperatur	Raumtemperatur	30 °C	30 °C	Raumtemperatur
Reaktionspuffer	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Kinase-Dilutionspuffer	4,17 μ l	3,35 μ l	2,5 μ l	2,92 μ l
Kinase (5U)	0,83 μ l	1,65 μ l	2,5 μ l	2,08 μ l
Substrat (CGM1a _{cyt})	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
γ -32-ATP-Mix (20Ci)	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Die Negativ- Kontrolle wurde identisch angesetzt, es wurde jedoch keine Kinase verwendet, sondern dafür 10 μ l Kinase-Dilutionspuffer zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei den für die

Kinasen empfohlenen Reaktionsbedingungen für 30 min. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die gesamte Probe mit 5 µl vierfach LP versetzt wurde. Dann wurde die Reaktion mit 17.5 %-SDS-PAGE untersucht.

KINASEN-VERGLEICH MIT EINEM UNIVERSALPUFFER:

Die Kinasen untereinander wurden mit einem Universalpuffer verglichen und die Kinasen entsprechend ihrer unterschiedlichen Aktivitäten eingesetzt.

Tabelle 12: Aktivitäten der einzelnen Kinasen in Unit (U)

	Src	Lyn	Lck	Fyn
U / µl	3	1.5	1	1.2

Der Ansatz wurde wie folgt gewählt:

Tabelle 13: Reaktionsansatz – Kinasen-Vergleich

	Src	Lyn	Lck	Fyn	Negativ
Assay-Puffer	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Kinase-Dilutionspuffer	4,17 µl	3,34 µl	2,5 µl	2,92 µl	5 µl
Kinase (2,5U)	0,83 µl	1,66 µl	2,5 µl	2,08 µl	---
CGM1	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Kaltes ATP (0,75mmol)	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
32-P-ATP	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Gesamtansatz	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Es folgte eine Inkubation bei 37 °C im Heizblock für 1 h, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl einfach Probenpuffer beendet und durch Auftragen auf 17,5 %-SDS-PAGE untersucht, silbergefärbt, autoradiographiert und am Phosphoimager die inkorporierte γ -³²P-Aktivität ausgemessen.

Puffer:

KINASE-ASSAY-PUFFER:

- 50 mM HEPES, 0,1 mg EDTA, 0,015 % Brij 35, pH 7,5

KINASE-DILUTIONSPUFFER:

- Kinase-Assay-Puffer, 0,1 mg/ml BSA, 0,2 % Mercaptoethanol

ATP-MIX:

- Kinase-Assay-Puffer, 0,5 mM ATP, 75 mM MgCl₂

Serin- /Threonin-Kinasen

Es wurden drei verschiedene Kinasen untersucht: Die Protein-Kinase C und die Casein-Kinasen I und II.

PROTEIN-KINASE C (PKC)

Die verwendete Protein-Kinase C wurde aus Rattenhirn gewonnen und lag in 95 %iger Reinheit vor (Bezugsquelle: Biomol).

Phosphoryliert wurde für 30 min bei 30 °C.

Der Ansatz ist Tabelle 14 zu entnehmen.

Puffer:

ASSAY-PUFFER:

- 20 mM HEPES, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 µg/ml Diacylglycerol, pH 7,4

KINASE-DILUTIONSPUFFER:

- 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % Glycerol, 2 mM EGTA, 10 mM K₃PO₄

CASEIN-KINASE I (CK-I)

Die CK-I wurde aus Rattenleber aufgereinigt erworben (Bezugsquellen: Biomol und Promega). Sie hat ihr Temperaturoptimum bei 37 °C und wurde bei diesem für 30 min inkubiert.

Der Ansatz ist Tabelle 14 zu entnehmen.

Puffer:

ASSAY-PUFFER:

- 25 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,4

DILUTIONSPUFFER:

- 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % Glycerol, pH 7,4

CASEIN-KINASE II (CK-II)

Auch die CK-II stammte aus Rattenleber (Bezugsquelle: Promega) und wurde ebenfalls bei 37 °C für 30 min inkubiert.

Der Ansatz ist Tabelle 14 zu entnehmen.

Puffer:

ASSAY-PUFFER:

- 25 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,4, 200 mM NaCl

KINASE-DILUTIONSPUFFER:

- 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % Glycerol, 200 mM NaCl, pH 7,4

ASSAY - PROTOKOLL:

Tabelle 14: Ansatz für Serin-/ Threonin-Kinasen

	PKC	CK-I	CK-II	Kontrolle
Substrat (CGM1a _{cyt})	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Assay-Puffer	3 µl	5,96 µl	6,67 µl	5 µl
Kinase (0,2/20/20U)	5 µl	2,04 µl	1,33 µl	3 µl Kinase- Dilutionspuffer
γ- ³² P-ATP	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl

Das Substrat CGM1a_{cyt} wurde vorher in den jeweiligen Kinase-Assay-Puffer umgepuffert (via Microcon).

Die Reaktion wurde durch Zugabe von γ-³²P-ATP gestartet und nach 30 min Inkubation bei den entsprechenden Temperaturen mit 3,75 µl vierfach Probenpuffer gestoppt. Dann wurden die Proben auf Tricine-Gele aufgetragen und mittels Silberfärbung und anschließender Autoradiographie untersucht.

PHOSPHOTYROSIN-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Um phosphorylierte Domäne zu gewinnen, war es notwendig, diese von der unphosphorylierten Domäne zu trennen. Dies erfolgte mit Hilfe eines P-Tyr-Immunoaffinitätssystems. Dazu wurden 0,5 ml anti-Phosphotyrosin-Agarose der Firma Oncogene verwendet und eine entsprechend große gravity-flow-Säule. Die Phosphorylierungsreaktion wurde, wie oben beschrieben, ausgeführt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde mit Kinase-Assay-Puffer auf 500 µl gebracht und zur Bindung zehnmal über die Säule laufen gelassen.

Nach der Bindung wurde mit 3 ml Kinase-Assay-Puffer vorgewaschen, nun folgte die eigentliche Waschung mit 3-5 ml Waschpuffer bis die Radioaktivität auf das normale Hintergrundniveau gesunken war. Jetzt wurde die Phosphotyrosin-Domäne mit 3-5 ml Elutionspuffer herausgelöst, wobei 5 Tropfen als jeweils eine Fraktion gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden anschließend am Szintillationsmessgerät ausgemessen und eine Elutionskurve anhand der Aktivitäten erstellt.

Dieser mit radioaktivem ATP durchgeführte Vorversuch wurde dann mit unmarkiertem ATP wiederholt, um das Experiment im Kühlraum durchführen und somit größere Mengen an phosphorylierter Domäne herstellen zu können.

Die Säule wurde nach Gebrauch mit 3 ml Regenerationspuffer und dann mit 3 ml Lagerungspuffer gewaschen, mit diesem überschichtet und bei 4 °C gelagert.

Puffer:

WASCHPUFFER:

- 1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM Natriumpyrophosphat, 50 mM Natriumfluorid, 100 µM Natrium-Orthovanadat, 0,1 % Azid, pH 7,6

ELUTIONSPUFFER:

- 1 % Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM Natriumpyrophosphat, 50 mM Natriumfluorid, 100 µM Natrium-Orthovanadat, 0,1% Azid, 10 mM Phenylphosphat, pH 7,6

REGENERATIONSPUFFER:

- 1 % Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1,5 M NaCl, 30 mM Natriumpyrophosphat, 50 mM Natriumfluorid, 100 µM Natrium-Orthovanadat, 0,1% Azid, 10 mM Phenylphosphat, pH 7,6

LAGERUNGSPUFFER:

- 50 mM Natriumphosphat, 0,14 M NaCl, 0,1 % Azid, pH 7,2

KINASE-ASSAYS

Untersucht wurde sowohl hinsichtlich einer Tyrosin-Kinase-Aktivität, als auch einer Serin- oder Threonin-Kinase-Aktivität.

Die Tyrosin-Kinase-Aktivität wurde allgemein mit einem artifiziellen Substratpeptid in einem ELISA untersucht, im speziellen wurde CGM1a_{cyt} selbst als Substrat verwendet und in einem radioaktiven Assay versucht, Kinase-Aktivität zu detektieren.

Die Serin- oder Threonin-Kinase-Aktivität wurde ausschließlich in einem allgemeinen, radioaktiven Assay untersucht.

Untersuchung auf Tyrosin-Kinasen

NACHWEIS ÜBER ELISA

Die Untersuchung erfolgte mit einem Tyrosin-Kinase-Assay-Kit (Boehringer Mannheim).

Hier wurde ein Peptid mit der zu untersuchenden Enzymprobe phosphoryliert und an-

schließlich an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte gebunden. Dann wurde mit einem Phosphotyrosin-Antikörper, der POD-konjugiert ist, die Tyrosin-Phosphorylierung detektiert [Cleaveland et al., 1990]. Die durch die Peroxidase vermittelte Farbreaktion lieferte dann am ELISA-Reader quantitative Ergebnisse. Die Abbildung 15 zeigt das Assay-Prinzip.

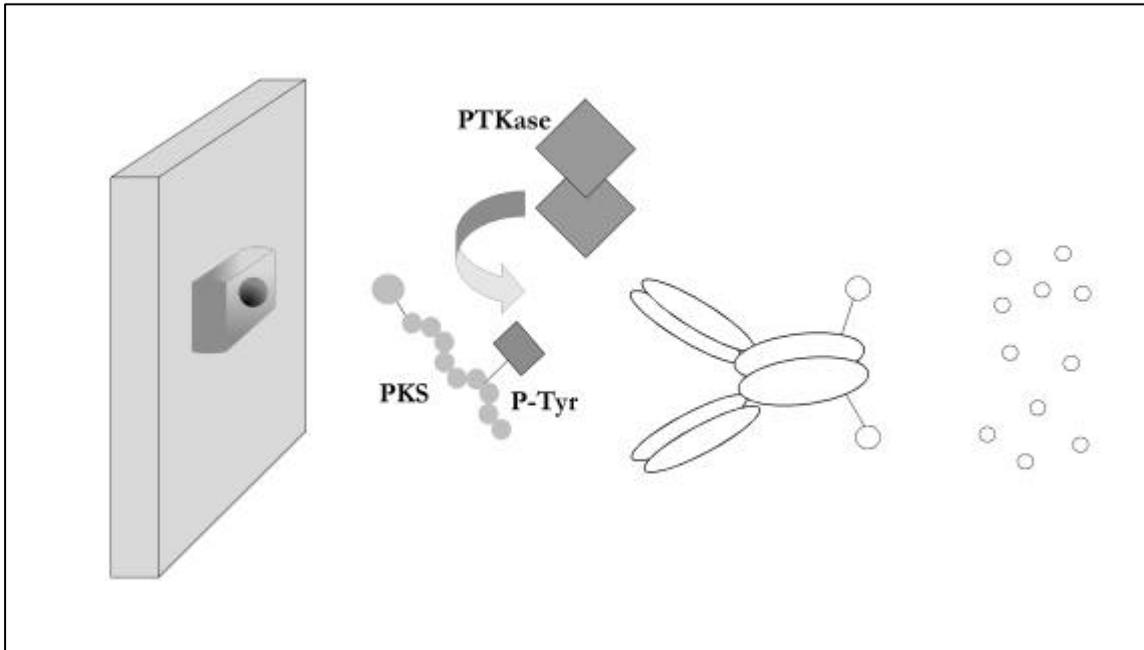


Abbildung 15: Prinzip des Tyrosin-Kinase-Assay (Abkürzungen: PTK: Proteintyrosin-Kinase, PKS: Protein-Kinasesubstrat, P-Tyr: Phosphotyrosin)

Hierbei wurde weitestgehend den Anweisungen des Herstellers gefolgt. Abweichend waren die verwendeten Puffer, die zur Phosphorylierungsreaktion verwendet wurden. Hier wurde dem entwickelten Reaktionsprotokoll (siehe Phosphorylierungsreaktion) entsprechend verfahren.

NACHWEISMETHODIK MIT ^{32}P -ATP

Der Nachweis erfolgte hier über den Einbau von radioaktivem Phosphat.

Der Reaktionsansatz ist der Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Ansatz des Tyrosin-Kinase-Assays

	Positiv	Negativ
Substratpeptid	2 µl	2 µl
Kinase-Dilutionspuffer	8 µl	8 µl
Kinase-Assay-Puffer	8 µl	8 µl
Src	2 µl	---
dH ₂ O	---	2 µl
γ- ³² P ATP	1 µl	1 µl
ATP-Mix	9 µl	9 µl

Als Kontrolle dienten zwei Positivansätze, wobei unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen benutzt wurden: Ein ATP-Mix mit 30 mM MgCl₂ und ein ATP-Mix mit 75 mM MgCl₂. Die zugesetzte Src-Kinase ist eine Tyrosin-Kinase, die bekanntermaßen die ausgewählten Substrate phosphoryliert.

Die Ansätze wurden, wie oben beschrieben, pipettiert und bei 37 °C für 80 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zusatz von 10 µl einfach Probenpuffer gestoppt, 6 min bei 90 °C im Heizblock denaturiert und auf ein Tricin-Gel aufgetragen.

Dann wurde über Nacht fixiert, um die Fixierung gleichzeitig als Waschung fungieren zu lassen. Da nicht nur die radioaktiven Banden detektieren werden sollten, wurde das Gel zusätzlich mit Silber angefärbt. Nun erfolgte die Autoradiographie mit unterschiedlichen Expositionszeiten.

Puffer:

TYR-KINASE-ASSAY-PUFFER:

- 50 mM HEPES, 0,1 mg EDTA, 0,015 % Brij 35, pH 7,5

TYR-KINASE-DILUTIONSPUFFER:

- Kinase-Assay-Puffer, 0,1 mg / ml BSA, 0,2 % Mercaptoethanol

ATP-MIX:

- Kinase-Assay-Puffer, 0,5 mM ATP, 30mM MgCl₂

SUBSTRAT-PEPTIDE:

- Kinase-Substrate-Peptide (Boehringer - Mannheim)
- Bi-KVEKIGEGTYGVVYK-amid (entspricht den AS 6-20 der Cell Division Kinase p 34 cdc2)
- 50 µmol / l PKS, 5 mg / ml BSA, in PBS,
- Direkter Einsatz von aufgereinigtem CGM1_{cyt}

Untersuchung auf Serin-/Threonin-Kinasen

Der Assay erfolgte analog zu dem gerade beschriebenen radioaktiven Tyrosin-Kinase-Assay. Nur der Reaktionsansatz (siehe Tabelle 16) und die verwendeten Puffer unterschieden sich.

Tabelle 16: Ansatz des Serin-/Threonin-Kinasen-Assays

	Positiv	Negativ
Kemptide	2 µl	2 µl
Assay-Puffer	16 µl	16 µl
PKC	2 µl (0.2 U)	---
dH ₂ O	---	2 µl
γ- ³² P ATP	1 µl	1 µl
ATP-Mix	9 µl	9 µl

Puffer:

SER- /THR-ASSAY-PUFFER:

- 20 mM HEPES, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 µg / ml, pH 7.4

SUBSTRATPEPTID:

- Kemptide (Biomol , P-107)
- Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly
- Jeweils 1 mg / ml in dH₂O

PHOSPHATASE-ASSAYS

Die Phosphatase-Assays wurden wie die kalten Kinase-Assays auf Basis eines ELISAs durchgeführt (Kit, Boehringer Mannheim). Hier wurde, bezüglich der ELISA-Nachweisreaktion, den Instruktionen des Herstellers gefolgt. Die Phosphatase-Reaktionspuffer und Reaktionsbedingungen wurden verschiedenen Veröffentlichungen [Zhao et al., 1993; Dechert et al., 1995] entnommen.

Tabelle 17: Reaktionsansatz des Phosphatase-Assays

	Enzymprobe	Pos-I	Pos-II	dH ₂ O
Enzymprobe	10 µl	-	-	-
Phosphopeptid (5 µmol/l) Lsg. IIIa	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Phosphatase-Assay- Puffer I, II, III	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
dH ₂ O	-	8 µl	8 µl	10 µl
Phosphatase	-	2 µl	2 µl	--
Ansatzvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Zunächst wurde eine Standardreihe angesetzt: 25 µl 5-mikromolarer Phosphopeptid-Lösung (Lsg. IIIa) wurden 75 µl PBS/BSA zugesetzt, daraus wurde eine Verdünnungsreihe (jeweils 50 µl aus dem Reaktionsgefäß + 50 µl PBS/BSA) erstellt, die dann folgende Konzentrationen hatte: 1250, 625, 312, 156, 78, 39, 19, 9, 4, 2, 1 nmol / l. Der Assay wurde dann mit den unterschiedlichen Assay-Puffern (I-III) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei den entsprechenden Temperaturen für 30 min. Dann wurden die 50 µl-Proben in die Steptavidin-beschichteten Wells überführt. Gebunden wurde bei 37 °C für 20 min, wobei die Wells mit Klebefolie abgedeckt wurden. Dann folgte die Waschphase: Der Überstand wurde verworfen und dreimal mit 300 µl PBS gewaschen, die Waschlösung anschließend für mindestens 30 sec im Well belassen und dann die Wells auf einem trockenen Lappen ausgeschlagen. Nun folgte die Tyr-Ab-Bindung durch Zugabe von 75 µl anti-p-Tyr-POD working dilution (Va) / Well und Inkubation bei 37 °C für 1 h. Der Überstand wurde wiederum verworfen und wie oben dreimal mit 300 µl PBS gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl POD-Substrat / Well und Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion gestartet und nach 2 min, 4 min und 10 min bei 405 nm am ELISA-Reader gemessen. Die Reaktion wurde mit 5 M KOH gestoppt.

Puffer:

PHOSPHATASE-ASSAY-PUFFER I [DECHERT ET AL., 1995]:

- 100 mM Mes, 50mM NaCl, 10mM 2-Mercaptoethanol, pH 5.5, (Temp.:23 °C)

PHOSPHATASE-ASSAY-PUFFER II (FÜR P-NPP UND PHOSPHOTYROSIN) [ZHAO ET AL., 1993]:

- 25 mM Na-Acetat, 20 % Glycerol, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA, pH 5, (Temp.: 22 °C)

PHOSPHATASE-ASSAY-PUFFER III (FÜR RCM-LYSOZYM, MYELIN BASIC PROTEIN MBP) [ZHAO ET AL., 1993]:

- 25 mM Imidazol-HCl, 1 mM EDTA, 1mM Dithiothreitol, 1mg/ml BSA, pH 7, (Temp.: 30 °C)

GRANULOZYTENMEMBRAN-PRÄPARATION

Die Granulozyten wurden aus 500 ml Buffy-Coats normaler Blutspender gewonnen, bearbeitet wurden im Normalfall acht Buffy-Coats gleichzeitig. Getrennt wurden die unterschiedlichen Zellen durch einen Ficoll-Gradienten ($d=1,077 \text{ g / cm}^3$, Pharmacia): 30 ml Buffy-Coat wurden vorsichtig mit 15 ml Ficoll in einem 50 ml Falcon-Gefäß überschichtet und 30 min bei 1500 U/min im Swing-Out-Rotor bei 4 °C zentrifugiert.

Die Abbildung 16 zeigt die Auftrennung der Blutzellen im Ficoll-Gradienten.

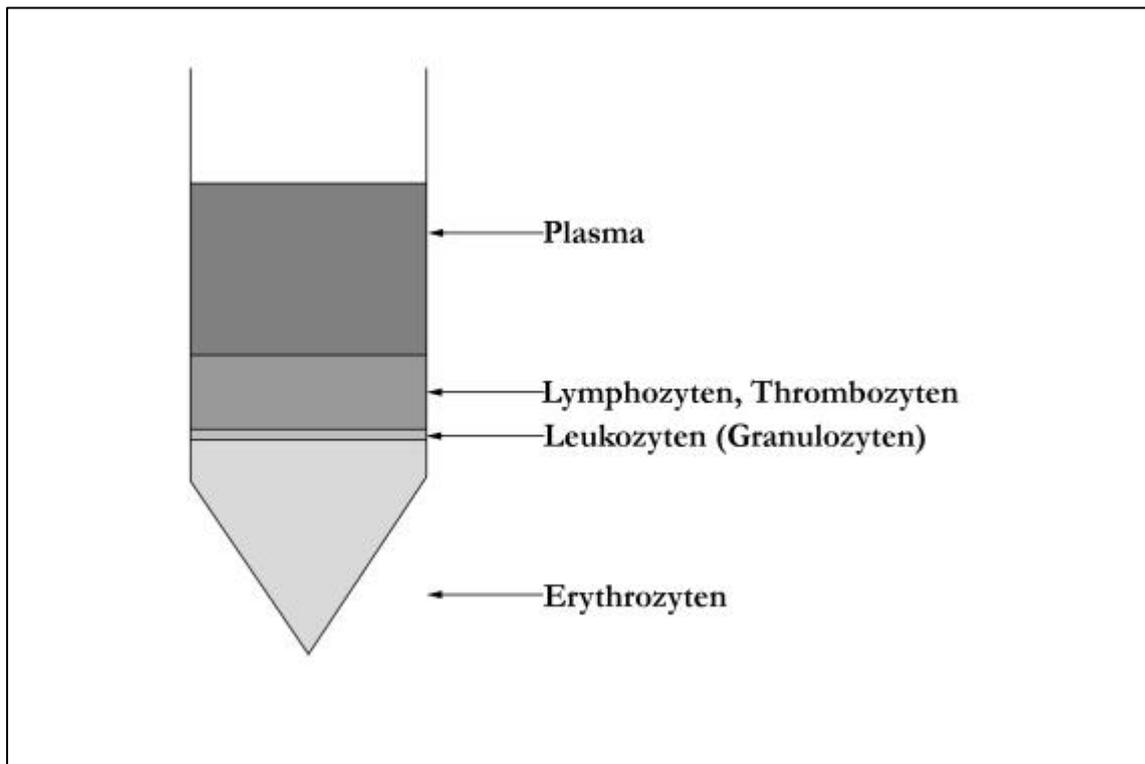


Abbildung 16: Auftrennung der Blutzellen im Ficoll-Gradienten

Danach wurde der Überstand, bestehend aus Lymphozyten und Plasma, abgehoben und verworfen. Das Sediment, das nun hauptsächlich Erythrozyten und Granulozyten enthielt, wurde mit Lyse-Puffer (150 mM Ammoniumchlorid, 10 mM Kaliumhydrogencarbonat, 0,1 mM EDTA) resuspendiert und etwa 5 min inkubiert, dann wie oben für 20 min zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert und der Arbeitsschritt wiederholt, um eine möglichst quantitative Lyse der Erythrozyten zu erreichen.

Die Pellets entsprachen der Granulozytenfraktion und wurden nun dreimal in PBS gewaschen (jeweils mit 20 ml PBS überschichtet und bei 15 min wie oben zentrifugiert), der Überstand abgenommen und wiederum mit 10 ml PBS resuspendiert.

Nach diesem Arbeitsschritt wurde die Zellzahl und Qualität bestimmt, die üblicherweise bei $1-2 \times 10^9$ Zellen/ Buffy-Coat mit einem Granulozytenanteil von 99 % lag.

Nun wurden jeweils 10 ml zweifach Extraktionspuffer (2 % Triton, 10 mM Benzamidin, 20 mM EDTA, 200 mM 6-Aminohexansäure, 4 mM PMSF) zugegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und folgend die Zelltrümmer für 1 h mit 2600 xg bei 4 °C abzentrifugiert. Die so gewonnenen Granulozytenextrakte (Überstand) wurden mit Proteaseinhibitoren-Puffer (10 ml: 7,83 mg Benzamidin, 38 mg EDTA, 132 mg 6-Aminohexansäure, 200 µl PMSF frisch zugesetzt aus 100 mM Stammlösung, in PBS) versetzt und bei -70 °C gelagert. Nach dem Auftauen mußten die Extrakte nochmals für 30 min mit 9000 U/min bei 4 °C zentrifugiert werden, da während des Einfrierens nochmals Material ausfiel.

ISOLIERUNG CGM1A_{CYT}-ASSOZIIERTER PROTEINE

Immuno-Affinitätschromatographische Detektion

Das Gewinnen assoziierter Proteine in größerem Maßstab erfolgte über eine affinitätschromatographische Methode.

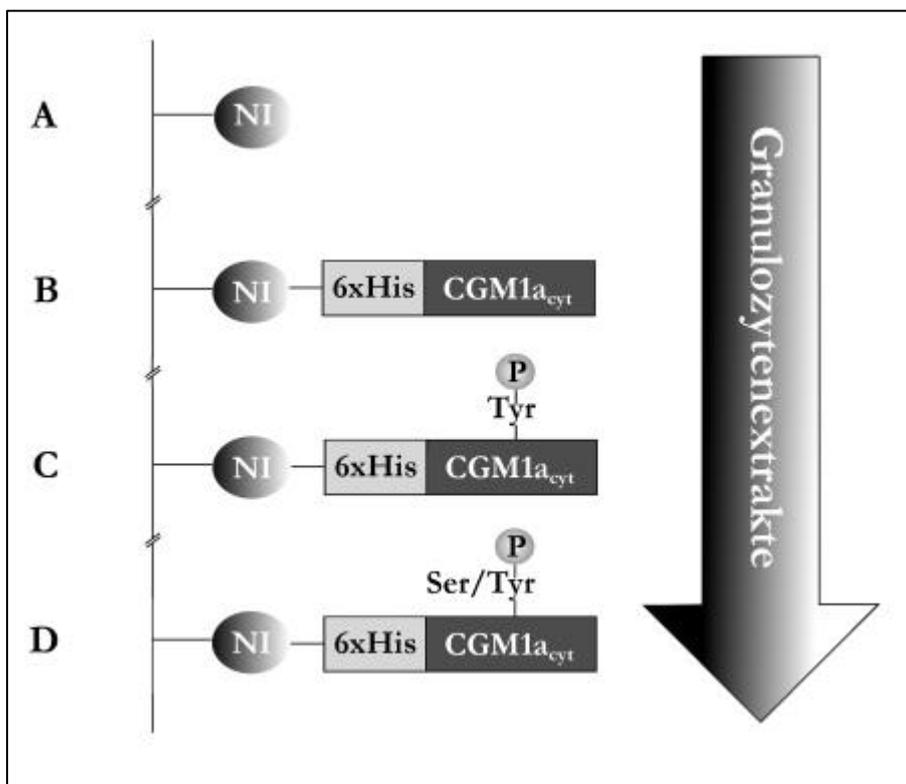


Abbildung 17: Prinzip der Untersuchung

Dazu wurde, wie in Abbildung 17 gezeigt, die rekombinant hergestellte, aufgereinigte Domäne an Ni-NTA gebunden. Daneben wurden die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände der

Domäne an die Matrix gebunden, d.h. zum einen Tyr-phosphorylierte und zum anderen Ser-/Thr-phosphorylierte Domäne.

Die Granulozytenextrakte wurden wie oben beschrieben über einen Ficoll-Gradienten gewonnen. Zum Teil wurde vorgereinigtes Granulozytenextrakt verwendet, diese Serie ist mit „B“ gekennzeichnet. Die Säulen, bei denen unaufbereitete Extrakte zum Einsatz kamen, mit „A“.

Bei den Proben „Tyr-P“ bzw. „Ser/Thr-P“ handelt es sich um zuvor aufgereinigte phosphorylierte zytoplasmatische Domäne. Phosphoryliert wurde mit Src bzw. mit PKC über Nacht gemäß den oben stehenden Protokollen.

Als Säulen wurden Ni-NTA-Spin-Columns verwendet, die mit max. 500 µl beladen und für jeweils 2 min bei 2000 U/min zentrifugiert wurden. Die Tabelle 18 gibt das Prozedere wieder. Die Experimente wurden bei 4 °C im Kühlraum ausgeführt.

Tabelle 18: Arbeitsschema zur Isolierung CGM1a_{cyt} – assoziierter Proteine

	Kontrolle		Unphosphorylierte Domäne		Tyr-phosphorylierte Domäne		Ser/Thr-phosphorylierte Domäne	
Arbeitsschritt	Säule 1 A	Säule 2 B	Säule 3 A	Säule 4 B	Säule 5 A	Säule 6 B	Säule 7 A	Säule 8 B
Äquilibrieren mit Äquilibrierungspuffer	zweimal 0,5 ml	zweimal 0,5 ml	zweimal 0,5 ml	zweimal 0,5 ml	zweimal 0,5 ml	zweimal 0,5 ml	zweimal 0,5 ml	zweimal 0,5 ml
primäre Bindung (dreimal über die Säule)	200 µl Granulozytenextrakt	200 µl Granulozytenextrakt (vorgereinigt)	300 µl zytopl. Domäne	300 µl zytopl. Domäne	200 µl Tyr-P zytopl. Domäne	200 µl Tyr-P zytopl. Domäne	800 µl Ser/Thr-P zytopl. Domäne	800 µl Ser/Thr-P zytopl. Domäne
Bezeichnung	DL1 S1	DL1 S2	DL1 S3	DL1 S4	DL1 S5	DL1 S6	DL1 S7	DL1 S8
Sekundäre Bindung (zweimal über die Säule)			200 µl Granulozytenextrakt	300 µl Granulozytenextrakt (vorgereinigt)	200 µl Granulozytenextrakt	200 µl Granulozytenextrakt (vorgereinigt)	200 µl Granulozytenextrakt	200 µl Granulozytenextrakt (vorgereinigt)
Bezeichnung	DL2 S1	DL2 S2	...					
Waschen mit Waschpuffer	zweimal 2x 0,5 ml	zweimal 2x 0,5 ml	zweimal 2x 0,5 ml	zweimal 2x 0,5 ml	zweimal 2x 0,5 ml	zweimal 2x 0,5 ml	zweimal 2x 0,5 ml	zweimal 2x 0,5 ml

Bezeichnung	W1 S1 W2 S1	W1 S2 W2 S2	W1 S3 W2 S3	W1 S4 W2 S4	W1 S5 W2 S5	W1 S6 W2 S6	W1 S7 W2 S7	W1 S8 W2 S8
Elution mit Elutionspuffer1	zweimal 2x 0,5 ml							
Bezeichnung	E1 S1 E2 S1	E1 S2 E2 S2	E1 S3 E2 S3	E1 S4 E2 S4	E1 S5 E2 S5	E1 S6 E2 S6	E1 S7 E2 S7	E1 S8 E2 S8
Elution mit Elutionspuffer2	dreimal 2x 0,5 ml							
Bezeichnung	E3 S1 E4 S1 E5 S1	E3 S2 E4 S2 E5 S2	E3 S3 E4 S3 E5 S3	E3 S4 E4 S4 E5 S4	E3 S5 E4 S5 E5 S5	E3 S6 E4 S6 E5 S6	E3 S7 E4 S7 E5 S7	E3 S8 E4 S8 E5 S8
Stripping	viermal 2x 0,5 ml							
Bezeichnung	E6 S1 E7 S1 E8 S1	E6 S2 E7 S2 E8 S2	E6 S3 E7 S3 E8 S3	E6 S4 E7 S4 E8 S4	E6 S5 E7 S5 E8 S5	E6 S6 E7 S6 E8 S6	E6 S7 E7 S7 E8 S7	E6 S8 E7 S8 E8 S8

Anschließend wurden die Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und mit SDS-PAGE untersucht.

Puffer:

ÄQUILIBRIERUNGSPUFFER:

- 0,02 M Na_2HPO_4 , 1 M NaCl, pH 8,

WASCHPUFFER:

- 0,02 M Na_2HPO_4 , 1 M NaCl, pH 7,2

ELUTIONSPUFFER 1:

- 0,02 M Na_2HPO_4 , 1 M NH_4Cl , pH 7,2

ELUTIONSPUFFER 2:

- 0,02 M Na_2HPO_4 , 0,5 M NaCl, pH 3,5

STRIP-PUFFER:

- 0,02 M Na_2HPO_4 , 0,05 M EDTA, 0,5 M NaCl, pH 7,2

HERSTELLUNG EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS GEGEN CGM1a_{cyt}

Die Herstellung wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec realisiert. Dafür waren zunächst 1500 µg aufgereinigte zytoplasmatische Domäne notwendig. Um möglichst geringe Kreuzreaktivitäten zu erzeugen, wurde hochreines CGM1a_{cyt} (über 95%ige Reinheit) verwendet.

Die Herstellung erfolgte dann in vier Abschnitten:

1. Die Immunisierung
2. Die Fusion
3. Das Screening und die Aufzucht von Hybridomazellen
4. Das Klonieren und die Subtypenbestimmung

Immunisierung

Obwohl es sich bei CGM1a_{cyt} um ein Heteroantigen für die Maus handelt, war die Immunogenität der zytoplasmatischen Domäne als gering einzuschätzen, da sie zum einen ein lösliches, monomeres Antigen ohne Bindungsaffinitäten zu zellulären Komponenten des Empfängerorganismus und zum anderen ein Peptid unter 10 kD war.

Deshalb wurde in Absprache mit der Firma Eurogentec zur Verstärkung der Immunantwort Freundts komplettes bzw. inkomplettes Adjuvans verwendet. Freundts Adjuvans wirkt depotbildend (Mineralöl) und stimuliert B- und T-Zellen sowie Makrophagen (inaktivierte Mykobakterien). Es wurden vier Mäuse mit jeweils 50 µg pro Injektion nach dem untenstehenden Schema (siehe Tabelle 19) immunisiert. Dabei wurden 100 µl Antigen (CGM1a_{cyt}) und 100 µl Freundts Adjuvans emulgiert und anschließend intraperitoneal gespritzt. Die erste Immunisierung erfolgte mit vollständigem Freundts Adjuvans (CFA) und die weiteren mit inkomplettem (IFA), die letzte Immunisierung vor der Fusion wurde gänzlich ohne Freundts Adjuvans ausgeführt (20 µg CGM1a_{cyt} in PBS und 200 µl/ Maus). Die Blutentnahmen erfolgten aus dem Schwanz, wobei etwa 25 µl Serum pro Abnahme gewonnen wurden.

Tabelle 19: Schema zur Immunisierung der Mäuse

Tag	0	14	21	35	42	56	Fusion (-4 Tage)	Fusion
Injektion	Antigen		Antigen		Antigen		Antigen	
Blut- entnahme	Vor der Immuni- sierung	Serum		Serum		Serum		Serum

ÜBERPRÜFUNG DER SERUM-TITER DER MÄUSE

Die Immunisierung der vier Mäuse wurde mittels ELISA überprüft. Dabei wurde mit 1 µg CGM1a_{cyt} / ml Carbonat-Puffer und 50 µl / Well 1 h bei 37 °C beschichtet, dann mit 200 µl PBS / Well dreimal gewaschen. Nun wurde mit 200 ml / Well Saturationspuffer für 30 min bei 37 °C abgesättigt, dann wiederum dreimal mit PBS gewaschen und 50 µl Serum in einer Verdünnung von 1/1000 und weiteren Verdünnungsschritten (x 1/2) in Saturationspuffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit PBS-Tween viermal mit 200 µl / Well gewaschen, einmal mit 200 µl / Well äquilibriert und der POD-konjugierte Zweitantikörper (Boehringer ret. 1047523) in einer Verdünnung von 1/667 in Saturations-Puffer mit jeweils 50 µl / Well zugesetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgte die Entwicklung mit 100 µl TMB-Citrat in dH₂O / Well für 1-10 min bei Raumtemperatur. Folgend wurde die Reaktion mit 100 µl / Well 1 M H₃PO₄-Lösung gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen.

Puffer:

PBS-TWEEN:

- PBS, 0,1% (v/v) Tween 20

CARBONAT-PUFFER:

- 1,68g NaHCO₃ / 100 ml dH₂O (A), 2,12g Na₂CO₃ / 100 ml dH₂O (B), Mischen von 74 ml A und 26 ml B, pH 9,4-9,7

SATURATIONSPUFFER:

- 1:1 HC in PBS-Tween

HC (CASEIN HYDROLYSAT):

- 25 µg Casein Hammersten in 800 ml 0,3 m NaOH für 16 h bei 37 °C gerührt, pH 7: 17 ml HCl conc. + 800 ml HC mit dH₂O auf 1 l gebracht, 1g Thimerosal zugesetzt

REVELATION-PUFFER:

- 0,5 ml TMB, 9,5 ml Citrat-Puffer+H₂O₂

CITRAT-PUFFER:

- 50 mM, pH 4,25, 14,7 g Trinatrium Citrat, 9,6g Citronensäure, auf 1000 ml mit dH₂O

CITRAT / H₂O₂:

- 1,66 ml H₂O₂ 30 %, 1000 ml dH₂O

TMB:

- 40 mg TMB, 9,9 ml dH₂O, 100 µl HCl conc.

Fusion

Die Fusion erfolgte unter Verwendung von PEG 1500 (Boehringer Mannheim) nach dem entsprechenden Protokoll, die Ausführung erfolgte durch die Firma Eurogentec.

Dabei wurden zunächst etwa 10^6 Zellen der präparierten Milz der Maus mit etwa 2×10^7 Myelomzellen in Kulturmedium suspendiert.

Dann wurden die Zellen für 5 min bei 200-400 x g abzentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette möglichst vollständig abgesaugt. Das Pellet wurde dann durch vorsichtiges Klopfen aufgebrochen. Darauf wurde das Röhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und dort während der Fusion belassen. Nun wurde über einen Zeitraum von 1 min mit einer 1 ml Pipette PEG 1500, das zuvor auf 37 °C erwärmt wurde, auf das Pellet gegeben. Dabei wurde ständig mit der Pipettenspitze umgerührt.

Die Zellen wurden nun in 50 %igem PEG 1500 für 1-2 min weitergerührt. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 1 min 1 ml Medium, das zuvor auf 37 °C vorgewärmt wurde, zur Fusionsmischung zugegeben und dabei ständig weitergerührt.

Nochmalige Zugabe von 3 ml vorgewärmtem Medium über etwa 3 min, dann wurden langsam unter ständigem Rühren weitere 10 ml vorgewärmtes Medium zugegeben. Das Gemisch wurde nun für 5 min inkubiert und die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Selektionsmedium vorsichtig resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen ausgesät.

Puffer:

KULTURMEDIUM

- RPMI 1640 (Biowhitaker), 10 % FCS (Biowhitaker, Lot 6SB008), 1 % Glutamin, 1 % Pyruvat-Natrium, 0,1 % Mercaptoethanol, 1 % NEAA, HAT HT (Boehringer Mannheim)

PEG 1500

- Polyethylenglycol, fertig bezogen von Boehringer Mannheim

SELEKTIONSMEDIUM

- Identisch wie Kulturmedium

MYELOMZELLEN

- SP20Ag14

Die oben beschriebenen Phasen erfolgten in Abstimmung mit der Firma Eurogentec, die letzten beiden Phasen, das Screening und die Vermehrung der Hybridomazellen, sowie die Klonierung und Subtypenbestimmung wurden vollständig von der Firma Eurogentec ausgeführt.

ELISA

Die Untersuchungen waren als Festphasen-Assays in 96-Well-Mikrotiterplatten angelegt. Die nicht-kovalente Beschichtung (Coating) mit dem Antigen oder Antikörper erfolgte in 100 µl / Well Beschichtungspuffer über Nacht bei Raumtemperatur. Die folgenden Inkubationen wurden am ELISA-Inkubator bei 25 °C und leichter Rotation durchgeführt, die Waschschrte am ELISA-Washer mit jeweils 300 µl pro Waschschrte. Am nächsten Tag wurde der Beschichtungspuffer dekantiert und die noch freien Valenzen mit 200 µl / Well Blockierungslösung für 2 h bei Raumtemperatur abgedeckt. Danach erfolgte die Inkubation mit 100 µl / Well der zu untersuchenden Probe. Nach dem Dekantieren der Probenlösung wurde dreimal mit jeweils 300 µl PBS gewaschen. Der Detektions-Antikörper (2.-Ab) wurde 1:2000 in 1% BSA / PBS verdünnt und 100 µl davon in jedes Well pipettiert. Im Anschluß an die Bindung (2 h auf dem ELISA-Inkubator) wurde dreimal mit Citrat-Puffer gewaschen. Dann folgte die POD-Reaktion mit 100 µl /Well OPD-Substrat-Puffer, und nach 20 min Inkubation wurde die Absorption am ELISA-Reader bei 492 nm gemessen.

Tabelle 20: ELISA – Schema zur Kontrolle der Hybridoma-Überstände

Schritt	CGM	Positiv 1	Positiv 2	Kein Hybridoma-Überstand	Kein CGM	Kein CGM + Kein Hybridoma-Überstand
Beschichtung übernacht, RT	100 µl CGM1acyt	100 µl Hybridoma-Überstand	PBS	100 µl CGM1acyt	PBS	PBS
Blockierung 2h, RT	200 µl Blocking-Puffer	200 µl Blocking-Puffer	100 µl Hybridoma-Überstand	200 µl Blocking-Puffer	200 µl Blocking-Puffer	200 µl Blocking-Puffer
1.-Ab-Bindung Hybridoma-Überstand 2 h, RT	100 µl Hybridoma-Überstand	200 µl Blocking-Puffer	200 µl Blocking-Puffer	200 µl Blocking-Puffer	100 µl Hybridoma-Überstand	200 µl Blocking-Puffer
1. Waschung dreimal PBS	300 µl PBS	300 µl PBS	300 µl PBS	300 µl PBS	300 µl PBS	300 µl PBS
2.-Ab-Bindung Anti-mouse-FC-POD, 2 h, RT	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

2. Waschung dreimal Citrat-Puffer	300 µl Citrat-Puffer	300 µl Citrat-Puffer	300 µl Citrat-Puffer	300 µl Citrat-Puffer	300 µl Citrat-Puffer	300 µl Citrat-Puffer
POD-Reaktion mit OPD Substrat 20 min	100 µl OPD					

Puffer:

BLOCKIERUNGSPUFFER

- 5% Boehringer Blocking Reagent in PBS

CITRAT-PUFFER:

- 50 mM Citrat, pH 4,25

OPD-SUBSTRAT-PUFFER:

- 1Tbl- OPD, 12.5 ml Citrat-Puffer, 5 µl H₂O₂
- Ansetzen unter Lichtabschluß

UMPUFFERUNG: DIALYSE, ULTRAFILTRATION

Die Dialysen wurden bei 4 °C (im Kühlraum) über 24 h gegen 3,5 l der gewünschten Vorlage unter ständigem Rühren durchgeführt. Die Vorlage wurde normalerweise zwei- bis viermal gewechselt.

Zum Umpuffern kleiner Mengen wurde mit Centricon-, Centriprep- und Milipore-Ultrazentrifugationseinheiten zentrifugiert.

Die Zentrifugationsbedingungen wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt, grundsätzlich wurde in der Kühlzentrifuge bei 4 °C gearbeitet.

PROTEINAUFKONZENTRATION: ULTRAFILTRATION, VAKUUMVERDAMPFER

Die Proteinaufkonzentration wurde ebenfalls mit Centricon-, Centriprep und Milipore-Ultrazentrifugationseinheiten wie oben ausgeführt. Bei größeren Volumina wurden die Einheiten bis zu viermal nacheinander befüllt und ggf. über Nacht zentrifugiert.

Als Alternative für kleinste Volumina (bis 1 ml) und temperaturstabile Proben wurde eine Speed-Vac mit Kühlfalle benutzt.

MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN

NORTHERN-BLOT

Verwendet wurden MTN-Blots (Multiple Tissue Northern Blot) der Firma Clontech. Dabei handelte es sich um modifizierte Nilon-Membranen, auf die Poly-A⁺-RNA aus verschiedenen humanen Geweben mit einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel transferiert wurden. Jede Lane enthielt 2 µg aufgereinigte Poly-A⁺-RNA. Die Hybridisierungslösung wurde auf 50 °C erwärmt, um das SDS zu lösen, und der Blot damit für 4 h bei 42 °C prähybridisiert. Dann wurde mit 12 ml der radioaktiv markierten DNA-Sonde (als Sonde diente das CGM1a_{cyt}-PCR-Produkt, Konzentration: 2x10⁶ cpm/ml) bei 42 °C über Nacht im Ofen unter Rotation hybridisiert. Anschließend wurde der Blot bei Raumtemperatur mehrere Male mit Waschlösung 1 gespült und für dreimal 10 min mit der Waschlösung im Hybridisierofen gewaschen. Folgend wurde der Blot mit Waschlösung 2 für zweimal 20 min im Ofen bei 50 °C gewaschen, die Lösung abgegossen und der Blot sofort in Folie eingeschweißt. Abschließend wurde der Blot zur Autoradiographie in eine Filmkassette gelegt und bei -70°C über Nacht exponiert.

Puffer:

HYBRIDISIERUNGSLÖSUNG:

- 5 x SSPE, 10 x Denhardts Lösung, 100 µg/ml Lachsspermien DNA, 50 % Formamid, 2 % SDS, lagerbar für 2 Wochen bei 4 °C

20 X SSPE:

- 3 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄-H₂O, 0,02 M Na₂EDTA, auf pH 7,4 mit 10 N NaOH, bei RT lagerbar

20 X SSC:

- 3 M NaCl, 0,3 M Na₃Citrat-2H₂O, auf pH 7 mit 1 M HCl, bei RT lagerbar

50 X DENHARDTS LÖSUNG:

- 5 g Ficoll, 5 g Polyvinylpyrrolidon, 5 g BSA, mit dH₂O auf 500 ml bringen, bei -20 °C lagerbar

WASCHLÖSUNG 1:

- 2 x SSC, 0,05 % SDS, bei RT lagerbar

WASCHLÖSUNG 2:

- 0,1 x SSC, 0,1 % SDS, bei RT lagerbar

WASCHLÖSUNG 3:

- 2 x SSC, 0,1 % SDS, bei RT lagerbar

ERGEBNISSE

HERSTELLUNG UND AUFREINIGUNG VON CGM1A_{CYT}

Die Sequenzanalyse mit dem im Internet zur Verfügung stehenden Programm Expasy lieferte eine potentielle Länge der zytoplasmatischen Domäne von 76 Aminosäuren. Aus dieser Analyse ergaben sich folgende Daten für CGM1a_{CYT}:

Tabelle 21: Aminosäurenkomposition der zytoplasmatischen Domäne

Aminosäure	Anzahl	Aminosäureanteil in %
Ala (A)	10	13,2
Arg (R)	5	6,6
Asn (N)	2	2,6
Asp (D)	3	3,9
Cys (C)	1	1,3
Gln (Q)	5	6,6
Glu (E)	4	5,3
Gly (G)	3	3,9
His (H)	3	3,9
Ile (I)	3	3,9
Leu (L)	6	7,9
Lys (K)	4	5,3
Met (M)	2	2,6
Phe (F)	1	1,3
Pro (P)	7	9,2
Ser (S)	10	13,2
Thr (T)	4	5,3
Trp (W)	0	0
Tyr (Y)	2	2,6
Val (V)	1	1,3

Damit errechnet sich das Molekulargewicht der Domäne auf 8247,2 Dalton.

Der theoretische pI liegt bei 8,99. Die abgeschätzte Halbwertszeit der zytoplasmatischen Domäne liegt bei 4,4 h in Retikulozyten, bei etwa 20 h in Hefe und bei etwa 10 h in E. coli. Der Instabilitätsindex wurde auf 49,17 geschätzt, was das Protein als instabil klassifizierte.

EXPRESSION VON CGM1A_{CYT} IN E. COLI

Um die Expression möglichst zeitsparend zu gestalten, wurde das von Qiagen vorgeschlagene Protokoll (Large Scale Culture) auf 6 l Kulturansätze erweitert. Als sinnvoll erwies sich hier die Benutzung von vier 2 l Schikane-Kolben, da ansonsten die Kulturen aufgrund des Sauerstoffmangels nur mäßig wuchsen (siehe Abbildung 18).

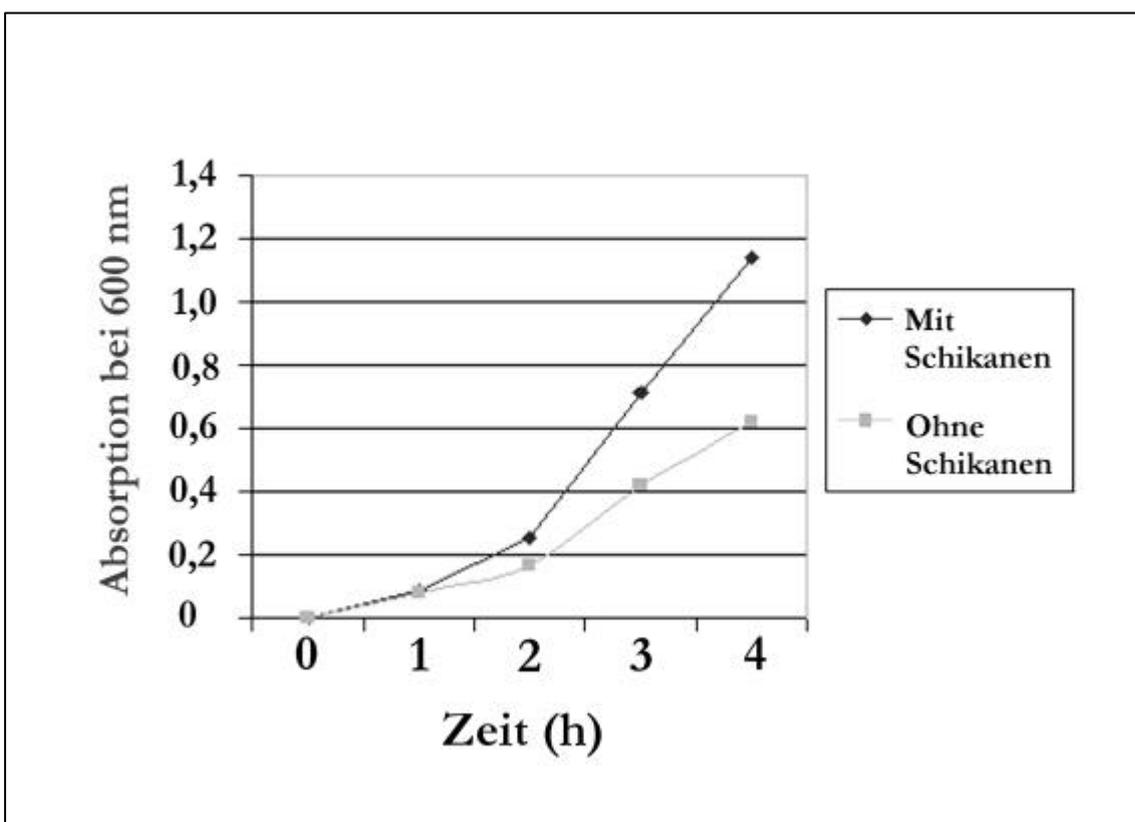


Abbildung 18: Wachstumskurve der CGM1a_{cyt}-transformierten *E. coli*

Nach der Expression wurden die Bakterien abzentrifugiert und das Feuchtgewicht bestimmt. Im Schnitt ergaben sich etwa 2,5 g Zellpellet pro Liter Kulturansatz.

Die Untersuchung auf die Expressionsart des Proteins ergab durch Abschätzung auf SDS-PAGE eine deutlich höhere Konzentration im zytoplasmatischen Anteil als im periplasmatischen. Danach richteten sich die verwendeten Lysemethoden.

LYSEMETHODEN

Die Art der Lyse der Bakterien spielte insbesondere in Bezug auf Ausbeute und Aufreinigung eine Rolle.

Deshalb wurden hier vier verschiedene Methoden miteinander verglichen. Jeweils 750 ml Pellets, das entsprach in diesem Falle 1.7 g Feuchtgewicht, wurden lysiert.

Die unterschiedliche Qualität der Lysate wurde optisch (siehe Tabelle 22) und mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 19).

Tabelle 22: Makroskopische Begutachtung der Lysate

	Optische Beschaffenheit	Viskosität	Zunehmende Färbung
Natriumborat	Fast wässrig, klar	Nicht viskös	↓ Stark
Temperatur	Hellgelb, klar	Wenig viskös	
Harnstoff	Mittelgelb, klar	Nicht viskös	
Ultraschall	dunkelgelb, wenig trübe	viskös	

Ein ähnlich unterschiedliches Bild ergab sich bei der folgenden SDS-PAGE Analyse.

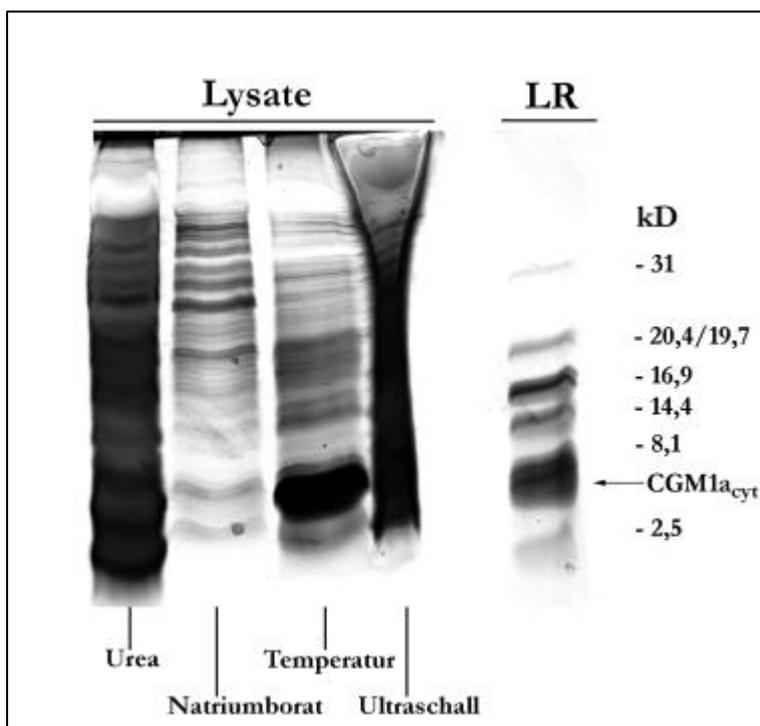


Abbildung 19: Vergleich der Lysate für rekombinant hergestelltes CGM1a_{cyt} (Abkürzungen: LR: Low-Range-Standard, Urea: Harnstoff)

Die schlechte Auftrennung der Ultraschall-Lysate war auch bei der späteren Aufreinigung zu bemerken, mit diesen Lysaten ließ sich keine ausreichende Aufreinigung erzielen.

Dies ließ die Entscheidung klar zugunsten der Temperaturlyse ausfallen, denn hier schien zum einen die absolute Konzentration der zytoplasmatischen Domäne am höchsten, zum anderen aber auch der Anteil „verunreinigender“ Proteine geringer zu sein.

AUFREINIGUNG

Die Isolierung des rekombinant hergestellten Proteins war nach Routineprotokollen nur ungenügend möglich, insbesondere das Standardvorgehen nach dem Protokoll der Firma Qiagen lieferte nur mäßige Aufreinigungsergebnisse (Abbildung 20).

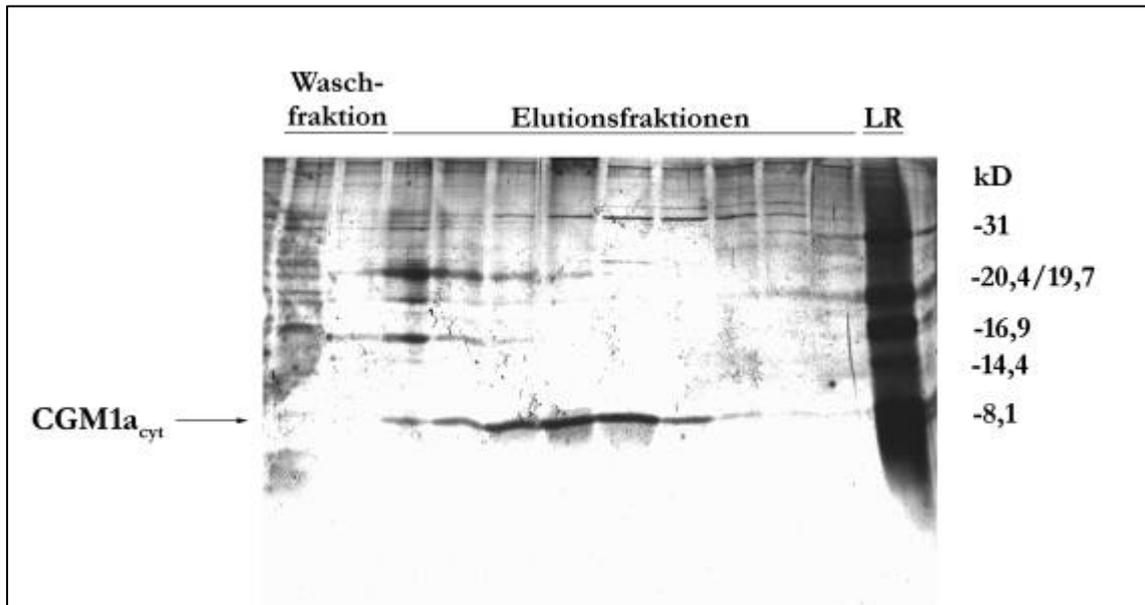


Abbildung 20: Ausgangspunkt der Aufreinigung (Spin Columns mit Imidazolgradient), 17,5%-SDS-PAGE (Abkürzungen: LR: Low-Range-Standard)

Die Abbildung 20 zeigt, daß die Menge der verunreinigenden Proteine bei diesem Verfahren noch ganz erheblich war. Die Banden in Höhe von etwa 8 kD (siehe Pfeil) entsprachen der rekombinant hergestellten zytoplasmatischen Domäne von CGM1a.

Vergleich der Aufreinigungsmethoden

Entsprechend den im Methodenteil angegebenen Protokollen wurden die verschiedenen Formen der Aufreinigung miteinander verglichen. Im folgenden werden die Chromatogramme in Zusammenhang mit der SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen gezeigt.

ELUTION MIT IMIDAZOL

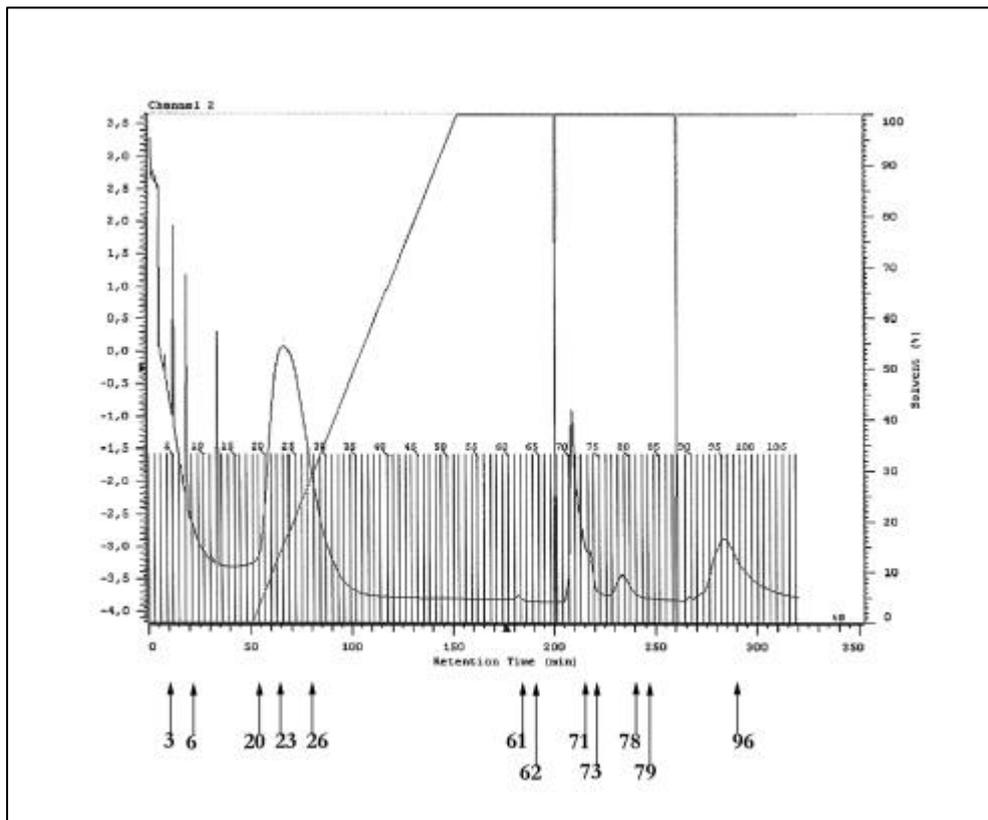


Abbildung 21: Chromatogramm der Imidazol Elution, Säulenmaterial: EMD

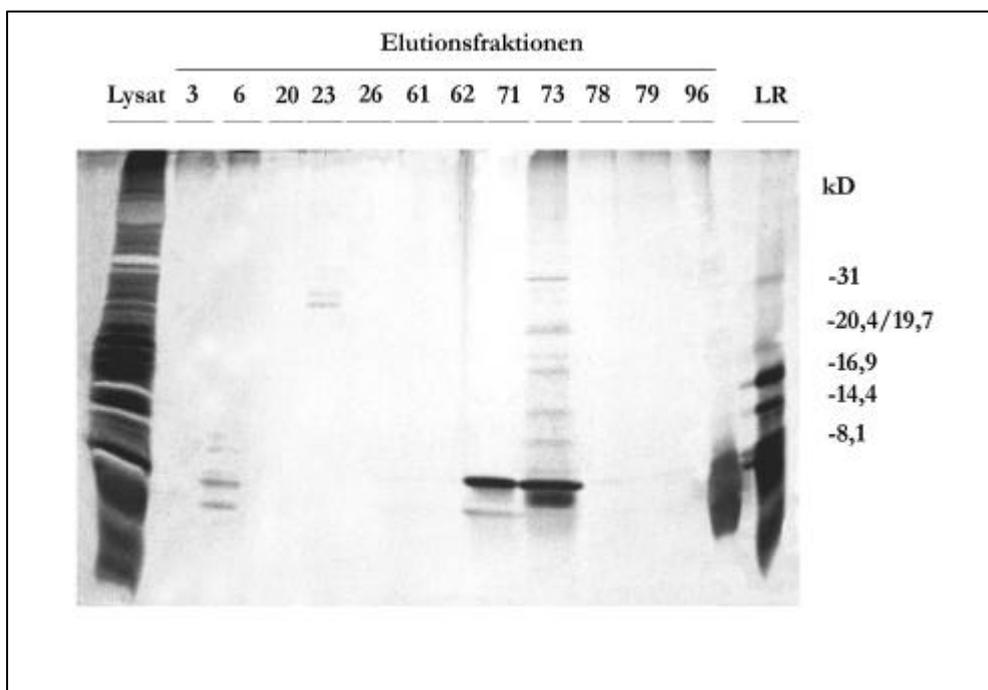


Abbildung 22: Silberfärbung der Elutionsfraktionen, 17,5%-SDS-PAGE

Im Chromatogramm zeigten sich fünf Anstiege der Absorption, der erste (20-26) enthielt, wie in der SDS-PAGE zu sehen, kaum Banden in Höhe von 8 kD (Gewicht von CGM1a_{cyt}). Der

zweite (61-62) hatte eine nur geringe Konzentration, die auf dem Gel nicht detektierbar war. Der dritte Anstieg (71-73) enthielt zytoplasmatische Domäne, es fanden sich aber darüber noch weitere verunreinigende Banden, der vierte enthielt wiederum nur geringe Konzentrationen und im fünften (96) zeigte sich nochmals CGM1a_{cyt}.

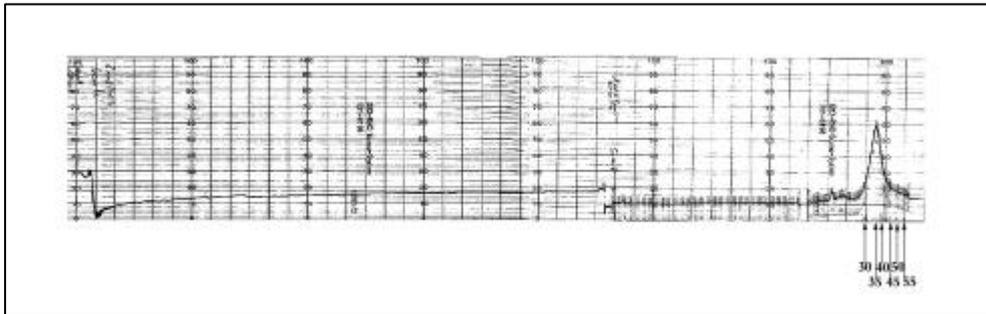


Abbildung 23: Chromatogramm der Imidazol Elution, Säulenmaterial: Ni-NTA

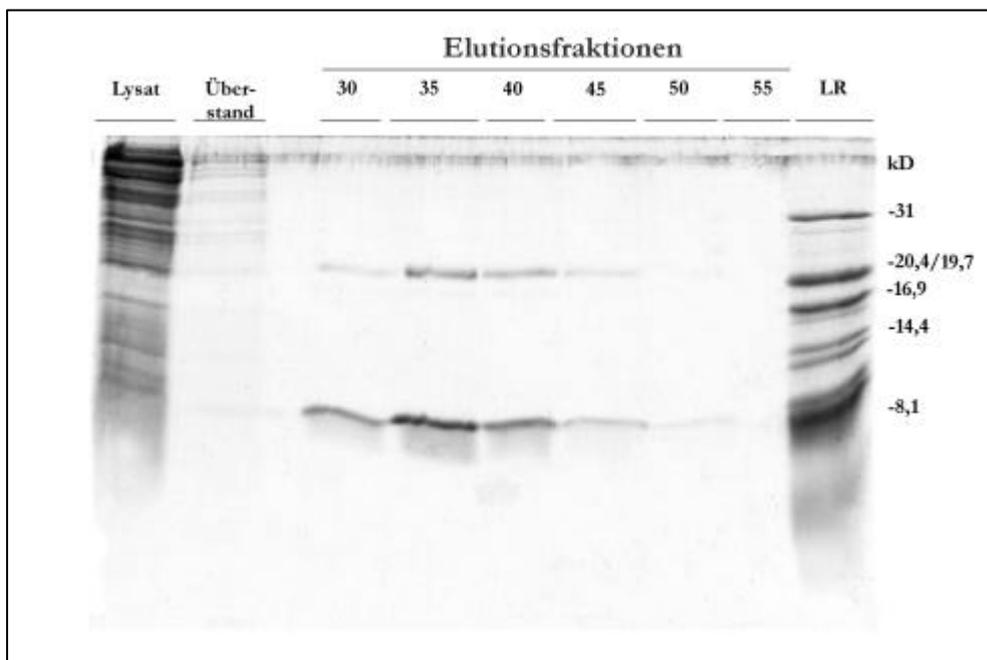


Abbildung 24: Silberfärbung der Elutionsfraktionen, 17,5%-SDS-PAGE

Bei der Verwendung von Ni-NTA zeigte sich ein einzelner starker Konzentrationsanstieg im Chromatogramm (30-55), der in der SDS-PAGE deutliche Banden in Höhe von 8 kD liefert. Es fanden sich aber in Höhe von etwa 20 kD verunreinigende Banden.

DENATURIERENDE ELUTION MIT HARNSTOFF

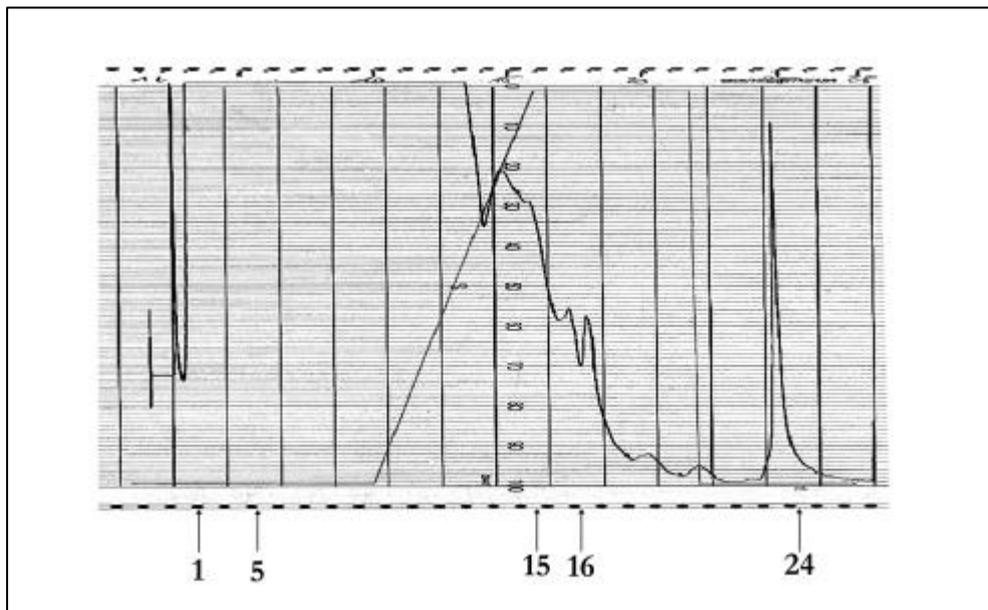


Abbildung 25: : Chromatogramm der Harnstoff-Elution, Säulenmaterial: EMD

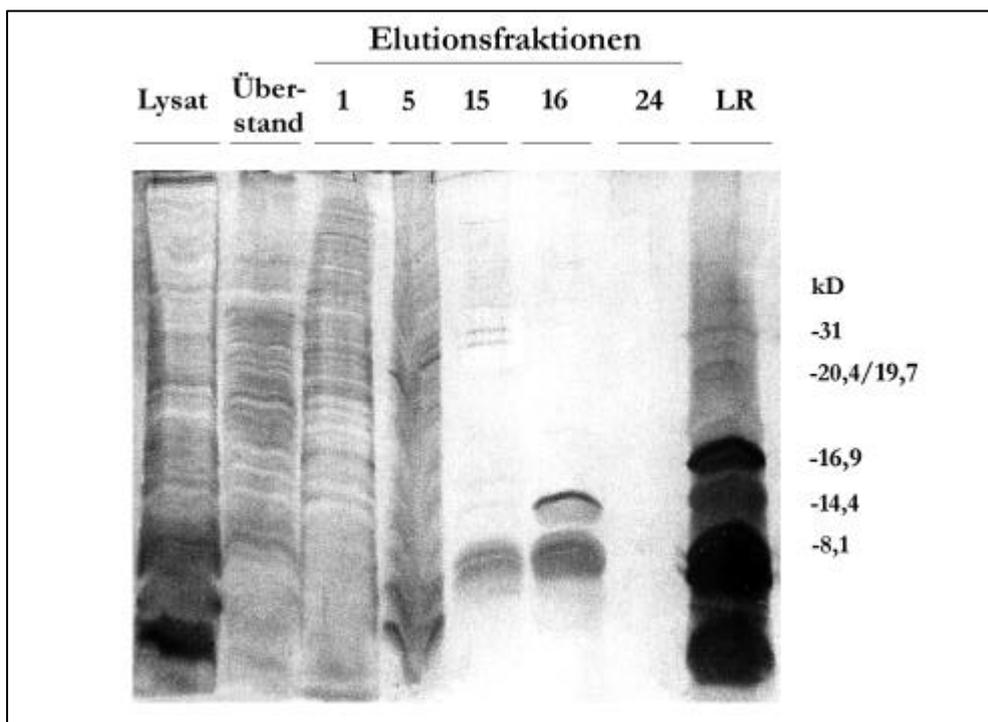


Abbildung 26: Silberfärbung der Elutionsfraktionen, 17,5%-SDS-PAGE

Bei der Elution mit Harnstoff und Verwendung von EMD zeigten sich im Chromatogramm drei größere Konzentrationsanstiege. In der SDS-PAGE fand sich in dem ersten Anstieg (15) CGM1a_{cyt}. Es fanden sich aber darüber noch verunreinigende Banden in geringer Konzentration. Der zweite Anstieg (16) enthielt ebenfalls CGM1a_{cyt}, aber in hoher Konzentration eine weitere Bande in Höhe von 14 kD.

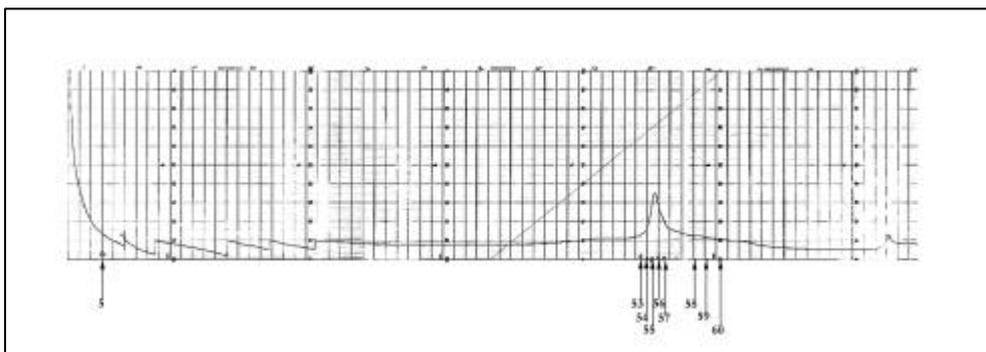


Abbildung 27: Chromatogramm der Harnstoff-Elution, Säulenmaterial: Ni-NTA

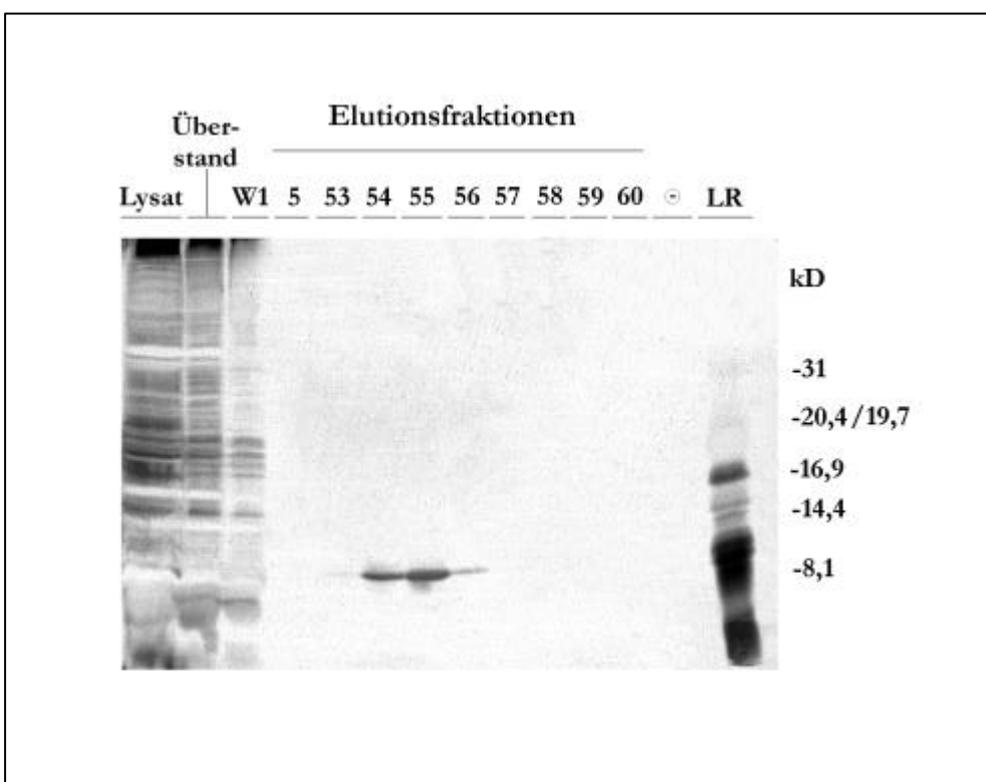


Abbildung 28: Silberfärbung der Elutionsfraktionen, 17,5%-SDS-PAGE

Bei der Elution mit Harnstoff und Verwendung von Ni-NTA fand sich im Chromatogramm ein breitbasiger Anstieg (53-60), der auf dem Gel CGM1a_{cyt} ohne weitere verunreinigende Proteine enthielt. Allerdings war die Konzentration der zytoplasmatischen Domäne relativ gering.

ELUTION DURCH PH-GRADIENT

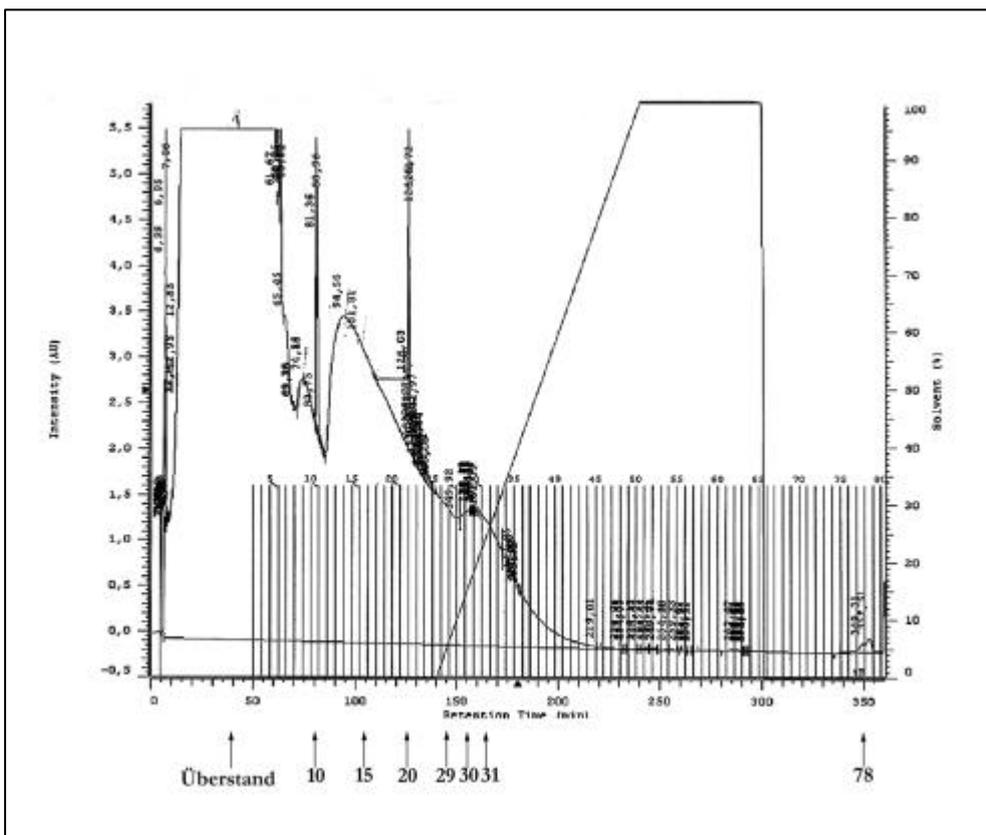


Abbildung 29: Chromatogramm der pH-Gradient-Elution, Säulenmaterial: EMD

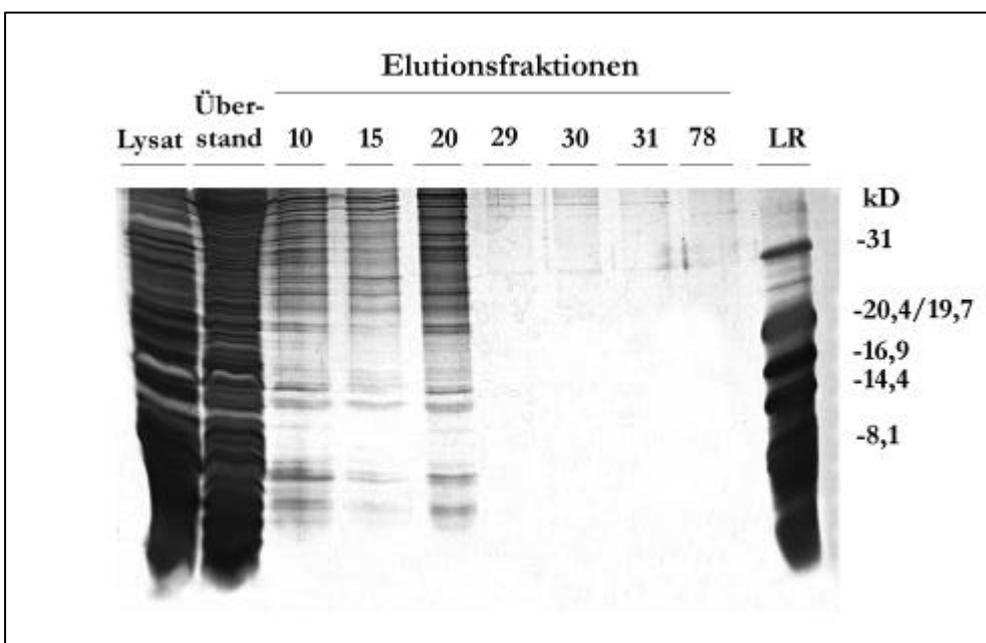


Abbildung 30: Silberfärbung der Elutionsfraktionen 17,5%-SDS-PAGE

Das Chromatogramm der Elution mit einem pH-Gradienten unter Verwendung von EMD zeigte zwei Anstiege. Den ersten noch vor Beginn des Gradienten (10-20) und den zweiten direkt nach Beginn der Elution (29-31). In der SDS-PAGE ließ sich in beiden Anstiegen keine Aufreinigung der Domäne erkennen.

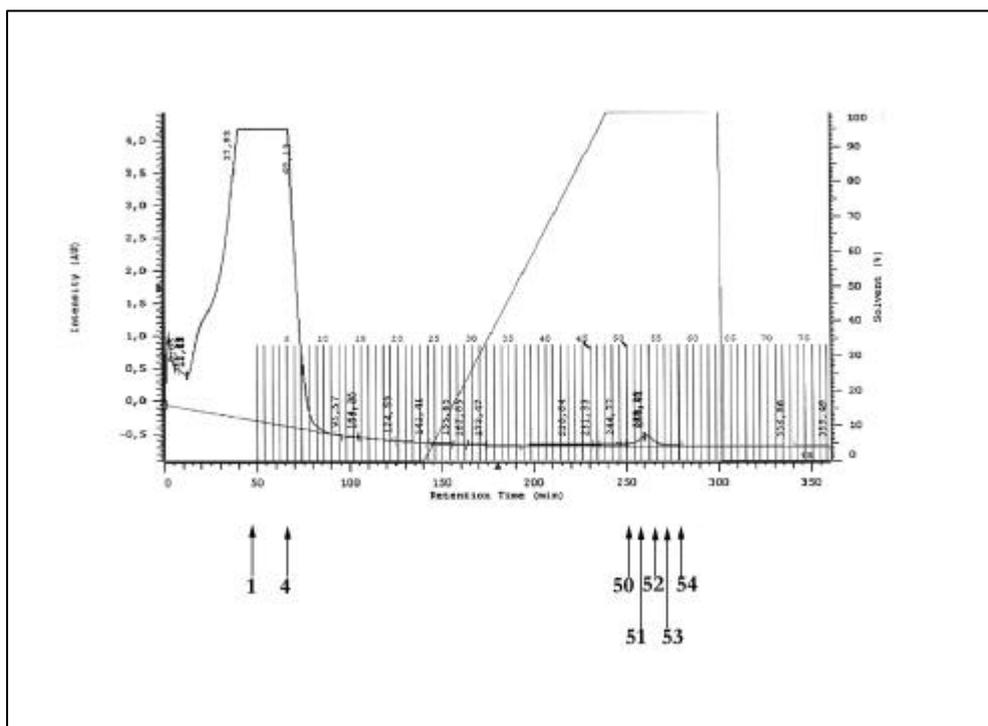


Abbildung 31: Chromatogramm der pH-Gradient-Elution, Säulenmaterial: Ni-NTA

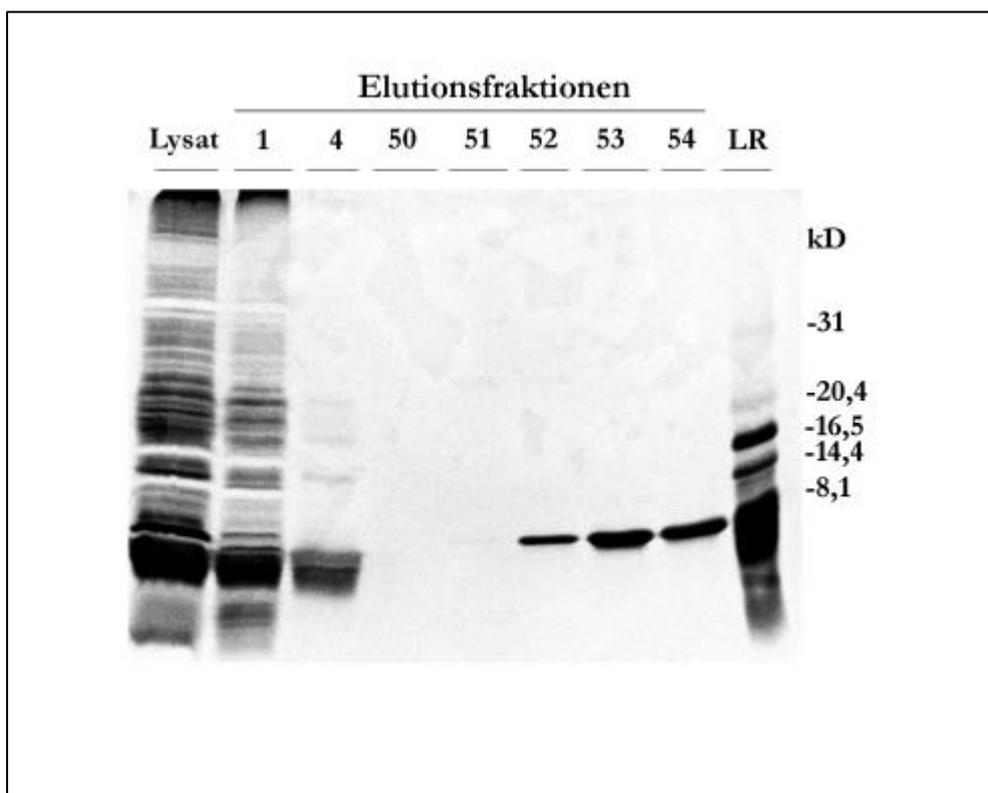


Abbildung 32: Silberfärbung der Elutionsfraktionen 17,5%-SDS-PAGE

Bei der Verwendung von Ni-NTA und einer Elution über einen pH-Gradienten fand sich im Chromatogramm ein nur sehr kleiner Anstieg, der aber in der SDS-PAGE nur eine einzelne Bande in der Höhe der zytoplasmatischen Domäne lieferte.

Nach Optimierung der Elution konnte dann das in Abbildung 33 gezeigte Ergebnis erzielt werden.

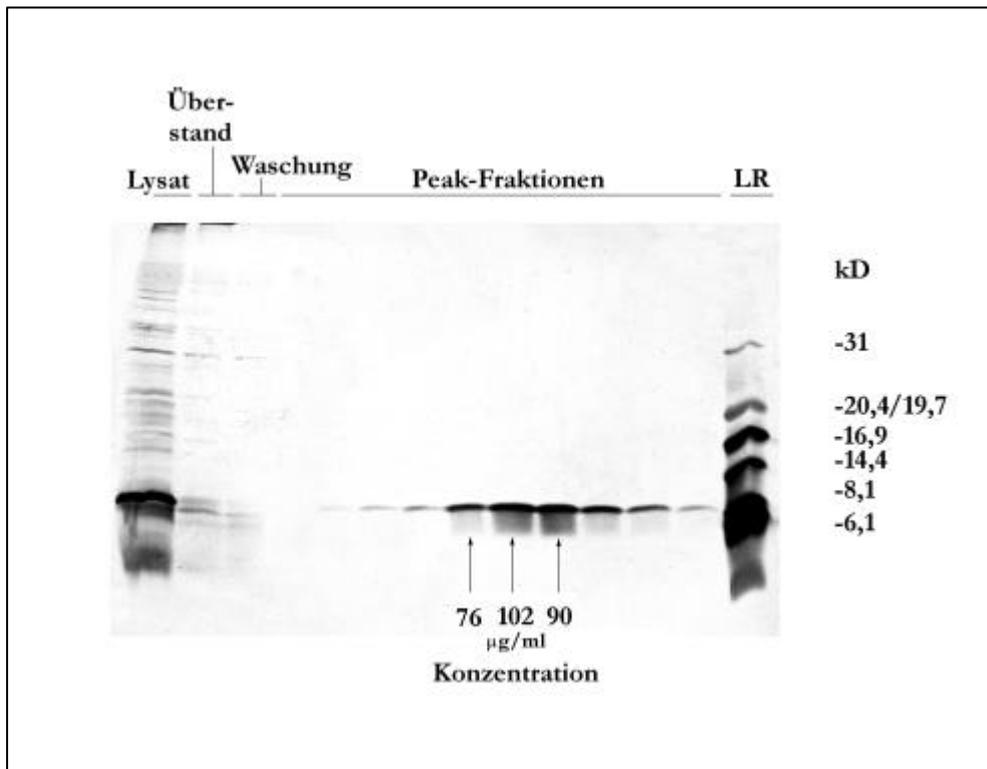


Abbildung 33: Ergebnis der Aufreinigung (Silberfärbung der Elutionsfraktionen, 17,5%-SDS-PAGE)

Es fand sich in der SDS-PAGE eine einzelne Bande in den Peak-Fractionen in Höhe von 8 kD ohne weitere verunreinigende Proteine. Die Höhe der Bande deckt sich mit dem zuvor errechneten Gewicht.

Die Konzentrationsbestimmung nach Bradford ergab in den Peak-Fractionen Konzentrationen von bis zu 100 µg / ml. Die dabei erreichte Reinheit ließ sich anhand der SDS-PAGE auf über 95 % schätzen.

HERSTELLUNG EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS GEGEN CGM1A_{CYT}

Die Herstellung wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec realisiert. Dafür waren zunächst 1500 µg aufgereinigte (über 95 % Reinheit) zytoplasmatische Domäne notwendig. Dann gliederte sich die Herstellung in vier Phasen:

1. Die Immunisierung
2. Die Fusion
3. Das Screening und die Aufzucht von Hybridomazellen
4. Das Klonieren und die Subtypenbestimmung

IMMUNISIERUNG

Es wurden vier Mäuse nach dem Schema (Tabelle 19, s. S. 59) immunisiert. Dabei wurden 100 µl Antigen (CGM1a_{cyt}) und 100 µl Freund's Adjuvans intraperitoneal gespritzt, anschließend wurde am Tag 0, 14, 35 und 56 Blut aus dem Schwanz entnommen, wobei etwa 25 µl Serum pro Abnahme gewonnen wurden.

Anhand dieses Blutes wurde die Immunisierung der vier Mäuse mittels ELISA überprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 23 angegeben.

Tabelle 23: ELISA-Ergebnisse der Kontrolle der Immunisierung (OD_{450})

		Verdünnungen						
		Maus	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/32000
Tag 0	BL	34	58	38	38	39	47	
	TJ	40	52	40	40	40	48	
	DJ	40	49	39	41	38	45	
	CJ	41	44	39	40	38	42	
Tag 14	BL	87	61	56	48	47	45	
	TJ	68	56	45	40	41	41	
	DJ	40	40	38	37	37	38	
	CJ	147	108	79	56	47	45	
Tag 35	BL	437	341	251	179	123	92	
	TJ	354	287	210	149	104	75	
	DJ	255	194	128	88	68	54	
	CJ	390	320	243	186	133	98	
Tag 56	BL	488	470	447	366	260	208	
	TJ	461	423	371	326	240	181	
	DJ	408	310	248	186	126	85	
	CJ	446	439	380	332	246	171	

Den Daten war zu entnehmen, daß die Maus „BL“ die besten Resultate brachte.

Die Fusion erfolgte dann mit Milzzellen der Maus „BL“ mit Myelomzellen (SP20Ag14), die entsprechenden Hybridomazellen wurden in Kultur genommen, vermehrt und auf ihre Bindungsfähigkeit hin untersucht.

SCREENING UND VERMEHRUNG DER HYBRIDOMAZELLEN

Es wurden zwei Klonierungen vorgenommen. Die Untersuchung der ausgewählten Klone ergab im ELISA hinreichend gute Bindungen an CGM1a_{cyt}. Die Tabelle 24 gibt die Ergebnisse der ersten Klonierung wieder. 4H1 und 5H5 zeigten dabei im ELISA die besten Resultate.

Tabelle 24: Repräsentative ELISA-Ergebnisse der ersten Klonierung

Klon	1A1	2D2	4G8	4H1	5H5	1B6	3D4	6F8	Blank
OD ₄₅₀	0,069	0,148	0,170	0,259	0,210	0,155	0,252	0,363	0,064

Nach diesen Ergebnissen wurde die zweite Klonierung vorgenommen, die Tabelle 25 zeigt die ELISA-Ergebnisse.

Tabelle 25: Repräsentative ELISA-Ergebnisse der zweiten Klonierung

Klon	9F5	TS1	11E9	G8G1	TS2
OD ₄₅₀	0,135	0,191	0,111	0,187	0,192

Hier finden sich zwei weitere Klone mit relativ guten Bindungen an die zytoplasmatische Domäne, TS1 und TS2. Im Western-Blot (Abbildung 34) erwiesen sich dabei einzig TS1, TS2 und am stärksten 4H1 als fähig, die zytoplasmatische Domäne von CGM1a zu binden. Der Klon 4H1 war leider ein schlechter Produzent, somit wurde TS1 für die weitere Subklonierung verwendet.

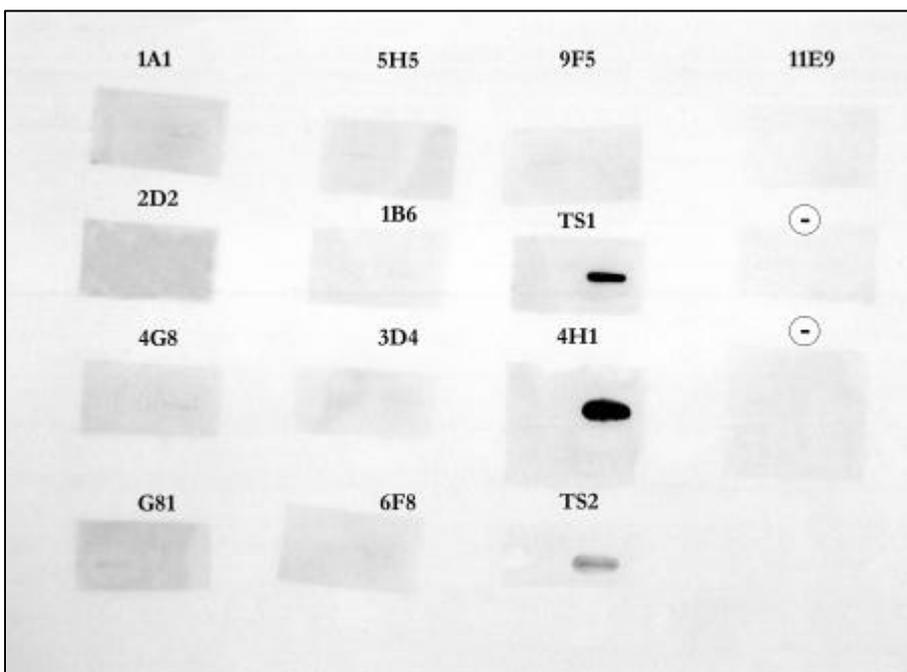


Abbildung 34: Detektion von CGM1a_{cyt} im Slot-Blot mit TS1 und anschließender Chemilumineszenzreaktion

KLONIERUNG UND SUBTYPENBESTIMMUNG

Der oben beschriebene Klon TS1 wurde subkloniert und die beiden Subklone TS1a und TS1b ebenfalls getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 zusammengefaßt.

Tabelle 26: ELISA-Ergebnisse der Subklone

		OD ₄₅₀ (19.12.1997)	OD ₄₅₀ (7.01.1998)
Klon	TS1	0,168	0,169
Subklon	TS1a	0,139	0,110
Subklon	TS1b	0,107	0,119
Kontrolle		0,048	0,038

Die Untersuchung auf die Art des exprimierten Antikörpers ergab für die beiden Subklone, daß sie Moleküle des Typs IgG_{1,K} produzieren.

NACHWEIS VON CGM1A IN GRANULOZYTEN MIT MAB TS1

Ergänzend zu den oben beschriebenen Untersuchungen des Expressionsmusters von CGM1a wurde nun Granulozytenextrakt direkt auf die Expression von CGM1a untersucht. Dazu wurden die Granulozyten wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet und anschließend mit SDS-PAGE aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurde die rekombinant hergestellte zytoplasmatische Domäne verwendet. Bei der Negativkontrolle (-) fehlte der erste Antikörper. Die SDS-PAGE und der folgende Blot ergaben das in Abbildung 35 (s. S. 79) gezeigte Bild. Der untere Pfeil in Höhe von 8 kD zeigt auf CGM1a_{cyt}, das hier als Positivkontrolle diente und ein deutliches Signal lieferte. Der obere Pfeil zeigt in der Reihe, in der das Granulozytenextrakt aufgetragen wurde, auf eine etwas schwächere Bande. Das Signal befindet sich in der Höhe von etwa 30 kD.

In Granulozytenextrakten wurde mit dem Antikörper nur eine einzige Bande detektiert (Auftrennungsbereich siehe Gel auf Abbildung 35, S.79).

Die Negativkontrolle ohne spezifischen Antikörper zeigt keine Signale.

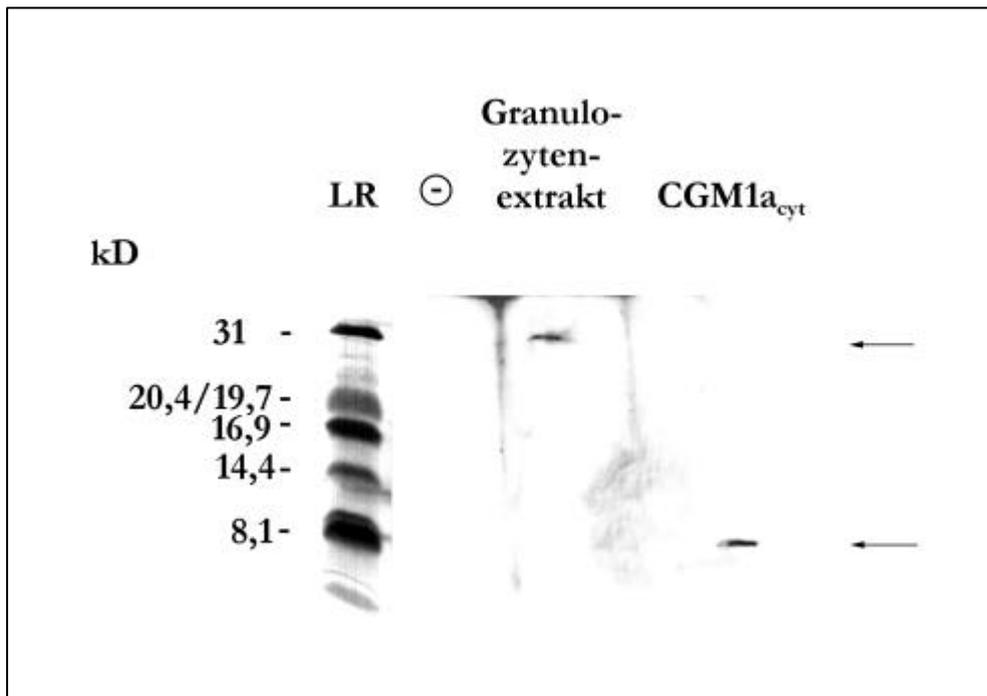


Abbildung 35: Detektion mit TS1 und anschließender Chemilumineszenz (Abkürzungen: LR: Low-Range-Marker, (-): Negativkontrolle)

Die Bande aus dem Granulozytenextrakt liegt damit in der Höhe, die dem erwarteten Gewicht des kompletten CGM1a-Moleküls entspricht.

FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN DER ZYTOPLASMATISCHEN DOMÄNE

IN VITRO PHOSPHORYLIERUNG DER TYROSIN-RESTE

Die Phosphorylierung wurde unter den im Methodenteil angegebenen Bedingungen ausgeführt. Die Auswertung des radioaktiven Assays zeigte, daß Aktivitäten an die zytoplasmatische Domäne gebunden wurden und sich dabei Laufunterschiede bei der SDS-PAGE-Analytik ergaben. Zum anderen gelang in dem kalten Assay (Verwendung von nicht-radioaktivem ATP) entsprechend der Nachweis mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosin-Reste.

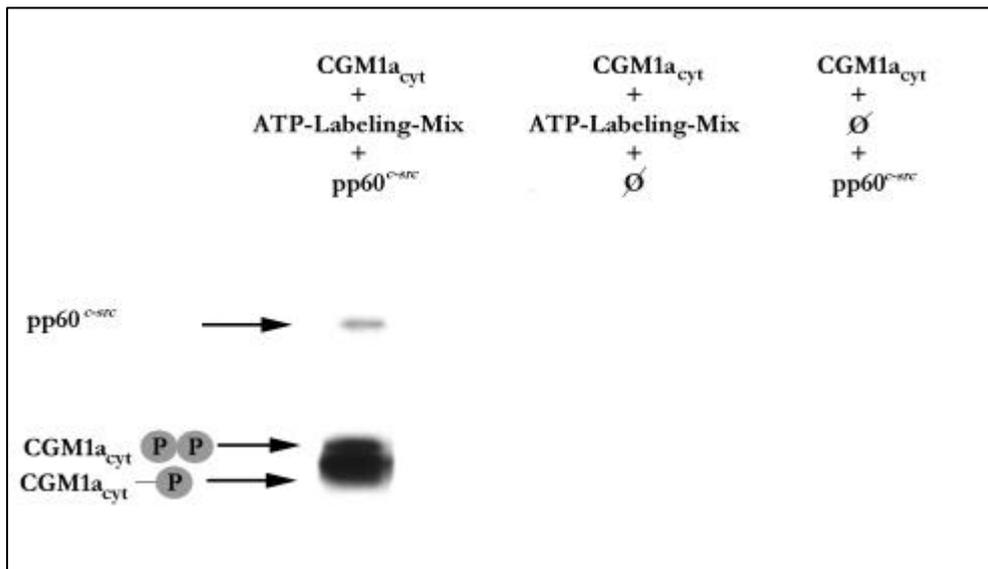


Abbildung 36: 17,5%-SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie

Die Abbildung 36 zeigt die Ergebnisse des radioaktiven Assays. Deutlich sieht man hier die Schwärzung des Filmes in Höhe der zytoplasmatischen Domäne.

Die entsprechenden Kontrollen ohne ATP bzw. ohne Src-Kinase lieferten keine Signale. Die obere starke Schwärzung bei etwa 60 kD entspricht der Kinase, die unter den Versuchsbedingungen eine Autophosphorylierung erfuhr.

Um zu zeigen, daß es sich nicht nur um unspezifisch an die Domäne angelagerte Aktivitäten handelte, wurde der Nachweis mit einem spezifischen Antikörper gegen Phosphotyrosin-Reste (PY-20) ebenfalls geführt.

Gleichzeitig wurde mit diesem Antikörper der Nachweis überprüft, ob es sich tatsächlich um eine Tyrosin-Phosphorylierung handelte.

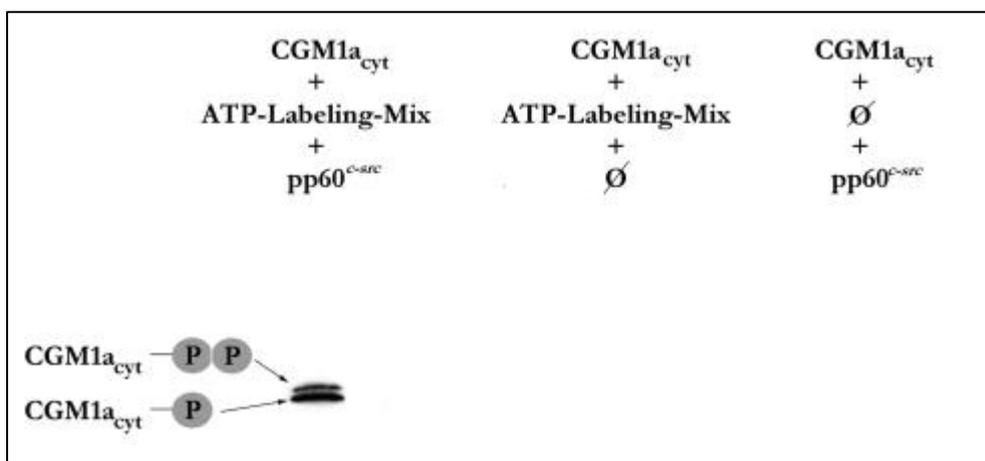


Abbildung 37: 17,5%-SDS-PAGE mit anschließendem Blot und immunchemischer Färbung (DAB) mit Ab PY-20 (anti-Phosphotyrosin-Antikörper)

Die Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE mit anschließendem Blot und der Detektion mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY-20. Hier konnte man die Auftrennung des Signals in zwei einzelne Banden sehen, was zu der Vermutung führte, daß es sich hier um die einfach- und zweifach-phosphorylierte Domäne handelte. Die angelagerte Aktivität wurde damit als Tyrosin-Phosphorylierung nachgewiesen. Die Kontrollen ohne Src-Kinase bzw. ATP waren wiederum negativ.

Kinetik der Src-Kinase

Die Untersuchung der Kinetik der Src-Kinase mit CGM1a_{cyt} als Substrat war aufgebaut als Assay, bei dem nach verschiedenen Zeiten Proben aus dem Reaktionsansatz entnommen wurden. Es wurde wiederum mit kaltem ATP gearbeitet, und der Nachweis erfolgte nach SDS-PAGE und Blot auf Nitrocellulose mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY-20. Zusätzlich wurde ein zweites Gel mit den gleichen Proben beladen und mit Silber gefärbt (Abbildung 38).

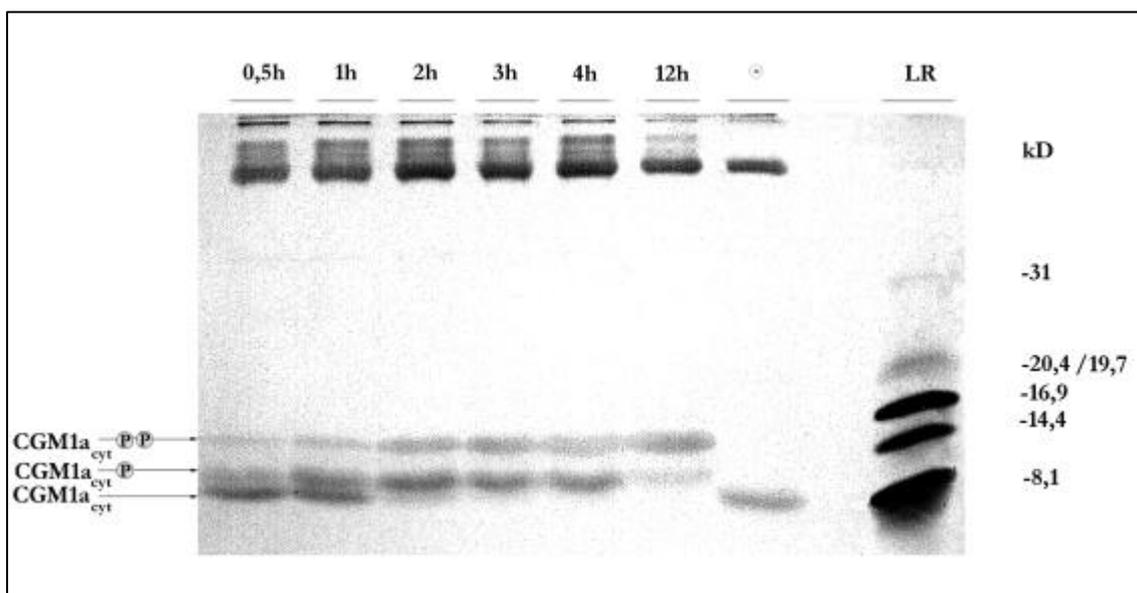


Abbildung 38: Kinetik der Src-Kinase: 17,5% SDS-PAGE mit Silberfärbung (Abkürzungen: LR: Low-Range-Standard, (-): Negativkontrolle)

Hier sind drei Banden zu erkennen, wobei sich deutliche Verschiebungen in der Intensität der Banden mit zunehmender Zeit ergeben.

Die unterste Bande (Pfeil CGM1a_{cyt}) läuft auf der Höhe der zytoplasmatischen Domäne. Sie ist nach 3 h nur noch andeutungsweise und nach 12 h gar nicht mehr zu erkennen.

Die Intensität der mittleren Bande (Pfeil CGM1a_{cyt}-P) nimmt ebenfalls ab, ist nach 12 h aber noch zu erkennen.

Gleichzeitig kann man eine Intensitätszunahme der oberen Bande (Pfeil $\text{CGM1a}_{\text{cyt}}\text{-PP}$) erkennen.

Die Abbildung 39 zeigt die gleiche SDS-PAGE nun mit anschließendem Blot und immunchemischer Detektion (PY-20). Es zeigen sich Doppelbanden, wobei die Intensität der unteren Bande (Pfeil $\text{CGM1a}_{\text{cyt}}\text{-P}$) mit zunehmender Zeit zunächst zunimmt und dann nach 12 h wieder abnimmt. Die obere Bande (Pfeil $\text{CGM1a}_{\text{cyt}}\text{-PP}$) ist bei 0,5 h noch schwach ausgeprägt und zeigt mit zunehmender Zeit einen kontinuierlichen Intensitätszuwachs.

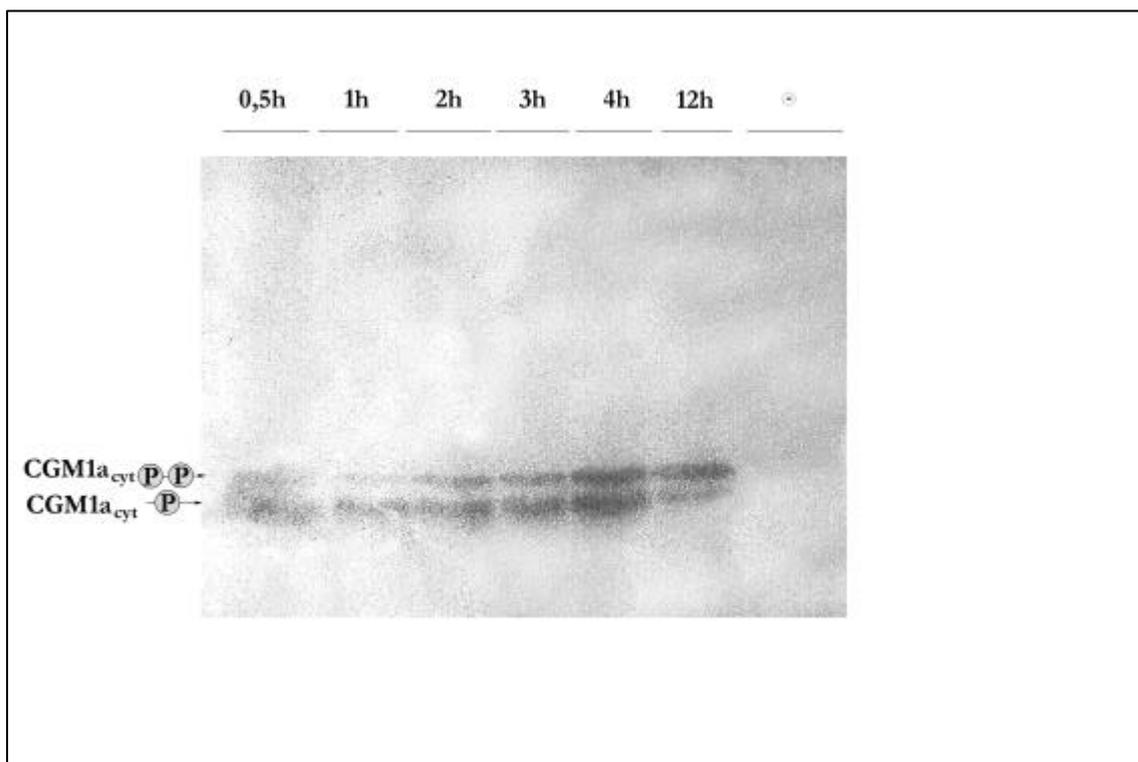


Abbildung 39: Kinetik der Src-Kinase: 17,5%-SDS-PAGE mit anschließendem Blot und immunchemischer Färbung (DAB)

Dieses Phänomen wurde als mit der Zeit zunehmende einfach-Phosphorylierung der zytosmatischen Domäne durch die Src-Kinase interpretiert. Zugleich erfolgte die Umsetzung der einfach-phosphorylierten Domäne durch die Src-Kinase hin zu der zweifach-phosphorylierten Form.

Die vollständige Umsetzung der zytosmatischen Domäne war unter den angegebenen Bedingungen bereits nach 3 h zu beobachten, bei der Fortsetzung des Experimentes über Nacht konnte man nach 12 h bereits eine quantitative Verschiebung hin zu der zweifach-phosphorylierten Form feststellen.

Als Kontrolle diente $\text{CGM1a}_{\text{cyt}}$ ohne Src-Kinase, das über die 12 h mitinkubiert wurde. In der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung zeigten sich die Laufdifferenzen zwischen den verschiedenen Zuständen der Domäne.

Die native Form läuft in Höhe von etwa 8 kD, die einfach-phosphorylierte Form findet sich in der Höhe von etwa 10 kD und die zweifach-phosphorylierte Form etwas oberhalb von 14 kD. Die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände führten zu Veränderungen im Laufverhalten.

Differentielle Phosphorylierung von CGM1a_{cyt} durch Tyrosin-Kinasen

Die differentielle Umsetzung durch verschiedene kommerziell erhältliche Kinasen wurde, um quantitative Unterschiede feststellen zu können, in einem Assay mit γ -³²P-ATP durchgeführt, die Proben mit SDS-PAGE aufgetrennt, und die einzelnen Banden am Phosphoimager ausgemessen.

Verwendet wurde eine Auswahl von Tyrosin-Kinasen: Src-Kinase (p60^{Src}), Lyn-Kinase (p56^{Lyn}), Lck-Kinase (p56^{Lck}) und Fyn-Kinase.

Diese wurden zunächst unter den für sie jeweils idealen Bedingungen eingesetzt und anschließend mit einem Universalpuffer, der den *in vivo* Voraussetzungen näherkommt, verglichen. Als Substrat diente in beiden Fällen die rekombinant hergestellte und aufgereinigte zytoplasmatische Domäne.

Die Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse für den Phosphorylierungsansatz unter Idealbedingungen.

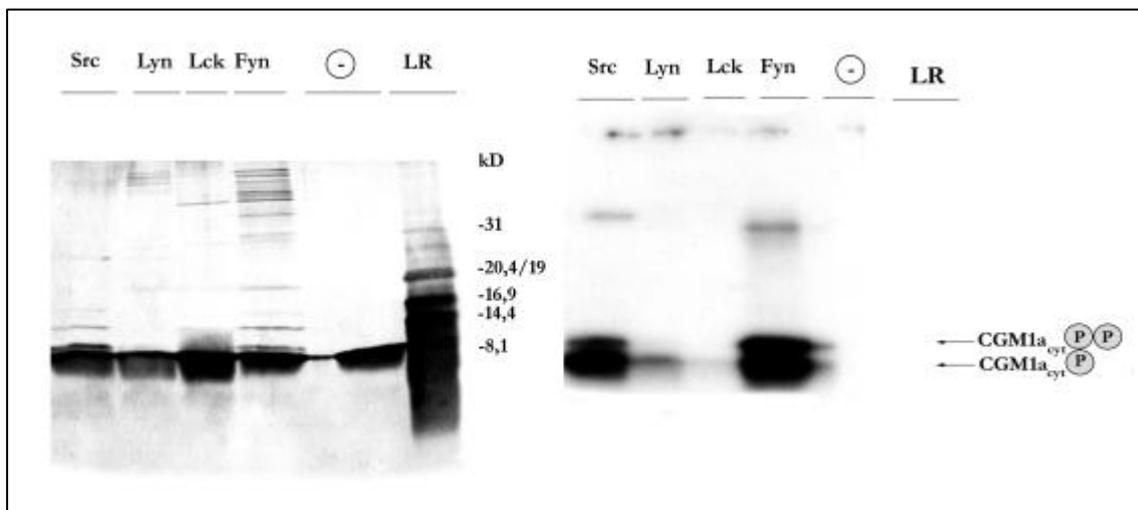


Abbildung 40: Links: 17,5%-SDS-PAGE mit Silberfärbung, Rechts: Autoradiographie der Phosphorylierung unter Idealbedingungen für jede Kinase

Der linke Teil der Abbildung 40 entspricht der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung, und der rechte Teil zeigt die zugehörige Autoradiographie.

Auf der Autoradiographie kann man bei der Src-Kinase wieder die Doppelbanden erkennen (die untere Bande entspricht Pfeil CGM1a_{cyt}-P und die obere Bande dem Pfeil CGM1a_{cyt}-PP),

das gleiche Bild ergibt sich für die Fyn-Kinase, bei der Lyn-Kinase ist die obere Bande nur noch andeutungsweise und bei der Lck-Kinase nicht zu erkennen.

Die Aktivität der Banden wurde dann am Phosphoimager direkt quantifiziert.

Die Abbildung 41 zeigt die Ergebnisse der Messungen.

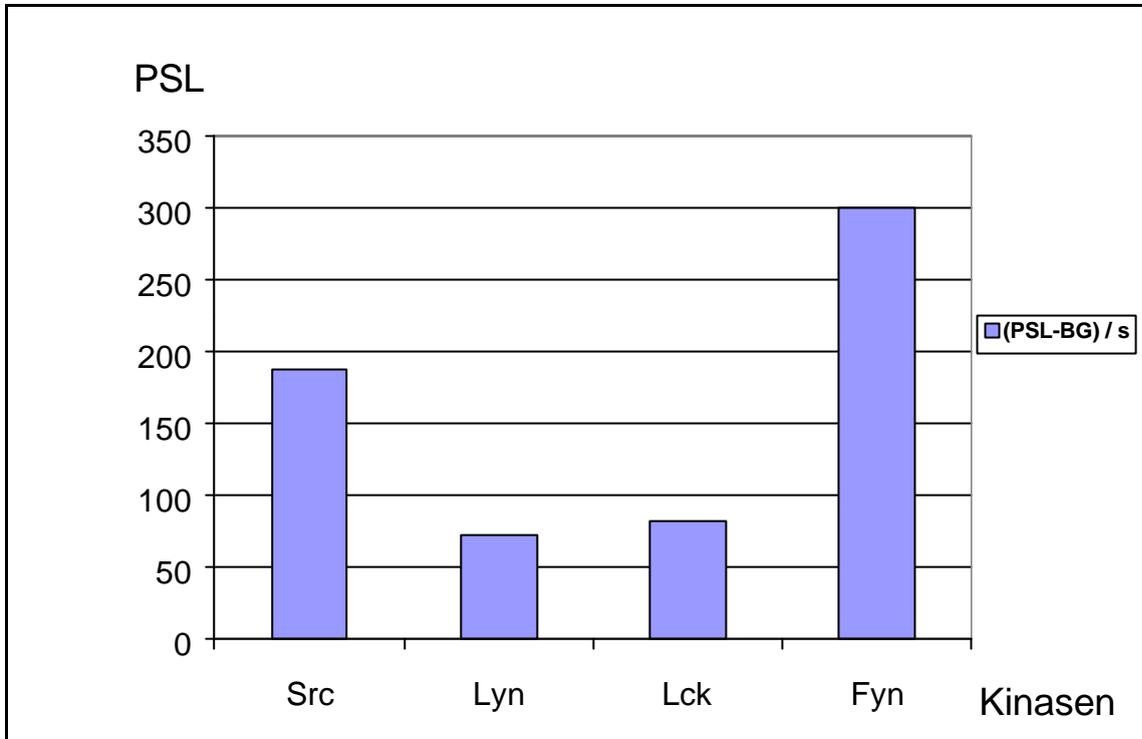


Abbildung 41: Quantifizierung der Banden aus Abbildung 40 am Phosphoimager (Abkürzungen: PSL: Photo Stimulated Luminescence, BG: Background)

Die Banden wurden gegeneinander ausgemessen, indem die „Photo Stimulated Luminescence“ (PSL) pro Zeiteinheit bestimmt wurde. Der Hintergrund (Background, BG) wurde vorher abgezogen.

Dabei zeigte die Fyn-Kinase mit 300 PSL / s in Bezug auf die eingebaute Aktivität die höchsten Werte, gefolgt von der Src-Kinase (188 PSL / s) und dann mit deutlich geringeren Werten die Lck - (82 PSL / s) und Lyn-Kinase (72 PSL / s).

Bei Verwendung eines Universalpuffers und ansonsten identischen Versuchsbedingungen ergab sich ein ähnliches Bild.

Links in der Abbildung 42 ist das silbergefärbte Gel, das anschließend autoradiographiert (rechter Teil der Abbildung) wurde.

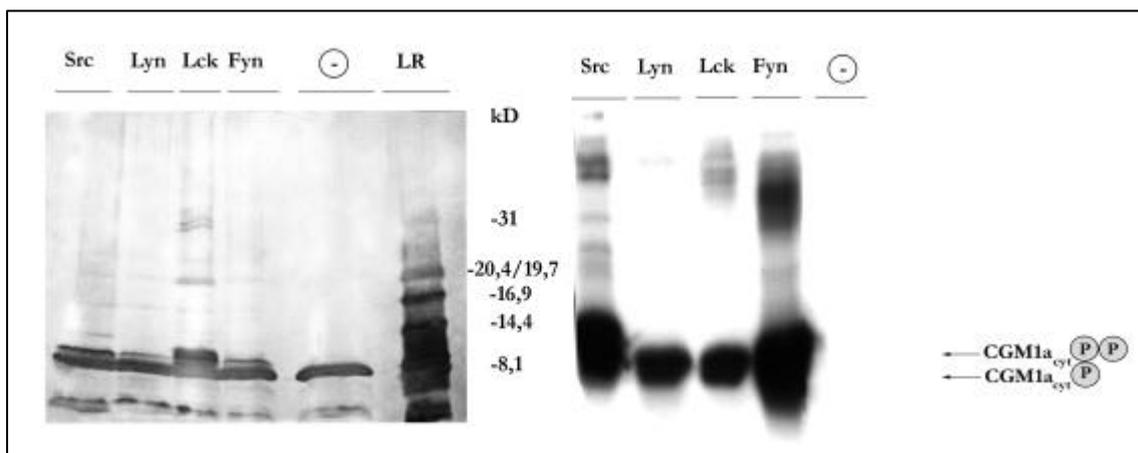


Abbildung 42: Links: 17,5%-SDS-PAGE mit Silberfärbung. Rechts: Autoradiographie der Phosphorylierung mit einem Universalpuffer

In dem silbergefärbten Gel findet sich oberhalb der starken Bande in Höhe von 8 kD (die der zytoplasmatischen Domäne entspricht) die aus den Vorexperimenten bekannte Doppelbandenstruktur. In der zugehörigen Autoradiographie sieht man die unterschiedliche Intensität der Signale. Die Fyn-Kinase lieferte die stärksten Signale, gefolgt von der Src-Kinase und etwa gleich stark die Signale von der Lyn- und Lck-Kinase. Die Abbildung 43 zeigt die Ergebnisse der korrespondierenden Messung am Phosphoimager.

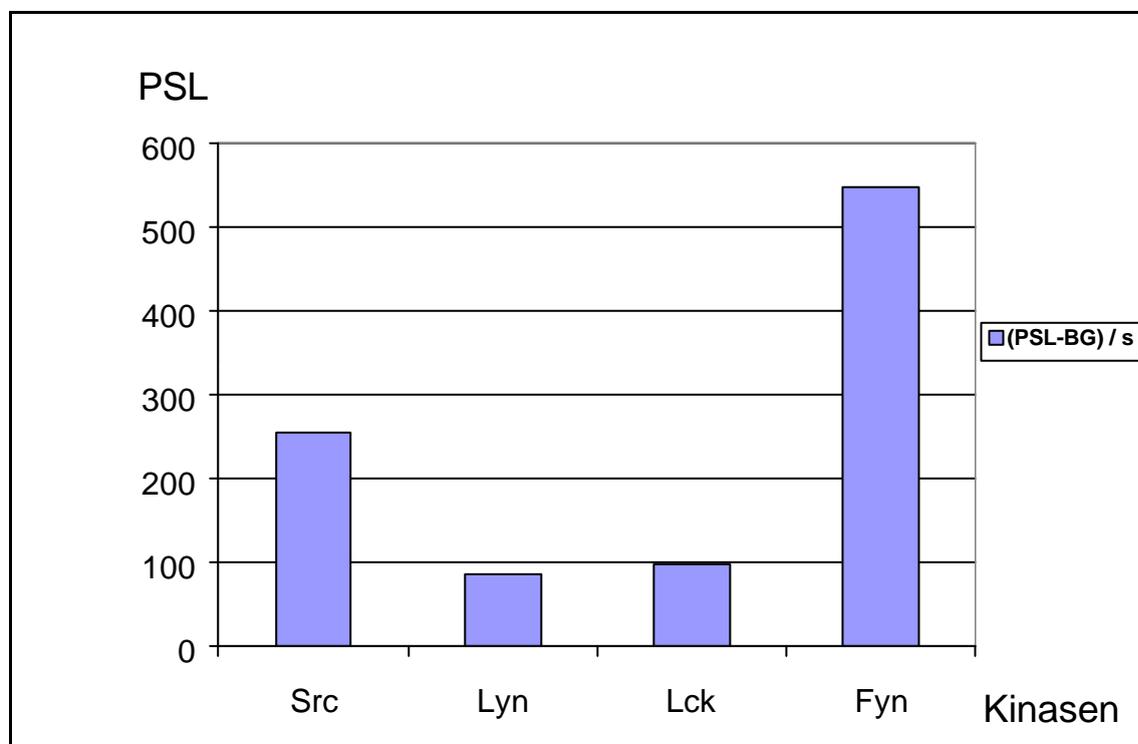


Abbildung 43: Quantifizierung der Banden aus Abbildung 42 am Phosphoimager (Abkürzungen: PSL: Photo Stimulated Luminescence, BG: Background)

Hier zeigte sich nun deutlich die differentielle Phosphorylierung. Die eingebauten Aktivitäten lieferten die stärksten Signale bei der Phosphorylierung durch die Fyn-Kinase (548 PSL /s), dann folgte die Src-Kinase (254 PSL /s) und wiederum die schwächsten Signale lieferten die Lck- und Lyn-Kinase mit 97 und 87 PSL /s.

IN VITRO PHOSPHORYLIERUNG DER SERIN-/ THREONIN-RESTE

Es wurden drei kommerziell erhältliche Vertreter dieser Kinasenfamilie, die Protein-Kinase C sowie die Casein-Kinasen I und II, verwendet. Als Substrat diente wie in den vorangegangenen Experimenten die aufgereinigte zytoplasmatische Domäne.

Als Kontrolle diente zum einen ein Negativansatz ohne Kinase, zum anderen wurde zunächst die Autophosphorylierung der Kinasen überprüft.

Zur Autophosphorylierung wurden die Kinasen ohne Zusatz eines Substrates mit γ -³²P-ATP inkubiert, die Proben mit SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert.

Die Abbildung 44 zeigt die Ergebnisse. Die Pfeile kennzeichnen die Laufhöhe der einzelnen Signale der Kinasen.

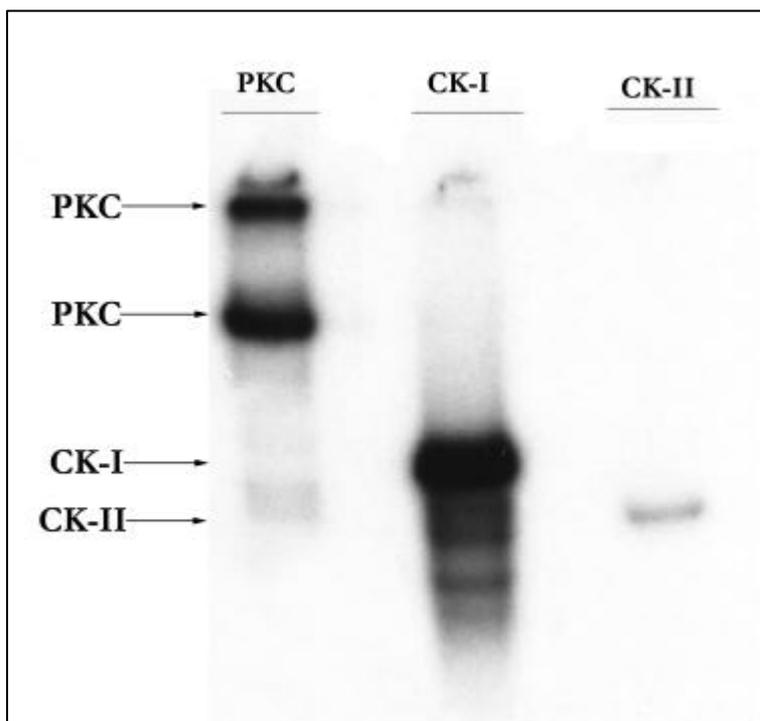


Abbildung 44: Kontrolle der Autophosphorylierung der Ser-/ Thr-Kinasen (17,5%-SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie)

Es zeigt sich in jeder Lane das Eigensignal der Kinasen, das sich bei Inkubation mit γ -³²P-ATP ergab. Bei der Protein-Kinase C finden sich zwei Banden und bei der Casein-Kinase I und II finden sich jeweils eine einzelne Bande (siehe Pfeile).

Mit $CGM1a_{cyt}$ als Substrat ergab sich dann folgende Veränderung des ansonsten identisch aufgebauten Versuchs.

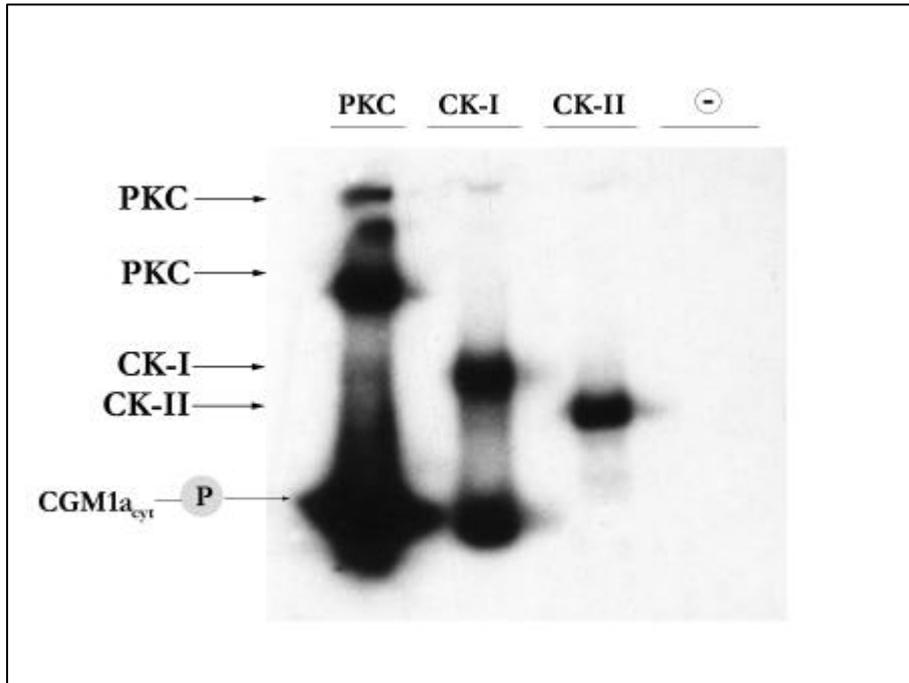


Abbildung 45: Phosphorylierung von $CGM1a_{cyt}$ mit Ser-/Thr-Kinasen (17,5%-SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie)

In der Abbildung 45 sieht man ein Signal oberhalb von 8 kD, das als Ser-/Thr-phosphoryliertes $CGM1a_{cyt}$ interpretiert wurde (unterer Pfeil), ansonsten sind analog zu der vorangegangenen Kontrolle (Abbildung 44) die Eigensignale der autophosphorylierten Kinasen zu erkennen.

Der Negativansatz sowie die Kontrolle der Autophosphorylierung zeigten die Bande oberhalb von 8 kD nicht.

Des weiteren konnte man einen Unterschied in dem Grad der Phosphorylierung erkennen: Die PKC lieferte das stärkste Signal, die CK-I konnte ebenfalls Aktivitäten an die Domäne binden, bei der CK-II war hingegen kein Signal detektierbar.

AUFREINIGUNG VON TYROSIN-PHOSPHORYLIERTEM $CGM1a_{cyt}$

Für weitere Untersuchungen der phosphorylierten Domäne war es notwendig, die phosphorylierte von der unphosphorylierten Form zu trennen. Dies geschah durch eine Immunoaffinitätschromatographie. Die zunächst mit Src-Kinase und $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ -phosphorylierte Domäne wurde an eine PY-20 Säule gekoppelt und anschließend eluiert. Die Eluate wurden dann am Szintillationsmessgerät ausgemessen, dabei ergab sich das in Abbildung 46 dargestellte Chromatogramm.

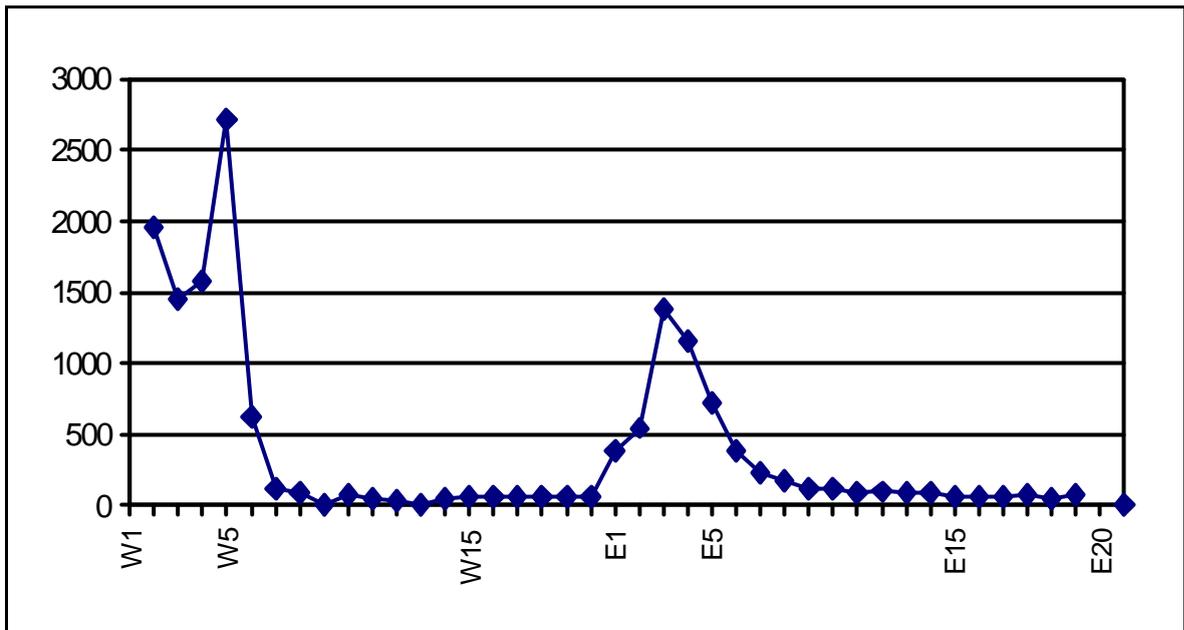


Abbildung 46: Chromatogramm der PY-20-Säule

Zunächst wusch sich noch ein ganzer Teil an Aktivität aus der Säule heraus, dann sank die Aktivität in den Waschfraktionen fast bis auf die Hintergrundstrahlung ab und lieferte in den Elutionsfraktionen einen deutlichen Anstieg der Aktivität.

Die Proben wurden anschließend mit SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert (hier nicht gezeigt).

Dabei war zu erkennen, daß im Durchlauf noch ein Anteil an ungebundener phosphorylierter Domäne Signale lieferte, allerdings konnte man bei etwa 60 kD die ebenfalls phosphorylierte Src-Kinase erkennen.

Sie reinigte sich über dieses System mit auf und wurde in einem zweiten Reinigungsschritt über Ni-NTA Spin Columns, der bei den weiteren Untersuchungen vorgeschaltet war, abgetrennt.

ISOLIERUNG ASSOZIIERTER PROTEINE

Im ersten Ansatz wurde CGM1a_{cyt} sowohl phosphoryliert als auch nativ direkt über Nacht entsprechend dem Methodenteil mit Granulozytenextrakt inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Komplexe mit Ni-NTA präzipitiert. Die Abbildung 47 zeigt den Versuchsaufbau.

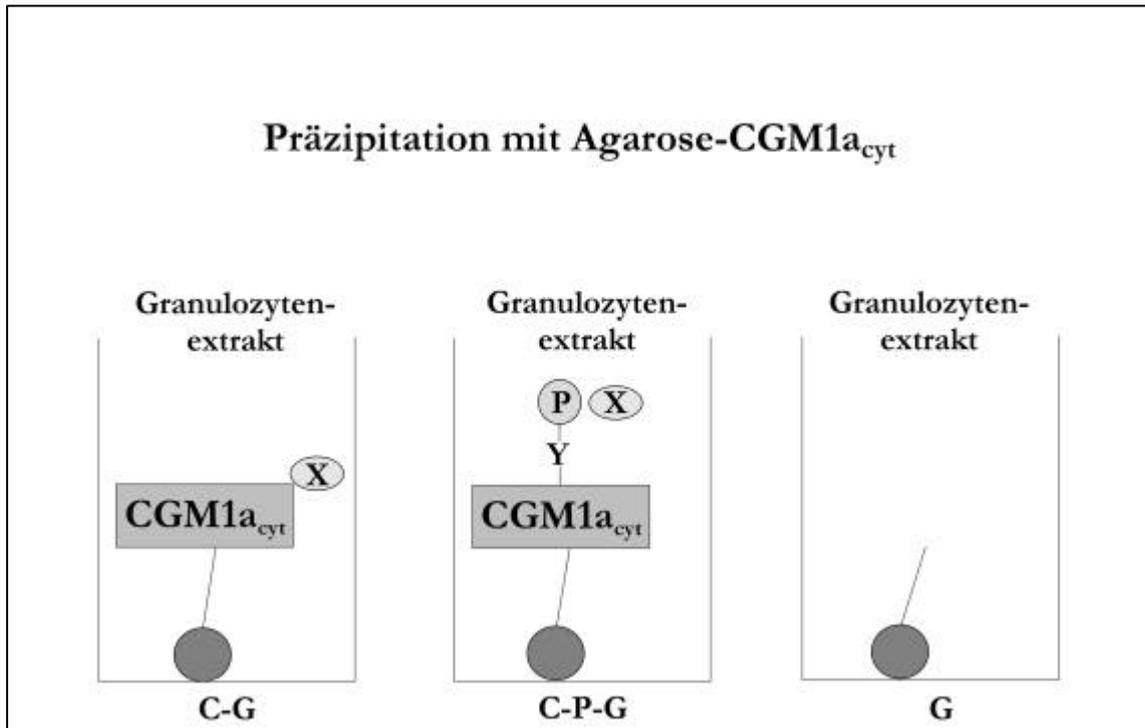


Abbildung 47: Versuchsaufbau zur Präzipitation (Abkürzungen: C-G: $CGM1a_{cyt}$ und Granulozytenextrakt, C-P-G: $CGM1a_{cyt}$ -Tyrosin phosphoryliert und Granulozytenextrakt, G: Granulozytenextrakt)

Es wurden drei Fälle untersucht: Im ersten Fall wurde die native Domäne mit Granulozytenextrakt (als C-G bezeichnet), im zweiten die tyrosinphosphorylierte Domäne mit Granulozytenextrakt (als C-P-G bezeichnet) und als Kontrolle nur Ni-NTA mit Granulozytenextrakt (G) inkubiert.

Anschließend wurden alle gewonnenen Fraktionen mittels SDS-PAGE (7,5 % und 17,5 %) aufgetrennt und mit Silber gefärbt.

Im folgenden wird eine Auswahl dieser Gele gezeigt. In der Abbildung 48 zeigt sich in den Waschfraktionen (W2, W3) noch ungebundenes Material, das sich aber in den untersuchten Fällen nicht signifikant voneinander unterscheidet (siehe Abbildung 48 und Abbildung 49).

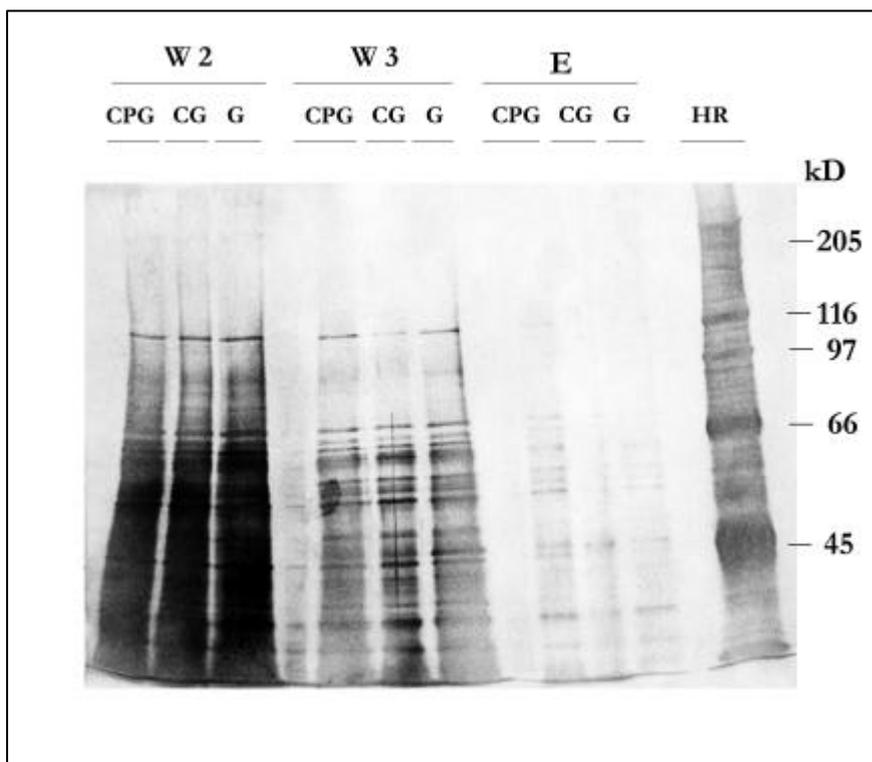


Abbildung 48: 7.5%-SDS-PAGE der gewonnenen Fraktionen; (Abkürzungen: W 2,3: Waschfraktionen 2,3; E: Elutionsfraktion)

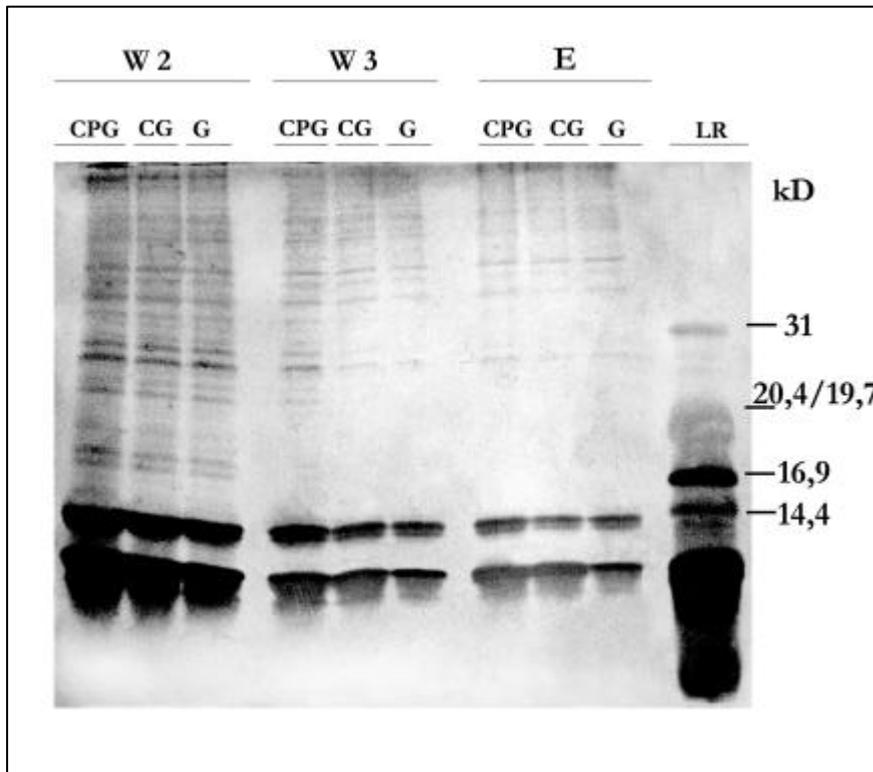


Abbildung 49: 17.5%-SDS-PAGE der gewonnenen Fraktionen; (Abkürzungen: W 2,3: Waschfraktionen 2,3; E: Elutionsfraktion)

Insbesondere die Elutionsfraktionen (E) in Abbildung 49 wiesen keine mittels SDS-PAGE nachweisbaren Unterschiede auf. Da sich aber in einem gleichartig aufgebauten Versuch mit der zytoplasmatischen Domäne von BGP Src-Kinase-Aktivität [Brümmer, 1995] präzipitieren ließ, wurden die Eluate auf Kinase-Aktivität hin überprüft (s. S. 95).

Dem zweiten Versuch zur Isolierung assoziierter Proteine lag der Ansatz zugrunde, die zytoplasmatische Domäne über ihren 6xHis-Tag an eine Ni-NTA Säule zu koppeln und anschließend mit Granulozytenextrakten zu inkubieren (siehe Abbildung 50). Er zielte auf eine bessere Aufreinigung und weniger Hintergrund ab. Die möglichen Wechselwirkungen wurden anschließend über verschiedene Puffersysteme (siehe Methoden) rückgängig gemacht und somit die assoziierten Proteine eluiert.

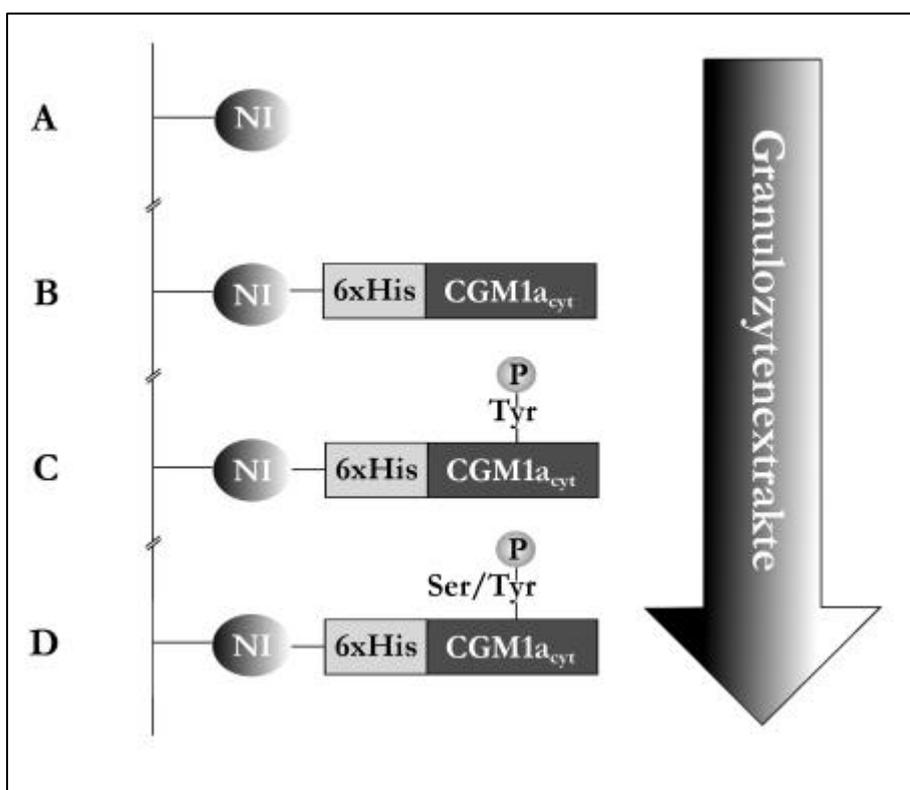


Abbildung 50: Versuchsaufbau

Insgesamt wurden acht verschiedene Zustände untersucht.

Tabelle 27: Übersicht der untersuchten Phosphorylierungszustände von CGM1a_{cyt}

	Kontrolle		Unphosphorylierte Domäne		Tyr-phosphorylierte Domäne		Ser/Thr-phosphorylierte Domäne	
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	(H)
Granulozytenextrakt	unbehandelt	Ni-NTA-adsorbiert	unbehandelt	Ni-NTA-adsorbiert	unbehandelt	Ni-NTA-adsorbiert	unbehandelt	Ni-NTA-adsorbiert

In dieser Reihenfolge finden sich die Fraktionen auch auf den Gelen.

Bei den Ni-NTA-adsorbierten Extrakten handelt es sich um zuvor mit Ni-NTA-inkubierte Granulozytenextrakte. In der ersten Serie wurden 96 Fraktionen (Überstand, Wasch- und Elutionsfraktionen) gewonnen und jeweils mit 17,5%- und 7,5%-SDS-PAGE aufgetrennt und untersucht.

In einer zweiten Serie wurde der Versuch unter identischen Bedingungen aber mit größeren Mengen wiederholt.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Gele, die signifikante Auffälligkeiten, d.h. Unterschiede im Bandenmuster zur Kontrolle aufwiesen.

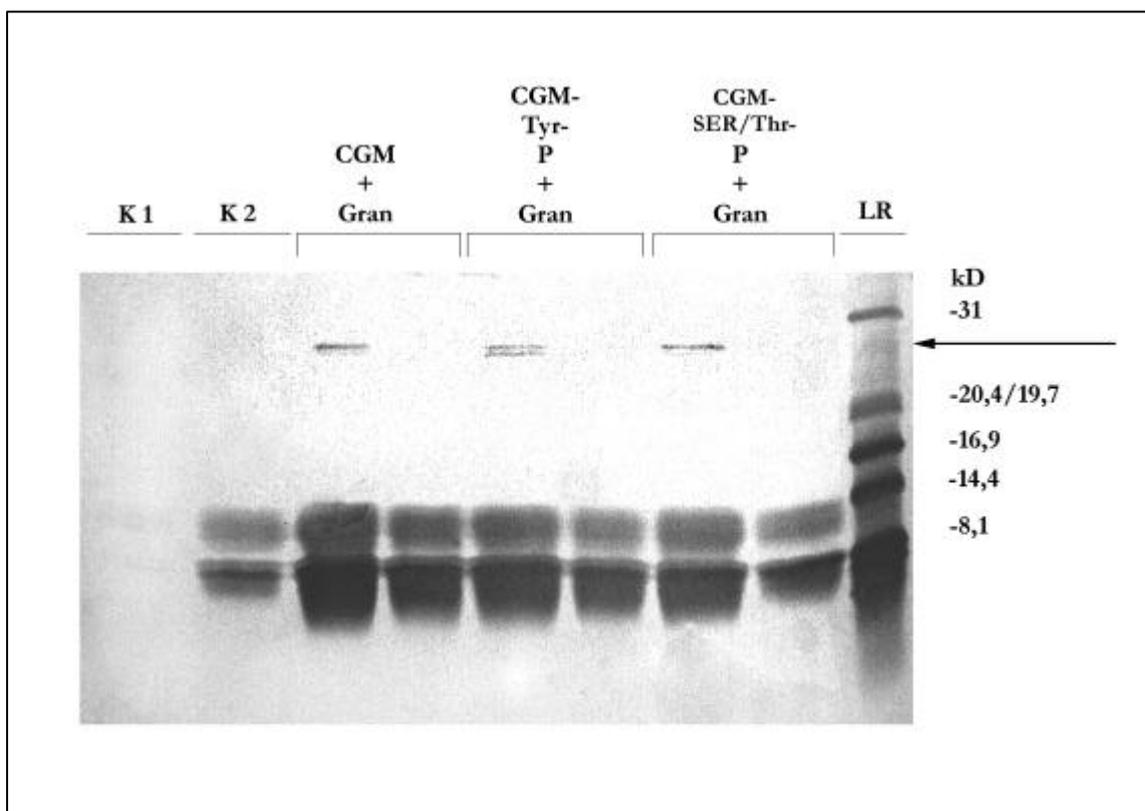


Abbildung 51: 17.5%-SDS-PAGE der gewonnenen Fraktionen - Elutionsfraktion 3 (Abkürzungen: K: Kontrolle, CGM: $CGM1a_{gt}$, CGM-Tyr-P: an Tyrosin-Resten phosphoryliertes $CGM1a_{gt}$, CGM-Ser/Thr-P: an Serin-/Threonin-Resten phosphoryliertes $CGM1a_{gt}$, Gran: Granulozytenextrakt)

In der Elutionsfraktion 3 (Abbildung 51) ist kaum noch Hintergrund vorhanden. In den Bahnen CGM+Gran, CGM-Tyr-P+Gran und CGM-Ser/Thr+Gran fanden sich Banden in Höhe von etwa 30 kD, die sehr scharf begrenzt waren. Bei den Kontrollen fanden sich diese Banden nicht, außerdem waren sie nur in den nicht an Ni-NTA zuvor adsorbierten Granulozytenextrakten zu erkennen. Die Anlagerung dieses Proteins war unabhängig vom Funktionszustand der Domäne.

Ein ähnliches Bandenmuster wies die Elutionsfraktion 5 (Abbildung 52, s. S. 93) auf.

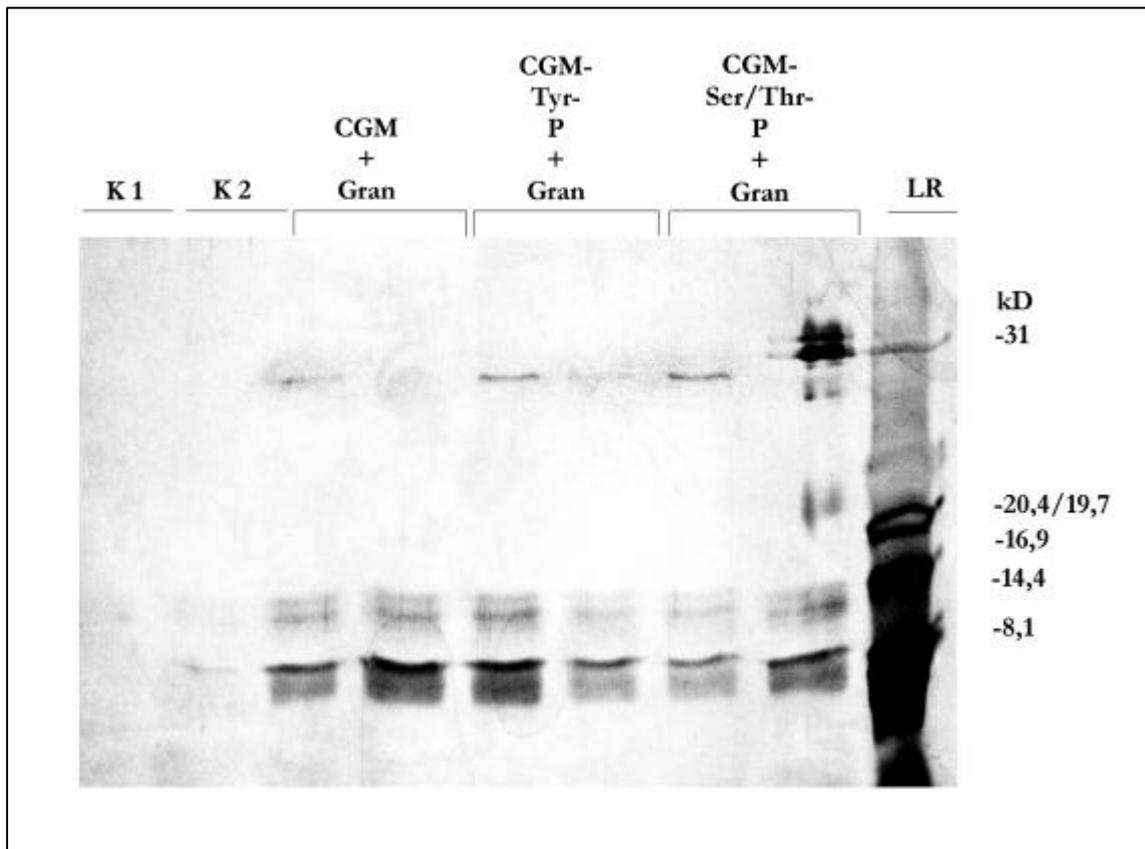


Abbildung 52: 17.5%-SDS-PAGE der gewonnenen Fraktionen - Elutionsfraktion 5 (Abkürzungen: K: Kontrolle, CGM: CGM1a_{cyt}, CGM-Tyr-P: an Tyrosin-Resten phosphoryliertes CGM1a_{cyt}, CGM-Ser/Thr-P: an Serin-/Threoninresten phosphoryliertes CGM1a_{cyt}, Gran: Granulozytenextrakt)

Auch hier (in Abbildung 52) fanden sich die Banden in Höhe von 30 kD bei den Bahnen CGM+Gran, CGM-Tyr-P+Gran und CGM-Ser/Thr+Gran und erschienen wiederum sehr distinkt. In den Kontrollen fanden sich keine Signale mehr.

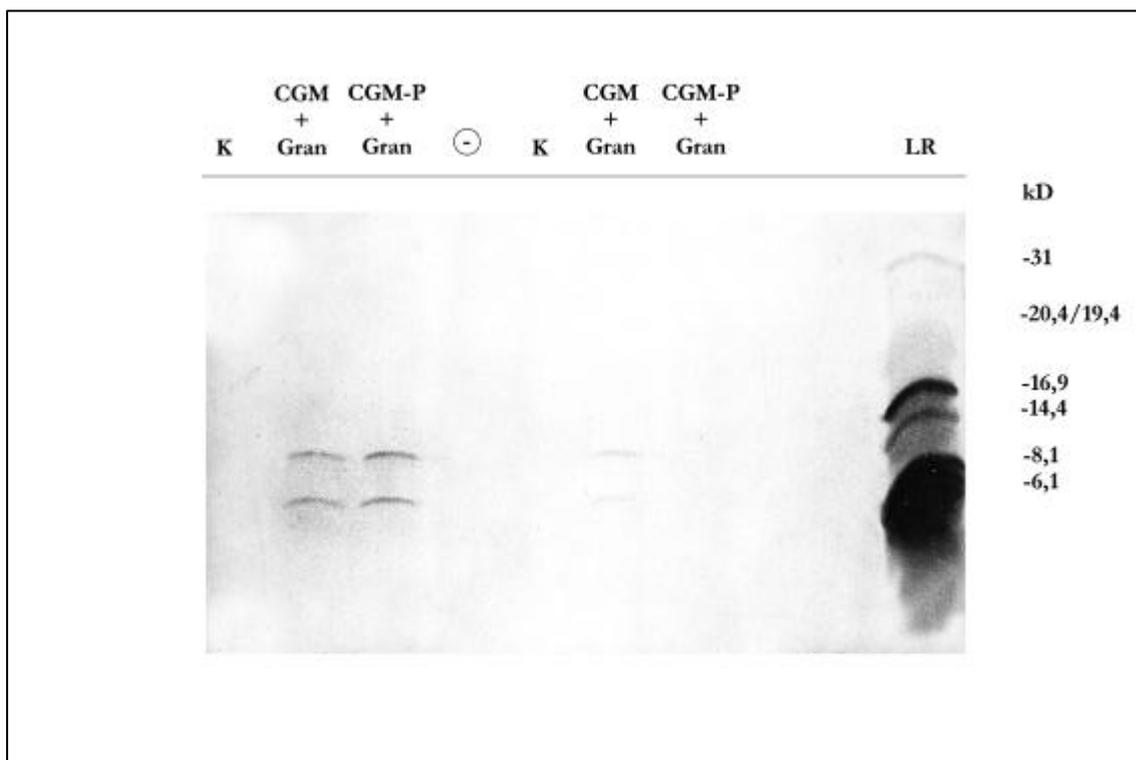


Abbildung 53: Elutionsfraktion der Serie II (Abkürzungen: K: Kontrolle, CGM: CGM1a_{cyt}, CGM-P: an Tyrosin-Resten phosphoryliertes CGM1a_{cyt}, Gran: Granulozytenextrakt)

Bei dem in der Abbildung 53 dargestellten Gel der Serie II wurden nur die native Form, die Tyrosin-phosphorylierte Form der zytoplasmatischen Domäne und die Kontrolle aufgetragen. Es fanden sich in den Bahnen CGM+Gran, CGM-P+Gran zwei Banden bei 8 und etwa 12 kD, die in der Kontrolle nicht vorhanden waren.

Die entsprechenden Banden wurden weiter untersucht. Die Ergebnisse der Sequenzierung finden sich auf S. 102.

FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN GEWONNENER PROTEINE

Unter der Vorstellung, daß die zytoplasmatische Domäne in einen Signaltransduktionsweg eingebunden sein könnte, wurde angenommen, daß CGM1a_{cyt} möglicherweise Proteine bindet, die Funktionen vermitteln. Die klassischen Varianten sind Tyrosin-Kinasen oder Phosphatasen, die nachgeschaltete Proteine in ihrem Zustand verändern. Deshalb wurden in den oben gewonnenen Elutionsfraktionen diese Funktionen in Tyrosin-Kinase- bzw. Phosphatase-Assays untersucht. Zudem sind enzymatische Aktivitäten bei Enzymkonzentrationen nachweisbar, die unterhalb der Detektionsgrenze von SDS-PAGE mit Silberfärbung liegen.

ERGEBNISSE DER KINASE-ASSAYS

Tyrosin-Kinase-Aktivität

EINSATZ DER PRÄZIPITIERTEN FRAKTIONEN

Die Proben aus dem vorangegangenen Abschnitt wurden in einem Kinase-Assay untersucht, der CGM1a_{cyt} als Substrat und γ -³²P-ATP beinhaltete. Dazu wurde bei 30 °C für 3 h inkubiert, nach jeweils einer Stunde ein Aliquot entnommen und die Proben anschließend mit 17,5-% SDS-PAGE getrennt und autoradiographiert.

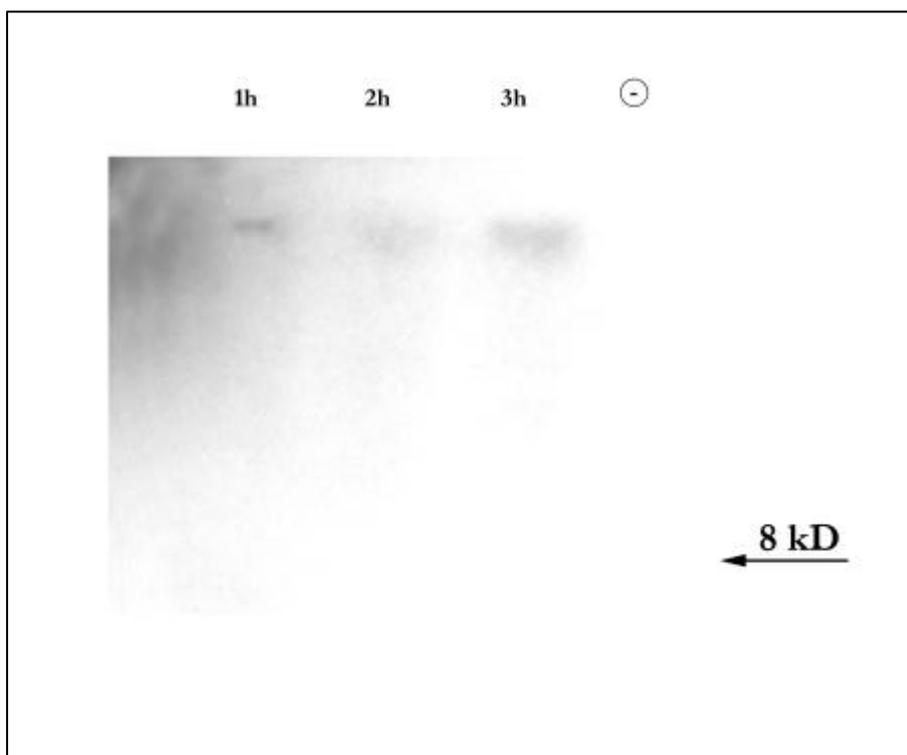


Abbildung 54: Kinase-Assay (17,5%-SDS-PAGE und Autoradiographie, der Pfeil kennzeichnet die Höhe von 8,1 kD)

Die Autoradiographie in Abbildung 54 zeigte keine Signale in der Höhe, in der phosphoryliertes CGM1a_{cyt} zu erwarten gewesen wäre (Pfeil). Die Banden, die an der oberen Kante des Gels zu sehen waren, entsprachen den Taschen des Gels und stellen keine spezifische Aktivität dar.

Es ließen sich also keine Kinase-Aktivitäten präzipitieren.

Da der Versuchsaufbau CGM1a_{cyt} als Substrat voraussetzte, wurden die Fraktionen nochmals mit einem allgemeinen Tyrosin-Kinasen-Substrat (Enolase) inkubiert.

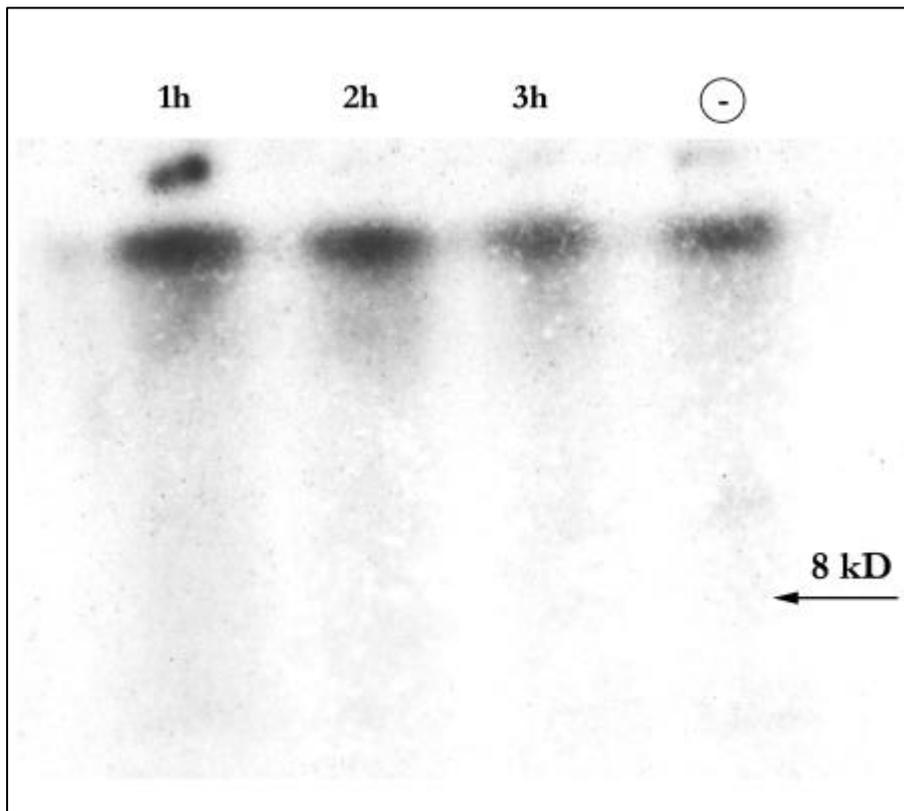


Abbildung 55: Kinase-Assay mit Enolase als Substrat (7,5%-SDS-PAGE und Autoradiographie)

Die in Abbildung 55 wiedergegebene Autoradiographie bietet ein ähnliches Bild. Auch hier zeigten sich keinerlei spezifische Signale, das bestätigte die Ergebnisse des vorangegangenen Kinase-Assays.

KONTROLLE DER VERSCHIEDENEN ELUTIONSFRAKTIONEN AUF TYROSIN-KINASE-AKTIVITÄT

RADIOAKTIVER KINASE-ASSAY

Die im Rahmen der Suche nach assoziierten Fraktionen gewonnenen Elutionsfraktionen (s. S. 88f) wurden diesem Assay unterzogen, dann mit 17,5-% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert. Die Gele (hier nicht gezeigt) lassen in Analogie zu der Abbildung 54 (s. S. 95) und der Abbildung 55 keine Banden erkennen, die auf eine Kinase-Aktivität hindeuten könnten.

ELISA ALS KINASE-ASSAY

Die mögliche Kinase-Aktivität wurde zunächst mit einem Assay, der als ELISA aufgebaut war, untersucht. Dazu wurde ein biotinyliertes Peptid mit der zu untersuchenden Probe inkubiert und anschließend an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte gebunden. Dann wurde die Tyrosin-Phosphorylierung mit einem entsprechenden Antikörper (POD-konjugiert) detektiert. PKS1 und PKS2 stellten zwei unterschiedliche Peptide dar, um den Assay hinreichend substratunabhängig zu gestalten.

Die Abbildung 56 gibt die optische Dichte der Proben wieder.

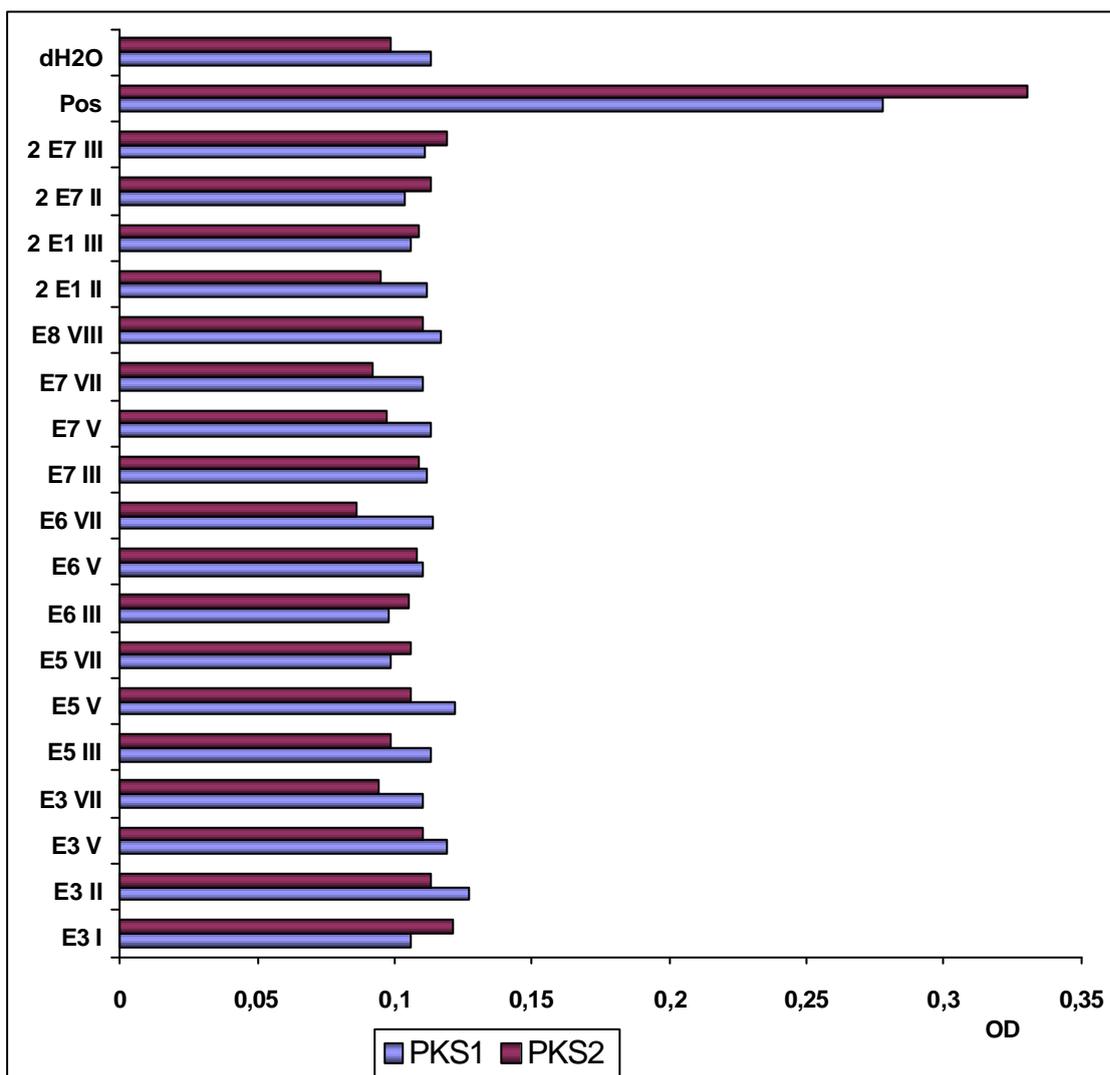


Abbildung 56: ELISA-Ergebnisse des Kinase-Assays (Abkürzungen: dH₂O: Wasserkontrolle, Pos: Positivkontrolle, E: Elutionsfraktion, die Ziffern kennzeichnen die entsprechenden Fraktionen, PKS1,2: Protein-Kinasesubstrat 1,2, OD: Optische Dichte)

Die Meßwerte lagen ausnahmslos im Bereich der Wasserprobe (dH₂O ist die Negativkontrolle, im Bild oben), während die Positivkontrolle (Pos) mit Src-Kinase ein deutliches Signal lieferte.

Im ELISA ließ sich ebenfalls keine Tyrosin-Kinase-Aktivität in den gewonnenen Eluaten nachweisen.

RESULTATE DER PHOSPHATASE-ASSAYS

Die Phosphatase-Assays waren ebenfalls als ELISA aufgebaut. Anhand einer Standardkurve konnte dann die Abspaltung des Phosphates ermittelt werden.

Der Assay wurde mit drei verschiedenen Puffersystemen durchgeführt, Puffer I (nach Dechert et al.), Puffer II und III (Zhao et al.) Die Puffersysteme lieferten jedoch nur gering abweichende Ergebnisse, und somit wurde in der Abbildung 57 der Median wiedergegeben. Als Positivkontrollen dienten zwei kommerziell erhältliche alkalische Phosphatasen.

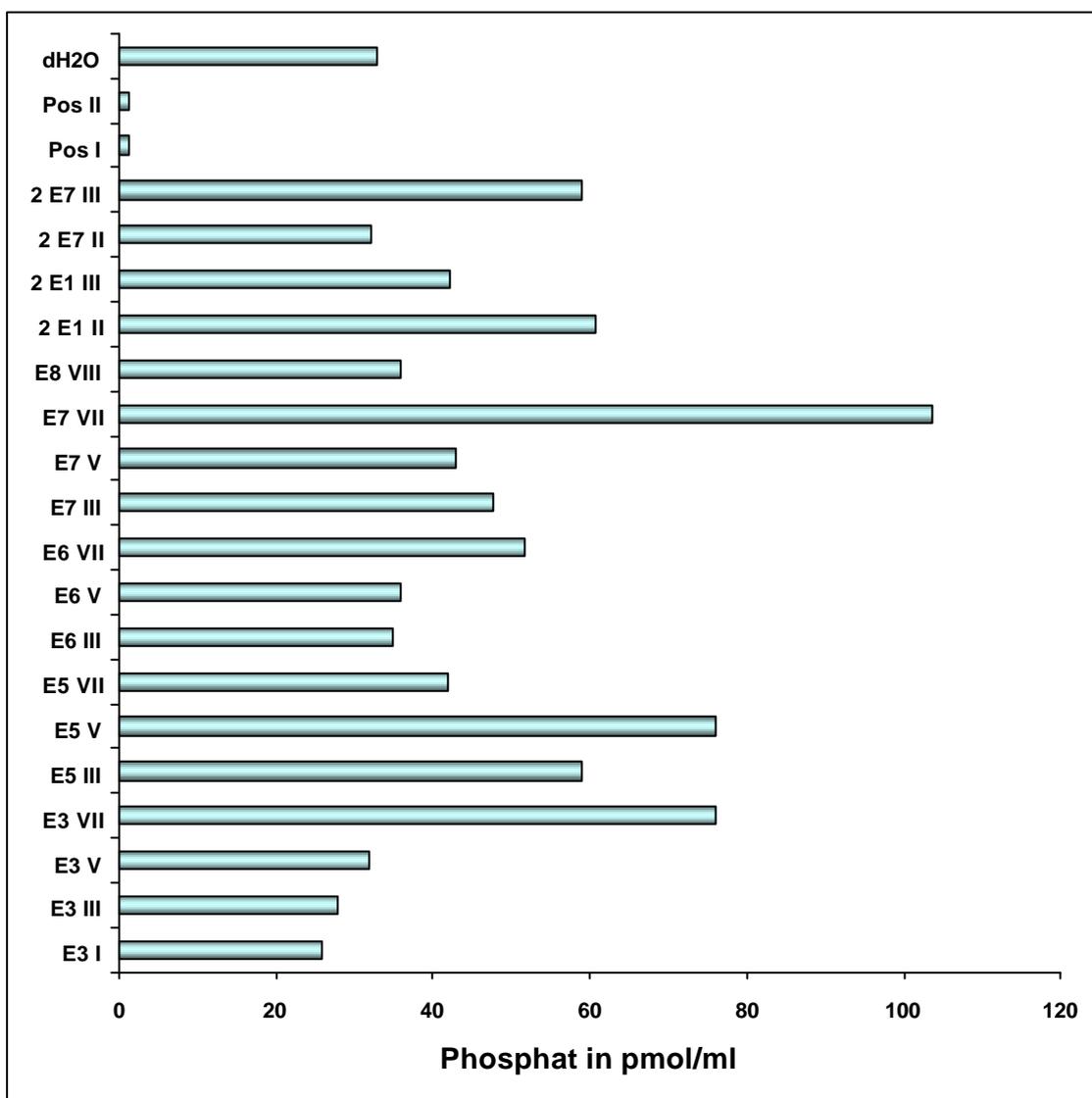


Abbildung 57: Ergebnisse des Phosphatase-Assays (Abkürzungen: dH₂O: Wasserkontrolle, Pos I,II: Positivkontrolle I,II, E: Elutionsfraktion, die Ziffern kennzeichnen die entsprechenden Fraktionen)

In den frühen Elutionsfraktionen (E3 I und III) ließ sich eine geringfügig stärkere Abnahme des Phosphatgehaltes feststellen, in den späteren Fraktionen fand sich eine geringere Abnahme des Phosphatgehaltes als zu Beginn. Es gab aber keine Probe, die Ergebnisse im Bereich der Positivkontrollen lieferte.

Im Gesamtbild konnte man keine Phosphatase-Aktivität in den Eluatn detektieren.

PHOSPHORYLIERUNG ASSOZIIERTER PROTEINE

ÜBERPRÜFUNG VON GRANULOZYTENEXTRAKTEN AUF PHOSPHORYLIERBARE PROTEINE

Um zu überprüfen, ob sich in Granulozytenextrakten Proteine finden, die sich mit Src-Kinase phosphorylieren lassen, wurde das unbearbeitete Granulozytenextrakt direkt mit Src-Kinase und γ - 32 P-ATP inkubiert, anschließend mit SDS-PAGE getrennt und autoradiographiert.

Zudem ist der Detektionslevel bei einem Nachweis mit γ - 32 P-ATP deutlich niedriger, so daß auch Proteine in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden können.

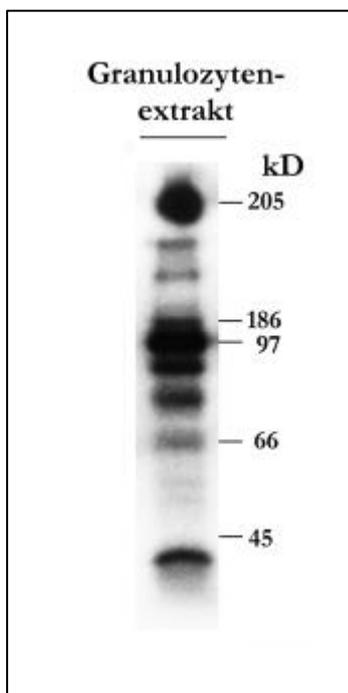


Abbildung 58: Phosphorylierung von Granulozytenextrakten mit Src-Kinase (7,5%-SDS-PAGE mit folgender Autoradiographie)

In der Abbildung 58 zeigte sich eine erstaunlich geringe Zahl von Banden, die Aktivitäten eingebaut hatten.

ÜBERPRÜFUNG ASSOZIIERTER PROTEINE AUF PHOSPHORYLIERBARKEIT

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich in den zuvor gewonnenen Fraktionen möglicherweise assoziierte Proteine befinden, die sich mit Src-Kinase phosphorylieren lassen. Um dies zu überprüfen, wurde mit den Fraktionen eine Phosphorylierungsreaktion durchgeführt. Es wurde zu den Elutionsfraktionen Src-Kinase und γ -³²P-ATP gegeben und entsprechend den Protokollen im Methodenteil inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert.

Als Positivkontrolle wurde CGM1a_{cyt} als Substrat eingesetzt.

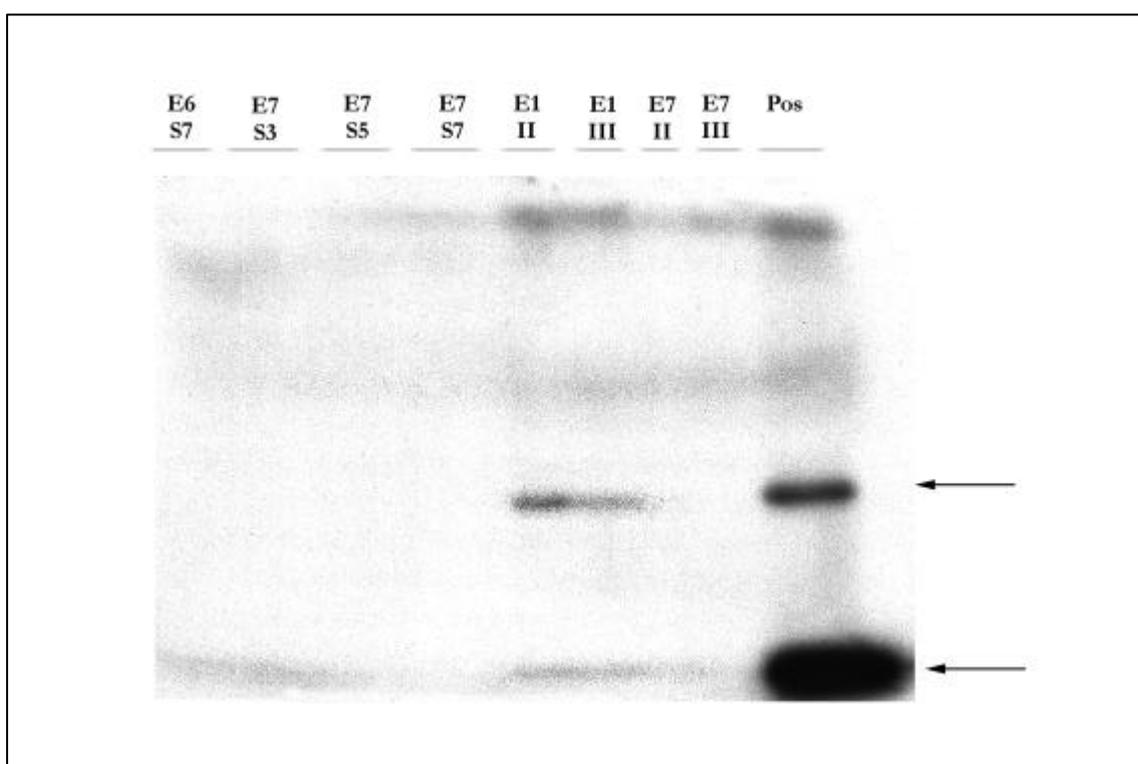


Abbildung 59: Phosphorylierung assoziierter Proteine (7,5%-SDS-PAGE und Autoradiographie, Abkürzungen: E: Elutionsfraktion, S: Säule, Pos: Positivkontrolle)

Die Autoradiographie in der Abbildung 59 zeigte bei den frühen Elutionsfraktionen (E1) in Höhe von 60 kD (oberer Pfeil) und bei etwa 10 kD (unterer Pfeil) ein durchgehendes Bandenmuster, was in den späten Elutionsfraktionen (E6 und E7) nicht mehr zu erkennen war.

Die obere Bande lief auf Höhe der Src-Kinase, was auch an der Positivkontrolle zu sehen war, und durfte als autophosphorylierte Form dieser interpretiert werden. Die Bande in Höhe von etwa 10 kD entsprach der phosphorylierten zytoplasmatischen Domäne, wie man ebenfalls im Vergleich mit der Positivkontrolle sehen konnte. Die unterschiedlichen Intensitäten der

Signale ließ sich durch die Tatsache erklären, daß das im Versuchsansatz zunächst an die Säule gekoppelte CGM1a_{cyt} mit den verwendeten Puffern ebenfalls zu eluieren war und somit in den Elutionsfraktionen auch unterschiedliche Gehalte an CGM1a_{cyt} zu finden waren, die dann wiederum in einer Phosphorylierungsreaktion unterschiedlich starke Signale lieferten.

Um die Auftrennung im unteren Bereich zu verbessern, wurden die gleichen Proben auch mit 17,5 %-SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert.

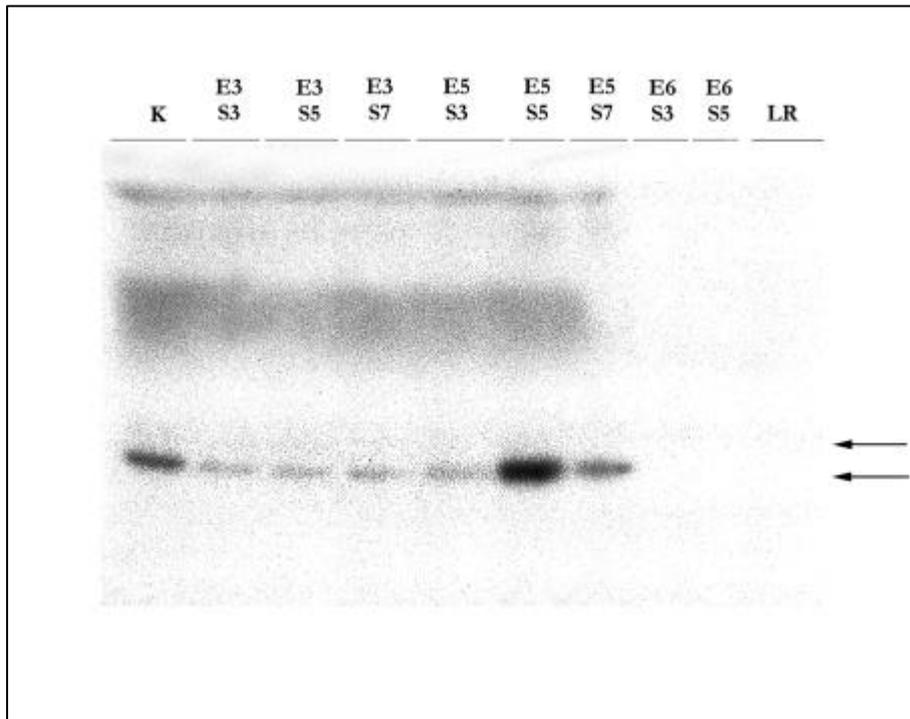


Abbildung 60: Phosphorylierung assoziierter Proteine (17,5-% SDS-PAGE und Autoradiographie
 Abkürzungen: E: Elutionsfraktion, S: Säule, K: Positivkontrolle)

Die Abbildung 60 gibt die entsprechende Autoradiographie wieder. Es zeigte sich ein vergleichbares Bandenmuster zu dem vorangegangenen Versuch.

IDENTIFIKATION DER AUFGEREINIGTEN PROTEINE

Die direkte Identifikation der eluierten Proteine erfolgte durch die N-terminale Sequenzierung im Edman-Abbau. Untersucht wurden die in Abbildung 53 gezeigten Fraktionen, die Banden bei etwa 8 und 12 kD aufwiesen, die sich in der zugehörigen Kontrolle nicht fanden.

Mit diesen Proben wurde die Sequenzierungsreaktion durchgeführt. Dabei ließ sich die Bande in Höhe von etwa 8 kD als humanes Calcium-bindendes Protein MRP-8 identifizieren.



Abbildung 61: Übereinstimmung der N-terminalen Sequenz der Probe (oben) mit der des Calcium-bindenden Proteins (unten)

Die Abbildung 61 gibt das Ergebnis des Edman-Abbaus wieder. Die Übereinstimmung war bei einer Überlappung von 10 Aminosäuren 100 %, die rechnerische Wahrscheinlichkeit, daß es sich um ein anderes Protein als das angegebene handelte, lag bei 0,012.

Das Protein ist auch unter den folgenden Synonyma bekannt:

- Calgranulin A
- CF Ag
- Cystic fibrosis associated protein
- MIF-related Protein 8k chain
- Oncodevelopmental protein

Die Bande über diesem Protein bei etwa 14 kD ließ sich wiederholt nicht sequenzieren und war wahrscheinlich N-terminal blockiert.

Des weiteren wurde die in Abbildung 51 und Abbildung 52 (s. S. 92) gezeigte Bande in Höhe von etwa 30 kD im Edman-Abbau untersucht.

Die Bande bei 30 kD (siehe Abbildung 51 und Abbildung 52, S. 92) lieferte in der Sequenzreaktion aufgrund der sehr geringen Konzentration und der verunreinigenden Proteine ein uneinheitliches Bild und ließ sich nicht sicher sequenzieren, damit konnte auch kein Datenbankgleich gemacht werden.

Da die Bande jedoch auf Höhe des Fullsize-CGM1a lag, wurde diese Bande mit dem im Rahmen dieser Arbeit generierten mAb 4H1 auf einem Blot mit folgender sehr sensitiver Chemilumineszenzreaktion untersucht.

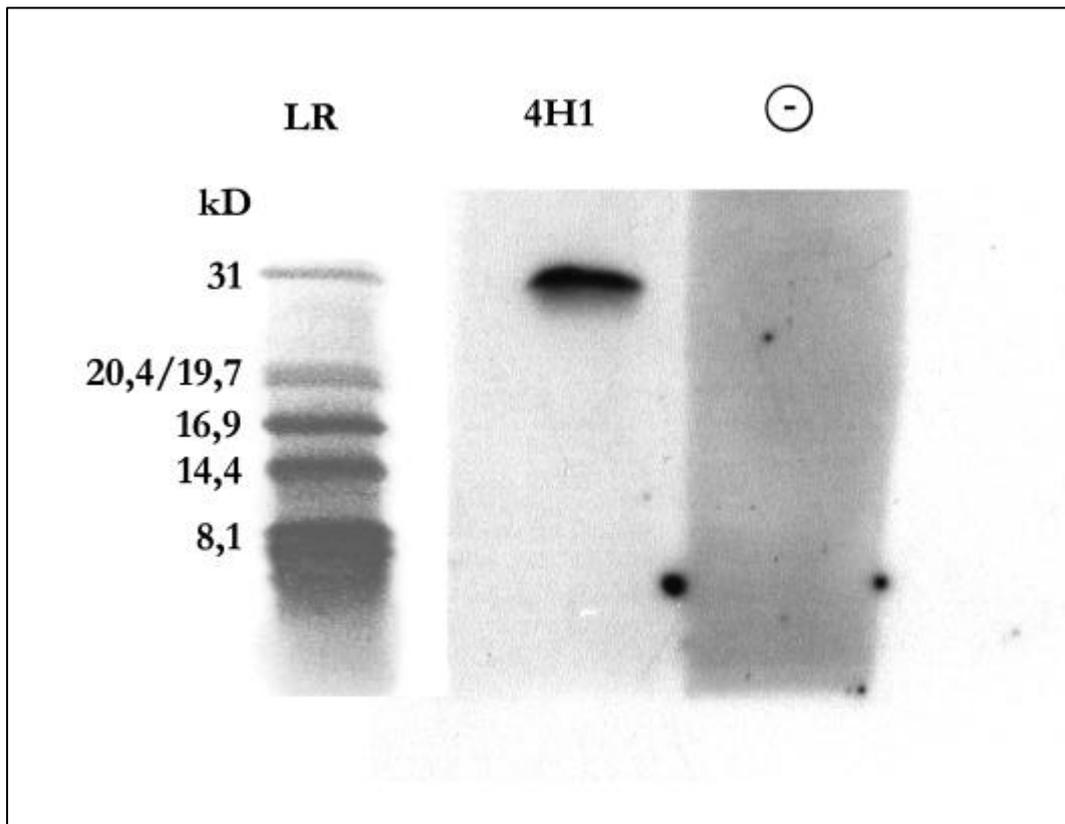


Abbildung 62: Detektion mit mAb 4H1 und anschließender Chemilumineszenzreaktion

Dabei zeigte sich ein deutliches Signal in der entsprechenden Höhe von etwa 30 kD bei der Detektion mit 4H1. Die Kontrolle war ohne Erstantikörper und zeigte kein Signal.

Die anderen oben beschriebenen Banden waren in ihrer Konzentration zu gering bzw. ließen sich nur schwer auf die Blot-Membran transferieren und waren damit einer weiteren Analyse nicht zugänglich.

UNTERSUCHUNG DES EXPRESSIONSMUSTERS VON CGM1A_{CYT}

Mittels Northern-Blot und anschließender Hybridisierung mit einer CGM1a_{cyt}-DNA-Sonde wurden verschiedene Zellen und Gewebe untersucht:

- Milz
- Hoden
- Kolon
- Hirn
- Leber
- Pankreas
- Thymus
- Ovar
- Periphere Monozyten
- Plazenta
- Skelettmuskel
- Prostata
- Dünndarm
- Herz
- Lunge
- Niere

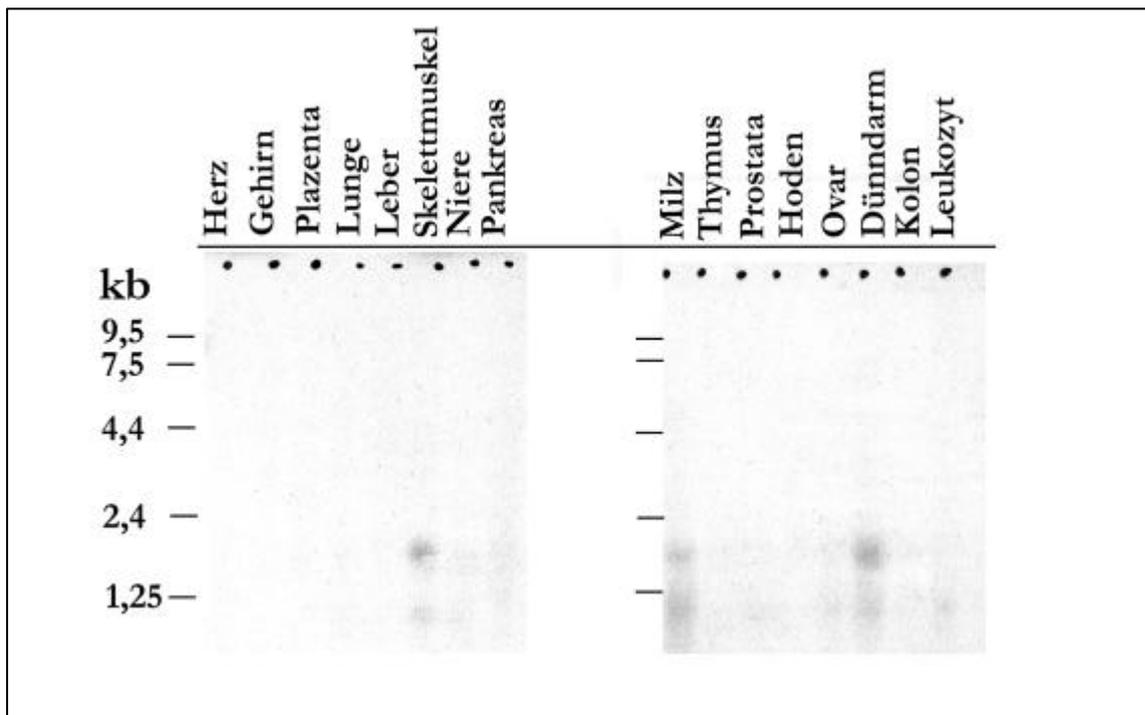


Abbildung 63: Northern-Blot verschiedener Gewebe nach Hybridisierung mit dem PCR-Produkt von *CGM1a_{yt}* und Autoradiographie

Dabei zeigten sich, wie man der Abbildung 63 entnehmen kann, nur sehr schwache Signale in der entsprechenden Höhe von 1,3 kb, insbesondere fanden sich diese bei Skelettmuskel, Milz, Dünndarm und Leukozyten. Insgesamt waren die Signale aber so schwach, daß man sie nicht als Äquivalent einer echten Expression deuten kann.

DISKUSSION

Unter Signaltransduktion versteht man den Wechsel der Form des Signals auf seinem Weg von einem Träger zum nächsten. Die Proteine, die dieses Signal weitertragen, arbeiten nicht als Enzyme, die eine große Zahl von Molekülen umsetzen, sondern beeinflussen – auch wenn sie z.B. eine Phosphorylierung katalysieren – nur eine kleine definierte Menge von Zielproteinen. Unter den Aminosäuren, auf die Phosphatgruppen übertragen werden, spielen Serin und Threonin quantitativ die größte Rolle. Bei einem geringen Teil (ca. 0,1%) der zellulären Phosphoproteine sind die Phosphatreste an Tyrosin gebunden.

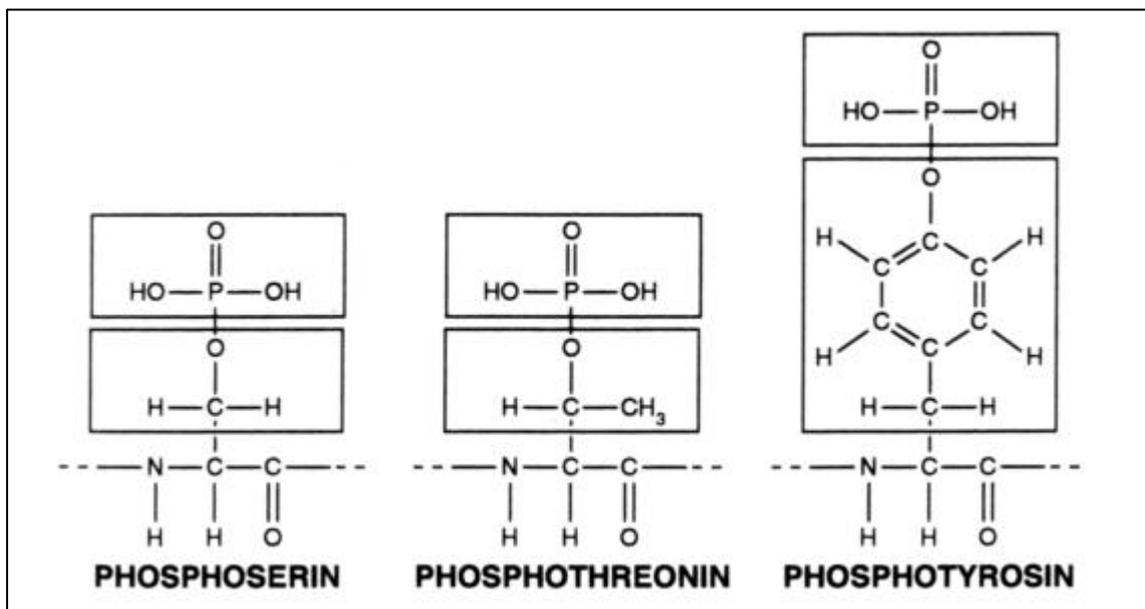


Abbildung 64: Struktur phosphorylierter Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste in Proteinen [nach Wagener, 1996: Molekulare Onkologie]

Die Enzyme, die diese Phosphorylierungsreaktion katalysieren, werden als Protein-Tyrosin-Kinasen bezeichnet. Diesen Tyrosin-Kinasen und ihren Substraten kommt ein zentraler Stellenwert im Rahmen der Regulation von immunologischen Reaktionen, Wachstumsprozessen, morphogenetischen Programmen und der malignen Transformation zu.

Die Protein-Kinasen sind zum Teil als Rezeptoren mit eigener katalytischer Aktivität ausgestattet (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen), teilweise aber auch als Kinasen, denen transmembranöse und extrazelluläre Domänen fehlen (Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen) und die somit ausschließlich im Zellinneren lokalisiert sind [Übersicht in Wagener, 1996: Molekulare Onkologie].

Die Trennung der katalytischen Domänen der Kinasen von Bindungsregionen (z.B. von Rezeptoren) ermöglicht es, daß Substrate in die Nähe von katalytischen Zentren oder

bestimmte Proteinkomplexe in Subregionen der Zelle gebracht werden können. Somit kann eine Beeinflussung weiterer Moleküle des Signalweges erfolgen: Es können Adaptor-Proteine gebunden, weitere Enzyme aktiviert oder Struktur-Proteine modifiziert werden. Dieser hierarchische Aufbau mit der Phosphorylierung von untergeordneten bzw. nachgeschalteten Molekülen ist mittlerweile von einigen Signalwegen bekannt (PDGF-, EGF-Signalweg, MAP-Kinase-Kaskaden) [Erpel et al., 1995].

Moleküle, die auf diesen Signaltransduktionswegen liegen, sind oft modular aufgebaut und enthalten spezifische Bindungsregionen für vor- oder nachgeschaltete Reaktionspartner [Cohen et al., 1995]. Eben diese Bauweise findet sich auch für Moleküle des CD66-Clusters (siehe Abbildung 5, S. 10), insbesondere für das u.a. als Signaltransduktionsmolekül beschriebene BGP_a. In Homologie zu BGP_a (und CGM7 oder CGM1c) läßt auch die deduzierte Aminosäure-Sequenz von CGM1a erkennen, daß das Molekül modular angelegt ist. Dabei besteht CGM1a aus einem kurzen Leader-Peptid, einer IgV-artigen Domäne, einer transmembranär angelegten Domäne und einem zytoplasmatischen Anteil [Thompson et al., 1991; Nagel et al., 1993]. Die nähere Untersuchung der Aminosäure-Sequenz zeigt mögliche Phosphorylierungsstellen für Tyrosin-Kinasen, aber auch Angriffspunkte für Serin-/Threonin-Kinasen (siehe Abbildung 7, S. 14).

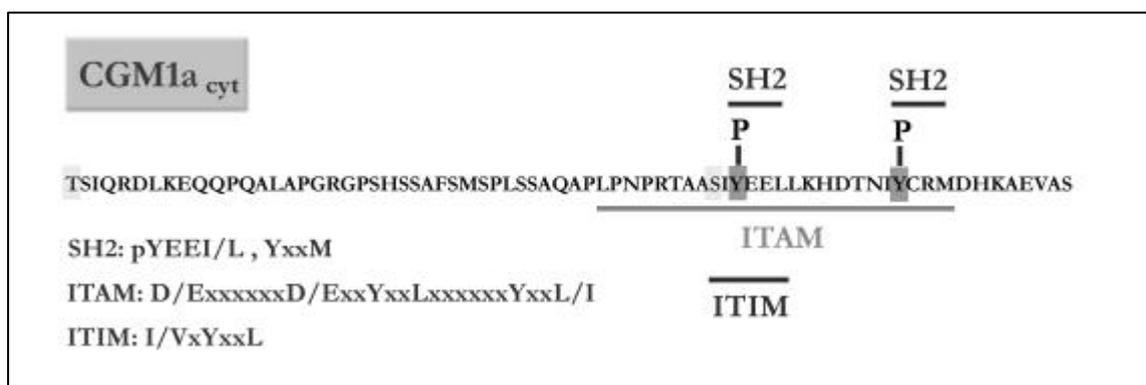


Abbildung 65: SH2-bindende Anteile und ITAM- bzw. ITIM-Sequenzen der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a (Abkürzungen: SH2: Src-Homology, ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif, ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif)

In den auf Seite 14 und hier auf Seite 106 gezeigten Abbildungen (Abbildung 7 und Abbildung 65) erkennt man Tyrosin-Reste, die in dem Konsensus-Motiv für Tyrosin-Kinasen der Src-Familie (YX₂LX₇YX₂M) liegen, das ähnlich ist zu dem „YLYL“-Motiv (YX₂LX₇YX₂L/I) und aus den zytoplasmatischen Domänen von Molekülen bekannt ist, die als Signaltransduktionsmoleküle oder Immunrezeptoren beschrieben sind [Keegan und Paul, 1992]. Diese Motive entsprechen zudem den als SH2 (Src-Homology)- Bindungsstellen bekannten Sequenzen.

SH2-Domänen vermitteln in Abhängigkeit von ihrem Phosphorylierungszustand sequenzspezifische Kontakte, die eine Annäherung oder Zusammenlagerung von Signalkomplexen bewirken können [Koch et al., 1991]. Mittlerweile sind eine Vielzahl zytoplasmatischer Proteine bekannt, die in Signaltransduktionswegen eine Rolle spielen und die diese SH2-Domänen enthalten. Um diese Motive näher zu charakterisieren, untersuchten Songyang et al. anhand synthetischer Phosphopeptide verschiedene Aminosäurevariationen auf ihre spezifische SH2-Bindungsfähigkeit hin. Dabei zeichnete sich das pYEEI/L-Motiv durch eine besondere Bindungsfähigkeit aus. Eben diese Sequenz findet sich in CGM1a_{cyt} in 100%iger Übereinstimmung. Liu et al. geben die Bindungsfähigkeit an diese Sequenz mit einer $K_d=40\text{nM}$ als hochaffin an [Liu et al., 1993].

Songyang et al. postulieren einen weiteren interessanten Punkt: Proteine, die zwei SH2-Domänen enthalten, könnten eine bidentale Assoziation ermöglichen. Für den PDGF-Rezeptor konnte die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase über die simultane Bindung beider SH2-Domänen gezeigt werden. Als Voraussetzung müssen die Motive etwa 10 Aminosäuren voneinander entfernt liegen. Diese Bedingung erfüllt die Sequenz von CGM1a_{cyt}. Im Abstand von 10 Aminosäuren findet sich ein zweiter Tyrosin-Rest, der in einem weiteren, wenn auch „schlechteren“ SH2-Motiv (YXXM) liegt [Songyang et al., 1993]. Über diese SH2-Motive könnten z.B. nachgeschaltete Kinasen in ihrer Aktivität reguliert werden (siehe unten).

Gleichzeitig ist der gesamte Sequenzkontext von Öbrink als ITAM-Sequenz (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) beschrieben worden, wobei der proximale Anteil für sich alleine eine ITIM-Sequenz darstellt (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif). ITAMs und ITIMs finden sich in einer Reihe von Membran-Rezeptoren, wie T-Zell-Rezeptor-Komplexen, B-Zell-Rezeptor-Komplexen, Fc γ -RIIB, CD22, Interleukin-Rezeptoren und den inhibitorischen Rezeptoren der Natürlichen-Killer-Zellen (KIRs). Nach einer Phosphorylierung binden ITAMs oder ITIMs Protein-Tyrosin-Kinasen oder Protein-Tyrosin-Phosphatasen, deren Wirkung dann in der Stimulation oder der Termination eines Signals liegt [Öbrink, 1997]. In der Abbildung 65 auf Seite 106 sind diese beiden Motive in der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a dargestellt.

Deutlich geringer als das für die Src-Kinase oben beschriebene Motiv ist die Homologie der für die Fyn- und Lyn-Kinase beschriebenen Konsensus-Sequenzen (D/E(X)₇D/E(X)₂Y(X)₂L/I(X)₇Y(X)₂L/I) [Reth, 1989; Klausner und Samelson, 1991; Weiss, 1993; Law et al., 1993]. Die Angaben der Motive differieren leicht, so daß sich für die Fyn- und Lyn-Kinase eine errechnete Übereinstimmung von 63-88% auf Aminosäurenniveau ergibt [Songyang et al., 1993]. Die Unterschiede der Motive in der Literatur deuten darauf hin, daß

diese Kinasen eine Gruppe verschiedener Zielproteine haben könnten, so daß eine geringere Substratspezifität durchaus gefordert sein könnte.

Zusätzlich liegt das Thr 179 in einer Konsensus-Sequenz für die Phosphorylierung durch die Protein-Kinase C [Woodgett et al., 1986], und für die Casein-Kinase II findet sich ein theoretischer Angriffspunkt an dem Ser 228 [Pinna, 1990].

Im Gegensatz dazu enthält CGM1c (siehe Abbildung 6, S. 13), das eine differente Struktur aufweist, keine Tyrosin-Reste und kein Motiv für Casein-Kinasen, so fehlen diesem Molekül wichtige funktionelle Anteile für die Signaltransduktion.

Bekannt ist, daß CD66a in myeloischen Zell-Linien (CML) und Kolonzell-Linien an Tyrosin-, Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert ist [Afar et al., 1992; Skubitz et al., 1993].

Die zytoplasmatische Domäne von CD66a besitzt in der von Brümmer et al. untersuchten Isoform zwei Tyrosin-Reste, die in den oben beschriebenen Konsensus-Motiven für die Src-Kinase liegen (pY-hydrophil-hydrophil-hydrophob). Brümmer et al. konnten den Nachweis führen, daß über diese Motive die rekombinante zytoplasmatische Domäne von CD66a in direkte Wechselwirkung mit der Src-Kinase treten kann [Brümmer et al., 1995]. Aufgrund der Sequenzhomologien der zytoplasmatischen Domänen von CD66a und CD66d insbesondere in Bezug auf die oben angegebenen Konsensus-Motive für Kinasen der Src-Familie sollte die Phosphorylierbarkeit von CGM1a *in vitro* nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob sich diese vorhergesagten Angriffspunkte für die verschiedenen Kinasen *in vitro* bewahrheiteten. Für diese Untersuchung wurde entsprechend den oben beschriebenen Motiven eine Auswahl der zum damaligen Zeitpunkt kommerziell erhältlichen Tyrosin- und Serin-/ Threonin-Kinasen verwendet. Die Src-Kinase, für die gezeigt wurde, daß sie spezifisch Tyrosin-Reste und nicht Serin-/ Threonin-Reste phosphoryliert [Hunter und Sefton, 1980], fungierte als Referenzkinase. Die *in vitro* Experimente zeigten bei der Verwendung der Src-Kinase und CGM1a_{cyt} als Substrat in einem radioaktiven Assay eine deutliche Anlagerung von γ -³²-Phosphat an die zytoplasmatische Domäne. Diese Anlagerung konnte zudem mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper als spezifische Phosphorylierung der Tyrosin-Reste der Domäne charakterisiert werden (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37, S. 80). Bei den Phosphorylierungsexperimenten ergab sich bei der SDS-PAGE-Analyse ein typisches Bild: Die native zytoplasmatische Domäne, die in Höhe von etwa 8 kD lief, wurde umgesetzt zu einer Doppelbande, die sich etwas oberhalb zwischen 10 und 14 kD fand. Diese Veränderung im Laufverhalten bei der SDS-PAGE-Analyse ließ sich nicht durch einen realen Anstieg des Molekulargewichts um 2 bzw. 6 kD während der enzymatischen Umsetzung erklären. Der Einbau einer Phosphatgruppe erhöht

das Molekulargewicht lediglich um $1,328 \times 10^{-22}$ g, was 80 Dalton entspricht. Vielmehr ist diese Änderung des Laufverhaltens auf die Anlagerung von Ladungen (Phosphat-Reste) zurückzuführen, die ebenfalls die SDS-PAGE-Analytik beeinflussen. Ein ähnlich charakteristisches Bild ergab sich bei den Phosphorylierungsexperimenten mit der zytoplasmatischen Domäne von BGP [Brümmer et al., 1995]. Diese Beeinflussung des Laufverhaltens wurde in zweidimensionalen Gelsystemen bereits beschrieben, dort wurde ein veränderter isoelektrischer Punkt beobachtet [Garrison, 1993]. Besonders gut ließen sich diese Laufdifferenzen bei der Überprüfung der Kinetik der Src-Kinase an $\text{CGM1a}_{\text{cyt}}$ zeigen (siehe Abbildung 38 und Abbildung 39, S. 81f). Dabei war bereits nach 30 min die Doppelbandenstruktur oberhalb der zytoplasmatischen Domäne zu erkennen. Mit zunehmender Zeit fand eine Verschiebung der Intensitäten statt, zunächst hin zu dem unteren Anteil der Doppelbande und später hin zu dem oberen Anteil, bis sich nach 12 h keine Bande mehr auf Höhe der zytoplasmatischen Domäne fand. Gleichzeitig hatte die Intensität des unteren Anteils der Doppelbande abgenommen, während der obere Anteil an Intensität gewonnen hatte. Mittels einer anti-Phosphotyrosin-Antikörper-Säule ließ sich die der Doppelbande entsprechende phosphorylierte Domäne, aber nicht die native zytoplasmatische Domäne, anreichern. Dies läßt vermuten, daß die zytoplasmatische Domäne von CGM1a durch Src-Kinase an beiden Tyrosin-Resten phosphoryliert wird. Die Abbildung 66 zeigt die Modellvorstellung zu diesem Experiment.

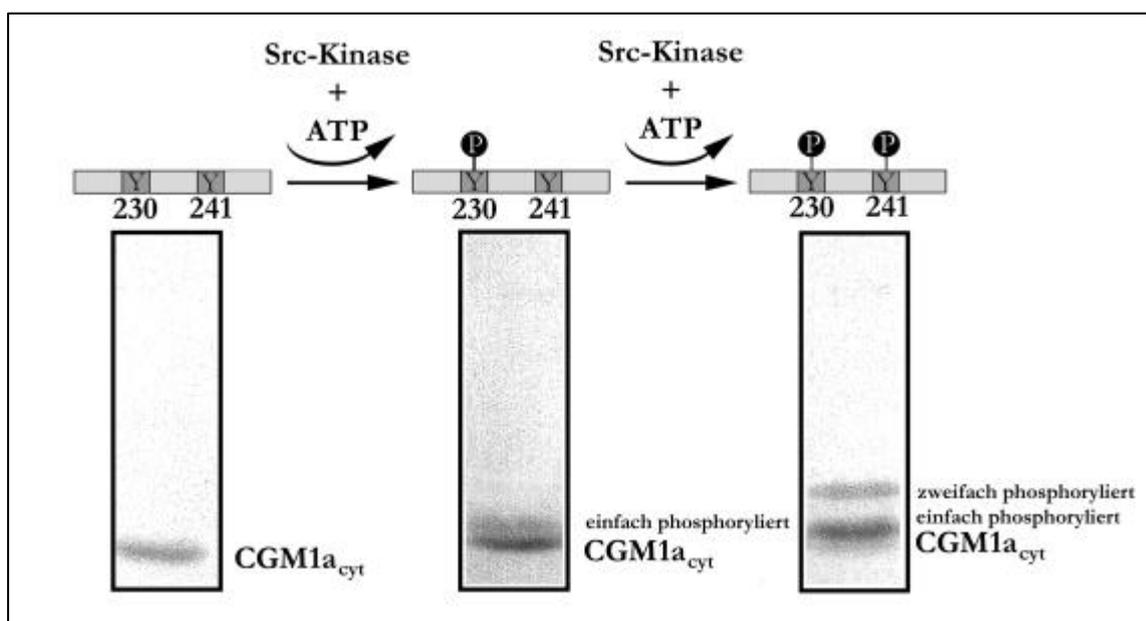


Abbildung 66: Modellvorstellung zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne durch Src-Kinase

Diese Umsetzung ließ sich nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ nachweisen, so fand sich wie oben beschrieben bei der Untersuchung der Kinetik der Reaktion eine Umsetzung hin zu der zweifach-phosphorylierten Form. Die Kinetik der Reaktion zeigt, daß das

Reaktionsgleichgewicht auf der rechten Seite, d.h. der zweifach-phosphorylierten Form liegt. Es kommt zu einer vollständigen Umsetzung der zytoplasmatischen Domäne, wobei nach Erreichen der Substratschöpfung die einfach-phosphorylierte Form an ihrem zweiten Tyrosin-Rest auch noch phosphoryliert wird. Das oben in Abbildung 66 gezeigte Modell impliziert, daß zunächst der Tyrosin-Rest an Position 230 und dann erst der Rest bei Position 241 phosphoryliert wird. Welches der beiden Tyrosine aber als erstes phosphoryliert wird, ist durch diesen Versuchsaufbau nicht zu entscheiden. Wahrscheinlich ist jedoch, daß die Phosphorylierung an dem Tyr 230 als erstes stattfindet, da es in dem besser passenden Konsensus-Motiv für die Src-Kinase liegt als der Tyrosin-Rest an Position 241.

Zusätzlich ließ sich im Rahmen dieser Experimente eine deutliche Anlagerung von γ - ^{32}P -Aktivität an die Src-Kinase beobachten. Diese Anlagerung wurde analog zu den von Barker et al. beschriebenen Experimenten als Autophosphorylierung der Src-Kinase interpretiert (siehe Abbildung 36, S.80) [Barker et al., 1995].

Da für CGM1a_{cyt} Konsensus-Motive für verschiedene Kinasen der Src-Familie beschrieben sind und bislang ungeklärt ist, welche Kinasen mit CGM1a in Wechselwirkung treten könnten, wurde eine Auswahl damals kommerziell erhältlicher Tyrosin-Kinasen untersucht. Dies waren neben der Src-Kinase die Lyn-, Lck- und Fyn-Kinase, allesamt strukturell verwandte Tyrosin-Kinasen der Src-Familie [Bolen et al., 1992; Wagener, 1996]. Für die Src-Kinase und die Lyn-Kinase sind direkte Aktivierungsvorgänge in Granulozyten beschrieben worden [Gaudry et al., 1992]. Für die Lck-Kinase und die Fyn-Kinase stehen solche Untersuchungen noch aus, lediglich Skubitz hat mit einer Auswahl von Antikörpern gegen eine Auswahl von Src-Familienmitgliedern (Yes, Src, Lck, Lyn, Fyn, Fgr und Hck) nach CD66-assoziiertes Aktivität gesucht. Allerdings konnten nur für Lyn und Hck Wechselwirkungen gezeigt werden [Skubitz et al., 1995].

Die geforderte Konsensus-Sequenz für die Fyn- und Lyn-Kinase findet sich in CGM1a je nach Motivbeschreibung mit einer errechneten Übereinstimmung von 63-88% auf Aminosäurenniveau, für die Src-Kinase liegt die Übereinstimmung bei 100% und für die Lck-Kinase bei 75%.

Der experimentelle Vergleich dieser Tyrosin-Kinasen ergab eine deutlich differentielle Phosphorylierung von CGM1a_{cyt} (siehe Abbildung 43, Abbildung 44, S. 85f), wobei die stärksten Signale für die Fyn-Kinase gefunden werden konnten, gefolgt von der Src-Kinase und mit weitaus schwächeren Signalen für die Lck- und die Lyn-Kinase. Die Experimente gaben die rechnerische Übereinstimmung auf Aminosäurenniveau in der unterschiedlich starken Phosphorylierung wieder. Wenn man die durch die Fyn-Kinase eingebaute Aktivität

als 100 % annimmt, lag die Src-Kinase mit einem Einbau von 46,3 - 62,2 % dahinter, während die Lck- und die Lyn-Kinase bei 16,7 - 25,6 % lagen. Dies ließ die Src- und die Fyn-Kinase als mögliche Bindungspartner für CGM1a besonders interessant erscheinen.

Die Funktion der Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist noch weitestgehend unbekannt. Gesichert ist, daß diese Kinasen ähnlich wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen an der Übertragung extrazellulärer Signale in die Zelle beteiligt sind. So spielt die Lck-Kinase in T-Lymphozyten eine Rolle bei der intrazellulären Übertragung von Signalen des T-Zell-Rezeptors [Wagener, 1996]. Zudem unterstellt man der Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen eine Funktion bei der Kontrolle der Zellproliferation und Differenzierung [Cheng et al., 1996], so induzieren IL-3 und GM-CSF (siehe Abbildung 2, S. 6) eine Tyrosin-Phosphorylierung einer Reihe von Proteinen. Umgekehrt können Tyrosin-Kinase Inhibitoren eine Apoptose in leukämischen Zell-Linien bewirken [Bergamaschi et al., 1993].

Die Src-Kinase hat in der molekularen Tumorforschung zwar eine überragende Rolle gespielt, in menschlichen Tumoren wurden Mutationen von Mitgliedern der Src-Familie bisher jedoch nicht beschrieben. Allerdings werden in der menschlichen kolorektalen Karzinogenese im Verlauf der Progression von Polypen über Primärtumoren bis hin zu Fernmetastasen steigende Aktivitäten der Src-Kinase beobachtet. Ferner ist die Src-Kinase mit der zytoplasmatischen Domäne von hC-CAM assoziiert. Das Adhäsionsprotein wirkt in kolorektalen Karzinomen als Tumorsuppressor [Wagener, 1996].

In Granulozyten bewirken Tyrosin-Kinasen eine Änderung der adhäsiven Eigenschaften und des Migrationsverhaltens [Gaudry et al., 1992]. Insbesondere für die Lyn-Kinase konnte nachgewiesen werden, daß sie eine Aktivierung erfährt, wenn neutrophile Granulozyten stimuliert werden [Gaudry et al., 1995].

Frühere Experimente unserer Arbeitsgruppe, die die Aktivierung der Src-Kinase untersuchten, zeigten ein weiteres interessantes Phänomen: Wenn die Src-Kinase an einem unabhängigen Substrat (Enolase) unter Zusatz der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a angreift, kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Src-Kinase-Aktivität.

Diese Eigenschaft der Aktivierung von Src-Kinase könnte z.B. über die Bindung der SH2-Domänen der Src-Kinase an die zytoplasmatische Domäne von CGM1a erfolgen. Das entsprechende Bindungsmotiv - pY,E,E,I/L- liegt in der zytoplasmatischen Domäne vor. Entsprechende Modellvorstellungen für solche Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsvorgänge existieren [Cooper und Howell, 1993; Erpel und Courtneidge, 1995].

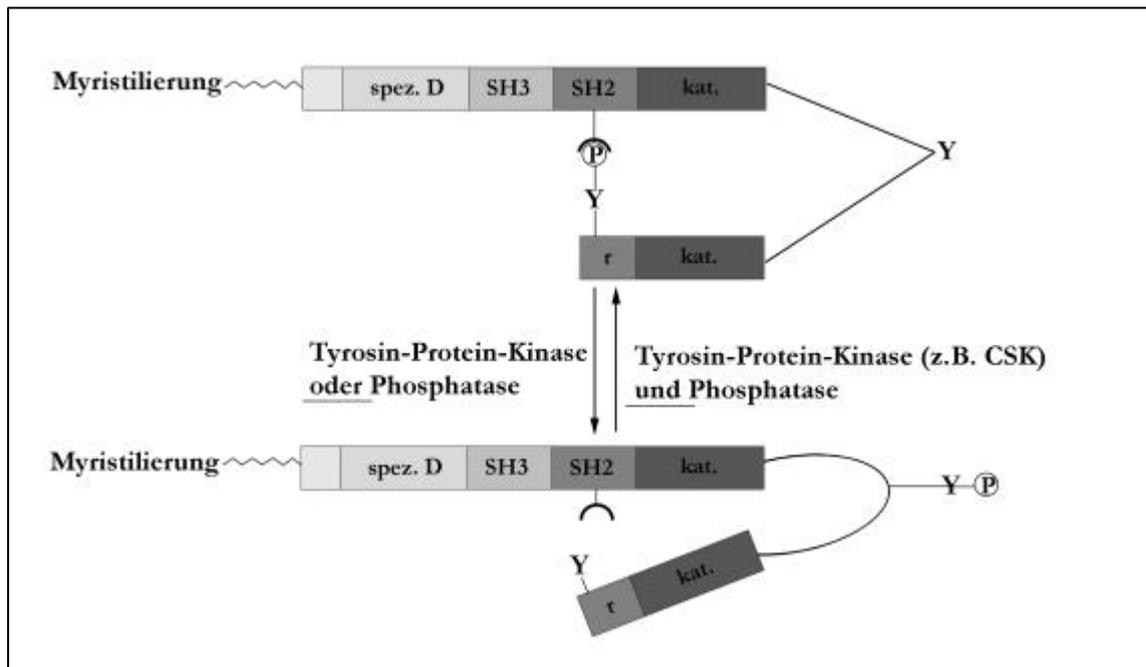


Abbildung 67: Aktivierung und Inaktivierung der Kinasen der Src-Familie [nach Wagener, 1996: *Molekulare Onkologie*]

So könnte die Src-Kinase auf zweierlei sich nicht ausschließende Weisen aktiviert werden: Zum einen könnte eine Protein-Tyrosin-Phosphatase mit der Src-Kinase interagieren, indem sie das C-terminale Tyrosin dephosphoryliert und somit zu einer Konformationsänderung und einer Autophosphorylierung führt (siehe Abbildung 67), einem Ereignis, das für die Aktivierung wichtig ist [Caron et al., 1992]. Zum anderen könnten zwischen Protein-Tyrosin-Kinasen selbst Wechselwirkungen bestehen, die zu einer Phosphorylierung der Autophosphorylierungsstelle in der *trans*-Position und somit wiederum zu Konformationsänderungen führen [Boerner et al., 1995].

In der Abbildung 67 finden sich zwei Domänen in der Src-Kinase, die mit SH2 und SH3 (Src-Homologie-Domäne) bezeichnet sind. Diese Domänen existieren in einer Vielzahl von Proteinen, die an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt sind. Die SH2-Domäne bindet an Phosphotyrosinreste in charakteristischen Aminosäuresequenzmotiven.

Die zytoplasmatische Domäne von CD66d enthält ebenso wie die von CD66a zwei potentielle Bindungsmotive für SH2-Domänen von Tyrosin-Kinasen der Src-Familie (siehe Abbildung 65). Diese Bindungsmotive sind selten in anderen Proteinen in so hoher Übereinstimmung vorhanden, was den Schluß nahelegt, daß an diesen Stellen hochaffine Bindungen möglich sind. Einen Nachweis lieferten Brümmer et al., indem sie zeigen konnten, daß korrespondierende Peptide zu den tyrosinhaltigen Domänen der zytoplasmatischen Domäne von CD66a die Src-Kinase stärker aktivieren konnten als ein Phosphopeptid aus der regulatorischen Domäne von Src [Brümmer et al., 1995]. Dies läßt CD66a und CD66d als

besonders interessante Moleküle für Signaltransduktionswege, in denen Src-Kinasen vorkommen, erscheinen.

Wenn man die mögliche Bindungssequenz der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a_{cyt} im Vergleich mit anderen Motiven sieht, die Songyang untersucht hat (Human CD3, Human vav oncogene, Human ErbB3, Human T Cell CD7 etc.), fällt auf, daß sich in keinem der beschriebenen Proteine eine 100%ige Übereinstimmung mit dem Idealmotiv – wie bei CGM1a_{cyt} der Fall - findet. CGM1a könnte am Anfang eines Signaltransduktionsweges stehen und über die Phosphorylierung der Bindungsgruppen funktionelle Proteine (Kinasen der Src-Familie) in ihrer Aktivität regulieren.

So unterstützen die SH2-Domänen die C-terminale Dephosphorylierung durch eine Phosphatase (siehe oben), indem die intramolekulare Bindung des Phosphotyrosin-Restes (siehe Abbildung 67) an die SH2-Domäne z.B. durch Kompetetion mit einem höheraffinen Phosphotyrosin-Peptid-Motiv anderer Phosphotyrosin-Proteine (z.B. CD66a und CD66d) gelöst werden. Gerade bei CD66d könnte ein kompetetiver Prozeß aufgrund des deutlich besseren SH2-Bindungsmotivs eine Rolle spielen. Die resultierende Konformationsänderung bewirkt dann die Autophosphorylierung des Tyrosin-Restes der katalytischen Domäne [Bolen, 1992; Pawson, 1995]. Diese Autophosphorylierung konnte man bei Phosphorylierungsreaktionen mit der Src-Kinase an CGM1a_{cyt} beobachten (siehe Abbildung 36, S. 80). Die Anlagerung von γ -³²P-Aktivität an die Src-Kinase bei der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne spricht für eine Modifikation der Kinase. Es könnte z.B. die oben beschriebene katalytische Domäne freigelegt werden.

Nagel hatte für CGM1a Angriffspunkte für Serin- / Threonin-Kinasen postuliert [Nagel et al. 1993]. So wurden in dieser Arbeit auch die Phosphorylierungsstellen für Serin-/ Threonin-Kinasen untersucht. Da das Thr 179 bzw. das Ser 228 in Konsensus-Motiven für PKC und CK-II liegen, wurden diese Kinasen für die *in vitro* Experimente ausgewählt.

Dazu wurde zunächst die Autophosphorylierung der Kinasen untersucht, um dann in einem zweiten Schritt CGM1a_{cyt} als Substrat einzusetzen.

Dabei erfolgte tatsächlich ein Einbau von γ -³²P-Aktivität in die zytoplasmatische Domäne von CGM1a, insbesondere bei Verwendung der Protein-Kinase C. In etwas schwächerem Maße fand sich auch eine Phosphorylierbarkeit für die Casein-Kinase I. Erstaunlicherweise fand sich dies aber nicht für die Casein-Kinase II, für die das Motiv eigentlich beschrieben war (siehe Abbildung 44 und Abbildung 45, S. 86). Auch hier ergaben sich die oben beschriebenen Laufunterschiede, allerdings konnte man keine klare Auftrennung in eine Doppelbandenstruktur erkennen, wie das für die Src-Kinase gezeigt werden konnte. Dies könnte darauf

hinweisen, daß es hier nicht zu einer zweifachen Phosphorylierung gekommen ist, sondern nur einer der beiden Reste umgesetzt wurde.

Signaltransduktionswege bilden sich häufig durch Anlagerung oder Annäherung nachgeschalteter Proteine aus [Huang et al., 1991; Ghazizadeh et al., 1994; Crabtree und Schreiber, 1996]. Dieses Prinzip kennt man sowohl von den klassischen Signalwegen als auch von Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten (Assoziation des IgG-Fc-Rezeptors II mit Src-Kinase [Hamada et al., 1993; Kiener et al., 1993; Jouvin et al., 1994]) und seit kurzem von einem Mitglied der CEA-Familie, das ähnlich wie CGM1a über eine transmembranäre und eine zytoplasmatische Domäne verfügt: BGP. Hier konnten Brümmer et al. eine direkte Assoziation von BGP mit Src-Kinase zeigen. Der Nachweis erfolgte über Immunpräzipitationen aus Granulozytenmembranpräparationen mit monoklonalen CD66a-Antikörpern und der rekombinant hergestellten zytoplasmatischen Domäne von BGP, dabei konnte direkt Phospho-Kinase-Aktivität präzipitiert werden, die dann spezifisch als Src-Kinase identifiziert werden konnte [Brümmer et al., 1995]. Entsprechend fanden Skubitz et al. assoziierte Protein-Kinase-Aktivitäten für CD66a, CD66b und CD66c [Skubitz et al., 1995]. Aufgrund des ähnlichen zytoplasmatischen Molekülaufbaus und der gezeigten Phosphorylierbarkeit sollten diese Experimente auch für CGM1a_{cyt} nachvollzogen werden. Der Vergleich der SH2-Motive von CGM1a und BGP, bezogen auf die von Songyang erhobenen Daten, ließ bei der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a eine stärkere Bindung assoziierter Kinasen erwarten als dies bei BGP der Fall war [Songyang et al., 1993].

Es wurden verschiedene Bindungsstudien durchgeführt, so wurde in Analogie zu den Experimenten von Brümmer et al. versucht, direkt Kinase-Aktivität mit CGM1a_{cyt} aus Granulozytenextrakten zu präzipitieren. Dabei fanden sich in der SDS-PAGE-Analyse keine signifikanten Unterschiede im Bandenmuster (siehe Abbildung 48 und Abbildung 49, S. 90). Die Untersuchungen lassen aufgrund der experimentellen Rahmenbedingungen keine absoluten Aussagen zu, denn assoziierte Proteine können durchaus in Mengen vorhanden sein, die mittels SDS-PAGE nicht zu detektieren sind (bei Silberfärbung 2-5 ng/ Bande). Da der Versuchsaufbau nur die Aufarbeitung relativ geringer Mengen gestattete und um die Sensitivität der Analysen zu erhöhen, wurden die experimentellen Bedingungen so verändert, daß eine Immuno-Affinitätschromatographie möglich wurde (siehe Abbildung 50, S. 91). Die Anlagerung von nachgeschalteten Proteinen könnte außerdem von dem Funktionszustand der Domäne abhängig sein. So wurde z.B. für die Bindung der Src-Kinase an SH2-Domänen eine absolute Abhängigkeit der Bindung vom Phosphorylierungszustand gezeigt [Liu et al., 1992].

Deshalb wurden in dem folgendem Versuchsaufbau die verschiedenen Zustände der zytoplasmatischen Domäne berücksichtigt. Nach den Protokollen, die bei den oben beschriebenen Phosphorylierungsexperimenten entwickelt worden sind, wurden unterschiedliche Funktionszustände der Domäne erzeugt. Es wurden also zum einen die native zytoplasmatische Domäne, die durch Src-Kinase an Tyrosin-phosphorylierte und die durch PKC an Serin- / Threonin-phosphorylierte zytoplasmatische Domäne an eine Säule gekoppelt. Dieser Ansatz lieferte dann detektierbar deutliche Unterschiede in der SDS-PAGE-Analyse. So fand sich unabhängig von dem Zustand der Domäne - das heißt sowohl bei der nativen als auch bei den phosphorylierten Formen - eine sehr distinkte Bande in Höhe von etwa 30 kD (siehe Abbildung 51 und Abbildung 52, S. 92), die sich bei den Kontrollen nicht fand. Darüber hinaus zeigten sich bei der SDS-PAGE (siehe Abbildung 53, S. 94) zwei weitere Banden in Höhe von 8 und 14 kD, die sich ebenfalls unabhängig von dem Funktionszustand der Domäne fanden. Diese Moleküle kommen jedoch aufgrund des Molekulargewichts nicht als Kinasen in Frage. Wie bei dem direkten Präzipitationsversuch ist die Sensitivität aber durch die SDS-PAGE vorgegeben. Da sich aber möglicherweise Kinasen in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von SDS-PAGE finden könnten, wurden die gesammelten Fraktionen zusätzlich in radioaktiven Assays auf Tyrosin-Kinase-Aktivität untersucht, wodurch sich die Sensitivität um ein Vielfaches erhöht. Im Gegensatz zu den für CD66a erhobenen Daten zeigte sich aber sowohl bei der Immunpräzipitation als auch bei der immun-chromatographischen Aufreinigung aus Granulozyten mit der zytoplasmatischen Domäne von CD66d keinerlei Tyrosin-Kinase-Aktivität. Dies war auch unabhängig von dem bei der Reaktion verwendeten Substrat (CGM1a_{cyt} / Enolase). Zur Sicherung dieses Ergebnisses wurde eine weitere Analyse in einem ähnlichen Sensitivitätsbereich durchgeführt: Sämtliche gewonnenen Fraktionen wurden mittels ELISA auf Tyrosin-Kinase-Aktivität untersucht, doch auch hier fanden sich keine Aktivitäten (siehe Abbildung 56, S. 97).

Die hier gewonnenen Proteine (30 kD, 8 und 14 kD) ließen keine Abhängigkeit der Bindung vom Phosphorylierungszustand erkennen. Wie die Experimente zeigten (siehe S. 88f), spielte bei CGM1a_{cyt} der Funktionszustand der eingesetzten Domäne keine Rolle. Die Ergebnisse waren sowohl für die unphosphorylierte Form als auch für die Tyrosin- bzw. Serin- / Threonin-phosphorylierten Zustände identisch. Dies könnte zum einen bedeuten, daß die Bindung dieser Proteine unabhängig von dem Zustand des Tyrosin-Restes bzw. Serin- oder Threonin-Restes erfolgt und somit die Anlagerung unabhängig ist von einem zuvor erfolgten Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsschritt. Zum anderen könnte die Bindung aber auch nicht an den beschriebenen SH2-Motiven der zytoplasmatischen Domäne erfolgen,

sondern an einer ganz anderen Position, die durch eine Phosphorylierung nicht beeinflusst wird.

Als mögliche Gegenspieler von Kinasen fungieren Phosphatasen, die den Signalfluß durch eine Dephosphorylierung unterbrechen und somit beenden können [Mouray und Dixon, 1994; Dechert et al., 1995; Denu et al., 1996; Fauman und Saper, 1996; Tonks und Neel, 1996]. Ob ein Impuls weitergeleitet wird, könnte somit von dem Verhältnis von aktiver Kinase zu aktiver Phosphatase abhängen [Hunter, 1995]. Die Rolle von Phosphatasen wird ebenfalls mit der Regulation von Zellwachstum in Verbindung gebracht [Honda et al., 1993]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Möglichkeit untersucht, daß die assoziierten Moleküle Phosphatase-Aktivitäten besitzen könnten. Die Ergebnisse des Phosphatase-Assays (ELISA, siehe Abbildung 57, S. 98) zeigten jedoch keine signifikanten Ergebnisse, sämtliche Fraktionen lieferten Werte im Bereich der Negativkontrolle. Somit fanden sich keine Hinweise in Bezug auf eine Assoziation von CGM1a_{cyt} mit Phosphatasen. Im Gegensatz dazu konnten Huber et al. die Assoziation von CD66a mit den Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 zeigen. Sie erfolgte über die beiden ITIM-(Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif) Konsensus-Sequenzen. Die Bindung von SHP-1 erfolgt dabei über zwei benachbarte N-terminale SH2-Domänen und bewirkt, sobald die Anlagerung erfolgt ist, die Dephosphorylierung. Für die initiale Anlagerung muß zumindest einer der beiden Tyrosin-Reste phosphoryliert sein. Zusätzlich scheint für die Bindung noch eine bislang nicht näher gekennzeichnete Domäne außerhalb der beiden ITIM-Motive notwendig zu sein. Diese drei Motive könnten regulativ auf die Bindung von entweder einer Kinase oder einer Phosphatase einwirken [Huber et al., 1999].

Unter der Vorstellung, daß sich in den Präzipitaten Proteine finden könnten, die in einem Signaltransduktionsweg nachgeschaltet sind und selbst modifiziert werden müssen, wurden die Präzipitate auch dahingehend untersucht, ob sie sich selbst phosphorylieren lassen. Gleichzeitig erhöht man mit dieser Analyse die Sensitivität des Versuchsaufbaus. Durch den Einbau von γ -³²Phosphat können Banden visualisiert werden, die bei der Silberfärbung nicht erfaßt werden. Es konnten jedoch auch hier keine Aktivitäten an die Präzipitate gebunden werden (siehe Abbildung 59 und Abbildung 60, S. 100f).

Der Ansatz der Immuno-Chromatographie lieferte aber Hinweise in Form verschiedener Proteine, die sich mit der zytoplasmatischen Domäne unabhängig vom Phosphorylierungszustand *in vitro* assoziierten. Es fanden sich wie oben beschrieben (siehe Abbildung 51, Abbildung 52 und Abbildung 53, S. 92f) drei Moleküle, von denen sich zwei direkt durch

Sequenzierung bzw. Antikörper identifizieren ließen. Das Protein mit dem Molekulargewicht von etwa 8 kD erwies sich dabei als Calgranulin (siehe Edman-Abbau, Abbildung 61, S. 102), die Bande bei etwa 14 kD war N-terminal blockiert und ließ sich nicht weiter untersuchen. Da Calgranulin jedoch aus einem Dimer mit den Untereinheiten A und B besteht, die mit einer Größe von ungefähr 8 und 14 kD angegeben werden [Bennet et al., 1994; Dell et al., 1996], liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei der 14 kD-Bande um den zweiten Teil von Calgranulin handelt.

Calgranulin ist unter verschiedenen Namen in der Literatur bekannt:

- Calcium Binding Protein MRP-8
- CF Ag (Cystic Fibrosis Associated Antigen)
- Leukocyte L1 Protein Light Chain
- MIF-related Protein (8kD-Chain), (Migration Inhibitory Factor)
- Oncodevelopmental Protein

Calgranulin ist Mitglied der 5100-Gen-Cluster auf Chromosom 1q21. Man findet es im Zytoplasma von Granulozyten und Makrophagen auf relativ hohem Expressionsniveau. Dabei liegt Calgranulin als Heterokomplex vor (Calgranulin A und B) und kann zwei Calcium-Ionen pro Molekül binden und somit regulierend auf den intrazellulären Calciumfluß einwirken. Die Funktionen von Calgranulin sind weitestgehend unbekannt, postuliert wurde eine Rolle bei Zellwachstum und Differenzierung, aber auch bei Immunantworten auf zellulärer Ebene [Imamichi et al., 1993]. Die Analysen von Houen et al. ergaben einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Calgranulin-Antikörpern und Autoimmunerkrankungen [Houen, 1994].

Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang die Studien von Klein et al., die zeigten, daß durch eine Antikörperbindung an den CD66-Cluster Granulozyten mit den Zeichen einer Aktivierung reagierten. So kam es zu einer Degranulation der Granula und einem Anstieg des intrazellulären Calciumflusses [Klein et al., 1996; Borregaard und Cowland, 1997].

Für CD66a ist die Bindung von Calmodulin gezeigt worden, einem Protein, das ebenfalls den intrazellulären Calciumfluß reguliert. Die Bindung dieses Proteins ist direkt abhängig von der Phosphorylierung an dem Serin 449 von CD66a. Die dafür notwendige Phosphorylierung dieses Serin-Restes erfolgte mit der Protein-Kinase C [Edlund et al., 1998].

Dabei scheint durch die Bindung von Calmodulin an CD66a die intrazelluläre Calcium-Konzentration reguliert und die homophile Adhäsion beeinflusst zu werden. So führt ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration zu einer Dissoziation der CD66a-Dimere. Die Zelle kann das Ausmaß der vorhandenen Dimere durch die Kontrolle des Calcium-

Flusses regulieren. Gleichzeitig wurde beobachtet, daß Calcium-aktiviertes Calmodulin die Dissoziation von CD66a-Dimeren *in vitro* verursachen kann [Öbrink, 1997].

Die Bande bei etwa 30 kD ließ sich aufgrund geringer Konzentrationen und Inhomogenität der Proben nicht sequenzieren. Da das Molekül aber auf der Höhe des Full-Size-CGM1a lief, wurde diese Bande mit dem im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörper untersucht. Tatsächlich ließ sich die Bande mit dem monoklonalen Antikörper, der gegen die zytoplasmatische Domäne von CGM1a gerichtet ist, markieren. Dies läßt darauf schließen, daß CD66d mit sich selbst in Wechselwirkung treten könnte. Für BGP sind solche homophilen Wechselwirkungen beschrieben [Benchimol, 1989], wobei sich die Beschreibungen auf Adhäsionsvorgänge konzentrieren, die extrazellulär stattfinden. So scheint die N-terminale IgV-artige Domäne für diese Interaktionen verantwortlich zu sein. Für eine intrazelluläre Zusammenlagerung von Molekülen des CD66-Clusters sind solche Daten bislang kaum vorhanden. In Insektenzellen (S9f) konnte für C-CAM eine homophile Adhäsion über die zytoplasmatische L-Domäne (L: Long) gezeigt werden [Cheung et al., 1993, Öbrink, 1997]. In CHO-Zellen konnte eine Adhäsion über die S-Domäne nachgewiesen werden, wobei CGM1a und BGP beide die lange zytoplasmatische Domäne besitzen. Die Tatsache, daß sich mit dem rekombinant hergestellten CGM1a_{cyt} das Gesamtmolekül CGM1a über eine Immuno-Affinitäts-Chromatographie anreichern läßt, legt den Schluß nahe, daß intrazelluläre homophile Wechselwirkungen über die zytoplasmatische Domäne von CGM1a stattfinden können.

In vitro konnte also gezeigt werden, daß die rekombinant hergestellte zytoplasmatische Domäne von CGM1a mit dem Full-Size-CGM1a assoziiert und auch eine Bindung mit Calgranulin eingeht. Die Abbildung 68 stellt ein Modell aufgrund der bekannten und den in dieser Arbeit gesammelten Daten zusammen.

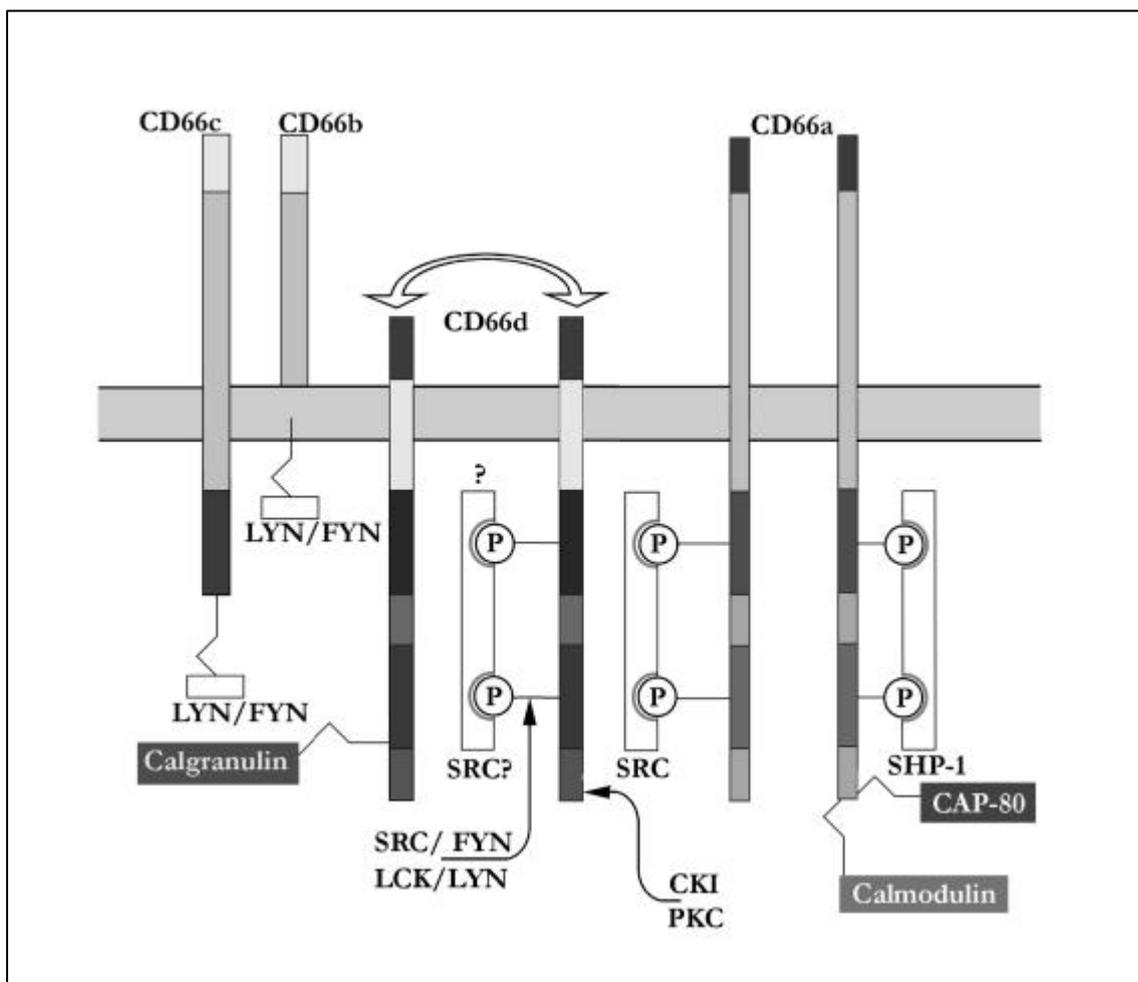


Abbildung 68: Signaltransduktion über den CD66-Cluster

Da die Zusammenlagerung von CGM1a untereinander unabhängig von dem Phosphorylierungszustand zu finden war, könnte CGM1a entweder beständig als Komplex (Dimer) in der Zelle vorliegen, oder die Kontrolle der Dimerisierung wird durch andere Domänen realisiert. Denkbar wäre auch hier eine Calcium-Abhängigkeit. Bei CD66d könnte die oben beschriebene Rolle von Calmodulin durch Calgranulin übernommen werden, so daß es mit sinkender Calcium-Konzentration zu einer Dimerisierung kommen und sich somit mehrere Moleküle in bestimmten Bereichen oder Zonen der Zelle konzentrieren könnten. Die intrazelluläre homophile Adhäsion könnte somit eine wichtige Funktion für die supramolekulare Organisation von CD66a und CD66d und den Interaktionen mit nachgeschalteten Molekülen haben [Öbrink, 1997].

Durch die Konzentration von CGM1 in bestimmten Zellbereichen könnte sich ein Proteinkomplex ausbilden. Dies könnte dann z.B. zu einer verstärkten Bindung von Kinasen der Src-Familie führen und somit einen lokalen Signalkomplex ausbilden, was jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.

In dem dargestellten CD66d-Dimer existieren Angriffspunkte für Tyrosin-Kinasen (ITAMs oder TAMs, s.o.), die in Zusammenhang mit Phagozytosevorgängen gebracht werden. Greenberg beschreibt die Mechanismen der Phagozytose, wobei die Tyrosin-Phosphorylierung eine zentrale Rolle spielt. So läßt sich z.B. die Aufnahme von Bakterien mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren verhindern. Auch das Ausschalten der ITAMs durch gezielte Mutation (Phenylalanin- anstelle der Tyrosin-Reste) führt zu dem Verlust des phagozytierenden Potentials der Zellen. Durch die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne könnten möglicherweise weitere Proteine in die räumliche Nähe des Komplexes gebracht werden. Greenberg hat dies z.B. für den Phagozytose-Rezeptor Fc_γR III gezeigt. Dort führt die Assoziation mit der Syk-Kinase zu einer Aktin-Polymerisierung und somit zu Verschiebungen im Cytoskelett, die dann eine Aufnahme des Bakteriums ermöglichen [Greenberg, 1995]. Modifizierend auf die zytoplasmatische Domäne von CGM1a können auch die Kinasen PKC und CK-I einwirken (siehe Abbildung 45, S. 87). Die Funktion bleibt unklar, jedoch werden neben den oben beschriebenen Tyrosin-Kinasen auch Serin- / Threonin-Kinasen bei dem Vorgang der Phagozytose benötigt, so erfahren die Protein-Kinasen A und C und die Casein-Kinase II eine Aktivierung. Für die PKC konnte gezeigt werden, daß es zu Beginn der Phagozytosesequenz zu einer Translokation der Kinase zur Membran und einer Aktivierung kommt, durch spezifische Hemmung dieser Kinase kann eine Phagozytose unterbunden werden [Zheleznyak und Brown, 1992]. Für den Prozeß der Phagozytose wurde ein Anstieg von freiem Ca²⁺ beobachtet. Noch ist nicht klar, ob diese Freisetzung von Ca²⁺ das Cytoskelett beeinflusst oder ob es eher die Arachidonsäureproduktion und die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom bewirkt [Greenberg, 1995].

Die ersten *in vivo* Untersuchungen von CGM1a führten 1992 McCuaig et al. durch. Der Assay war so aufgebaut, daß die Selbstadhärenz (Homotypische Bindung) untersucht wurde. Dabei zeigten mit CGM1a-transfizierte Mausfibroblasten eine Temperatur-unabhängige Adhäsionsfähigkeit, die mit entsprechenden Antikörpern blockiert werden konnte [McCuaig et al., 1992]. Ob CGM1a auch zu den von Kuijpers et al. beschriebenen Molekülen des CD66-Clusters gehörenden Molekülen gehört, die neutrophile Aggregation induzieren, bleibt aufgrund der Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper unklar. Der ähnliche Aufbau weist aber in diese Richtung [Kuijpers, 1993]. Skubitz et al. fanden hierzu einen weiteren interessanten Punkt, so konnten sie nachweisen, daß CD66a,b,c und d nach einer Stimulation deutlich stärker auf der Oberfläche von Neutrophilen exprimiert waren. Über die Stimulation dieser sogenannten Aktivierungsantigene mit spezifischen CD66-Antikörpern konnte die Adhäsion der

Neutrophilen an HUVEC-Zellen gesteigert werden. Gleichwohl konnte dieser Effekt mit einem CD18-Antikörper unterbunden werden. Skubitz schloß daraus, daß die Bindung von CD66a, CD66b, CD66c und CD66d-Antikörpern an die entsprechenden Epitope auf Granulozytenoberflächen ein vorübergehendes Signal triggern, das dann die adhäsive Aktivität von CD11/18 steigert. Dazu paßt auch die starke Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne durch die Fyn-Kinase. Die Fyn-Kinase greift über die oben angegebene Konsensus-Sequenz an. Dieses auch als ARH1 („antigen receptor homology 1“) bezeichnete Motiv in zytoplasmatischen Domänen mediiert eine Reihe von Funktionen, dazu gehören die Tyrosin-Kinase-Aktivierung, die Calcium-Freisetzung, die IL-2-Expression und die Endozytose [Clark et al., 1994].

In jüngster Zeit wurde über CGM1a berichtet im Zusammenhang mit der Bindung von Bakterien an neutrophile Granulozyten. *Neisseria gonorrhoeae* (oder transfizierte *E. coli*) exprimieren phasenabhängig sogenannte Opa-Proteine (Opacity), über die sie an Neutrophile binden und die Phagozytose derselben stimulieren. Solche Phagozytosevorgänge sind als Calcium-abhängig beschrieben worden [Della Bianca et al., 1990]. Dabei fanden Chen et al., daß die Adhärenz von Opa-Proteinen deutlich verstärkt werden konnte, wenn die Neutrophilen präaktiviert waren. Dies interpretierten sie als Hinweis auf eine Speicherung der Opa-bindenden Komponenten in sekundären Granula, von wo aus sie im Bedarfsfalle mobilisiert werden. Chen et al. konnten zeigen, daß diese Komponente ein Protein der Größe von etwa 30 kD war. Aufgrund der Vermutung, daß dieses Protein CGM1a sein könnte, führten sie Bindungsstudien an CGM1a-transfizierten HeLa-Zellen durch und fanden eine Bindung der Opa⁺-Bakterien an diese und eine anschließende Phagozytose, die mit einem CGM1a-Antikörper blockiert werden konnte [Chen et al., 1996].

Gray-Owen et al. konnten diese Resultate für die anderen Mitglieder des CD66-Cluster nachvollziehen. Sie zeigten die Bindung von Gonokokken und transfizierten *E. coli*-Stämmen, die das Opa-Protein 52 synthetisieren, an CD66 a,c,d,e-transfizierte HeLa-Zellen. Eine Bindung für CD66b konnte nicht gezeigt werden, die erhobenen Daten deuten auf eine Wechselwirkung des Opa-Proteins mit der N-terminalen Domäne hin [Gray-Owen et al., 1997].

Wenn die unterschiedlich transfizierten HeLa-Zellen auf ihre relative Fähigkeit hin, Opa⁺-Bakterien zu binden und zu phagozytieren, untersucht wurden, ergab sich das folgende Bild: Die Bindungsfähigkeit nahm in der nachstehenden Reihenfolge ab:

CEA=BGPa>CGM1a>NCA>>CGM6=Neo, dagegen war die Fähigkeit, die Invasion oder Phagozytose der Bakterien zu mediiieren, folgend:

CGM1a>CEA>BGPa>NCA>CGM6=Neo (Neo ist die Kontrolle) [Bos et al., 1997; Chen et al., 1997].

Da CEA aber nicht auf Granulozyten exprimiert wird, ist der wahrscheinlichste Kandidat für die Verstärkung der Phagozytose CGM1a. Ein möglicher Weg wäre dabei über die zytoplasmatische Domäne von CGM1a denkbar: Das Konsensus-Motiv „YLYL“ wurde von Greenberg als „immunoreceptor tyrosine activation motif“ (ITAM) beschrieben, das bei Aktivierung zu einer Aktinpolymerisation und Phagozytose führt [Greenberg, 1995].

Ergänzend findet sich hier ein früher Befund von Zheleznyak, der Immunglobulin-medierte Phagozytosevorgänge an Monozyten untersuchte und dabei eine Aktivierung der Protein Kinase C feststellen konnte, zusätzlich konnte er die Ingestion mit einem pharmakologischen PKC-Inhibitor unterbinden [Zheleznyak et al., 1992].

Dazu passend sind die Ergebnisse dieser Arbeit, die zeigen, daß sowohl die Tyrosin-Kinasen Src und Fyn als auch die Serin- / Threonin-Kinasen PKC und CK-I modifizierend auf die zytoplasmatische Domäne von CGM1a wirken können.

Die Abbildung 69 zeigt ein mögliches Modell für die Interaktion von Opa-Proteinen und neutrophilen Granulozyten über Mitglieder des CD66-Clusters.

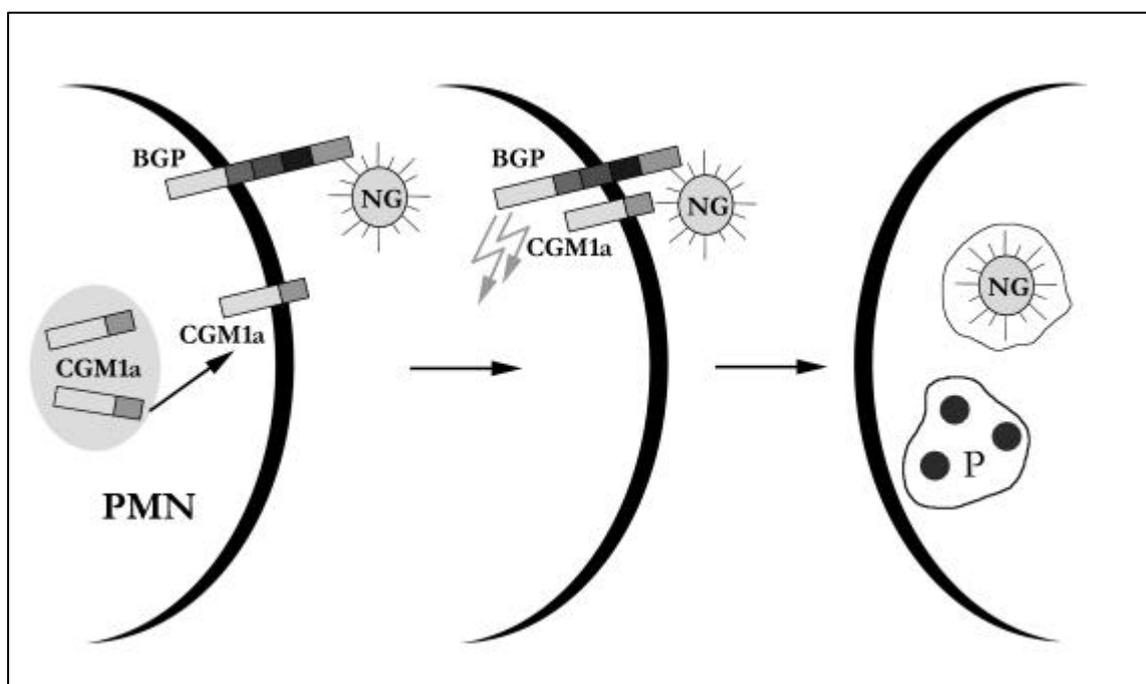


Abbildung 69: Modellvorstellung zur Interaktion von CGM1a mit Opa-Proteinen (Abkürzungen soweit nicht im Text: PMN: neutrophiler Granulozyt, NG: *Neisseria Gonorrhoeae*, P: Phagosom):

Bei der Aktivierung des neutrophilen Granulozyten kommt es zu einer verstärkten Expression von CD66-Mitgliedern. Für CD66d konnte die Speicherung in sekundären Granula gezeigt werden, aus denen es dann zu einer Mobilisation von CD66d und einer Translokation zur

Membran kommt. Die Opa⁺-Neisserien können nun mit CD66-Mitgliedern in Wechselwirkung treten. Wobei es wahrscheinlich zunächst zu einer über BGP_a vermittelten Adhäsion und in einem zweiten Schritt zu einer zusätzlichen Bindung von CGM1a kommt, das dann die Internalisation der Opa⁺-Neisserien triggert. Anschließend erfolgt der Abbau der Bakterien in den Phagosomen.

Die unterschiedliche Adhäsionsfähigkeit von CD66a und CD66d dürfte in den deutlich abweichenden extrazellulären Domänen begründet sein. Warum die Fähigkeit zur Internalisation ebenfalls differiert, ist schwerer zu begründen: Möglich ist aber eine maßgebliche Kontrolle durch die beiden SH2-Motive, die in CGM1a in einem signifikant besseren Sequenzkontext liegen. So könnte die Regulation der Phagozytose hinsichtlich der Quantität (wieviele Bakterien werden aufgenommen) und Qualität (wie schnell werden die Bakterien aufgenommen) gerade durch das (notwendige) Zusammenspiel von CD66a und CD66d realisiert werden.

CEA-Familienmitglieder weisen, wie aus cDNA-Untersuchungen geschlossen werden konnte, hohe Übereinstimmungen auf der DNA-Ebene auf [Thompson et al., 1993; Thompson et al., 1995]. Im Expressionsmuster hingegen weisen sie deutliche Unterschiede auf (siehe S. 11). Dabei sind in Bezug auf die Expression von CGM1a bislang nur wenige Daten erhoben worden. Nagel et al. versuchten mittels mRNA-Analysen CGM1a in Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten und Blutproben von CML-Patienten nachzuweisen. Gefunden wurden bei Monozyten und Lymphozyten keine oder nur schwache Signale. Allerdings konnte man CGM1a-RNA in normalen Granulozyten und Leukozyten von CML-Patienten nachweisen, wobei Nagel eine Sonde gegen die zytoplasmatische Domäne verwendete. Zusätzlich wurden Tumoren und Metastasen aus den drei Keimzellbahnen sowie einige Normalgewebe untersucht:

- Adenokarzinome des Pankreas, der Lunge, der Niere, des Magens und des Kolons,
- Muzinöse Karzinome des Ovars,
- Klein- und großzellige Karzinome der Lunge,
- Squamöse Karzinome der Gallenblase und der Lunge,
- Hepatozelluläre Karzinome,
- Osteosarkome,
- Sarkome des Ovars,
- Teratome,
- Melanome,

- Hodenkarzinome
- Milz,
- Plazenta und
- Kolonmukosa.

Auch hier konnte keine CGM1 mRNA detektiert werden.

Thompson et al. führten sensitivere Analysen durch, indem sie das Expressionsmuster mittels RT-PCR untersuchten. Analysiert wurde eine Vielzahl von Hirntumoren und gynäkologischen Tumoren, es konnten jedoch keine CGM1-Transkripte nachgewiesen werden [Thompson et al., 1993].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RNA-Untersuchungen verschiedener Gewebe bestätigen dieses Bild. Die Northern-Blots der Gewebe (siehe S. 103) zeigten nach Hybridisierung mit einer CGM1_{cyt}-Sonde (CGM1_{cyt}-PCR-Produkt) keine oder nur sehr geringe Signale. Die schwachen Signale fanden sich bei Skelettmuskel-Zellen, Milz- und Dünndarmgewebe sowie Leukozyten. Die niedrige Signalintensität ließ nicht auf eine echte Expression schließen, zumal die Aufarbeitung der Gewebe nicht blutfrei erfolgen konnte, so daß additive Effekte durch mitpräparierte Granulozyten nicht auszuschließen sind (dies gilt insbesondere für die blutreiche Milz). Die Datenlage und die Ergebnisse der durchgeführten Ergebnisse lassen auf eine ausschließliche Expression von CGM1a in Zellen der myeloischen Reihe schließen.

Um die Untersuchung nicht nur auf RNA-Niveau durchzuführen, sondern auch auf Proteinebene, stand der Nachweis mit einem spezifischen Antikörper aus. Nagel et al. testeten dazu ein Panel von Antikörpern und benutzten die monoklonalen Antikörper mAb Tu2 und mAb 73, die beide CGM1 erkennen, aber kreuzreaktiv mit CEA sind. Da CEA nicht auf Granulozyten präsent ist, konnten diese Antikörper benutzt werden, um CGM1 auf diesen nachzuweisen. Dies gelang mittels Durchfluß-Zytometrie, dennoch waren die Signale sehr schwach, was dafür spricht, daß CGM1 nur in geringen Mengen auf Granulozytenoberflächen zu finden ist [Kuijpers et al., 1993; Nagel et al., 1993].

CGM1a scheint somit ein Granulozyten-spezifisches Protein zu sein. Das könnte bedeuten, daß CGM1a auch ebenso spezifische Funktionen übernehmen könnte. Für die weitere Untersuchung des Expressionsmusters auf Proteinebene wurde in dieser Arbeit ein monoklonaler Antikörper gegen die zytoplasmatische Domäne von CGM1a hergestellt. Dies hatte den Vorteil, daß die anderen Mitglieder des CD66-Clusters bis auf CGM7, CGM1c und BGPa keine zytoplasmatischen Domänen besitzen und zusätzlich die Ähnlichkeit der zytoplasmatischen Domänen begrenzt ist. Das heißt, ein gegen die zytoplasmatische Domäne gerichteter Antikörper könnte selektiv CGM1a erkennen.

Das Ergebnis der Antikörperherstellung waren zwei Klone, die CGM1a_{cyt} sowohl im ELISA als auch im Western-Blot binden konnten: 4H1 und TS1.

Aufkonzentrierte Granulozytenmembranpräparationen, die mit diesen Antikörpern untersucht wurden, zeigten bei einem sehr sensitiven Chemilumineszenznachweis in Höhe von etwa 30 kD ein deutliches Signal. Die Höhe stimmt mit dem in der Literatur angegebenen Molekulargewichten überein, wobei die unglykosylierte Form mit einem Gewicht von 27 kD und die glykosylierte Form mit bis zu 35 kD angegeben wird [Kuroki et al., 1990].

Die Intensität der Signale war in Anbetracht der Sensitivität des Assays ebenso gering wie von Nagel et al. beschrieben, was ebenfalls für die geringe Expression von CGM1a auf Granulozyten spricht. Die Tatsache, daß sich in Granulozytenextrakten nur eine einzige Bande fand, an die der Antikörper gebunden hat, zeigt die Spezifität des generierten Antikörpers TS1. Eine Reaktion mit BGP ließ sich nicht beobachten.

Eine darüber hinausgehende *in vivo* Untersuchung weiterer Gewebe und Zellen ist mit diesem Antikörper als Werkzeug nun möglich. Weitergehende Untersuchungen könnten die gewonnenen *in vitro* Daten erhärten und in Zukunft vielleicht einen Ausblick auf die Funktion von CGM1a ermöglichen.

ZUSAMMENFASSUNG

CGM1a gehört zum CD66-Cluster (CEACAM-Gruppe) und besteht aus einer IgV-artigen Domäne, einem transmembranären Anteil und einer zytoplasmatischen Domäne. In der zytoplasmatischen Domäne finden sich Konsensus-Motive für Tyrosin-Kinasen, für Serin- und Threonin-Kinasen sowie SH2-Domänen bindende Motive. In dieser Arbeit wurde die Phosphorylierbarkeit der zytoplasmatischen Domäne von CGM1a durch die verschiedenen Kinasen untersucht und im Hinblick auf die SH2-bindenden Motive nach möglichen assoziierten Proteinen gesucht. Dabei ergaben sich folgende *in vitro* Daten:

- CGM1a_{cyt} wird durch die Src-Kinase an beiden Tyrosin-Resten quantitativ phosphoryliert. Der Vergleich von verschiedenen Kinasen der Src-Familie ergab eine differentielle Phosphorylierung und lieferte die nachstehende Reihenfolge, in der die Phosphorylierbarkeit abnahm: Fyn > Src > Lck = Lyn.
- Es zeigte sich, daß die zytoplasmatische Domäne an ihren Serin-/Threonin-Resten phosphorylierbar ist durch PKC > CK-I, nicht aber durch CK-II.
- Die Untersuchungen zur Isolierung assoziierter Proteine ergaben, daß sich aus Granulozyten mit CGM1a_{cyt} keine Tyrosin-Kinase- oder Phosphatase-Aktivitäten anreichern ließen. Des weiteren fanden sich weder Serin- / Threonin-Kinase-Aktivitäten noch phosphorylierbare Proteine in den gewonnenen Eluat.
- Es konnte *in vitro* eine Assoziation der zytoplasmatischen Domäne mit Calgranulin gezeigt werden. Zudem ergaben die Assays eine Zusammenlagerung der zytoplasmatischen Domäne mit dem Full-Size CGM1a.

Ausgehend von den bekannten Daten wurde das Expressionsmuster von CGM1a untersucht:

- CGM1a ließ sich in nachstehenden Geweben auf RNA-Ebene nicht nachweisen: Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Ovar, Dünndarm, Kolon, periphere Monozyten, Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit generierten monoklonalen Antikörper TS1, der gegen die zytoplasmatische Domäne von CGM1a gerichtet ist, ließ sich in Granulozytenextrakten eine Bande in Höhe des Full-Size CGM1a (30 kD) detektieren.

Die *in vitro* Daten dieser Arbeit im Vergleich mit der Literatur legen eine Rolle von CGM1a als Signaltransduktionsmolekül nahe, wobei die Generierung des monoklonalen Antikörpers zukünftige *in vivo* Untersuchungen möglich macht.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen, soweit im Text nicht erklärt:

µm	Mikrometer
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BGP	Biliäres Glykoprotein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Komplementfaktoren
CD	Cluster of Differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CGM	CEA Group Member
Cyt	Zytoplasmatische Domäne
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
His	Histidin
HR	High Range
Ig	Immunglobulin
kD	Kilo Dalton
LR	Low Range
mAb	monoklonaler Antikörper
MAC	Membranangriffskomplex
Mb	Megabasenpaare
MHC	Major Histocompatibility Complex
Na	Natrium
NCA	Non Specific Crossreacting Antigen
NK-Zellen	Natural Killer-Zellen
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
POD	Peroxidase
P-Tyr	Phosphotyrosin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser, S	Serin
TEMED	Tetraethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Tyr, Y	Tyrosin
U	Unit (Enzymeinheit)

LITERATURVERZEICHNIS

Abate, C., D., L., Gentz, R., Rauscher, F. J. d., and Curran, T. (1990). Expression and Purification of the Leucine Zipper and DNA-Binding Domains of Fos and Jun: both Fos and Jun contact DNA directly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *87(3)*, 1032-1036.

Afar, D. E. H., Stanners, C. P., and Bell, J. C. (1992). Tyrosine Phosphorylation of Biliary Glycoprotein, a Cell Adhesion Molecule related to Carcinoembryonic Antigen. *Biochimica et Biophysica Acta* *1134*, 46-52.

Baier, G., Baier-Bitterlich, G., Couture, C., Telford, D., Giampa, L., and Altman, A. (1994). An Efficient Expression, Purification and Immunodetection System for Recombinant Gene Products. *Biotechniques* *17*, 94,96,98-99.

Barker, S. C., Kassel, D. B., Weigl, D., Huang, X., Luther, M. A., and Knight, W. B. (1995). Characterization of pp60^{C-SRC} Tyrosine Kinase Activities Using a Continuous Assay: Autoactivation of the Enzyme is an Intermolecular Autophosphorylation Process. *Biochemistry* *34*, 14843-14851.

Beatty, B. G., Paxton, R. J., Sheibani, K., Duda, R. B., Williams, L. E., Shively, J. E., and Beatty, J. D. (1986). Testis imaging with In-Labeled anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibody: Identification of carcinoembryonic antigen in normal germ cells. *Cancer Res.* *46*, 6503-6508.

Benchimol, S. (1989). CEA, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* *57*, 327-334.

Bennett, J., Drettler, S., Selengut, J., and Orme-Johnson, W. (1994). Identification of the calcium-binding protein calgranulin in the matrix of struvite stones. *J Endourol* *8(2)*, 95-98.

Bergamaschi, G., Rosti, V., Danova, M., Ponchio, L., Lucotti, C., and Cazzola, M. (1993). Inhibitors of Tyrosine Phosphorylation Induce Apoptosis in Human Leukemic Cell Lines. *Leukemia* *7*, 2012-2018.

Berling, B., Kolbinger, F., Grunert, F., Thompson, J., Brombacher, F., Buchegger, F., von Kleist, S., and Zimmermann, W. (1990). Cloning of a carcinoembryonic antigen family member expressed in leukocytes of chronic myeloid leukemia patients and bone marrow. *Cancer Res.* *50*, 6534-6539.

Boehm, M. K., Mayans, M. O., Thornton, J. D., Begent, R. H. J., Keep, P. A., and Perkins, S. J. (1996). Extended Glycoprotein Structure of the Seven Domains in Human Carcinoembryonic Antigen by X-ray and Neutron Solution Scattering and an Automated Curve Fitting Procedure: Implications for Cellular Adhesion. *J. Mol. Biol.* *259*, 718-736.

Boerner, R. J., Kassel, D. B., Edison, A. M., and Knight, W. B. (1995). Examination of the Dephosphorylation Reactions Catalyzed by pp60^{C-SRC} Tyrosine Kinase Explores the Roles of Autophosphorylation and SH2 Ligand

Binding. *Biochemistry* 34, 14852-14860.

Bolen, J. B., Rowley, R. B., Spana, C., and Tsygankov, A. Y. (1992). The Src Family of Tyrosine Protein Kinases in Hemopoietic Signal Transduction. *FASEB J.* 6, 3403-3409.

Borregaard, N., and Cowland, J. B. (1997). Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood* 89, 3503-3521.

Bos, M. P., Grunert, F., and Belland, R. J. (1997). Differential Recognition of Members of the Carcinoembryonic Antigen Family by Opa Variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and Immunity* 65, 2353-2361.

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing of Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brandriff, B. F., Gordon, L. A., Tynan, K. T., Olsen, A. S., Mohrenweiser, H. W., Fertitta, A., Carrano, A. V., and Trask, B. J. (1991). Order and Genomic Distances among Members of the Carcinoembryonic Antigen (CEA) Gene Family Determined by Fluorescence in Situ Hybridization. *Genomics* 12, 773-779.

Brümmer, J., Neumaier, M., Göpfert, C., and Wagener, C. (1995). Association of pp60^{C-SRC} with Biliary Glycoprotein (CD66a), an Adhesion Molecule of the Carcinoembryonic Antigen Family Downregulated in Colorectal Carcinomas. *Oncogene* 11, 1649-1655.

Bush, G., Tassin, A., Friden, H., and Meyer, D. (1991). Secretion in Yeast. Purification and in Vitro Translocation of Chemical Amounts of Prepro-Alpha-Factor. *J. Biol. Chem.* 266(21), 13811-13814.

Caron, L., Abraham, N., Pawson, T., and Veillette, A. (1992). Structural requirements for enhancement of T-cell responsiveness by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *Mol. Cell. Biol.* 12(6), 2720-2729.

Casey, J., Keep, P., Chester, K., Robson, L., Hawkins, R., and Begent, R. (1995). Purification of Bacterially Expressed Single Chain Fv Antibodies for Clinical Applications Using Metal Chelate Chromatography. *J. Immunol. Methods* 179, 105-116.

Chen, T., and Gotschlich, E. C. (1996). CGM1a Antigen of Neutrophils, a Receptor of Gonococcal Opacity Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci* 93, 14851-14856.

Chen, T., Grunert, F., Medina-Marino, A., and Gotschlich, E. C. (1997). Several Carcinoembryonic Antigens (CD66) Serve as Receptors for Gonococcal Opacity Proteins. *J. Exp. Med.* 185, 1557-1564.

Cheng, J., Daimaru, L., Fennie, C., and Lasky, L. A. (1996). A Novel Protein Tyrosine Phosphatase Expressed in $lin^{lo} CD34^{hi} Sca^{hi}$ Hematopoietic Progenitor Cells. *Blood* 88, 1156-1167.

- Cheung, P. H., Culic, O., Qiu, Y., Earley, K., Thompson, N., Hixson, D. C., and Lin, S. H. (1993). The cytoplasmic domain of C-CAM is required for C-CAM-mediated adhesion function: studies of a C-CAM transcript containing an unspliced intron. *Biochem. J.* *295*, 427-435.
- Clark, M. R., Johnson, S. A., and Cambier, J. C. (1994). Analysis of Ig- α -tyrosine Kinase Interaction Reveals Two Levels of Binding Specificity and Tyrosine Phosphorylated Ig- α Stimulation of Fyn Activity. *The EMBO Journal* *13*, 1911-1919.
- Cleaveland, J. S., Kiener, P. A., Hammond, D. J., and Schacter, B. Z. (1990). A Microtiter-Based Assay for the Detection of Protein Tyrosine Kinase Activity. *Analytical Biochemistry* *190*, 249-253.
- Cohen, G. B., Ren, R., and Baltimore, D. (1995). Modular Binding Domains in Signal Transduction Proteins. *Cell* *80*, 237-248.
- Cooper, J. A., and Howell, J. (1993). The When and How of Src Regulation. *Cell* *73*, 1051-1054.
- Crabtree, G. R., and Schreiber, S. L. (1996). Three-Part Inventions: Intracellular Signaling and Induced Proximity. *TIBS* *21*, 418-422.
- Dechert, U., Affolter, M., Harder, K. W., Matthews, J., Owen, P., Clark-Lewis, I., Thomas, M. L., Aebersold, R., and Jirik, F. R. (1995). Comparison of the Specificity of Bacterially Expressed Cytoplasmic Protein-Tyrosine Phosphatases SHP and SH-PTP2 Towards Synthetic Phosphopeptide Substrates. *Eur. J. Biochem.* *231*, 673-681.
- Dell, A. E. C., Schleicher, C. H., Simpson, R. J., and Santome, J. A. (1996). Complex assembly of calgranulins A and B, two S100-like calcium binding proteins from oig granulocytes. *Int J Biochem Cell Biol* *28(1)*, 53-62.
- Della Bianca, V., Grzeskowiak, M., and Rossi, F. (1990). Studies on Molecular Regulation of Phagocytosis and Activation of the NADPH Oxidase in Neutrophils. *The Journal of Immunology* *144*, 1411-1417.
- Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A., and Dixon, J. E. (1996). Form and Function in Protein Dephosphorylation. *Cell* *87*, 361-364.
- Ding, Y.-P., Remmers, E. F., Du, Y., Longman, R. E., Goldmuntz, E. A., Zha, H., Kotake, S., Cannon, G. W., Griffiths, M. M., and Wilder, R. L. (1996). Genetic Maps of Polymorphic DNA Loci on Rat Chromosome 1. *Genomics* *36*, 320-327.
- Edlund, M., Wikstrom, K., Toomik, R., Ek, P., and Obrink, B. (1998). Characterization of protein Kinase C mediated phosphorylation of the short cytoplasmic domain isoform of C-CAM. *FEBS-Lett* *425*, 166-170.
- Erpel, T., and Courtneidge, S. A. (1995). Src Family Protein Tyrosine Kinases and Cellular Signal Transduction Pathways. *Current Opinion in Cell Biology* *7*, 176-182.

- Fauman, E. B., and Saper, M. A. (1996). Structure and Function of the Protein Tyrosine Phosphatases. *TIBS* 21, 413-417.
- Fischer, W. H., Karr, D., Jackson, B., Park, M., and Vale, W. (1991). Microsequence Analysis of Proteins Purified by Gel Electrophoresis. *Methods in Neurosciences* 6, 69-84.
- Garrsion, J. C. (1993). Study of protein phosphorylation in intact cells. In *Protein Phosphorylation - A Practical Approach*, D. G. Hardie, ed. (New York: Oxford University Press), pp. 1-30.
- Gaudry, M., Caon, A. C., Gilbert, C., Lille, S., and Naccache, P. H. (1992). Evidence for the Involvement of Tyrosine Kinases in the Locomotory Responses of Human Neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 51, 103-108.
- Gaudry, M., Gilbert, C., Brabe, F., Poubelle, P. E., and Naccache, P. H. (1995). Activation of *Lyn* is a Common Element of the Stimulation of Human Neutrophils by Soluble and Particulate Agonists. *Blood* 86, 3567-3574.
- Gentz, R., Chen, C. H., and Rosen, C. A. (1989). Bioassay for Trans-Activation using Purified Human Immunodeficiency Virus Tat-Encoded Protein: Trans-Activation Requires mRNA Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(3), 821-824.
- Ghazizadeh, S., Bolen, J. B., and Fleit, H. B. (1994). Physical and Functional Association of Src-related Protein Tyrosine Kinases with FcγRIII in Monocytic THP-1 Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 8878-8884.
- Godfraind, C., Langreth, S. G., Cardellichio, C. B., Knobler, R., Coutelier, J.-P., Dubois-Dalcq, M., and Holmes, K. V. (1995). Tissue and Cellular Distribution of an Adhesion Molecule in the Carcinoembryonic Antigen Family That Serves as a Receptor for Mouse Hepatitis Virus. *Laboratory Investigation* 73, 615-627.
- Gray-Owen, S. D., Dehio, C., Haude, A., Grunert, F., and Meyer, T. F. (1997). CD66 Carcinoembryonic Antigens Mediate Interactions between Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* and Human Polymorphonuclear Phagocytes. *The EMBO Journal* 16, 3435-3445.
- Greenberg, S. (1995). Signal Transduction of Phagocytosis. *Trends in Cell Biology* 5, 93-99.
- Hamada, F., Aoki, M., Akiyama, T., and Toyoshima, K. (1993). Association of Immunoglobulin G Fc Receptor II with Src-like Protein-Tyrosine Kinase FcγR in Neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 6305-6309.
- Hanenberg, H., Baumann, M., Quentin, I., Nagel, G., Grosse-Wilde, H., von Kleist, S., Göbel, U., Burdach, S., and Grunert, F. (1994). Expression of the CEA Gene Family Members NCA-50/90 and NCA-160 (CD66) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemias (ALLs) and in Cell Lines of B-Cell Origin. *Leukemia* 8, 2127-2133.
- Hashimoto, S., Mohrenweiser, H. W., Gregersen, P. K., and Chiorazzi, N. (1994). Chromosomal Localization, Genomic Structure, and Allelic Polymorphism of the Human CD79a (Ig-a/mb-1) Gene. *Immunogenetics* 40.

- Hengen, P. (1995). Purification of His-Tag Fusion Proteins from Escherichia Coli. *Trends Biochem Sci* 20, 285-286.
- Hochuli, E., Dobeli, H., and Schacher, A. (1987). New Metal Chelate Adsorbent Selective for Proteins and Peptides Containing Neighbouring Histidine Residues. *J-Chromatogr* 411, 177-184.
- Hochuli, E. (1988). Large-Scale Chromatography of Recombinant Proteins. *J-Chromatogr* 444, 293-302.
- Hochuli, E. (1990). Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Adsorbent. *Genet-Eng-N-Y* 12, 87-98.
- Honda, H., Shibuya, M., Chiba, S., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1993). Identification of Novel Protein-Tyrosine Phosphatases in a Human Leukemia Cell Line, F-36P. *Leukemia* 7, 742-746.
- Hostetter, R. (1990). CEA as selective enhancer of colorectal cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 82, 380-385.
- Houen, G., and Koch, C. (1994). Human placental calreticulin: purification and association with other proteins. *Acta Chem Scand* 48 (11), 905-911.
- Huang, M.-H., Bolen, J. B., Barnwell, J. W., Shattil, S. J., and Brugge, J. S. (1991). Membrane Glycoprotein IV (CD36) is Physically Associated with the Fyn, Lyn and Yes Protein-Tyrosine Kinases in Human Platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7844-7848.
- Huber, M., Izzi, L., Grondin, P., Houde, C., Kunath, T., Veillette, A., and Beauchemin, N. (1999). The Carboxyl-terminal Region of Biliary Glycoprotein Controls Its Tyrosine Phosphorylation and Association with Protein-tyrosine Phosphatases SHP-1 and SHP-2 in Epithelial Cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 274, 335-344.
- Hunter, T., and Sefton, B. M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1311ff.
- Hunter, T. (1995). Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell* 80, 225-236.
- Imamichi, T., Uchida, I., Wahl, S. M., and McCartney-Francis, N. (1993). Expression and cloning of migration inhibitory factor related protein (MRP)8 and MRP14 in arthritis-susceptible rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 819-825.
- Isakov, N. (1998). ITAMs: immunoregulatory scaffolds that link immunoreceptors to their intracellular signalling pathways. *Receptors-Channels* 5, 243-253.
- Jouvin, M.-H. E., Adamczewski, M., Numerof, R., Letourneur, O., Valle, A., and Kinet, J.-P. (1994). Differential Control of the Tyrosine Kinases Lyn and Syk by the Two Signaling Chains of the High Affinity Immunoglobulin E

Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 5918-5925.

Keegan, A. D., and Paul, W. E. (1992). Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signalling pathways. *Immunol. Today* 13, 63-68.

Kempf, A., Zanger, U., and Meyer, U. (1995). Truncated Human P450 2D6: Expression in *Escherichia coli*, Ni(2+)-Chelate Affinity purification, and Characterization of Solubility and Aggregation. *Arch Biochem Biophys* 321, 277-288.

Khan, W. N., Frångsmyr, L., Teglund, S., Israelsson, A., Bremer, K., and Hammarström, S. (1992). Identification of Three New Genes and Estimation of the Size of the Carcinoembryonic Antigen Family. *Genomics* 14, 384-390.

Kiener, P. A., Rankin, B. M., Burkhardt, A. L., Schieven, G. L., Gilliland, L. K., Rowley, R. B., Bolen, J. B., and Ledbetter, J. A. (1993). Cross-linking of Fcγ Receptor I (FcγRI) and Receptor II (FcγRII) on Monocytic Cells Activates a Signal Transduction Pathway Common to Both Fc Receptors That Involves the Stimulation of p72 Syk Protein Tyrosine Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 24442-24448.

Kim, J., Kaye, F. J., Henslee, J. G., Shively, J. E., Park, J. G., Lai, S. L., Linnoila, R. I., Mulshine, J. L., and Gazdar, A. F. (1992). Expression of carcinoembryonic antigen and related genes in lung and gastrointestinal cancers. *Int. J. Cancer* 52, 718-725.

Kishimoto, T., Kikutani, H., Von dem Borne, A. E. G. K., Goyert, S. M., Mason, D. Y., Miyasaka, M., Moretta, L., Okumura, K., Shaw, S., Springer, T. A., Sugamura, K., and Zola, H. (1997). *Leukocyte Typing VI* (New York & London: Garland Publishing, Inc.).

Klausner, R. D., and Samelson, L. E. (1991). T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* 64(5), 875-878.

Klein, M. L., McGhee, S. A., Baranian, J., Stevens, L., and Hefta, S. A. (1996). Role of Nonspecific Cross-Reacting Antigen, a CD66 Cluster Antigen, in Activation of Human Granulocytes. *Infection and Immunity* 64, 4574-4579.

Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C., and Pawson, T. (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signalling proteins. *Science* 252, 668-674.

Kuijpers, T. W., van der Schoot, E., Hoogerwerf, M., and Roos, D. (1993). Cross-Linking of the Carcinoembryonic Antigen-Like Glycoproteins CD66 and CD67 Induces Neutrophil Aggregation. *The Journal of Immunology* 151, 4934-4940.

Kuroki, M., Arakawa, F., Matsuo, Y., Oikawa, S., Misumi, Y., Nakazato, H., and Matsuoka, Y. (1991). Molecular Cloning of Nonspecific Cross-reacting Antigens in Human Granulocytes. *The Journal of Biological Chemistry*

266, 11810-11817.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Law, D. A., Chan, V. W. F., Datta, S. K., and DeFranco, A. L. (1993). B-cell Antigen Receptor Motifs have Redundant Signalling Capabilities and Bind the Tyrosine Kinases PTK72, Lyn and Fyn. *Current Biology* 3, 645-657.

Leusch, H. (1991). Binding of E coli and salmonella strains to members of the CEA family: differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose. *Infect Immun* 59, 2051-2057.

Lindner, P., Guth, B., Wülfing, C., Krebber, C., Steipe, B., Müller, F., and Plückthun, A. (1992). Purification of Native Proteins from the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli* Using IMAC and Histidine Tails: A Comparison of Proteins and Protocols. *Methods* 4, 41-56.

Liu, X., Brodeur, S. R., Gish, G., Songyang, Z., Cantley, L. C., Laudano, A. P., and Pawson, T. (1993). Regulation of c-Src Tyrosine Kinase Activity by the Src SH2 Domain. *Oncogene* 8, 1119-1126.

McCuaig, K., Turbide, C., and Beauchemin, N. (1992). mmCGM1a: A Mouse Carcinoembryonic Antigen Gene Family Member, Generated by Alternative Splicing, Functions as an Adhesion Molecule. *Cell Growth & Differentiation* 3, 165-174.

Metze, D., Bhardwaj, R., Amann, U., Eades-Perner, A.-M., Neumaier, M., Wagener, C., Jantschkeff, P., Grunert, F., and Luger, T. A. (1996). Glycoproteins of the Carcinoembryonic Antigen (CEA) Family Are Expressed in Sweat and Sebaceous Glands of Human Fetal and Adult Skin. *J. Invest. Dermatol.* 106, 64-69.

Mims, Playfair, Roitt, Wakelin, Williams, and Roy. (1993). *Medical Microbiology* (Mosby, London).

Miron, T., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M., and Geiger, B. (1991). A 25-kD Inhibitor of Actin Polymerization Is a Low Molecular Mass Heat Shock Protein. *The Journal of Cell Biology* 114, 255-261.

Mourey, R. J., and Dixon, J. E. (1994). Protein Tyrosine Phosphatases: Characterization of Extracellular and Intracellular Domains. *Current Opinion in Genetics and Development* 4, 31-35.

Nagel, G., Grunert, F., Kuijpers, T. W., Watt, S. M., Thompson, J., and Zimmermann, W. (1993). Genomic Organization, Splice Variants and Expression of *CGM1*, a CD66-Related Member of the Carcinoembryonic Antigen Gene Family. *Eur. J. Biochem.* 214, 27-35.

Nap, M., Mollgard, K., Burtin, P., and Fleuren, G. J. (1988). Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumor Biol* 9, 145-153.

- Neumaier, M., Zimmermann, W., Shively, L., Hinoda, Y., Riggs, A. D., and Shively, J. E. (1988). Characterization of a cDNA clone for the nonspecific cross-reacting antigen (NCA) and a comparison of NCA and carcinoembryonic antigen (CEA). *J. Biol. Chem.* *263*, 3202-3207.
- Öbrink, B. (1997). CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Current Opinion In Cell Biology* *9*, 616-626.
- Pawson, T., and Schlessinger, J. (1993). SH2 and SH3 Domains. *Current Biology* *3*.
- Pawson, T. (1995). Protein Modules and Signalling Networks. *Nature* *373*, 573-579.
- Paxton, R. (1987). Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: Identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family. *PNAS* *84*, 920.
- Pinna, L. A. (1990). Casein kinase 2: an eminence grise in cellular regulation? *Biochem. Biophys. Acta* *1054*, 267-284.
- Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Loning, T., and Wagener, C. (1996). CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family is expressed in epithelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem* *44* (1), 35-41.
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue [letter]. *Nature* *338(6214)*, 383-384.
- Roitt, Bortstoff, and Male. (1995). *Kurzes Lehrbuch der Immunologie* (Stuttgart: Georg-Thieme Verlag).
- Skubitz, K. M., Mendiola, J. R., and Collett, M. S. (1988). CD15 Monoclonal Antibodies react with a Phosphotyrosine-Containing Protein on the Surface of Human Neutrophils. *The Journal of Immunology* *141*, 4318-4323.
- Skubitz, K. M., Ducker, T. P., Skubitz, A. P. N., and Goueli, S. A. (1993). Antiserum to Carcinoembryonic Antigen Recognizes a Phosphotyrosine-Containing Protein in Human Colon Cancer Cell Lines. *FEBS* *318*, 200-204.
- Skubitz, K. M., Campbell, K. D., Ahmed, K., and Skubitz, A. P. N. (1995). CD66 Family Members are Associated with Tyrosine Kinase Activity in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology* *155*, 5382-5390.
- Skubitz, K. M., Campbell, K. D., and Skubitz, A. P. N. (1996). CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each Independently Stimulate Neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* *60*, 106-117.
- Skubitz, K. M., Campbell, K. D., and Skubitz, A. P. N. (1997 a). CD50 Monoclonal Antibodies Inhibit Neutrophil Activation. *The Journal of Immunology* *159*, 820-828.

- Skubitz, K. M., Grunert, F., Jantscheff, P., Kuroki, M., and Skubitz, A. (1997b). CD66 family Workshop Panel report. In *Leukocyte Typing VI*, T. Kishimoto, H. Kikutani, A. E. G. K. Von dem Borne, S. M. Goyert, D. Y. Mason, M. Miyasaka, L. Moretta, K. Okumura, S. Shaw, T. A. Springer, K. Sugamura and H. Zola, eds. (New York & London: Garland Publishing), pp. 992-1000.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., Neel, B. G., Birge, R. B., Fajardo, J. E., Chou, M. M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B., and Cantley, L. C. (1993). SH2 Domains Recognize Specific Phosphopeptide Sequences. *Cell* 72, 767-778.
- Songyang, Z., Carraway III, K. L., Eck, M. J., Harrison, S. C., Feldmann, R., Mohammadi, M., Schlessinger, J., Hubbard, S. R., Smith, D. P., Eng, C., Lorenzo, M. J., Ponder, B. A. J., Mayer, B. J., and Cantley, L. C. (1995). Catalytic Specificity of Protein-Tyrosine Kinases is Critical for Selective Signalling. *Nature* 373, 536-539.
- Stocks, S. C., Ruchaud-Sparagano, M.-H., Kerr, M. A., Grunert, F., Haslett, C., and Dransfield, I. (1996). CD66: Role in the Regulation of Neutrophil Effector Function. *Eur. J. Immunol.* 26, 2924-2932.
- Stoffel, A. (1993). Immunchemische Charakterisierung der Domänenstruktur von Isoformen des Zell-Adhäsionsmoleküls Biliäres Glykoprotein. In *Fachbereich Chemie (Hamburg: Universität Hamburg)*, pp. 97.
- Stoffel, A., Neumaier, M., Gaida, F., Fenger, U., Drzeniek, Z., Haubeck, H., and Wagener, C. (1993). Monoclonal, antidomain and anti-peptide antibodies assign the molecular weight 160,00 granulocyte antigen of the CD66 cluster to a mRNA species encoded by the biliary Glycoprotein gene, a member of the carcinoembryonic antigen gene family. *J. Immunol.* 150, 4978-4984.
- Teixeira, A. M., Fawcett, J., Simmons, D. L., and Watt, S. M. (1994). The N-Domain of the Biliary Glycoprotein (BGP) Adhesion Molecule Mediates Homotypic Binding: Domain Interactions and Epitope Analysis of BGPc. *Blood* 84, 211-219.
- Tezuka, M., Ito, K., Ito, M., and Sato, Y. (1989). A monoclonal antibody study of carcinoembryonic antigen (CEA) in skin and skin tumours. *Jpn. J. Dermatol.* 99, 697-707.
- Thompson, J. A., Mauch, E.-M., Chen, F.-S., Hinoda, Y., Schrewe, H., Berling, B., Barnert, S., von Kleist, S., Shively, J. E., and Zimmermann, W. (1989). Analysis of the Size of Carcinoembryonic Antigen (CEA) Gene Family: Isolation and Sequencing of N-Terminal Domain Exons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 158, 996-1004.
- Thompson, J. A., Grunert, F., and Zimmermann, W. (1991). The carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* 5, 344-366.
- Thompson, J., Zimmermann, W., Osthus-Bugat, P., Schleussner, C., Eades-Perner, A.-M., Barnert, S., von Kleist, S., Willcocks, T., Craig, I., Tynan, K., Olsen, A., and Mohrenweiser, H. (1992). Long-Range Chromosomal Mapping of the Carcinoembryonic Antigen (CEA) Gene Family Cluster. *Genomics* 12, 761-772.

- Thompson, J., Mössinger, S., Reichardt, V., Engels, U., Beauchemin, N., Kommoss, F., von Kleist, S., and Zimmermann, W. (1993). A Polymerase-Chain-Reaction Assay for the Specific Identification of Transcripts Encoded by Individual Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Gene-Family Members. *Int. J. Cancer* 55, 311-319.
- Thompson, J. A. (1995). Molecular Cloning and Expression of Carcinoembryonic Antigen Gene Family Members. *Tumor Biol.* 16, 10-16.
- Tonks, N. K., and Neel, B. G. (1996). From Form to Function: Signaling by Protein Tyrosine Phosphatases. *Cell* 87, 365-368.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350-4354.
- Wagener, C. (1996). *Molekulare Onkologie* (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).
- Watt, S. M., Fawcett, J., Murdoch, S. J., Teixeira, A. M., Gschmeissner, S. E., Hajibagheri, N. M. A. N., and Simmons, D. L. (1994). CD66: Identifies the Biliary Glycoprotein (BGP) Adhesion Molecule: Cloning, Expression, and Adhesion Functions of the BGPc Splice Variant. *Blood* 84, 200-210.
- Weiss, A. (1993). T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* 73(2), 209-212.
- Wilson, C. M. (1983). Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Methods Enzymol* 91, 236-247.
- Woodgett, J. R., Gould, K. L., and Hunter, T. (1986). Substrate specificity of protein kinase C: Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *Eur. J. Biochem.* 161, 177-184.
- Zhao, Z., Bouchard, P., Diltz, C. D., Shen, S.-H., and Fischer, E. H. (1993). Purification and Characterization of a Protein Tyrosine Phosphatase Containing SH2 Domains. *The Journal Of Biological Chemistry* 268, 2816-2820.
- Zheleznyak, A., and Brown, E. J. (1992). Immunoglobulin-mediated Phagocytosis by Human Monocytes Requires Protein Kinase C Activation. *The Journal Of Biological Chemistry* 267, 12042-12048.

DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich hier bei Herrn Prof. Dr. C. Wagener für die Möglichkeit der Promotion und die Überantwortung des Themas bedanken.

Des weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Jens Brümmer, der als mein Betreuer und Arbeitsgruppenleiter nicht nur fachlich versiert war.

Die Zahl derer, denen ich im Labor danken muß, ist groß!

Die Arbeit wäre nicht zu diesem Aussehen gelangt, hätte mich nicht Anke bei der grafischen Gestaltung mit viel Routine unterstützt.

Und wem hätte ich mehr zu danken als meinen Eltern!

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Thomas Streichert
Geburtsdatum: 6.11.1971
Geburtsort: Johannesburg (Südafrika)
Nationalität: Deutsch
Familienstand: Ledig
Konfession: Evangelisch-lutherisch
Studienadresse: Emil-Andresen-Str. 34c/6.2.A, 22529 Hamburg
Meldeadresse: Am Gehäge 14, 30827 Garbsen

Ausbildung:

Schulische Ausbildung:

- Besuch der Grundschule (Garbsen/Berenbostel) 1978 - 1982
- Besuch der Orientierungsstufe (Garbsen/Berenbostel) 1982 - 1984
- Besuch des Gymnasiums (Garbsen/Berenbostel):
 - Sekundarstufe I von 1984 - 1988
 - Sekundarstufe II von 1988 bis Juni 1991 mit
Abschluß Abitur

Universitäre Ausbildung:

- Beginn des Studiums der Humanmedizin zum Wintersemester (15.10.1992) an dem
Universitätskrankenhaus Eppendorf / Hamburg
- Physikum und Eintritt in die Klinik am 31.8.1994
- 1. Staatsexamen am 19.9.1995
- 2. Staatsexamen am 15.9.1998
- Praktisches Jahr seit dem 26.10.1998

Tätigkeiten:

- Zivildienst in der Medizinischen Hochschule Hannover (Station für Neurologie und
Neurochirurgie, Prof. Dr. Dietz) vom 1.7.1991 - 30.9.1992

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.

gez. Thomas Streichert