Aus dem Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

Expression der humanen ecto-ADP-Ribosyltransferasen hART3 und hART4 als rekombinante Fusionsproteine im pro- und eukaryontischen System sowie Nachweis und Charakterisierung von mART4, des murinen Homologen von hART4

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin vorgelegt von Kathrin Firner aus Offenbach/Main

Hamburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 9.2.2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. F. Nolte

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. M. Jücker

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. F. Haag

Für meine Oma

# Inhaltsverzeichnis

1	Ei	nleitung	5
	1.1	Der T-Zell-Differenzierungsmarker RT6 (rART2) der Ratte	5
	1.2	ADP-Ribosyltransferasen als bakterielle Toxine und Ekto-Enzyme vo Säugetieren	
	1.3	Humane Mono-ADP-Ribosyltransferasen	
2	Zie	ele der Arbeit	13
3	Má	aterial und Methoden	14
	3.1	Vektoren	14
	3.1	.1 Klonierungsvektoren TA Cloning™pCR™II und pGEM®-T	
	3.1	2 Prokaryontischer Expressionsvektor pASK60-Strep	
	3.1	3 Eukaryontischer Expressionsvektor pMECD8Fneo	
	3.2	Klonierungen	
	3.2	.1 Klonierung eines prokaryontischen Expressionsvektors für humanes ART4	
	3.2	2 Klonierung eines prokaryontischen Expressionsvektors für hART3	
	3.2	Kiomerung eines eukaryontischen Expressionsvektors für nAR14	
	3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
	3.3	<ol> <li>Amplifikation von zur Klonierung vorgesehenen Fragmenten</li> <li>Kreuz-Spezies PCR Amplifikationen</li> </ol>	
	3.3	<ul> <li>5' und 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) Analysen</li> </ul>	
	3 /	Weitere molekularhiologische Methoden	31
	<b>3.4</b>	1 Agarosegelelektrophorese	
	3.4	2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen und DNA-Aufreinigung	
	3.4	3 Ligation	32
	3.4	4 Transformation der Vektoren und Kultivierung in E. coli	
	3.4	6 Sequenzierung und Sequenzanalysen	
	3.4	7 Northern Blotting	
	3.5	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in E coli	37
	3.5	.1 Induktion der Expression rekombinanter Fusionsproteine und Herstellung von	
	Per	iplasmalysaten	37
	3.5	2 Proteinaufreinigung über Streptavidin-Affinitätssäulen	
	3.5	3 Proteinaufreinigung mittels Talon <sup>1M</sup>	
	3.6	SDS-PAGE, Western Blotting und Immunodetektion	
	3.6	1 SDS-PAGE	
	3.0	<ul> <li>Western Blotting</li> <li>Silberf</li></ul>	
	3.6	4 Immunodetektion	
	3.7	Expression und Nachweis von membranständiger hART4 in	
	<u> </u>	COS-Zellen	
	3.7	1 Vorbereitung der Zellen	
	3.7	3 Selektion stabil transfizierter Zellen	
	3.7	4 FACS-Analysen	44

4	Ergel	bnisse	. <b> 46</b>	
4	4.1.1 4.1.2 4.1.3	lonierung, Expression und Aufreinigung von hART4 in E. coli Herstellung des Expressionskonstruktes Expression und Detektion des rekombinanten Fusionsproteins hART4-Strep Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins hART4-Strep	<b> 46</b> 47 53 54	
4	4.2.1 Ex	<b>xpression von <i>hART3</i> in E. coli</b> Feststellung der maximalen Bindungskapazität von rekombinantem hART3-FH an Talon <sup>TM</sup>	<b>58</b> 59	
4	4.2.2 <b>.3 K</b> 4.3.1 4.3.2	Ionierung und Expression von hART4-GPI in COS-Zellen Herstellung der Expressionskonstrukte Detektion der exprimierten rekombinanten Fusionsproteine mittels FACS-Analyse	62 63 64 70	
4	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4	achweis und Charakterisierung des murinen Homologen von hAR <sup>2</sup> Nachweis von hART4-Homologen in weiteren Spezies Untersuchung des Genexpressionsmusters von Art4 in der Maus Komplettierung der mArt4-Sequenz DNA-Sequenzanalysen, Hydrophobizitätsprofil und Aminosäuresequenzvergleich M und humanes ART4	<b>F472</b> 72 74 76 ⁄Iaus- 78	
5	Disku	ussion	83	
6	Zusa	mmenfassung	86	
7	Dank	sagung	88	
8	Abkürzungsverzeichnis			
9	Literaturverzeichnis			
10	Nac	chwort	99	

# 1 Einleitung

Der rasante Wissenszuwachs der letzten Jahrzehnte auf dem Gebiet der Immunologie hat das heutige Verständnis für Ätiologie und Pathogenese von Erkrankungen der verschiedensten medizinischen Disziplinen grundlegend verändert. Dies führte nicht zuletzt zu entscheidenden Verbesserungen sowohl in der Diagnostik als auch der Therapie verschiedenster Krankheiten.

Einen wesentlichen Anteil an der explosionsartigen Zunahme an Erkenntnissen hatte und hat weiterhin die sich ebenfalls rasch entwickelnde Wissenschaft der Molekularbiologie und deren sich ständig erweiternde Möglichkeiten im Bereich der DNA-Rekombinationstechnik. Die Möglichkeit der Genisolation, -analyse und -manipulation hat das Verständnis für fundamentale biologische Prozesse in pro- sowie eukaryotischen Lebewesen revolutioniert. Dennoch bleiben und ergeben sich ständig neue Fragen, deren Klärung in den nächsten Jahren weitere Fortschritte in der Humanmedizin bedeuten könnten.

Das Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Eppendorf beschäftigt sich seit Jahren mit der Struktur und Funktion von T-Lymphozyten, sowie deren Interaktion untereinander und mit anderen Zellen des Immunsystems.

#### 1.1 Der T-Zell-Differenzierungsmarker RT6 (rART2) der Ratte

Im Mittelpunkt des Interesses steht der T-Zelldifferenzierungsmarker rART2, der zunächst aufgrund seiner starken Immunogenität bei Kreuzimmunisierungsexperimenten mit Lymphknotenzellen bei Ratten aufgefallen war (Lubaroff et al., 1983). Das rART2-Gen der Ratte wurde auf Chromosom 1 lokalisiert, zwischen den Genloci für Tyrosinase und ß-Hämoglobin (Butcher et al., 1979). Seine beiden, bemerkenswert divergierenden Allele werden als rART2a bzw. rART2b bezeichnet (Koch et al., 1990a) und kodieren für die Proteinprodukte rART2.1 bzw. rART2.2 (Lubaroff et al., 1983).



Abb. 1: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des rART2 Hervorgehoben sind vier Cysteinreste (Cys= fette Balken), die in allen Säugetier ARTs konserviert sind, sowie Aminosäurereste (R-S-QEE= schmale Balken), die dem R-S-EXE Motif der Arginin-spezifischen ARTs entsprechen.

Schraffiert dargestellt sind der Leader (L) und die Glykosylphosphatidylinositol-Verankerung (GPI).

Die Proteinstruktur des rART2 ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Durchgeführte biochemische und molekularbiologische Analysen zeigten, dass es sich um 25-30 kDa große, GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-verankerte Membranproteine handelt (Koch et al., 1990a, Thiele et al., 1986).

Die Sequenzierung beider Allele brachte die Erkenntnis, dass sich die Nukleotidsequenzen in 18 Basenpositionen unterscheiden, was zu einer Änderung der Aminosäuresequenz in 12 Positionen führt. Hierdurch bedingt ist auch das Fehlen einer Glykosylierungsstelle beim rART2.2, die beim rART2.1 vorhanden ist (Koch et al., 1990a, Haag et al., 1990a, Haag et al., 1990b). Beide Varianten enthalten vier konservierte Cysteine, die die Ausbildung von zwei intramolekularen Disulfidbrücken ermöglichen.

Die Expression des *rART2* in vivo beschränkt sich auf periphere T-Lymphozyten in ruhendem Zustand (Haag et al., 1988, Koch et al., 1988) und ist reziprok zu der des Thy1-Markers, der für unreife T-Zellvorstufen im Thymus charakteristisch ist (Thiele et al., 1987). Interessant ist auch die im Vergleich zu peripheren Lymphozyten zehnfach höhere Expression von *rART2* in intraepithelialen T-Lymphozyten des Darms (Fangmann et al., 1990, Fangmann et al., 1993), was auf eine unterschiedliche Regulation der Expression für verschiedene T-Zell-Entwicklungswege schließen läßt.

Klinische Relevanz erhielt rART2 durch die Beobachtung, dass polygenetisch bedingte Autoimmunerkrankungen wie der juvenile Diabetes mellitus Typ I und der systemische Lupus erythematodes in verschiedenen Tiermodellen mit Störungen in Struktur und Funktion des Proteins koinzidieren (Greiner et al., 1987, Koch-Nolte et al. 1995).

Im Tiermodell führt die Behandlung gesunder Ratten mit rART2spezifischen Antikörpern unter bestimmten Bedingungen zur Ausbildung des Typ I-Diabetes (Greiner et al., 1987), während die Behandlung diabetesanfälliger Tiere mit rART2<sup>+</sup>-exprimierenden-Lymphozyten vor der Erkrankung schützt (Burstein et al., 1989, Fowell et al., 1993).

Experimente mit BN-Ratten (Brown Norway) zeigten, dass diese Tiere, nach wiederholter Gabe von Quecksilber eine autoimmune Glomerulonephritis entwickelten, wohingegen die mit der gleichen Methodik behandelten und untersuchten Lewis-Ratten unauffällig blieben. Bei den Lewis Ratten konnte keinerlei Veränderung im Verhältnis von rART2<sup>+</sup> : rART2<sup>-</sup> T-Lymphozyten in Milz und Lymphknoten festgestellt werden. Im Gegensatz dazu kam es bei den BN-Ratten zu einer relativen Abnahme der rART2<sup>+</sup>-Zellen (im Vgl. zu den Lewis-Ratten) (Kosuda et al., 1993).

Trotz all dieser Erkenntnisse blieb es lange Zeit unklar, ob und welche Funktion das rART2 besitzt.

## 1.2 ADP-Ribosyltransferasen als bakterielle Toxine und Ekto-Enzyme von Säugetieren

Erst als es 1992 J. Moss und Mitarbeitern am NIH, USA, gelang, die erste eukaryotische GPI-verankerte ADP-Ribosyltransferase aus Kaninchenmuskel (genannt rbART1) zu klonieren (Zolkiewska et al., 1992), wurde deutlich, dass hohe Sequenzhomologien zu rART2 bestanden. In ersten Experimenten konnte gezeigt werden, dass rART2.2 NADase-Aktivität besitzt. Das Protein wurde somit zunächst als NAD-Glykohydrolase klassifiziert (Takada et al., 1994). Mittlerweile ist nachgewiesen, dass rART2 zur Arginin-spezifischen mono-ADP-Ribosylierung fähig ist (Maehama et al., 1995, Haag et al., 1995), wobei die Frage nach physiologischen Zielproteinen weiterhin ungeklärt bleibt.

Bei der mono-ADP-Ribosylierung handelt es sich um eine enzymatisch katalysierte posttranslationale Modifikation von Zielproteinen. Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) katalysieren den Transfer der ADP-Ribosegruppe von NAD<sup>+</sup> auf eine spezifische Aminosäure des Zielproteins (Jacobson et al., 1989, Haag, Koch-Nolte 1997). In Abwesenheit des Zielproteins benutzen manche ARTs Wasser als Substrat und katalysieren die Hydrolyse von NAD in Nikotinamid und ADP-Ribose (NADase) (Abb. 2).



# Abb. 2: Schematische Darstellung der von ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) katalysierten Reaktionen

Abgebildet ist der durch mono-ADP-Ribosyltransferasen katalysierte Transfer der ADP-Ribosegruppe des NAD<sup>+</sup> auf eine spezifische Aminosäure eines Zielproteins. Hierbei wird Nikotinamid frei. Manche ARTs nutzen Wasser als Substrat und katalysieren die Hydrolyse von NAD in ADP-Ribose und Nikotinamid. Die ART-Enzymaktivitäten können bei Verwendung von <sup>32</sup>P-markiertem NAD (durch # gekennzeichnet) autoradiographisch nachgewiesen werden. Zuerst beschrieben wurde die ADP-Ribosylierung als der Mechanismus, mit dem das Diphterietoxin den Elongationsfaktor 2 in humanen Wirtszellen inaktiviert (Honjo et al., 1968). Mittels des gleichen Mechanismus inaktivieren auch das Cholera-, Pertussis- und E. coli-Toxin die Signaltransduktion durch heterotrimere G-Proteine in humanen Wirtszellen (Aktories, 1991, Moss et al., 1990 und 1994). Des weiteren wurde gezeigt, dass auch die Regulation wichtiger physiologischer Funktionen in Prokaryonten mittels mADP-Ribosylierung gesteuert wird. In photosynthetischen Bakterien, *Rhodospirillium rubrum* und *Azospirillium braziliense*, führt die Übertragung einer ADP-Ribosegruppe zur Inaktivierung eines Schlüsselenzyms der Stickstoff-Fixierung, während die Abspaltung der ADP-Ribose die Reaktivierung des gleichen Proteins bedeutet (Ludden et al., 1994).

Auf der Suche nach weiteren Verwandten des *rART2* gelang es, mittels Southern Blot Analysen in der Maus eine zu 78% homologe Nukleotidsequenz zu identifizieren und im weiteren zu sequenzieren (Koch et al., 1990b, Haag et al., 1994). Das als *mArt2* bezeichnete Homologe in der Maus wird, wie Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen-Analysen zeigten, von zwei verschiedenen Genloci kodiert (Sequenzhomologie 85%). Beide befinden sich, wie auch ihr Homolog in der Ratte, zwischen den Genen für Tyrosinase und ß-Hämoglobin auf dem Chromosom 7 der Maus (Prochazka et al., 1991). Auch die Arginin-spezifische mADP-Ribosyltransferaseaktivität konnte in Enzymassays nachgewiesen werden (Koch-Nolte et al., 1996).

Weiterhin koinzidieren auch in der Maus ein *mArt2*-Expressionsdefekt mit der Ausbildung des Diabetes mellitus Typ I. In *mArt2* RNA-Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die jugendliche NOD-Maus (Nonobese diabetic = Mausmodell für IDDM) eine geringere *mArt2*-Expression als die NON-Maus (Nonobese normal = Diabetes-resistentes Mausmodell) aufweist (Prochazka et al., 1991), obwohl der T-Zellgehalt in Milzen von NOD-Mäusen deutlich höher liegt, als der von NON-Mäusen (Prochazka et al., 1987, Prochazka et al., 1989).

Weiterhin scheint auch hier ein Zusammenhang zum Systemischen Lupus erythematodes zu bestehen. So verfügt die NZW-Maus (Modell für SLE) nur über einen *mArt2*-Genlocus (Koch-Nolte et al., 1995).

Die Annahme, dass auch mART2 an immunregulatorischen Funktionen beteiligt sein könnte, wurde durch die Beobachtung, dass die mADP-Ribosylierung von Zelloberflächen zytotoxischer T-Lymphozyten in Mäusen die T-Zellaktivierung inhibiert (Wang et al., 1996), weiter unterstützt. Wie J. Wang und Mitarbeiter zeigten, inhibiert die Inkubation von zytotoxischen T-Lymphozyten mit NAD<sup>+</sup> deren Proliferation sowie Fähigkeit an Zielzellen zu binden und diese zu lysieren. Die Tatsache, dass die Präinkubation der Zellen mit PI-PLC (Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase) den Effekt des NAD<sup>+</sup> verhindert, deutet auf eine GPI-verankerte Transferase (Wang et al., 1996).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass diese GPI-verankerte mADP-Ribosyltransferase einen frühen Schritt der transmembranen, CD8-vermittelten Signaltransduktion beeinflußt. Konkret wird die ADP-Ribosegruppe des NAD+ auf ein 40 kDa Protein übertragen. Dieses Protein bildet einen Komplex mit der intrazellulären Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup>, welche durch die ADP-Ribosylierung des 40 kDa Proteins in ihrer Aktivität gehemmt wird (Wang et al., 1996).

Es wäre also vorstellbar, dass es sich bei der GPI-verankerten mADP-Ribosyltransferase zytotoxischer T-Zellen der Maus um mART2 handelt, dessen Funktion somit als immunsuppressiv einzuschätzen wäre.

#### 1.3 Humane Mono-ADP-Ribosyltransferasen

In Anbetracht dieser Ergebnisse stellt sich die Frage nach der Existenz und Funktion humaner mADP-Ribosyltransferasen. Zunächst wurden ein zu *rART2* bzw. *mArt2* homologes Intron-enthaltendes Pseudogen (Haag et al., 1994), sowie ein zu *rART*1 homologes, funktionsfähiges Gen (Okazaki et al., 1994) kloniert.

Durch die im Rahmen des humanen Genomprojektes durchgeführten großangelegten systematischen Sequenzierungen von cDNA-Fragmenten (ESTs = expressed sequence tags) (Boguski 1995, Pawlak et al., 1995) wurden Sequenzvergleiche mit den bekannten mADP-Ribosyltransferasen möglich, bei denen 9 weitere Teilfragmente identifiziert werden konnten (Koch-Nolte et al., 1997).

Diese wurden kloniert sowie sequenziert und dabei festgestellt, dass vier der ESTs einem Gen entstammen, dass auf Chromosom 4 lokalisiert ist, genannt *hART3* und die fünf anderen ESTs Transkripte eines weiteren Gens auf Chromosom 12 sind, genannt *hART4* (Koch-Nolte et al., 1997).

Northern Blot-Analysen zeigten daraufhin, dass *hART3* vor allem in Hodengewebe exprimiert wird. Schwache Signale waren jedoch auch in Darm-, Milz-, Herz- und Skelettmuskelgewebe nachweisbar. *hART4* wird vor allem in Milzgewebe exprimiert. Hier gab es schwache Signale in Darm- und Ovarialgewebe (Koch-Nolte et al., 1997). Interessanterweise werden auch *rART2* und *mArt2* hauptsächlich in Milzgewebe exprimiert (Koch et al., 1990a), was zu der Hypothese, dass *hART4* die Funktion des o.g. Pseudogens im Menschen übernimmt, führt.

Hydrophobizitätsanalysen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von hART3 und hART4 ergaben hydrophobe N- und C-terminale Signalpeptide, die charakteristisch für GPI-verankerte Membranproteine sind (Koch-Nolte et al., 1997). Vergleichende Sequenzanalysen von ART1-ART4 ergaben Homologien von 28-41% (Koch-Nolte et al., 1997).

Sekundärstrukturvorhersagen zeigten eine Reihe von Strukturmotiven und Aminosäureresten, die denen der bakteriellen Toxine sowie der eukaryotischen ARTs ähneln (s. Abb. 1) (Koch-Nolte et al., 1996, 1997), was zur Hypothese einer evolutiongeschichtlichen Verwandschaft dieser Proteine führt.

Zur näheren Charakterisierung der humanen Homologen der mADP-Ribosyltransferasen-Familie wäre die Verfügbarkeit der rekombinanten Proteine ein wichtiger Schritt. Hierdurch wäre der künftige Nachweis einer potentiellen Enzymaktivität, die Identifizierung physiologischer Zielproteine und die Klärung der durch Modifikation von Zielproteinen gesteuerten physiologischen Funktionen möglich. Dies könnte wichtige und interessante Einblicke in die Regulation der Immunantwort durch mADP-Ribosylierung und deren Einfluß auf die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen bedeuten.

12

## 2 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die rekombinante Expression von *hART3* und *hART4* auf Proteinebene. Hierzu sollten dienen:

a) die Klonierung, Expression und Aufreinigung von *hART3*/hART3 und *hART4*/hART4 als rekombinante Fusionsproteine (Nativprotein + Strep-Tag bzw. Flag-His-Tag) im prokaryontischen System (E. coli),

b) die Klonierung und Expression von hART4/hART4 als rekombinantes
 Fusionsprotein (Nativprotein + GPI-Anker + Flag-Tag) im eukaryontischen
 System (COS-Zellen).

Damit sollte die Grundlage für die Produktion größerer Mengen an rekombinanten Proteinen für weiterführende Aufgaben geschaffen werden (z.B. Enzymassys und Immunisierungen zur Herstellung ART-spezifischer Antikörper, die Aufschluß über die Funktion der potentiellen mADP-Ribosyltransferasen geben).

Weiterhin sollte der Nachweis von hART4-Homologen in weiteren Spezies, insbesondere in der Maus geführt und das entsprechende Gen in der Maus durch Sequenzierung und Untersuchung des Expressionsmusters näher charakterisiert werden.

# 3 Material und Methoden

### 3.1 Vektoren

3.1.1 Klonierungsvektoren TA Cloning™pCR™II und pGEM®-T

Der 3,9 kb große, von der Firma Invitrogen vertriebene Vektor TA Cloning<sup>™</sup>pCR<sup>™</sup>II (s. Abb. 3A), ist Bestandteil eines eigens für PCR-Produkte ausgearbeiteten Klonierungssystems. Sein Polylinker liegt im lacZ-Gen von E. coli. Weiterhin enthält er Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin. Die Ligation der PCR-Produkte in den Vektor und dessen Transformation in Bakterien wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt (Invitrogen, TA Cloning<sup>®</sup> System, 1996).

Der Vektor pGEM®-T der Firma Promega (s. Abb. 3B) ist, wie der Vektor pCR™II Bestandteil eines eigens für PCR-Produkte ausgearbeiteten Klonierungssystems. Sein Polylinker liegt ebenfalls im lacZ-Gen von E. coli und ist flankiert von einem T7- und einem SP6-Promoter. Weiterhin enthält er ein Resistenzgen für Ampicillin.



## Abb. 3: Schematische Darstellung der Vektoren TA Cloning™pCR™II (A) und pGEM®-T (B)

Beide Vektoren enthalten einen Polylinker der im lacZ-Gen von E. coli liegt. Der Polylinker des pGEM®-T ist von einem T7- und einem SP6-Promoter flankiert. Des weiteren abgebildet sind die Resistenzgene für Ampicillin (beide Vektoren) und Kanamycin (TA Cloning™pCR™II).

## 3.1.2 Prokaryontischer Expressionsvektor pASK60-Strep

Der 3832 bp große Vektor pASK der Firma Biometra (s. Abb. 4A) wurde zur Expression und Isolierung funktioneller Genprodukte entwickelt. Seine Nterminal kodierte OmpA-Signalsequenz ist für die Sekretion rekombinanter Proteine in den periplasmatischen Spalt von E. coli verantwortlich. Dort spaltet eine bakterielle Signalpeptidase die Signalsequenz ab. Der C-terminale Strep-Tag bindet an Streptavidin, womit unter Verwendung der speziellen Steptavidin-Affinitätssäulen eine schonende Einschritt-Aufreinigung möglich wird (Schmidt & Skerra, 1993). Weiterhin eignet sich die Streptavidinaffinität zum Nachweis des Proteins im Western Blot (Biometra, Das Strep-tag Expressions- und Reinigungssystem, 1996).

#### 3.1.3 Eukaryontischer Expressionsvektor pMECD8Fneo

Dem Transfektionsvektor pMECD8Fneo lag ursprünglich der Vektor pME18S (DNAX, USA) zugrunde. Dieser 4400 bp große Vektor wurde im DNAX Research Institute zusätzlich mit einem CD8-Leader und einem FLAG-Tag ausgestattet (s. Abb. 4B). Der CD8-Leader wird im endoplasmatischen Reticulum tranfizierter Zellen abgeschnitten und der dann N-terminale FLAG-Tag mit monoklonalem M2-Antikörper (Kodak, IBI) detektiert.

Der Vektor verfügt über ein Resistenzgen für Ampicillin sowie über ein Resistenzgen für Geneticin (G 418).



# Abb. 4: Schematische Darstellung der Vektoren pASK60Strep (A) und pMECD8Fneo (B)

A) Der 3832 bp große Vektor pASK60Strep enthält den OmpA-Leader zur Sekretion rekombinanter Proteine in den periplasmatischen Spalt von E. coli, wo dann die Abspaltung der Signalsequenz erfolgt. Die Detektion bzw.
Aufreinigung des rekombinanten Proteins erfolgt mittels der Streptavidinaffinität des C-terminalen Strep-Tags. Das dem lacZ Promotor vorgeschaltete Regulatorelement lacI ermöglicht die Induktion der Genexpression durch Zugabe von IPTG zum Kulturmedium. Ohne IPTG Zugabe erlaubt der lacZ Promotor eine schwache basale Gentranskription.
B) Der N-terminale FLAG-Tag des Vektors pMECD8Fneo kann mittels M2-Antikörper detektiert werden. Er enthält zudem Resistenzgene für Ampicillin und Geneticin. Der virale SRαPromotor dirigiert eine starke basale Transkription des nachgeschalteten Gens in transfizierten Säugerzellen.

### 3.2 Klonierungen

3.2.1 Klonierung eines prokaryontischen Expressionsvektors für humanes ART4

Als Matrize für die PCR-Amplifikation von *hART4* diente klonierte genomische DNA (ein Subklon aus einem, das *hART4*-Gen enthaltenden P1-Klons). Als Vorwärtsprimer diente ein 34 bp großes Oligonucleotid, genannt SFL. Durch die integrierte Stu I-Schnittstelle ist die N-terminale Fusion mit dem C-terminalen Ende der für das Signalpeptid OmpA kodierenden Region ohne Verschiebung des Leserasters möglich. Der 28 bp umfassende Rückwärtsprimer SRL beeinhaltet eine Pst I-Schnittstelle zur C-terminalen Fusion des PCR-Fragments an den Strep-Tag des Expressionsvektors pASK60-Strep (s. Abb. 4A).

SFL: TAA GGC CTT AGC AAT TAA AAT CGA CTT CGA CTT C

SRL: CT**C TGC AG**A AGC TTT TAG CAG CTG ACA G

(fett gedruckt sind die Schnittstellen von Stu I in Primer SFL bzw. von Pst I in Primer SRL)

Im Anschluß an die PCR-Amplifikation wurde das SFLxSRL-Fragment in den Vektor pCR™II kloniert und nach Restriktionsverdau (Stu I/Pst I) in den Expressionsvektor pASK60FH ligiert (s. Abb. 5).

Das Insert wurde mittels Sequenzierung auf seine korrekte Sequenz und korrekte Fusionsstellen überprüft.

## Humane genomische DNA



# Abb. 5: Schematische Darstellung der Genstruktur (oben) und des prokaryotischen Expressionskonstrukts (unten) für *hART4*

Schematisch dargestellt ist die das *hART4*-Gen enthaltende humane genomische Ausgangs-DNA sowie das pASK60hART4ST-Expressionsplasmid. Exon 1 kodiert für das Leaderpeptid, Exon 2 für das native Protein, Exon 3 für das Signalpeptid der GPI-Verankerung (kodierende Regionen sind rechts geneigt schraffiert, die eigenen Signalpeptide links geneigt schraffiert, nicht kodierende Exonanteile nicht schraffiert, Introns sind als Linien dargestellt). Die Lage der PCR-Primer ist durch Pfeile gekennzeichnet. Durch die integrierte Stu I-Schnittstelle im Vorwärtsprimer SFL ist die N-terminale Fusion mit dem Cterminalen Ende der für das Signalpeptid OmpA kodierenden Region (doppeltschraffiert) ohne Verschiebung des Leserasters möglich. Der Rückwärtsprimer SRL enthält eine Pst I-Schnittstelle mit der die C-terminale Fusion an den Strep-Tag (ST) (doppeltschraffiert) des Expressionsvektors möglich wird.



# Abb. 6: Schematische Darstellung der Klonierung und Expression des hART4 in E. coli

#### 3.2.2 Klonierung eines prokaryontischen Expressionsvektors für hART3

Ausgangsmaterial für die Expression von *hART3* in E. coli war das in unserem Labor hergestellte Plasmid pASK60T01x34FH. Der Vektor pASK60FH wurde durch Austausch des Strep-Tags des Vektors pASK60-Strep (Biometra, s.Abb. 4A) durch einen chimären Flag-His-Tag hergestellt. Der aus acht Aminosäuren bestehende Flag-Tag (DYKDDDDK) diente der Detektion von Proteinen im Western Blot mittels des monoklonalen M2-Antikörpers (Kodak/IBI). Die Affinität des His-Tags (6xHis) zu Talon<sup>™</sup> (Clontech) wurde zur Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine mittels einer Talonmatrix genutzt.

Das T01x34-Insert wurde durch PCR mit den *hART3*-spezifischen Primern T01 und T34 hergestellt. T01 lagert sich am 5'-terminalen Ende, T34 am 3'-terminalen Ende von Exon 5 an (s. Abb. 7).

#### T01: ATGGCAGATAATGCATTTGATG

T34: ATACAATTGTCGGTTTTTAGTCCACCT

(fett gedruckt sind die Schnittstellen von Nsi I in Primer T01 bzw. Mun in Primer T34)

Ausgangs-DNA war humane Testis "Marathon" cDNA (Clontech).

Im Anschluß an die PCR-Amplifikation wurde das T01xT34-Fragment in den Vektor pCR<sup>™</sup>II (s. Abb. 3) kloniert und nach Restriktionsverdau (Nsi I/Mun) in den Expressionsvektor pASK60.mART2.2.FH ligiert. (s. Abb. 7).

Das Insert wurde mittels Sequenzierung auf seine korrekte Sequenz und korrekte Fusionsstellen überprüft.

21

### Humane genomische DNA



# Abb. 7: Schematische Darstellung der Genstruktur (oben) und des prokaryotischen Expressionskonstrukts (unten) für *hART3*

Schematisch dargestellt ist die das *hART3*-Gen enthaltende humane Testis "Marathon" cDNA (oben) sowie das pASK60hART3FH-Expressionsplasmid (unten).

Exon 4 kodiert für das Leaderpeptid, Exon 5 für das native Protein, Exon 10 für den GPI-Anker, Exone 6-9 für einen in anderen ARTs nicht vorhandenen Einschub zwischen der ART-Domäne und der Membranverankerung (kodierende Regionen sind rechts geneigt schraffiert, die eigenen Signalpeptide links geneigt schraffiert, nichtkodierende Exonregionen nicht schraffiert, Introns sind als Linien dargestellt).

Die Lage der PCR-Primer ist durch Pfeile gekennzeichnet. Der Vorwärtsprimer T01 enthält eine Nsi I Schnittstelle durch die die N-terminale Fusion mit der für das Signalpeptid OmpA kodierenden Region (doppeltschraffiert) möglich wird.

Durch die integrierte Munl-Schnittstelle im Rückwärtsprimer T34 ist die Cterminale Fusion an den Flag-His-Tag (FH) (doppeltschraffiert) möglich.



Abb. 8: Schematische Darstellung der Expression von hART3 in E. coli

#### 3.2.3 Klonierung eines eukaryontischen Expressionsvektors für hART4

Bei der Ausgangs-DNA zur PCR-Amplifikation des *hART4*-GPI handelte es sich um kommerziell erhältliche cDNA, die durch Reverse Transkription aus humaner Milzzellen-RNA gewonnen wurde (Clontech). Zur Herstellung des PCR-Fragments aus humaner Milz-cDNA diente als Vorwärtsprimer ein L00 genanntes, 28 bp großes Oligonucleotid. Dieser Primer lagert sich im Bereich des Start-Codons des Leaderpeptids (Exon 1) an. Der 28 bp große Rückwärtsprimer L99 bindet im Bereich des Stop-Codons (Exon 3) (s. Abb. 9).

Zur Herstellung des Inserts diente als Vorwärtsprimer ein 32 bp großes Oligonucleotid, genannt PFL. Seine integrierte Bgl II-Schnittstelle befindet sich gerade vor der vermuteten N-terminalen Aminosäure des Nativproteins und dient der N-terminalen Fusion des PCR-Fragments an den Flag-Tag des Expressionsvektors pMECD8Fneo.

Der 31 bp umfassende Rückwärtsprimer PRL beinhaltet eine Xba I-Schnittstelle, welche direkt hinter dem Stop-Codon des *hART4* (Exon 3) liegt (s. Abb. 9).

L00: CCT CCT GCA ACG ATG AGA ATC TGG CTC C

L99: GGA GCC ACA AGA TTT CTT TAT ACT CTG C

PFL: GAA/ GAT CTG TTG CAA TTA AAA TCG ACT TCG AC

PRL: CCT/ CTA GAT TTC TTT ATA CTC TGC TTT TGG A

(Fett gedruckt sind die Schnittstellen von Bgl II in Primer PFL bzw. Xba I in Primer PRL)





Humane ART4 cDNA im Expressionsplasmid pME



# Abb. 9: Schematische Darstellung der nativen cDNA und des eukaryotischen Expressionsvektors für hART4

Schematisch dargestellt ist die hART4-Ausgangs-cDNA (oben) einschließlich der für N- und C-terminale Signalpeptide (L, GPI) kodierenden Regionen sowie das pMECD8FhART4GPI-Expressionsplasmid (unten). Exon 1 kodiert für das Leaderpeptid, Exon 2 für das native Protein, Exon 3 für den GPI-Anker (kodierende Regionen sind rechts geneigt schraffiert, die eigenen Signalpeptide links geneigt schraffiert, die nicht kodierenden Exonregionen nicht schraffiert, Introns sind als Linien dargestellt). Die Lage der PCR-Primer ist durch Pfeile gekennzeichnet. Zur Herstellung des PCR-Fragments aus humaner Milz-cDNA dienten der Vorwärtsprimer L00 (Anlagerung im Bereich des Start-Codons des Leaderpeptids) sowie der Rückwärtsprimer L99 (Anlagerung im Bereich des Stop-Codons). Die Herstellung des Inserts für den Expressionsvektor erfolgte mittels der PCR-Primer PFL/PRL. Die integrierte Bgl II-Schnittstelle im Vorwärtsprimer PFL befindet sich gerade vor der vermuteten N-terminalen Aminosäure des Nativproteins und dient der Fusion des PCR-Fragments an den Flag-Tag (F) des pMECDE8Fneo (doppelt schraffiert). Der Rückwärtsprimer PRL enhält eine Xba I-Schnittstelle, die direkt hinter dem Stop-Codon des hART4 liegt. CD8 entspricht der kodierenden Region für das Signalpeptid des Expressionsvektors pMECD8Fneo (doppelt schraffiert). GPI entspricht der kodierenden Region für das Signalpeptid für die Glykosylphosphatidylinositol-Verankerung (links geneigt schraffiert).



Abb. 10: Schematische Darstellung der Klonierung und Expression von hART4 in COS-Zellen

## 3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit verschiedenartig eingesetzt:

- f

   f
   i e Amplifikation von zur Klonierung vorgesehenen cDNA Fragmenten
- 2. für das Screening transformierter Bakterienkulturen
- 3. für die spezifische Amplifikation von 5' und 3' Enden der cDNA
- 4. für Kreuz-Spezies "Zoo"-PCR Amplifikationen

Die 20 µl Ansätze enthielten jeweils:

- 1x Taq+ low salt-Puffer (Stratagene)
- je 100 ng Vorwärts- und Rückwärtsprimer (0,5µM)

je 2 mM dNTPs

- 0,5 U Taq+-Polymerase (Beckman)
- 0,1-1 ng Plasmid-DNA

Der Ansatz wurde mit einem Tropfen sterilem Paraffinöl überschichtet, um Verdampfung zu verhindern.

Je nach Experiment liefen verschiedene Positivkontrollen sowie je eine Leerprobe mit. Zum Schutz vor Kontamination der Ansätze wurde das Ansetzen der Reaktionen sowie die DNA-Beigabe und die eigentliche PCR in zwei getrennten Räumen durchgeführt.

3.3.1 Amplifikation von zur Klonierung vorgesehenen Fragmenten

hART4-spezifische SFL x SRL und PFL x PRL Fragmente wurden in einem *Perkin Elmer Thermal Cycler* mit Touch-Down-Programm nach folgendem Modus amplifiziert:

- DNA-Denaturierung 20 sec bei 94 °C
- Annealing der Primer 20 sec bei variierender Temperatur (55 °C -40 °C)
- DNA-Synthese 60 sec bei dem Temperaturoptimum von 72 °C f
  ür die Taq<sup>+</sup>-Polymerase

Die Gesamtzahl der Zyklen betrug 25-30.

Zur Amplifikation der vollständigen kodierenden ART4 Region wurde mit den Primern L00 und L99 das Exon 1 bis Exon 3 umfassende Fragment aus humaner cDNA (Milz, Clontech) mit folgendem Programm amplifiziert:

initiale DNA Denaturierung 10' 94°C

- 5 Zyklen:

DNA Denaturierung 30 sec bei 94°C

Annealing und DNA Synthese 2 min bei 72°C

- 5 Zyklen:

DNA Denaturierung 30 sec bei 94°C Annealing und DNA Synthese 2 min bei 70°C

25 Zyklen:

DNA Denaturierung 30 sec bei 94°C Annealing und DNA Synthese 2 min bei 68°C

3.3.2 Kreuz-Spezies PCR Amplifikationen

Für die "Zoo-PCR" wurde genomische DNA verschiedener Tiere (Schwein, Maus, Affe, Rind, Huhn, Schaf) verwendet. Als Primer dienten aus hochkonservierten Regionen abgeleitete *hART4*-Primer L11, L41 und L42 (s. Abb 11):

L11: TCTTTTGATGATCAGTACCAAGGCTG

L41: GAAGTCTTGTACAGGTGCACCCAGGCA

L42: AACTTTAAACAGCTCATAGGGAGG.

Es wurde sowohl mit der Primerkombination L11xL41 als auch mit L11xL42 amplifiziert. Pro 20 µl Ansatz wurden 100-500 ng genomische DNA, 2mM dNTPs, und 0,5 Units Ampli TAQ Gold<sup>™</sup>-Polymerase (Applied Biosystems) eingesetzt und nach folgendem Modus amplifiziert:

- DNA-Denaturierung 30 sec bei 94°C

- Annealing der Primer 30 sec bei variierender Temperatur (65°C, 60°C, 55°C, 50°C, 45°C,40°C, alle je zweimal in Folge, dann 55°C fünfundzwanzig Mal in Folge) und

- DNA-Synthese 3 Minuten bei 72°C.

3.3.3 5' und 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) Analysen

Bei der Ausgangs-DNA für die 5'-3'-RACE-PCR handelte es sich um kommerziell erhältliche Maus-Herzmuskel cDNA der Firma Clontech, an deren Enden synthetische Oligonukleotide (AP1, AP2) ligiert wurden. Als Primer für die RACE-PCR in 3'-Richtung dienten die *mArt4*-spezifischen Primer S01 und S02 (von der bekannten Exon 2-Sequenz abgeleitet), für die PCR in 5'-Richtung die ebenfalls *mArt4*-spezifischen Primer S31 und S32. Weiterhin wurden die für die endständigen Oligonukleotide an der cDNA spezifischen Primer AP1 und AP2 (Clontech) eingesetzt (s. Abb 11). S01: GTGAGCTCTGACTTGGCCAAGGCCATG

- S02: GGCCAGTTCCTCTCTGCCTCCCT
- S31: GAAATAGTCTCCTTGATTTAGCTCCTCC
- S32: CCTCAGCAGCTGGATGGCTGAGGT



## Abb. 11: Schematische Darstellung der ART4 cDNA Struktur und der zur Klonierung von ART4 aus Maus und anderen Spezies verwendeten Primer

Schematisch dargestellt ist die Lage der degenerierten *hART4*-Primer L11, L41 und L42 mittels derer genomische DNA verschiedener Tiere zur Identifizierung von *ART4* Homologen in weiteren Spezies amplifiziert wurde. Zur Komplettierung der murinen *ART4*-Sequenz dienten dann die spezifischen Primer S01, S02, S31 und S32 sowie die cDNA Adapterspezifischen Primer AP1 und AP2, die im Rahmen von 5'- und 3'-RACE-PCR eingesetzt wurden.

Weiterhin abgebildet ist der vermutete Aufbau des *mArt4*-Gens (rechts geneigt schraffiert = kodierende Region, linksgeneigt schraffiert = die eigenen Signalpeptide, nichtschraffiert = die nichtkodierenden Exonregionen, Linien = Introns).

Die 50 µl Ansätze der 5'-3'-RACE-PCR enthielten je

1x Expand<sup>™</sup>Poly-Mix (Boehringer)

1µg TaqStart™Antikörper (Clontech)

1x Puffer #3 (Expand-Boehringer)

je 2mM dNTPs

je 50 ng Vorwärts- und Rückwärtsprimer

Im ersten Schritt wurde Maus-Herzmuskel Marathon-Ready™ cDNA (Clontech) (0,2 ng), im zweiten Schritt, die im ersten Schritt amplifizierten DNA-Fragmente eingesetzt. Amplifiziert wurde nach folgendem Modus:

30" 94°C

2' 72°C 5 Zyklen
 30" 94°C
 2' 70°C 5 Zyklen
 20" 94°C

## 2' 68°C 25 Zyklen

## 3.4 Weitere molekularbiologische Methoden

## 3.4.1 Agarosegelelektrophorese

Zu analytischen Zwecken wurden horizontale Gele aus 1% iger Agarose mit einem TBE-Puffersystem (0,5fach), zu präparativen Zwecken mit einem TAE-Puffersystem (0,5fach) verwendet. Zur Färbung der DNA wurden die Gele mit Ethidiumbromid in der Konzentration von 0,1  $\mu$ g/ml versetzt (Sambrook et al., 1989).

3.4.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen und DNA-Aufreinigung

Der DNA-Verdau für die Klonierung von *hART4* in den pASK60-Strep Vektor wurde mit Stu I (NEBiolabs)/Pst I (NEBiolabs) vorgenommen. Der SFL-Primer besitzt eine Schnittstelle für Stu I (5´ - AGG/CCT - 3´), die ein "stumpfes" Ende erzeugt. Der SRL-Primer besitzt eine Schnittstelle für Pst I (5´ - CTGCA/G - 3´), die ein "klebriges" Ende erzeugt. Für den Verdau wurden Reaktionsgemische mit einem Gesamtvolumen von je 10 µl hergestellt. Diese enthielten 1 µl des für die Enzyme empfohlenen 10x Puffers React #2 (Gibco, BRL), 7 µl der DNA und je 10 U der Restriktionsendonukleasen. Die Ansätze wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert, die entstandenen Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend die zu ligierenden DNA-Fragmente (*hART4*-DNA und Vektor) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Im Folgenden wurde die DNA mittels des DNA-Aufreinigungsverfahrens JETsorb (Verfahren zur Extraktion von Doppelstrang DNA aus Agarosegel; als Matrix dient ein in seiner Oberfläche modifiziertes Harz, von welchem die DNA mittels TE oder Wasser eluiert wird) nach Anleitung des Herstellers isoliert (Genomed, JETsorb, DNA Extraction from Agarose Gels, 1992).

Der Verdau für die Umklonierung von *hART4*-GPI vom pCR™II in den pMECD8Fneo wurde mit Bgl II (NEBiolabs)/Xba I (NEBiolabs) vorgenommen. Der PFL-Primer besitzt eine Schnittstelle für Bgl II (5'-A/GATCT-3'), der Primer PRL besitzt eine Schnittstelle für Xba I (5' -T/CTAGA-3'), die beide "klebrige" Enden erzeugen. Die 10 µl Reaktionsgemische enthielten jeweils 1,5 µl des 10x Puffers One for All Buffer (Pharmacia), 7µl DNA und je 10 Units der Restriktionsendonukleasen. Nach einstündiger Inkubation wurden die Ansätze per Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die zu ligierenden Fragmente ausgeschnitten und die DNA aufgereinigt.

#### 3.4.3 Ligation

## 1. Ligation von PCR-Produkten in den TA Cloning™pCR™II Vektor

Diese wurde nach dem "Instruction Manual" der Firma Invitrogen vorgenommen. Der in Strangform vorliegende Vektor wurde in TE-Puffer aufgenommen (Konz.: 25 ng/µl). Die DNA-Konzentration der zu klonierenden PCR-Ansätze wurde mittels Agarosegelelektrophorese abgschätzt und dann in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:3 zum Vektor eingesetzt. Die 10 µl Ansätze enthielten zudem 1 µl des 10x Ligationspuffers und 1 µl T<sub>4</sub>-Ligase (15 U/µl) (beides Invitrogen) und wurden über Nacht bei 12 °C inkubiert. Am Folgetag wurde 1 µl des Ansatzes in kompetente E. coli (INVaF´ One Shot<sup>™</sup> Competent Cells) transformiert.

2. Ligation von hART4-DNA in den Vektor pASK60-Strep

Diese erfolgte im Anschluß an den Stu I/Pst I-Verdau von Vektor und *hART4*-DNA. Die DNA-Konzentration der ausgeschnittenen, aufgereinigten Banden wurde abgeschätzt, um ein für die Ligation günstiges molares Verhältnis von Vektor zu Insert (1:2) zu erreichen. Ligiert wurde wieder über Nacht mit den in 3.4.3. 1. bereits erwähnten Reagenzien und am Folgetag wurden 2 µl des Ansatzes in kompetente E. coli (XL-2 Blue,Stratagene) transformiert.

#### 3.4.4 Transformation der Vektoren und Kultivierung in E. coli

Sowohl E. coli XL-2 Blue als auch NM522 Zellen wurden mittels 3-Strich-Technik auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde eine Bakterienkolonie gepickt und in ein mit 5 ml LB gefülltes Röhrchen überführt. Dieses wurde über Nacht bei 37 °C im Wasserschüttelbad inkubiert. Am folgenden Morgen befanden sich die Bakterien in der stationären Wachstumsphase ( $OD_{600} > 1$ ). Von dieser Kultur wurde dann eine 1:50 Verdünnung hergestellt und wieder inkubiert (ca. 2 h), bis eine für die Transformationseffizienz optimale OD600 von 0,35 - 0,55 erreicht war (entspricht etwa einer Bakterienkonzentration von 2,8 - 4,4 x 108 Zellen/ml (Sambrook et al., 1989). Der Ansatz wurde dann für 10 min bei 4 °C mit 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen sofort in eisgekühltem 1x TSS (1/10 des Ausgangsvolumens) aufgenommen. (TSS = Transformation and Storage Solution = LB mit 10% (w/v) PEG, 5% (v/v) DMSO, 20-50 mM Mg<sup>2+</sup> (MgSO<sub>4</sub> oder MgCl<sub>2</sub>, pH von 6,5). 100  $\mu$ l Aliquots wurden schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

1. Transformation des TA Cloning™pCR™II Vector in E. coli INVaF´

Wie bereits die Ligation der PCR-Produkte, wurde auch die Transformation in kompetente E. coli Bakterien gemäß des "Instruction Manuals" der Firma Invitrogen durchgeführt. Da das verwendete Bakterium über keinerlei Antibiotikaresistenz verfügt, bestätigte das Wachstum auf LB-Ampicillin-Agarplatten die erfolgreiche Aufnahme des ein Resistenzgen für Ampicillin enthaltenden Vektors. Weiterhin wurden durch blau/weiß Selektion (lacZa-Gen des Vektors) die E. coli Kolonien identifiziert, deren Vektoren "Insert-haltig" waren (weiße Kolonien, bei denen lacZ durch Einfügen des Inserts zerstört wurde). Hierzu wurden pro Agarplatte 25 µl des LacZ-Substrates Xgal (200 mg/ml) ausplattiert.

2. Transformation des pASK60-Strep Vektors in E. coli XL-2 Blue und E. coli NM522

Wie auch der INVaF<sup>2</sup>-Stamm, verfügen weder E. coli XL-2 Blue (Einsatz zur Herstellung von Plasmidpräparationen) noch E. coli NM522 Bakterien (Einsatz zur Proteinproduktion) über Antibiotikaresistenzen (somit Selektion der Vektoren enthaltenden Bakterien auf Ampicillin-haltigen Agarplatten).

Zunächst wurde der Ligationsansatz von *hART4*-DNA und pASK60-Strep-Vektor in E. coli XL-2 Blue transformiert. Die angelegten Kulturen wurden mittels PCR und Kontrollverdaus gescreent, von positiven Kulturen Plasmidpräparationen hergestellt und diese in E. coli NM522 transformiert. Neben den Ligationsreaktionen liefen immer Transformationsansätze mit nicht geschnittener pASK60-Strep Vektor-DNA mit (als Hinweis auf Funktionstüchtigkeit der kompetenten Zellen).

Für die Transformation wurden 50 μl kompetente E. coli-Zellen wurden mit 2 μl 0,5 molaren β-Mercaptoethanol vorsichtig gemischt. Dazu wurde 1-2 μl Ligationsansatz (s. S. 31, 3.4.3. 2.) bzw. Plasmidpräparation (1:500 in a.i.) (s. S. 34,3.4.5.) gegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Hitzeschock (42 °C für 30 sec) wurde der Ansatz nochmals für 2 min. auf Eis gestellt, um dann 450 μl SOC-Nährmedium (auf 37 °C vorgewärmt) hinzuzufügen und das ganze unter Schütteln 1 h bei 37 °C zu inkubieren, um eine Produktion der von den Antibiotika-Resistenz Genen kodierten Proteine zu ermöglichen. Im Folgenden wurden 100 μl des Ansatzes ausplattiert (auf Ampicillin- und Xgal-haltigen LB-Agarplatten) und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

#### 3.4.5 Plasmidpräparationen

Zur Präparation der klonierten Plasmid-DNA (TA Cloning<sup>™</sup>pCR<sup>™</sup>II in INVaF<sup>′</sup> und pASK60-Strep in XL-2 Blue mit jeweiligem Insert) wurden Übernachtkulturen (5 ml LB, 5 µl Ampicillin, 1 gepickte Kolonie bei 37 °C Wasserschüttelbad) verschiedener Bakterienklone angelegt. Die Isolierung der Plasmide aus diesen Kulturen erfolgte mittels Säulenchromatographie "Miniprep-Kit" der Firma Quiagen, gemäß der enthaltenen Anleitung:

Die Übernachtkulturen wurden zunächst bei 4 °C 10 min mit 4000 rpm abzentrifugiert und die resultierenden Pellets in je 0,4 ml Puffer 1 (100 µg/ml RNaseA, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Hinzu wurden je 0,4 ml des Lysepuffers 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) gegeben und zu RNA-Verdau und Zellyse 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Proteinausfällung. Hierzu wurden je 0,4 ml Puffer 3 (2,55 M KAc, pH 4,8) vorsichtig untergemischt, wodurch die denaturierten Proteine weißlich ausflockten. Die Ansätze wurden dann bei 4 °C 15 min mit 14000 rpm zentrifugiert und die Überstande auf zuvor mit Bindepuffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, 0,15% Triton X-100) equilibrierte Quiagen-Säulen gegeben. Nach zweimaliger Applikation von je 2,5 ml Waschpuffer (1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7) wurde die an die Säulen gebundene Nukleinsäure mit je 0,9 ml Elutionspuffer (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 8,2) in Eppendorf-Röhrchen eluiert. Zur Plasmidpräzipitation wurde dem Eluat Isopropanol (0,7 Vol.) zugegeben und wieder bei 4 °C 30 min mit 14000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig entfernt und die Pellets mit 100 µl Ethanol 70% gewaschen und abzentrifugiert. Das Ethanol wurde dann durch Abpipettieren und Lufttrocknen der Pellets komplett entfernt und die so gewonnene Plasmid-DNA in 50 µl TE aufgenommen.

Die Plasmidpräparationen von pGEML00xL99 sowie pCR™IIPFLxPRL wurden, nach vorherigem PCR-Screening der Übernachtkulturen (3 ml LB, 3 µl Ampicillin, 1 Kolonie bei 37°C Wasserschüttelbad) mit intern gelegenen Primern mittels "Miniprep-Kit" der Firma Quiagen hergestellt. Aufgrund der zu Transfektionszwecken benötigten größeren Menge, wurden zur Isolation der klonierten Plasmid-DNA pMECD8FPFLxPRLneo Übernachtkulturen von 200 ml
LB, 400 µl Ampicillin, 1 Kolonie bei 37°C Wasserschüttelbad angelegt. Diese wurden gemäß der "Maxi-Prep"-Anleitung "JetStar" der Firma Genomed weiterverarbeitet.

### 3.4.6 Sequenzierung und Sequenzanalysen

Das Plasmid pCR<sup>™</sup>IISFLxSRL wurde mittels des "ABI PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Perkin Elmer Corporation, 1995) sequenziert. Bei diesem nicht radioaktiven Verfahren wurden die farbig markierten Oligonucleotide 'M13 forward' und 'M13 reverse' eingesetzt. Die Analyse der Sequenzgele erfolgte mittels computergestützer maschineller Auswertung (unter Verwendung der DNA-Star und Mac Molly, Softgene, Berlin, Software).

Die Plasmide pGEML00xL99 und pCR™IIPFLxPRL wurden mittels des "ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Perkin Elmer Corporation, 1995) sequenziert. Im Gegensatz zum "Dye Primer"-Verfahren wurden hierbei farbig markierte ddNTPs eingsetzt. Die Analyse der Sequenzgele erfolgte mittels computergestützter maschineller Auswertung. Hydrophobizitätsprofile und Aminosäuresequenzvergleiche von Maus- und humanen ARTs wurden mit den Softwarepaketen MacMolly und DNA-Star auf einem Macintosh Personal Computer durchgeführt.

## 3.4.7 Northern Blotting

Ein "Mouse Multiple Tissue Northern Blot" der Firma Clontech wurde mit einer *mArt4*-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde mittels PCR-Amplifikation generiert und durch "Random Primer Labeling" (Amersham) nach Anleitung des Herstellers mit hoher spezifischer Aktivität radioaktiv markiert (>10<sup>8</sup> cpm/mg). Zur Entfernung nicht inkorporierter [<sup>32</sup>P]-markierter Nukleotide wurden Chromaspin<sup>™</sup>-Säulen (Clontech) verwendet. Hybridisiert wurde 17 Stunden bei 65°C in 7% SDS, 0,5 M Natriumphosphat, 1mM EDTA. Gewaschen wurde 3x15 min bei 65°C in 1% SDS, 40 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl. Die gebundene Sonde wurde mittels Autoradiographie mit X-Omat AR-Filmen (Kodak) bei -80°C für 4 Stunden detektiert.

### 3.5 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in E.coli

3.5.1 Induktion der Expression rekombinanter Fusionsproteine und Herstellung von Periplasmalysaten

Eine frische Einzelkolonie des mit pASK60-Strep und Insert transformierten Expressionsstamms NM522 wurde in 10 ml LB-Medium gebracht. Dieses enthielt zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin und 5mM Nicotinamid (Sigma, hemmt die NADase-Aktivität der mono-ADP-Ribosyltransferasen und somit deren Toxizität auf die Bakterien). Die Kultur wurde bei 28 °C über Nacht im Wasserbad geschüttelt.

Obwohl die optimale Wachstumstemperatur für E. coli 37 °C beträgt, werden bei dieser Temperatur einige rekombinante Proteine in unlöslicher, d.h. funktioneller nicht Form im Periplasma vorgefunden. Durch Temperatursenkung ist iedoch möglich diesem Phänomen es entgegenzuwirken (Biometra, Das Strep-tag Expressionsund Reinigungssystem).

Am folgenden Morgen lag die OD550 der Kultur bei 3,6. Für die Expressionskultur wurde daraufhin von den gesamten 10 ml der Vorkultur eine 1:100 Verdünnung (also auf 1I LB-Medium) hergestellt und wieder über Nacht bei gleichen Bedingungen inkubiert.

Am nächsten Morgen, bei einer OD550 von 3,3 wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4 °C, 3500 rpm, 10 min) geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20 ml vorgekühltem Periplasmalysepuffer (100mM TrisHCI, 500 mM Sucrose) aufgenommen und der Ansatz zum Aufschluß des periplasmatischen Raums 30 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung der entstandenen Sphäroplasten wurde die Suspension zweimalig zentrifugiert

(jeweils 4 °C, 4000 rpm, 10 min und RT, 8000 rpm, 20 min), und der die löslichen Komponenten des Periplasmas enthaltende Überstand in neue Tubes überführt.

Zur Einengung des Volumens und zur Abtrennung von Molekülen mit einem Molekulargewicht bis 10 kDa wurde das Periplasmalysat im CENTRIPREP Einwegkonzentrator (Amicon) bis zum Erreichen von 1/5 bis 1/10 des Ausgangsvolumens mit 3000 g zentrifugiert und dann bei 4°C gelagert.

## 3.5.2 Proteinaufreinigung über Streptavidin-Affinitätssäulen

Alle Arbeiten wurden bei 4 °C durchgeführt. Es wurden 100 µl Streptavidin-Sepharose-Suspension (= 50 µl Matrix) eingesetzt und diese zur Äquilibrierung 3 mal mit je 600 µl Puffer W (100 mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA, 0,02% w/v NaN<sub>3</sub>) gewaschen (Zentrifugation 1000 rpm, 2 min und Verwerfen des Überstands). Zur Matrix wurden dann 2 ml Centriprep des PPL gegeben und zur Adsorption des exprimierten Fusionsproteins 1 h auf einem Roller inkubiert. Die Suspension wurde danach wieder abzentrifugiert (1000 rpm, 2 min), der Überstand verworfen, die Matrix zweimal mit Puffer W gewaschen (s. oben), schließlich in 500 µl Puffer W aufgenommen und auf eine Säule gegeben. Diese wurde abermals mit zweimal 500 µl Puffer W gewaschen und dann das Protein fraktioniert mit sechsmal 40 µl Puffer E (100 mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA, 3 mM Diaminobiotin, 0,02% w/v NaN<sub>3</sub>) eluiert.

### 3.5.3 Proteinaufreinigung mittels Talon™

Zur Feststellung der maximalen Bindungskapazität von T01x34FH an Talon<sup>™</sup> wurden je 100 µl Talon<sup>™</sup>-Suspension (Clontech) (= 10 µl Talon-Matrix in 90 µl PBS) mit 20 µl, 40µl, 80 µl, 160 µl, 320 µl, 640 µl des CENTRIPREP T01x34FH bei 4°C unter ständigem Durchmischen über Nacht inkubiert. Am folgenden Morgen wurden die Pellets je viermal mit PBS gewaschen, um sie dann mit je 20 µl 1xProbenpuffer/DTT (s. S. xx) aufzunehmen und der SDS-PAGE zuzuführen.

Nach Feststellung der maximalen Bindungskapazität von T01x34FH an Talon<sup>™</sup>, wurde im entsprechenden Verhältnis aufgereinigt. Hierzu wurden zunächst 200 µl Talonmatrix dreimal mit 6 ml PBS gewaschen (Zentrifugation mit 1300 rpm für 2 min bei Raumtemperatur). Zur Adsorption des exprimierten Fusionsproteins wurde die Matrix dann mit 10 ml des T01x34FH-CENTRIPREP für eine Stunde bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Die Suspension wurde anschließend abzentrifugiert (1300 rpm, 3 min bei Raumtemperatur) und das Talon<sup>™</sup>-/Proteinpellet zweimal mit 6 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in PBS aufgenommen und auf eine Säule übertragen. Hier wurde abermals zweimal mit 600 µl PBS gewaschen und dann das Protein fraktioniert mit fünfmal 200 µl Elutionspuffer (100 mM EDTA, im Auffangtube je 2 µl 1M Tris pH 8,0) gewonnen. Die Analyse der Eluate erfolgte mittels SDS-PAGE, Western-Blotting und Immunodetektion.

## 3.6 SDS-PAGE, Western Blotting und Immunodetektion

Mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Immunodetektion wurden die hergestellten Periplasmalysate sowie die Eluate der Proteinaufreinigung über Streptavidin- und Talon-Affinitätssäulen auf rekombinante Fusionsproteine untersucht.

### 3.6.1 SDS-PAGE

Verfahren wurde in Anlehnung an die im "Molecular Cloning" (Sambrook et al., 1989) beschriebene Methode. Eingesetzt wurde ein "diskontinuierliches Puffersystem", wobei alle Komponenten zwischen 0,5% und 1% SDS enthielten (Ornstein & Davis, 1964). Gearbeitet wurde mit einer Minigel-Apparatur (Xcell II<sup>®</sup> Mini-Zelle von NOVEX).

Bereits fertig gekaufte Tricine-Minigele (10% Polyacrylamid, Größe: 8 cm x 8 cm, Schichtdicke 1,0 oder 1,5 mm und 10 bzw. 15 Taschen) von Novex wurden vertikal in die Elektrophoreseapparatur gespannt und die innere Pufferkammer (entspricht dem oberen Pufferreservoir bei anderen Systemen) mit ca. 170 ml 1x Laufpuffer (10x Laufpuffer: Tris 121g, Tricine 179 g, SDS 10 g, a.i. auf 1 l, pH 8,3) gefüllt. Nach dem Laden der Probentaschen (Probenvorbereitung s.u.) wurde die äußere Pufferkammer (entspricht dem unteren Pufferreservoir anderer Systeme) ebenfalls mit 600 ml 1x Laufpuffer gefüllt und die, nach Angaben des Herstellers, optimale Spannung von 100 V für ca. 90 min angelegt. Kurz bevor die in Front laufende Serva Blue/Phenol Red-Bande das untere Ende des Gels erreichte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel für den Western Blot vorbereitet.

Zur Probenvorbereitung wurden 10  $\mu$ l Centriprep des Periplasmalysates bzw. Eluat mit 10  $\mu$ l 2x Probenpuffer (3 ml 3.0 M Tris-HCl, pH 8,45, 2,4 ml Glycerin, 0,8 g SDS, 1,5 ml 0,1% Serva Blue G, 0,5 ml 0,1% Phenol Red, a.i. auf 10ml) und 50 mM DTT versetzt und bei 95°C 5 min inkubiert. Hiervon wurden 10  $\mu$ l pro Tasche geladen.

## 3.6.2 Western Blotting

Geblottet wurde im NOVEX Western Transfer Apparatus nach Anleitung der Firma Novex. Vorbereitend wurde das Elektrophoresegel, um überschüssige Puffersalze und Detergenzien zu entfernen, 10 min in Blotpuffer geschwenkt. Weiterhin wurden pro Gel jeweils eine PVDF- (Milipore, Applied Biosystems) und eine Nitrozellulose-Membran (Amersham) zugeschnitten, wobei die PVDF-Membran für 30 sec in Methanol aktiviert, kurz mit a.i. abgespült und schließlich für 15 min in Blotpuffer äquilibriert wurde. Die Nitrozellulosemembran wurde direkt für 15 min in Blotpuffer gegeben.

Für den Blot wurden, von der Kathode aus gesehen, aufeinandergeschichtet:

2-3 in Blotpuffer getränkte Blotting-Pads

1 in Blotpuffer getränktes Filterpapier

1 Nitrozellulosemembran

1 Gel

1 PVDF-Membran

1 in Blotpuffer getränktes Filterpapier

2-3 in Blotpuffer getränkte Blotting-Pads

und Abschluß durch die Anodenplatte.

Im Folgenden wurde das Blotmodul in die Pufferkammer eingeschoben und mit Blotpuffer aufgefüllt. In die Pufferkammer wurden 650 ml a.i. gegeben und die Spannung wie folgt angelegt: Zunächst wurde für 90 sec in Richtung Nitrozellulosemembran geblottet, danach für 90 min in Richtung PVDF-Membran (30 Volt, 200 mA). Maximal wurden zwei Gele aufeinmal geblottet.

Nach dem Blotten wurden die Nitrocellulosemembranen mittels Silberfärbung und die PVDF-Membranen mittels Immunodetektion weiterbehandelt. Die Gele wurden entsorgt.

Zusammensetzung Blotpuffer:

12 mM Tris 96 mM Glycine in 20 % Methanol pH 8,3

## 3.6.3 Silberfärbung

Die Nitrozellulosemembran wurde zunächst 5 min in  $H_2O$  bidest angefeuchtet und dann solange in der Färbelösung geschwenkt, bis deutliche Banden sichtbar waren. Die Färbelösung wurde als Sonderrmüll entsorgt. Die gefärbte Membran wurde abschließend mit Wasser abgespült, in  $H_2O$  bidest gewaschen und getrocknet.

Färbelösung:

9 ml a.i.

0,5 ml 40% w/v Natriumzitrat

0,4 ml 20% w/v FeSO<sub>4</sub>-Lösung

unter ständigem vortexen tropfenweise 0,1 ml 20% Silbernitrat zugeben.

#### 3.6.4 Immunodetektion

Die PVDF-Membran wurde zunächst zur Abschwächung unspezifischer Proteinbindung für 30 min in Blocklösung (10% Ziegenserum und 0,5% Tween 20 in TBS) inkubiert.

Um auszuschließen, dass es sich im Falle der Strep-Tag-Detektionen bei der zu detektierenden Bande (erwartete Größe ca. 29 kDa, nach der zu erwartenden Primärsequenz mit dem Programm *DNA-Star* auf einem Macintosh berechnet) um das kovalent biotinylierte Biotinyl-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP, 22 kDa) aus E. coli handelt, wurde eine zweite PVDF-Membran mit einer 2 µg/ml Avidin enthaltenden Blocklösung inkubiert. Hierdurch wurde die Detektion des BCCP durch Blockierung verhindert (Schmidt & Skerra, 1993).

Anschließend wurden beide PVDF-Membranen mit Streptavidin-Peroxidase (Amersham) 1:1000 in TBST (0,5% Tween 20 in TBS) bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Membranen je zweimal 5 min und viermal 15 min in TBST gewaschen und der gebundene Antikörper mittels ECL (Amersham) gemäß der Anleitung des Herstellers und Belichtung von Amersham ECL-Filmen für 1-5 min detektiert.

Zur Detektion des Flag-Tag wurde mit monoklonalem M2-Antikörper (Kodak/ IBI) als Erstantikörper in einer Konzentration von 1:2000 in TBST inkubiert. Nach der Inkubation von einer Stunde bei 4°C und intensivem Waschen mit TBST wurde als Zweitreagenz, zur Detektion des gebundenen M2-Antikörpers, Ziegen-anti-Maus IgG-Peroxidase (Konz.: 1:3000, Dianova) eingesetzt. Nach mehrmaligem Waschen mit TBST wurde der gebundene Antikörper mittels ECL (Amersham) detektiert.

42

# 3.7 Expression und Nachweis von membranständiger hART4 in COS-Zellen

### 3.7.1 Vorbereitung der Zellen

Die COS-Zellen wurden in *Coster Tissue Culture*-Flaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit DMEM (MOD Eagle Medium, Dulbecco, Gibco BRL, 1% Natrium-Pyruvat 100 mM, 1% Glutamat, 1% Penicillin-Streptomycin, 10% FCS) inkubiert. Geerntet wurde, nach Abnahme von DMEM und einmaligem Waschen mit PBS, mittels fünfminütiger Inkubation in EDTA-Trypsin (4ml PBS + 1 ml EDTA-Trypsin 10x) bei 37°C. Hiernach wurden die COS-Zellen mit DMEM neutralisiert, abzentrifugiert, gezählt, wiederum auf Kulturflaschen verteilt und inkubiert. Dieser Zyklus wurde solange wiederholt, bis 1,6 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Flasche (bei 10 Flaschen = 1,6 x 10<sup>7</sup> Zellen) ausplattiert werden konnten. Diese wurden wiederum über Nacht inkubiert, um sie am folgenden Tag zu transfizieren (pro Plasmid zwei Flaschen).

### 3.7.2 Transfektion

Zur Transfektion eingesetzt wurden die Plasmide pMECD8FPFLxPRLneo und pMECD8FNZWneo. Letzteres enthält anstelle des *ART4*-Inserts ein Insert für murines *ART2.1*.

Transfiziert wurde mittels Lipofektamin (Life Technologies<sup>™</sup>, Gibco BRL) nach Anleitung der Firma. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen ca. 60-70% konfluent (die zur Transfektion optimale Zelldichte).

Zunächst wurden getrennt je Flasche angesetzt:

- Lösung A: 15 μg DNA + 750 μl OPTI-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium (Gibco BRL) und
- Lösung B: 75 μl Lipofektamin (Gibco BRL) + OPTI-MEM<sup>®</sup> I

Danach wurden beide Lösungen sanft vermischt und zum Einschluß der DNA in die zellmembranähnliche Lipiddoppelschicht 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran wurden nochmals 6 ml OPTI-MEM<sup>®</sup> I zugegeben und das DNA-Liposomen-Gemisch zu den vorbereiteten COS-Zellen (zweimal mit 7,5 ml OPTI-MEM<sup>®</sup> I gewaschen) gegeben.

Die Kulturflaschen wurden bei 37°C 3 h unter Luftabschluß und 3 h mit losem Deckel inkubiert. Anschließend wurden 15 ml vorgewärmtes DMEM pro Flasche zugegeben, weitere 20 h bei 37°C inkubiert, um danach das Medium komplett gegen DMEM auszutauschen (Entfernung der überschüssigen Transfektionslösung) und die COS-Zellen wiederum über Nacht zu inkubieren.

Die transfizierten Zellen wurden erstmals ca. 36 h nach Transfektion geerntet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die COS-Zellen 2 min in 2x Trypsin-EDTA inkubiert und nach Zugabe von DMEM abzentrifugiert. Die Resuspension der Zellpellets erfolgte in 10 ml DMEM (ohne FCS-Zusatz).

## 3.7.3 Selektion stabil transfizierter Zellen

Hierzu wurde ein häufig in Säugerzellen verwendeter Selektionsmarker, ein bakterielles Antibiotikaresistenzgen, das Resistenz gegen Geneticin (= G 418, mit Neomycin verwandte Substanz) verleiht, eingesetzt. 1/10 der mit pMECD8FPFLxPRLneo und pMECD8FNZWneo transfizierten Zellen wurden in Petrischalen (15 cm<sup>2</sup>, Coster) in jeweils 20 ml DMEM + Geneticin (500  $\mu$ g/ml) bei 37°C inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage.

### 3.7.4 FACS-Analysen

Zum Nachweis der Proteinexpression auf der Zellmembran wurde ein Teil der kultivierten Zellen mittels fluoreszierender Antikörper vital markiert und per FACS-Analyse (fluoreszenzaktivierter Zellsortierer) untersucht. Hierzu wurden zunächst je 1/10 der geernteten Zellen abzentrifugiert und in je 100 µl DMEM aufgenommen. Zu je 50 µl dieser Zellsuspensionen wurde

1. kein Erstantikörper (Negativkontrolle) und

2. 1μl M2 (Maus-AK gegen Flag-Tag gerichtet) zugegeben und die Ansätze für 1 h bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellpellets in je 100 μl DMEM mit FITC-anti-Maus IgG resuspendiert und für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum mehrmals in PBS gewaschen, abzentrifugiert, in jeweils 100 μl 2% Paraformaldehyd in 1,5x PBS (Fixierung der Zellen) aufgenommen und der automatisierten FACS-Analyse mit einem FACS-Calibur Gerät (Becton Dickinson) zugeführt.

# 4 Ergebnisse

Im Folgenden wird in chronologischer Reihenfolge die Klonierung, Expression und Aufreinigung von hART4 im prokaryontischen E. coli System, die Expression und Aufreinigung von hART3 in E. coli sowie die Klonierung und Expression von hART4 im eukaryontischen COS-Zell-System dargestellt. Den Abschluß der Untersuchungen bildet der Nachweis von hART4-Homologen in weiteren Spezies und die nähere Charakterisierung des entsprechenden Gens in der Maus.

## 4.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung von hART4 in E. coli

Ziel der Untersuchung war die Klonierung, Expression sowie Aufreinigung von hART4 als rekombinantes Fusionsprotein im prokaryontischen E. coli-System (s. Abb. 6).

Zunächst erfolgte die PCR-Amplifikation der für das Nativprotein kodierenden Sequenz aus genomischer DNA. Hiernach wurde diese in ein eigens für PCR-Produkte ausgearbeitetes System kloniert. Nach Sequenzierung der hergestellten Plasmidpräparationen wurde das PCR-Fragment mit der korrekten Sequenz in einen Expressionsvektor umkloniert.

Nach Expression des rekombinanten Fusionsproteins in einem weiteren E. coli-Stamm wurde dessen Gewinnung aus dem periplasmatischen Spalt der Bakterien vorgenommen. Hiernach erfolgte mittels Immunodetektion der Nachweis des hART4Strep. Des weiteren wurde versucht über ein Aufreinigungsverfahren die Konzentration des potentiell gewonnenen rekombinanten Fusionsproteins zu steigern.

46

### 4.1.1 Herstellung des Expressionskonstruktes

a) PCR-Amplifikation von hART4 mittels der Primer SFL und SRL

Die PCR-Amplifikation von *hART4* erfolgte mittels der Exon 2 überspannenden Primer SFL und SRL (s. Abb. 5). Das Exon 2 des *hART4*-Gens codiert mit einer Größe von ca. 720 bp für die Sequenz des Nativproteins. Das amplifizierte Insert beinhaltet folglich weder Introns noch das C-terminale hydrophobe Signalpeptid für die GPI-Verankerung (Exon 3).

Als Matrize für die PCR-Amplifikation diente klonierte genomische DNA. Der Primer SFL codiert für eine Stu I-Schnittstelle direkt am N-terminalen Ende von Exon 2 und ist so gewählt, dass es nicht zu Leserasterverschiebungen am Übergang von OmpA-Signalsequenz des pASK60-Strep-Vektors und *hART4*-Insert kommt. Der Primer SRL codiert für eine Pst I-Schnittstelle am Cterminalen Ende von Exon 2.

Die Agarosegelanalyse des SFLxSRL-PCR-Ansatzes zeigte eine Bande mittlerer Stärke etwas unterhalb der 770 bp großen Marker-Bande (s. Abb. 12), was der theoretisch zu erwartenden Größe von 717 bp entspricht und auf eine relativ gute Amplifizierung von *hART4* aus genomischer DNA hinweist (Vergleich zur Negativkontrolle).



# Abb. 12: Agarosegelelektrophorese des PCR-Amplifikats der für das Nativprotein des hART4 kodierenden Sequenz aus genomischer DNA

Zur PCR-Amplifikation wurden die Exon 2 überspannenden Primer SFL und SRL eingesetzt (s. Abb. 5).

Auf ein 1%iges Agarosegel wurden 0,5 μl des Markers Lambda DNA-Hind III Digest (Pharmacia) (1) und jeweils 2 μl der PCR-Ansätze hART4 SFLxSRL (2) sowie eine Negativkontrolle ohne DNA (3) aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels Ethidiumbromid.

Bei einer erwarteten Größe von 717 bp zeigte sich eine Bande mittlerer Stärke auf der entsprechenden Höhe.

Zur Klonierung des *hART4*-Fragments SFLxSRL wurde dieses in den Vektor pCR™II ligiert (Bestandteil eines eigens für PCR-Produkte ausgearbeiteten Klonierungssystems) (s. Abb. 3A) und die Ligationsansätze in E. coli INVaF′ transformiert.

Die im weiteren Verlauf hergestellten Plasmidpräparationen wurden mittels Restriktionsendonukleasen gescreent und die positiven Klone, zum Ausschluß von Mutationen und zur Feststellung der Korrektheit der Insertfusionsstellen, sequenziert. Über die korrekte Sequenz verfügte eine der untersuchten Plasmidpräparationen, welche dann zur Umklonierung in den Expressionsvektor eingesetzt wurde. b) Umklonierung des PCR-Fragments SFLxSRL vom Vektor pCR™II in den Expressionsvektor pASK60-Strep

Zunächst wurden sowohl der pCR™II SFLxSRL als auch der Expressionsvektor pASK60-Strep (s. Abb. 4A) mittels der Restriktionsendonukleasen Stu I und Pst I verdaut.

Wie erwartet zeigte die Agarosegelanalyse des pCR™IISFLxSRL-Verdaus drei Banden (s. Abb. 13a), wobei es sich bei der kleineren um das SFLxSRL-Fragment von 717 bp handelt und die beiden größeren Banden von 2398 bp bzw. 1167 bp durch zwei weitere Pst I- Schnittstellen im Vektor bedingt sind (ein weiteres erwartetes Fragment von 335 bp wurde aufgrund seiner geringen Größe in diesem Gel nicht detektiert).

Beim Verdau des Expressionsvektors (enthält jeweils nur eine Schnittstelle für Stu I und Pst I) wurde dieser aus seiner zirkulären Form linearisiert, wobei Stu I für ein stumpfes Ende und Pst I für ein "klebriges" Ende verantwortlich ist. Fragmentgröße: 3832 bp (s. Abb. 13b).

Nach der Auftrennung im Agarosegel wurden sowohl das SFLxSRL-Fragment, als auch der linearisierte Vektor ausgeschnitten und die enthaltene DNA mittels JETsorb (Genomed) aufgereinigt (s. Abb. 13c). Nach der relativen Konzentrationsbestimmung wurde im Verhältnis Vektor zu Insert von etwa 1:2 ligiert und der Ansatz in den resistenzlosen E. coli-Stamm XL-2 Blue ultracompetent transformiert.



# Abb. 13: Umklonierung des *hART4*-PCR-Fragments SFLxSRL vom Vektor pCR™II in den Vektor pASK60-Strep

Hierzu erfolgte der Restriktionsverdau von pCR™IISFLxSRL (a) und pASK60-Strep (b) mittels der Restriktionsendonukleasen Stu I und Pst I (s. Abb. 6).

Die Pfeile markieren die ausgeschnittenen Banden. Die enthaltene DNA wurde mittels JETsorb (Genomed) aufgereinigt und zur relativen Konzentrationsbestimmung erneut mittels Agarosegelelektrophorese (1%iges Gel) aufgetrennt (c). Im folgenden sind zu sehen:

- a) 1. Marker Lambda DNA-Hind III Digest
  - 2. pCR™IISFLxSRL (Fragment von 717 bp)
- b) 1. Marker Lambda DNA-Hind III Digest
  - 2. pASK60-Strep (linearisierter Vektor von 3832 bp)
- c) 1. Marker Lambda DNA-Hind III Digest
  - 2. pASK60-Strep
  - 3. SFLxSRL

Die im Anschluß an die Transformation hergestellten Übernachtkulturen wurden mittels PCR mit den intern gelegenen Primern L11 und L42 auf enthaltene Inserts untersucht. Die Agarosegelanalyse zeigte, dass zwei von vier Kulturen Banden der Größe des *hART4*-Fragments enthielten (s. Abb.

14a). Hiervon wurden Plasmidpräparationen hergestellt, welche wiederum mittels Restriktionsenzymverdau mit Stu I und Pst I kontrolliert wurden. Dieser zeigte, dass die Plasmidpräparation der Übernachtkultur aus Abb. 14a Spur 5 die insertbegrenzenden Schnittstellen auch nach der Klonierung in den Expressionsvektor pASK60-Strep noch aufwies (s. Abb. 14b, Spur 1.).

Der Eco RI-Verdau ergab eine Bande etwas unterhalb der Markerbande von 4361 bp, die dem unverdauten pASK60SFLxSRLST entspricht (keine Eco RI-Schnittstelle in Vektor und Insert).



# Abb. 14: PCR-Screening (a) und diagnostischer Restriktionsverdau (b) der klonierten hART4 Expressionsvektoren pASK60SFLxSRLST

Mittels der intern gelegenen Primer L11 und L42 wurden die hergestellten Kulturen aus transformierten Bakterien auf inserthaltige Vektoren untersucht. Es zeigte sich, daß zwei Ansätze das hART4-Fragment enthielten (Spur 4 und 5).

- (a) 1. Marker Lambda DNA-Hind III Digest
  - 2. kein PCR-Amplifikat
  - 3. wie 2.
  - 4. PCR-Amplifikat L11xL42 (ca. 655 bp)
  - 5. wie 4.

Die hergestellten Plasmidpräparationen der positiven Kulturen wurden einem diagnostischen Restriktionsenzymverdau zugeführt. Es zeigte sich, daß ein Klon auch nach der Umklonierung die insertbegrenzenden Schnittstellen aufwies.

- (b) 1. Restriktionsverdau mit Stu I und Pst I
  - 2. Marker Lambda DNA-Hind III Digest
  - 3. Restriktionsverdau mit Eco RI

# 4.1.2 Expression und Detektion des rekombinanten Fusionsproteins hART4-Strep

Nach Transformation der positiven Plasmidpräparation aus Abb. 14 in E. coli NM522 wurden die in den periplasmatischen Spalt sezernierten Proteine in Form eines Periplasmalysates gewonnen. Dieses wurde durch Abtrennung niedermolekularer Proteine bis 10 kDa (s. Centriprep S. 37) konzentriert und die zurückbleibenden Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt (im Vergleich zu einem rART2-Strep enthaltendem Periplasmalysat). Die so größenfraktionierten Proteine wurden mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferriert und mit Streptavidin-Peroxidase detektiert.

In der ECL-Detektion zeigte das rART2-Periplasmalysat eine relativ schwache Bande der erwarteten Größe von 33 kDa, das potentiell hART4 enthaltende Periplasmalysat bzw. Centriprep zeigten Banden etwas stärkerer Intensität etwas unterhalb der 30 kDa Markerbande (vorausgesagte Größe ca. 29 kDa) (s. Abb. 15).



# Abb. 15: Western Blot Analyse von Periplasmalysaten aus mit hART4 und rART2 transformierten E. coli

Es erfolgte die Größenfraktionierung der Proteine des E. coli Periplasmalysates (PPL) pASK60hART4ST sowie desselben nach Abtrennung niedermolekularer Proteine bis 10 kDa (mittels Filter und Zentrifugation = CENTRIPREP) durch SDS-PAGE (12%iges Tricine Gel, Novex). Im Anschluß wurde ein Western Blot auf eine PVDF-Membran und eine Immunodetektion mittels Streptavidin-Peroxidase durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein rART2 enthaltendes E. coli Periplasmalysat analysiert. Es wurde aufgetragen:

- 1. Marker SeeBlue™ (Novex)
- 2. PPL pASK60rART2ST
- 3. PPL pASK60hART4ST (pASK60SFLxSRLST)
- 4. CENTRIPREP pASK60hART4ST (pASK60SFLxSRLST)

Der Pfeil markiert die Bande der vorausgesagten Größe von ca. 29 kDa, dem potentiellen hART4 entsprechend.

## 4.1.3 Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins hART4-Strep

Um die Konzentration des rekombinanten Fusionsproteins zu steigern (insbesondere für spätere Enzymassays und Antikörperproduktion), wurde das CENTRIPREP des Periplasmalysates mittels einer Streptavidin-Matrix aufgereinigt und Proben der einzelnen Schritte (Matrix ohne und mit gebundenem Protein, Waschvorgänge, Überstände, Eluate etc.) mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Streptavidin-Peroxidase detektiert.

Erwartet wurde, den Hauptteil des aufgereinigten rekombinanten Fusionsproteins in den Eluaten 2-5 zu finden. Die ECL-Detektion zeigte jedoch, entgegen aller Voraussagen, dass in keinem der untersuchten Eluate das zu erwartende Protein enthalten war (s. Abb. 16, Spur 8-12). Festzustellen war, dass der Großteil des ca. 29 kDa großen Proteins des Periplasmalysates, nach Inkubation mit der Streptavidinmatrix, an dieser haftete und sich durch den verwendeten Diaminobiotin-haltigen Elutionspuffer nicht abkoppeln ließ.

Bei einer weiteren detektierten Bande in Höhe von ca. 10 kDa handelt es sich offensichtlich um einen Bestandteil der verwandten Matrix (s. Abb. 16, Spur 2).



# Abb. 16: Western Blot Analyse einer Affinitätsreinigung von Streptavidin-bindenden Proteinen aus einem Periplasmalysat von hART4ST transformierten E. coli

Dargestellt ist ein Versuch, rekombinantes Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie an einer Streptavidinmatrix aufzureinigen. Die Proben der einzelnen Schritte wurden SDS-PAGE sowie Western Blotting zugeführt. Es wurde erneut mit Streptavidin-Peroxidase immunodetektiert. Die Proben wurden wie folgt aufgetragen:

- 1. Marker SeeBlue™
- 2. Periplasmalysat (PPL) aus pASK.60hART4ST transformierten E.coli
- 3. Original Streptavidin-Matrix
- 4. Überstand (= nicht an die Matrix gekoppeltes Protein)
- 5. Streptavidin-Matrix mit gekopppeltem Protein aus PPL
- 6. Waschpuffer nach 1. Waschung
- 7. Waschpuffer nach 4. Waschung
- 8. Diaminobiotin Eluat 1
- 9. Eluat 2
- 10. Eluat 3
- 11. Eluat 4
- 12. Eluat 5
- 13. Streptavidin-Matrix nach der Elution des gebundenen Proteins

Dieses Ergebnis führte zu der Frage, ob es sich bei der detektierten 29 kDa Bande überhaupt um das rekombinante Fusionsprotein aus Exon 2 des *hART4* mit Strep-Tag handelte, oder etwa um ein E. coli eigenes Protein. Hier kam das Biotinyl-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP, ca. 22 kDa) aus E. coli in Frage.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden wiederum Proben der verschiedenen Schritte der Streptavidin-Aufreinigung mittels SDS-PAGE und Western Blotting größenfraktioniert auf eine PVDF-Membran übertragen und diese vor der Detektion mit einer Avidin enthaltenden Blocklösung inkubiert. Hierdurch wurde die Detektion des BCCP aus E. coli mittels Streptavidin ausgeschlossen. Die anschließende ECL-Detektion zeigte, dass durch die Inkubation mit Avidin die zuvor detektierten Banden nicht mehr nachweisbar waren (s. Abb. 17). Dies führte zu dem Schluß, dass es sich bei den detektierten Banden aus Abb. 15 und 16 nicht wie zunächst angenommen, um das gewünschte rekombinante Fusionsprotein hART4 handelt, sondern um das E. coli eigene Biotinyl-Carboxyl-Carrier-Protein.

Entsprechende Analysen mit einem vergleichbaren Expressionskonstrukt für hART3 mit einem chimären FLAG-His (6x) Epitopmarker anstelle des Strep-Tags zeigten eine erfolgreiche Produktion von rekombinanten Proteinen (R. Braren, persönliche Mitteilung). Auf Grund dessen wurden die im folgenden Abschnitt beschriebenen Untersuchungen mit diesem Konstrukt durchgeführt.

#### 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



30 kDa 16 kDa

# Abb. 17: Western Blot Analyse der affinitätsgereinigten Proteine nach Blockade des Biotiny-Carboxyl-Carrier Proteins (BCCP) mit Avidin

Das Vorgehen war wie unter Abb. 16 beschrieben, jedoch wurde zusätzlich Avidin zur verwendeten Blocklösung beigegeben. Avidin kann die Bindung von Streptavidin-Peroxidase an BCCP unterdrücken, nicht jedoch die Bindung an den Streptag. Die Proben wurden wie folgt aufgetragen.

- 1. Periplasmalysat aus pASK60hART4ST transformierten E.coli
- 2. mittels CENTRIPREP konzentriertes PPL pASK60hART4ST
- 3. Überstand (= nicht an die Matrix gekoppeltes Protein)
- 4. Waschpuffer nach 1. Waschung
- 5. Waschpuffer nach 3. Waschung
- 6. Streptavidin-Matrix vor der Elution des gekoppelten Proteins
- 7. Marker SeeBlue™
- 8. Streptavidin-Matrix nach der Elution des gekoppelten Proteins
- 9. Diaminobiotin Eluat 1
- 10. Eluat 2
- 11. Eluat 3
- 12. Eluat 4
- 13. Eluat 5
- Pro Spur 10 µl Probe geladen.

## 4.2 Expression von *hART3* in E. coli

Ziel der Untersuchung war die Expression und Aufreinigung von hART3 als rekombinantes Fusionsprotein im prokaryontischen E. coli-System (s. Abb. 8). Als Ausgangsmaterial diente ein bereits von Rickmer Braren in unserem Labor hergestellter Expressionsvektor, der die kodierende Sequenz für hART3 enthielt (s. Abb. 7). Nach Expression des rekombinanten Fusionsproteins in einem E. coli Stamm sowie Feststellung der maximalen Bindungskapazität des His-Tags des Proteins an Talon erfolgte in optimalem Konzentrationsverhältnis die Aufreinigung des rekombinanten hART3-FH über diese Matrix.

4.2.1 Feststellung der maximalen Bindungskapazität von rekombinantem hART3-FH an Talon™

Das mittels CENTRIPREP konzentrierte und potentiell rekombinantes hART3-Flag-His (T01x34FH) enthaltende Periplasmalysat (der mit pASK60T01x34FH transformierten E. coli NM 522-Bakterien) wurde, zur Bestimmung der maximalen Bindungskapazität des T01x34FH an Talon™, in unterschiedlicher Konzentration mit der Matrix inkubiert. Je 10 µl Talonmatrix wurden in aufsteigender Reihe mit 20 µl, 40µl, 80 µl, 160µl, 320 µl und 640 µl hART3-haltigem, konzentriertem Periplasmalysat inkubiert. Im Anschluß daran wurden sowohl die Matrixpellets (d.h. das gebundene Protein) als auch deren Überstände (d.h. das nicht gebundene Protein) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Flag-Tag wurde mit monoklonalem M2-Erstantikörper und dem Zweitantikörper Ziegen-anti-Maus-IgG-Peroxidase und anschließender ECL detektiert.

Die ECL-Detektion (s. Abb. 18) zeigte in allen Spuren der aufgetrennten Pellets Banden der erwarteten Größe von ca. 30 kDa, was den Gehalt an rekombinantem hART3 im Periplasmalysat bestätigt. Die Intensität der Banden nimmt mit ansteigender Menge des eingesetzten Periplasmalysates zu. Sehr starke Signale sind bei 320 µl und 640 µl zu sehen.

Die Spuren mit den Überständen hingegen zeigten bis zum Einsatz von 160 µI Centriprep kein Signal. Dies spricht für eine komplette Bindung des hART3-FH-Proteins an die Matrix. Schwache Banden der Größe von 33 kDa sind erst ab einem Einsatz von 320  $\mu$ l und 640  $\mu$ l zu detektieren, wobei die Bande des 640  $\mu$ l Überstandes von stärkerer Intensität ist.

Hieraus leitet sich die maximale Bindungskapazität des T01x34FH an Talon ab, die also bei einer Menge zwischen 320  $\mu$ l und 640  $\mu$ l Centriprep auf 10  $\mu$ l Talonmatrix zu suchen ist.

#### 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



36 kDa 30 kDa

1

# Abb. 18: Western Blot Analyse zur Feststellung der maximalen Bindungskapazität von rekombinantem, FLAG/His6x-getagtem hART3 aus E.coli Periplasmalysaten an eine Talonmatrix

Zur Bestimmung der maximalen Bindungskapazität wurden steigende Mengen des rekombinanten hART3-FLAG/His6x enthaltenden konzentrierten Periplasmalysates mit einer konstanten Menge Talonmatrix (Clontech) inkubiert. Nach Größenfraktionierung der Matrix-gebundenen Proteine (Spuren 2-6) sowie der nichtgebundenen Proteine (Spuren 8-13) über SDS-PAGE (12%iges Tricine Gel) und Western Blotting auf eine PVDF-Membran erfolgte die Immunodetektion mittels des FLAG-spezifischen M2 Antikörpers, Ziegen-anti-Maus-IgG-Peroxidase und anschließender ECL. Die Expositionsdauer des Films betrug 10 Sekunden.

Die Proben wurden wie folgt aufgetragen:

- 1. Marker SeeBlue™
- 2. 10 µl Talonmatrix mit 20 µl Periplasmalysat
- 3. mit 40 μl
- 4. mit 80 μl
- 5. mit 160 μl
- 6. mit 320 μl
- 7. mit 640 μl

8. Überstand des Ansatzes aus Spur 1

- 9. Spur 2
- 10. Spur 3
- 11. Spur 4
- 12. Spur 5
- 13. Spur 6

#### 4.2.2 Aufreinigung von rekombinantem hART3-FH mittels Talon™

Zur Aufreinigung des rekombinanten hART3-FH wurde das hART3-FH enthaltende konzentrierte Periplasmalysat in optimaler Konzentration zur Talonmatrix (wie im Vorversuch bestimmt) eingesetzt. Hierzu wurden 10 ml Periplasmalysat mit 200 µl Talonmatrix inkubiert, die nicht gebundenen Bakterienproteine mittels mehrmaligem Waschens aus der Matrix entfernt und das gebundene Protein schließlich in vier Fraktionen mit EDTA eluiert (Eluate 1-4). Die Proben der einzelnen Schritte (Periplasmalysat, Centriprep, Überstand, Waschung, Elution) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mittels Antikörpern und ECL detektiert.

Die ECL-Detektion (s. Abb.19) zeigt in allen Spuren Banden der erwarteten Größe von ca. 30 kDa. Sichtbar ist die bereits deutliche Konzentrationszunahme vom ursprünglichen Periplasmalysat zu seinem Konzentrat (Spuren 2 und 3). Weiterhin sind Banden sehr starker Intensität in den Spuren der Eluate zu sehen, wobei sich, wie erwartet, der Hauptteil des aufgereinigten rekombinanten Fusionsproteins in den Eluaten 2 und 3 befindet (Spuren 8 und 9). Deutlich wird, dass nur sehr geringe Mengen des T01x34FH nicht an die Matrix binden, was durch sehr zarte Banden in den Spuren des Überstandes und der Waschungen belegt wird.

Zusammengefaßt deuten diese Ergebnisse auf die Etablierung eines optimalen Expressions- und Aufreinigungssystems für rekombinantes hART3-FH hin, was die Möglichkeit der Produktion großer Proteinmengen eröffnet. Das aufgereinigte rekombinante Fusionsprotein kann so, unter anderem, zu Funktionsuntersuchungen zur Beurteilung einer potentiellen Enzymaktivität sowie zu Immunisierungen zur Herstellung hART3-spezifischer Antikörper eingesetzt werden.

62

#### 2 3 4 5 6 7 8 9 10



# Abb. 19: Western Blot Analyse der Aufreinigung von rekombinantem hART3FH aus E. coli Periplasmalysat

Das rekombinante hART3FH Fusionsprotein wurde an die Talonmatrix in einem im Vorversuch festgelegten optimalen Verhältnis gebunden (10 ml PPL an 200  $\mu$ l Talonmatrix). Die Matrix wurde gewaschen und das gebundene Protein mit vier 200  $\mu$ l Fraktionen EDTA eluiert. Aliquots (je 10  $\mu$ l) der einzelnen Schritte wurden wie in Abb. 18 mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert.

Die Spuren wurden wie folgt beladen:

1

- 1. Marker SeeBlue™
- 2. PPL pASK60hART3FH (pASK60T01x34FH)
- 3. CENTRIPREP pASK60hART3FH
- 4. Überstand (= nicht an Matrix gekoppeltes Protein)
- 5. Waschpuffer nach erster Waschung
- 6. Waschpuffer nach dritter Waschung
- 7. Eluat 1
- 8. Eluat 2
- 9. Eluat 3
- 10. Eluat 4

## 4.3 Klonierung und Expression von hART4-GPI in COS-Zellen

Nachdem die Expression von *hART4* in E. coli nicht erfolgreich war, wurde als Alternative ein eukaryontisches Expressionssystem gewählt. Ziel war die

Expression eines nativen, GPI-verankerten Membranproteins. Zum Nachweis dieses Proteins auf der Zelloberfläche wurde am N-Terminus ein Flag-Tag angefügt.

Zunächst erfolgte die PCR-Amplifikation der für das Nativprotein und den GPI-Anker kodierenden Sequenz aus humaner Milz cDNA. Hiernach wurde diese in ein für PCR Produkte ausgearbeitetes System kloniert. Nach Sequenzierung der hergestellten Plasmidpräparationen wurde ein in seiner Sequenz korrektes PCR-Fragment in den gewählten Expressionsvektor umkloniert. Die im Anschluß gewonnenen Plasmidpräparationen wurden in COS-Zellen transfiziert. Zum Nachweis der auf der Zellmembran exprimierten Proteine wurden diese mittels fluoreszierender Antikörper markiert und per FACS-Analyse detektiert.

### 4.3.1 Herstellung der Expressionskonstrukte

a) PCR-Amplifikation von *hART4*-GPI mittels der Primer L00 und L99 sowie der intern gelegenen Primer PFL und PRL

Zunächst erfolgte die Herstellung der Matrize für die PCR-Amplifikation des Expressionsfragments. Hierzu wurde mittels PCR aus humaner Milz cDNA sowie den Exon 1 bis Exon 3 überspannenden Primern L00 und L99 ein Fragment generiert, welches die Sequenz des *hART4* von seinem natürlichen Start- bis Stop-Codon beinhaltete (d.h., die volle Information für das Nativprotein und den GPI-Anker) (Abb. 9).

In der Agarosegelelektrophorese war eine Bande mittlerer Stärke der erwarteten Größe von 900 bp sichtbar (Abb. 20), was auf eine relativ gute Amplifikation des cDNA Fragments aus humanem Milzgewebe hinweist. Zur Fertigstellung der Matrize wurde das L00xL99 Fragment in den pGEM®-T-Vektor ligiert (s. Abb. 3B), dieser in E. coli XL-2 Blue ultracompetent transformiert und die anschließend hergestellten Plasmidpräparationen sequenziert.

Das eigentliche Expressionsfragment wurde dann mittels PCR-Amplifikation der Matrize pGEM®-TL00xL99 mit den intern gelegenen Primern PFL und PRL generiert. Der PFL-Primer kodiert für eine Bgl II-Schnittstelle am 3'-terminalen Ende von Exon 1 und ist SO gewählt, dass es nicht zu Leserasterverschiebungen am Übergang zu der, für den Flag-Tag codierenden Sequenz des pMECD8Fneo-Vektors kommt. PRL kodiert für eine Xba I-Schnittstelle am 5'-terminalen Ende von Exon 3.

Die Agarosegelelektrophorese ergab auch hier ein Fragment mittlerer Stärke oberhalb der 770 bp großen Markerbande, dass ebenfalls der erwarteten Größe von ca. 840 bp entspricht (s. Abb. 20).



1057 bp 770 bp 612 bp

Abb. 20: Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikate der für das vollständige offene Leseraster (Spur 1) bzw. für das Nativprotein plus GPI-Anker (Spur 3) des hART4 kodierenden Sequenzen aus Milz cDNA Zur PCR-Amplifikation aus humaner Milz cDNA wurden zunächst die Exon 1 bis Exon 3 überspannenden Primer L00 und L99 eingesetzt. Nach Klonierung des Fragments in den Vektor pGEM®-T und Transformation in E. coli wurde aus den hergestellten Plasmidpräparationen das Leaderlose Expressionsfragment mittels der Primer PFL und PRL generiert. Auf ein 1%iges Agarosegel wurden je 2 µl der 20 µl PCR-Ansätze *hART4* L00xL99 (1) und *hART4* PFLxPRL (3) sowie der Marker Lambda DNA-Hind III Digest (2) aufgetragen.

Die Detektion erfolgte mittels Ethidiumbromid.

Das PFLxPRL-Fragment wurde in den pCR™II-Vektor (s. Abb. 3A) ligiert und dieser in E. coli INVaF' transformiert.

Die angelegten Bakterienkulturen wurden mittels der Primer PFL und PRL gescreent (fünf von sechs Kulturen positiv) und von den positiven Kulturen Plasmidpräparationen hergestellt. Diese wurden durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen und Sequenzierung auf die korrekte Basenabfolge hin untersucht, wobei drei von vier Plasmidpräparationen das gewünschte Insert ohne Mutation und mit korrekten Insertfusionsstellen enthielten. Einer dieser Klone wurde für die Umklonierung in den Expressionsvektor ausgewählt. b) Umklonierung des Fragments PFLxPRL vom Vektor pCR™II in den Expressionsvektor pMECD8Fneo

Die Plasmide pCR<sup>™</sup>IIPFLxPRL und pMECD8Fneo(+Insert) wurden zunächst mit den Restriktionsendonukleasen Bgl II und Xba I verdaut. Die Agarosegelelektrophorese des Verdaus des Vektors pMECD8Fneo(+Insert) zeigte wie erwartet eine große Bande von ca. 4400 bp, die dem linearisierten Vektor incl. CD8-Leader und Flag-Tag entspricht. Das zu eliminierende Insert wurde durch die sich am Übergang zum Vektor befindlichen Bgl II und Xba I-Schnittstellen aus dem Vektor herausgeschnitten und durch eine zusätzliche Bgl II-Schnittstelle in ein kleines und ein größeres Fragment zerschnitten (s. Abb. 21a).

Wie erwartet zeigte auch die Agarosegelanalyse des pCR<sup>™</sup>II-Verdaus drei Fragmente unterschiedlicher Größe, wobei das Kleinste, etwas oberhalb der 770 bp großen Markerbande, dem Expressionsfragment PFLxPRL (ca. 840 bp) entspricht. Durch eine zusätzliche Bgl II-Schnittstelle wurde der Vektor in ein großes Fragment von ca. 2600 bp und in ein kleineres von ca. 1300 bp zerschnitten (s. Abb. 21b).

Der linearisierte Vektor pMECD8Fneo sowie das Fragment PFLxPRL wurden aus den Gelen ausgeschnitten, die DNA mittels JETsorb aufgereinigt und zur relativen Konzentrationsbestimmung erneut durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (s. Abb. 21c). Ligiert wurde etwa im Verhältnis Vektor zu Insert 1:2. Der Ligationsansatz wurde anschließend in E. coli XL-2 Blue transformiert.

67



# Abb. 21: Umklonierung des für hART4 kodierenden cDNA Fragments PFLxPRL von dem Vektor pCR™II in den Vektor pMECD8Fneo

Hierzu erfolgte der Restriktionsverdau von pMECD8Fneo(+Insert) (A) und pCR™IIPFLxPRL (B) mittels der Restriktionsendonukleasen Bgl II und Xba I. Die Pfeile markieren die ausgeschnittenen Banden. Die in den Banden enthaltene DNA wurde mittels JETsorb-Matrix aufgereinigt und zur relativen Konzentrationsbestimmung erneut durch Agarosegelelektrophorese (1%iges Gel) aufgetrennt (C). Es wurden jeweils 10 µl Aliquots aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels Ethidiumbromid. Im einzelnen sind zu sehen:

- A) 1. Marker Lambda DNA-Hind III Digest
  - 2. pMECD8Fneo(+Insert)
- B) 1. Marker Lambda DNA-Hind III Digest
  - 2. pCR™IIPFLxPRL
- C) 1. Marker Lambda DNA-Hind III Digest
  - 2. pMECD8Fneo
  - 3. PFLxPRL

Um festzustellen, ob die durch die Transformation erhaltenen E. coli-Klone "Insert-haltige" Vektoren enthielten, wurden diese mittels PCR (Primer PFL und PRL) gescreent (2 von 30 positiv, keine Abbildung). Von den positiven Klonen wurden Plasmidpräparationen ("Maxi") hergestellt und diese erneut durch Restriktionsenzymverdau mit Bgl II/Xba I sowie Hind III kontrolliert. Der Bgl II/Xba I-Verdau des pMECD8FneoPFLxPRL Plasmids ergab, dass die insertbegrenzenden Schnittstellen auch nach der Umklonierung erhalten waren, wodurch zwei Banden (linearisierter Vektor und PFLxPRL-Insert) in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt wurden (s. Abb. 22, Spur 2). Der Hind III-Verdau ergab zwei Banden, die durch je eine Schnittstelle im PFLxPRL-Fragment sowie im Vektor bedingt sind (s. Abb. 22, Spur 3).



1057 bp 770 bp

# Abb. 22: Agarosegelelektrophorese des diagnostischen Restriktionsenzymverdaus des eukaryontischen Expressionsvektors für hART4 (pMECD8FneoPFLxPRL)

Die positiven Klone der Plasmidpräparationen wurden einem diagnostischen Restriktionsenzymverdau zugeführt. Es zeigte sich, dass der hier abgebildete Klon das hART4-Fragment mit diagnostischer, interner HindIII Schnittstelle enthielt. Auf ein 1%iges Agarosegel wurden aufgetragen:

- 1. Marker Lambda DNA-Hind III Digest
- 2. pMECD8FneoPFLxPRL (Bgl II/Xba I)
- 3. pMECD8FneoPFLxPRL (Hind III)

# 4.3.2 Detektion der exprimierten rekombinanten Fusionsproteine mittels FACS-Analyse

Lipofektamin-Transfektion Plasmide Im Anschluß an die der pMECD8FneoPFLxPRL bzw. pMECD8FneoNZW in COS-Zellen wurde drei Tage nach der Transfektion zum Nachweis der vorübergehenden Expression der rekombinanten Fusionsproteine hART4-GPI bzw. mART2.1-GPI eine Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern vorgenommen. Hierzu wurde zur Detektion des Flag-Tags je die Hälfte der transfizierten Zellen mit monoklonalem M2-Antikörper inkubiert. Als Negativkontrolle diente die andere Hälfte der COS-Zellen. Hier wurde kein Erstantikörper zugegeben. Alle Ansätze wurden mit fluoreszierendem Zweitantikörper inkubiert.

Mittels FACS-Analyse wurde dann untersucht, welcher Anteil an COS-Zellen fluoreszierende Antikörper auf der Oberfläche und somit die rekombinanten Fusionsproteine exprimiert hatte. Von 6000 gezählten COS-Zellen konnte bei ca. 5-10% der mit pMECD8FneoPFLxPRL transfizierten, die durch den Zweitantikörper bedingte Fluoreszenz nachgewiesen werden (die Negativkontrolle wies diese nicht auf) (s. Abb. 23 C + D).

Bei den mit pMECD8FneoNZW transfizierten COS-Zellen war der Prozentsatz an Zellen die das Protein auf ihrer Oberfläche exprimierten etwas geringer (s. Abb. 23 A + B). Dieses Ergebnis deutet auf eine gelungene Transfektion hin, wenn auch der Anteil der COS-Zellen, die die rekombinanten Fusionsproteine vorübergehend exprimierten nicht besonders hoch war.

In weiteren Versuchen, die nach Abschluß dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnten stabil ART4-exprimierende Zellen, nach Transfektion mit dem pMECD8FneoPFLxPRL-Konstrukt und Selektion mit Geneticin isoliert werden.

70





COS-Zellen wurden mittels Lipofectamin mit Expressionsvektoren für FLAGtag markiertes mART2.1(pMECD8FneoNZW) (A, B) bzw. hART4 (pMECD8FneoPFLxPRL) (C, D) transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen mit FLAG-Tag spezifischem M2 Antikörper und FITC-markiertem anti-Maus Ig angefärbt (B, D). A und C zeigen Kontrollanfärbungen ohne Erstantikörper. Die relative Fluoreszenzintensität der Zellen wurde mithilfe eines Durchflusszytometers ermittelt. Die gestrichelte Linie markiert den festgesetzten Schwellenwert. Zahlen geben den Anteil von Zellen mit einer Fluoreszenzintensität oberhalb dieses Wertes an.
## 4.4 Nachweis und Charakterisierung des murinen Homologen von hART4

Ziel der im folgenden dargestellten Untersuchung war einerseits der Nachweis von hART4-Homologen in weiteren Spezies. Hierzu diente die sog. "Zoo-PCR", in der genomische DNA verschiedenster Tiere als Matrizen für PCR-Amplifikationen mit hART4-spezifischen Primern, die aus hochkonservierten Regionen abgeleitet waren, eingesetzt wurde. Die erhaltenen Fragmente wurden kloniert und seguenziert. Nachdem der Nachweis eines hART4-Homologen in der Maus gelungen war, interessierte Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher das Genexpressionsmuster. "Multiple Tissue Northern Blot" der Maus mit einer mArt4-spezifischen Sonde hybridisiert. Zur Komplettierung der noch unbekannten mArt4-Seguenz wurden 5 und 3 RACE-PCR Analysen mit kommerziell erhältlicher Maus-Herzmuskel cDNA mittels mArt4- sowie cDNA-spezifischen Primern durchgeführt. Nach Sequenzierung der erhaltenen Fragmente wurden computergestützt Hydrophobizitätsanalysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz von mArt4 durchgeführt. Des weiteren wurden die Aminosäuresequenzen des hART4 und des mART4 verglichen.

#### 4.4.1 Nachweis von hART4-Homologen in weiteren Spezies

Zur Identifizierung von *hART4*-Homologen in anderen Spezies wurde eine "Zoo-PCR" durchgeführt, wobei vor allem das Vorkommen eines *hART4*-Homologen in der Maus interessierte. Hierzu wurde genomische DNA verschiedener Tiere (inkl. der Maus) mit den aus der *hART4*-Sequenz abgeleiteten Primerpaaren L11xL42 und L11xL41 (s. Abb. 11) amplifiziert.

Die Agarosegelelektrophorese (Abb. 24) zeigt in den Spuren der mit der Primerkombination L11xL42 amplifizierten Ansätze Banden von ca. 600 bp beim Schwein, Macaca (Alte-Welt Affe; Primat), Rind und Schaf sowie eine fehlende Amplifikation bei der Maus und beim Huhn. In den Spuren der Primerkombination L11xL41 zeigt die Agarosegelelektrophorese bei allen Tieren Banden der Größe von ca. 500 bp (Ausnahme Huhn 300 bp). Weiterhin konnten Fragmente der erwarteten Größe aus Ratte, Kaninchen, Tupaia und Lemur amplifiziert werden (hier nicht abgebildet).



# Abb. 24: Kreuzspezies ("Zoo-PCR") PCR Amplifikation aus genomischer DNA mit degenerierten humanen *ART4*-Primern

Mit zwei Paaren von *hART4*-spezifischen Primern, die aus hochkonservierten Regionen abgeleitet waren, wurden Fragmente aus genomischer DNA verschiedener Spezies mittels PCR amplifiziert. Die Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese (1%iges Gel) größenfraktioniert und mit Ethidiumbromid detektiert.

Die genomische DNA stammte von folgenden Tieren:

- 1) Schwein
- 2) Maus
- 3) Speciosa125 (= Primat)
- 4) Rind
- 5) Huhn
- 6) Schaf

7) Marker Lambda DNA-Hind III Digest

Primerpaare:

- a) L11 und L42 (472 bp)
- b) L11 und L41 (441 bp)

Die amplifizierten Fragmente wurden in den Vektor pCR™II ligiert, in E. coli INVaF' transformiert und kultiviert. Die im Anschluß hergestellten Plasmidpräparationen wurden sequenziert und Aminosäuresequenzvergleiche durchgeführt (s. u.). Von dem Maus-*Art4*-enthaltenden Vektor (472 bp aus Exon 2) wurde das Insert für Northern Blot Analysen PCR-amplifiziert und radioaktiv markiert. Von der erhaltenen Maus-*Art4*-Sequenz wurden ferner Primer abgeleitet, synthetisiert und für 5' und 3' RACE-PCR eingesetzt.

#### 4.4.2 Untersuchung des Genexpressionsmusters von Art4 in der Maus

Zur Untersuchung des Expressionsmusters von *Art4* in der Maus wurde ein Northern Blot mit einer *mArt4*-spezifischen Sonde aus Exon 2 (s.o.) hybridisiert. Es zeigten sich prominente Signale in Herzmuskel, Milz, Lunge, Leber, Lymphknoten, Knochenmark sowie fetaler Leber (s. Abb. 25).



# Abb. 25: Northern Blot Analyse der Genexpression von muriner und humaner *ART4*

Northern Blots (Clontech) mit RNAs aus verschiedenen Geweben der Maus (oben) bzw. des Menschen (unten) wurden mit radioaktiv markierten *mArt4-* bzw. *hART4*spezifischen Sonden hybridisiert. Die gebundene Radioaktivität wurde mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die dicke Bande zeigt die Position der Markerbande von 2.4 kb, die dünne Bande von 1.35 kb.

Die RNA stammte aus

- 1. Herzmuskel
- 2. Gehirn
- 3. Milz
- 4. Lunge
- 5. Leber
- 6. Skelettmuskel
- 7. Niere
- 8. Hoden
- 1. Milz
- 2. Lymphknoten
- 3. Thymus
- 4. Appendix
- 5. Leukozyten des peripheren Blutes
- 6. Knochenmark
- 7. Fetaler Leber

#### 4.4.3 Komplettierung der *mArt4*-Sequenz

Zur Vervollständigung der noch unbekannten *mArt4*-Sequenz wurden *mArt4*-spezifische Primer abgeleitet (S01, S02, S31, S31, s. Abb. 11) und mit diesen 5' und 3'-RACE-PCR durchgeführt. Als Matrize wurde Maus-Herzmuskel cDNA gewählt, da die Art4 Genexpression in diesem Gewebe durch Northern Blot bestätigt worden war (Abb. 25). Im ersten Schritt der PCR wurde aus dieser cDNA, die an ihren 5' und 3' Enden bereits an geeignete Adapterprimer fusioniert war, mit den Primerkominationen AP1xS32 (5'-RACE) und AP1xS01 (3'-RACE) Fragmente amplifiziert, die dann als Matrize für den zweiten Schritt der RACE-PCR dienen sollten.

Wie die Agarosegelelektrophorese (s. Abb. 26 a) zeigt, konnte im ersten Schritt noch kein amplifiziertes Fragment detektiert werden. Im zweiten Schritt der PCR wurde dann mittels der intern gelegenen Primerkombinationen AP2xS31 und AP2xS02 amplifiziert. Die Agarosegelelektrophorese (s. Abb. 26 b) zeigt bei der 5'-RACE (Spur 2) ein Bandengemisch aus Banden unterschiedlicher Größe und Intensität, wobei eine Bande besonders starker Intensität von 1500 bp auffällt. Bei der 3'-RACE (Spur 3) fallen zwei Banden von ca. 300 bzw. 200 bp auf.



## Abb. 26: PCR Amplifikation der 5'- und 3'- Enden von *mArt4* aus Herzmuskel-cDNA

5'-3'-RACE-PCR Amplifikationen wurden in zwei Schritten mittels *mART4*spezifischer Primer (S01, S02, S31, S32) sowie cDNA Adapterprimer (AP1, AP2) durchgeführt (s. Abb. 11). Im ersten Schritt (A) wurde Maus-Herzmuskel-cDNA (Clontech) verwendet. Das Reaktionsgemisch dieses Schrittes wurde als Matrize in der zweiten PCR mit intern gelegenen Primern (B) eingesetzt. Die Endprodukte wurden mittels Agarosegelelektrophorese größenfraktioniert und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Im folgenden wurden aufgetragen:

- A) PCR: 1. Schritt, Matrize: Maus-Herzmuskel cDNA
- 1. Marker Lambda DNA-Hind III Digest
- 2. AP1xS32
- 3. AP1xS01
- B) PCR: 2. Schritt, Matrize: Produkte der Erst-Schritt PCR
- 1. Marker Lambda DNA-Hind III Digest
- 2. AP2xS31, template AP1xS32
- 3. AP2xS02, template AP1xS01

Zur näheren Charakterisierung der 5'-3'-RACE-Produkte und zur Prüfung, ob es sich bei den amplifizierten Fragmenten auch um Teile der *mArt4*-cDNA handelt, wurden die PCR-Ansätze aus Abb. 26 B Spuren 2+3 in den Vektor pCR<sup>™</sup>II kloniert, in E. coli INVaF' transformiert, Plasmidpräparationen hergestellt und diese mittels diagnostischem Restriktionsverdau mit Eco RI (s. Abb. 27) und Sequenzierung kontrolliert.



А



В

## Abb. 27: Größenanalyse der potentiellen 5'- und 3'- cDNA Enden von *mArt4*

Die PCR-Produkte aus Abb. 26 wurden in den pCR™II Vector kloniert und einem diagnostischen Restriktionsenzymverdau mit Eco RI unterzogen. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Agarosegelelektrophorese größenfraktioniert und die Banden durch Färbung mit Ethidiumbromid detektiert.

- A) 3'- RACE Klone (pCR™IIAP2xS02)
- B) 5'- RACE Klone (pCR™IIAP2xS31)

## 4.4.4 DNA-Sequenzanalysen, Hydrophobizitätsprofil und Aminosäuresequenzvergleich Maus- und humanes ART4

Die mittels  $5^{|}-3^{|}$ -RACE-PCR gewonnenen, bisher unbekannten *mArt4*-Fragmente wurden sequenziert (unter Verwendung der DNA\*- und MacMolly-Software (Softgene, Berlin)). Hierdurch gelang der Erhalt der kompletten cDNA-Sequenz des *mArt4*. Abb. 28 zeigt die cDNA und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des murinen ART4. Abb. 29 zeigt einen Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von murinem und humanem ART4. Das *mART4* kodiert ebenso wie das *hArt4* für vier konservierte Cysteinreste, welche möglicherweise konservierte Disulfidbrücken bilden.

Die Hydrophobizitätsanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von mART4 ergab, wie auch bei den anderen ARTs, hydrophobe N- und C-terminale Signalpeptide, die charakteristisch für GPI-verankerte Membranproteine sind (Abb. 30).

Die Aminosäuresequenzanalyse des mART4 ergab zudem vier potentielle N-gekoppelte Glykosilierungsstellen, wovon drei im humanen Homologen konserviert sind. Das hART4 verfügt über fünf dieser Glykosilierungsstellen (Abb. 29, 30).



**Abb. 28:** Nukleotid und abgeleitete Aminosäuresequenz von mART4 Untereinander abgebildet sind die Basenabfolge sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz von mART4.

Markiert ist zudem die Lage der zur RACE-PCR verwendeten Primer sowie die der beiden Introne. Konservierte Cysteinreste sind durch ein Oval hervorgehoben. Die potentielle Glykosilierungsstellen sind durch kurze Boxen, die Aminosäuren im vorhergesagten aktiven Zentrum durch ein schraffiertes Oval, Leader sowie GPI-Signalpeptid durch lange Boxen umrandet.

```
MRIWLLGGLL PFLLLLSGLQ RPTEGSEVAI KIDFDFAPGS FDDQYQGCSK
M--WL-GG-L --LLLL---Q -P----E--- K-D-D--P-S FDDQY-GCS-
MALWLPGGQL TLLLLLWVQQ TPAGSAEAPL KVDVDLTPNS FDDQYQGCSE
QVMEKLTQGD YFTKDIEAQK NYFRMWQKAH LAWLNQGKVL PQNMSTTHAV
Q--E-L-QGD YF-----K -Y-R-WQKAH L-WLNQ-K-L P--M---HAV
QMVEELNQGD YFIKEVDTHK YYSRAWQKAH LTWLNQAKAL PESMTPVHAV
AILFYTLNSN VHSDFTRAMA SVARTPOOYE RSFHFKYLHY YLTSAIOLLR
AI---TLN-N V-SD---AMA --A--P-OY- -SFHFKYLHY YLTSAIOLLR
AIVVFTLNLN VSSDLAKAMA RAAGSPGQYS QSFHFKYLHY YLTSAIQLLR
KDSIMENGTL CYEVHYRTKD TKDVHFNAYT GATIRFGQFL STSLLKEEAQ
KDS---NG:L CY-V----KD -KDV---A-- G-TIRFGQFL S-SLLKE---
KDSSTKNGSL CYKVYHGMKD MKDVSIGANV GSTIRFGQFL SASLLKEETR
EFGNQTLFTI FTCLGAPVQY FSLKKEVLIP PYELFKVIN MSYHPRGDW
--GNQTLFTI FTCLGA-VQ- FSL-KEVLIP PYELF-V-- -S--P-GD-
VSGNQTLFTI FTCLGASVQD FSLRKEVLIP PYELFEVVS KSGSPKGDL
LQLRSTGNLST YNCQLLKASS KKCIPDPIAI ASLSFLTSVI
--LRS-GN-ST YNCQLLKA-S KKC-P-P--I --L-FL--V-
INLRSAGNMST YNCQLLKACS KKCAPAPVVI VCL-FLVTVV
IFSKSRV-- ----.
I-SKSR--- -----.
ISSKSREQR NLLAPF.
```

Abb. 29: Alignment der Aminosäuresequenzen von hART4 und mART4 Die abgeleitete Aminosäuresequenz des hART4 ist oben, die des mART4 unten zu sehen. Die "Consensus"-Sequenz befindet sich in der Mitte. Leader und GPI-Signal Peptid sind kursiv, in der ART-Familie konservierte Cysteine sind unterstrichen, potentielle Glykosylierungsstellen sind fett hervorgehoben, Aminosäuren im vorhergesagten aktiven Zentrum sind fett kursiv hervorgehoben.



B)

A)



C)



# Abb. 30: Hydrophobizitätsprofile der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von mART2.1 (A), mART4 (B) und hART4 (C)

Hydrophobizitätsprofile wurden mit dem Kyte-Doolittle Algorithmus und einem Fenster von 19 Aminosäuren berechnet. Positionen von potentiellen Glycosylierungsstellen sind durch Gabeln markiert, von konservierten Cysteinen durch Kreise, von vermuteten Aminosäuren im aktiven Zentrums durch ovale Umrandung. Für das Leaderpeptid und den GPI-Anker kodierende Regionen sind durch orange bzw. grüne Ovale eingekreist.

## 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein stabiles Expressions- und Aufreinigungssystem für hART3 erstellt. Das hART3 wurde als rekombinantes Fusionsprotein (Nativprotein + FLAG-His-Tag) im prokaryontischen System exprimiert und mittels einer Talon<sup>™</sup>-Matrix aufgereinigt.

Die Gewinnung des hART3 als natives Protein wurde durch das pASK60-Strep-Expressionssystem (Biometra), nach Wechsel des Epitopmarkers Strep gegen FLAG-His, möglich. Das lösliche hART3 wurde mittels OmpA-Leader in den periplasmatischen Spalt von E. coli sezerniert. Hier besteht, wie im ER von Eukaryonten ein reduktives Milieu, das es den Proteinen erlaubt, ihre intramolekularen Disulfidbindungen auszubilden und dadurch ihre physiologische Konformation zu wahren (Glockshuber et al., 1992, Skerra und Pluckthun, 1988).

Die Etablierung dieses Expressionssystems für hART3 eröffnet die Möglichkeit der Produktion großer Mengen an rekombinantem Fusionsprotein und somit dessen Einsatz im Rahmen von Immunisierungen zur Produktion monoklonaler Antikörper sowie in Enzymassays. Dies könnte ein wichtiger Schritt in der Aufklärung der Funktion des hART3 sein.

Die Etablierung eines entsprechenden Expressionssystems für hART4 als rekombinantes Fusionsprotein (Nativprotein + Strep-Tag) im prokaryontischen System gelang leider nicht. Ursache hierfür könnte eine mögliche Toxizität von hART4 gegenüber E. coli und eine daraus resultierende Selektion gegen die das Plasmid tragenden Zellen sein. In diesem Fall wäre eine wirkungsvolle Repression des Promotors, sowie deren gezielte Aufhebung in einer Ein bestimmten Wachstumsphase der Bakterien vonnöten. diese Anforderungen erfüllendes Expressionssystem wäre die Weiterentwicklung des bereits verwendeten pASK60-Strep (Biometra) - nämlich der Expressionsvektor pASK75-Strep (Das Strep-Tag Expressions- und Reinigungssystem, Biometra, Dieser beinhaltet die Promotor/Operator-Region des tetA-1997). Resistenzgens, das die Expressionskassette des pASK75 kontrolliert (Skerra,

1994). Der tetA-Promotor wird duch Zugabe von Anhydrotetrazyklin induziert (Skerra, 1994), während die Expression des tet-Repressorgens in Abwesenheit des Induktors die hohe Repression des Promotors gewährleistet (Skerra, 1994).

Aufgrund der Tatsache, dass entsprechende Analysen mit einem vergleichbaren Expressionskonstrukt für hART (chimärer FLAG-His Epitopmarker, s.o.) eine erfolgreiche Produktion von rekombinanten Fusionsproteinen zeigte, ist es theoretisch denkbar, dass auch die Expression von hART4FH im prokaryontischen System zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht werden könnte. Dieses Konzept wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

Eine weitere Möglichkeit der Expression des hART4 ist die im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich durchgeführte Expression als rekombinantes, mit einem Epitopmarker versehenes, Membranprotein (Nativprotein + GPI-Anker + FLAG-Tag) im eukaryontischen System (COS-Zellen). Mit einer Expressionsrate um die 10% bilden diese Ergebnisse die Grundlage für die Isolation stabil hART4 exprimierender Zellen, und somit, wie schon für das hART3 beschrieben, die Möglichkeit, die Proteinproduktion für Immunisierungen und Funktionsuntersuchungen zu nutzen.

Des weiteren gelang es, Homologe des *hART4* in anderen Spezies nachzuweisen und eine nähere Charakterisierung des *mArt4* vorzunehmen.

Das Vorkommen der jeweiligen Homologen in vielen Säugern weist darauf hin, dass diese Gene durch Duplikation während oder vor der Radiation der Säuger entstanden sind. Zudem deutet der Nachweis von Homologen des *hART4* in verschiedenen Säugetierarten als auch in Primaten eine entwicklungsgeschichtliche Konstanz der Genexpression an.

Weil die Maus ein gut etablierter Modellorganismus ist und aufgrund der Möglichkeiten zur Herstellung von transgenen und knock-out Tieren, interessierte hier insbesondere die nähere Charakterisierung des Homologen in der Maus. Die Untersuchung des Genexpressionsmusters von *mArt4* läßt auf eine in hohem Maße konservierte Gewebespezifität des ART4 bei Mensch und Maus schließen.

Nach Komplettierung der noch unbekannten Aminosäuresequenz des mART4 ergab die Hydrophobizitätsanalyse, wie auch bei den anderen Familienmitgliedern, die für GPI-verankerte Membranproteine charakteristischen hydrophoben C- und N-terminalen Signalpeptide.

Aminosäuresequenzvergleiche ergaben konservierte N-gekoppelte Glykosilierungsstellen sowie Cysteinreste, jedoch kodieren *hART4* und *mArt4* nicht für das für Arginin-spezifische ADP-Ribosyltransferasen katalytische Zentrum (R-S-EXE-Motif). Dies wirft die Frage auf, ob diese Proteine über eine andere Zielproteinspezifität verfügen, oder aber die Enzymfunktion einer mADP-Ribosyltransferase gänzlich verloren haben. Denkbar wäre hier eine neue Funktion, z.B. als GPI-verankertes Rezeptorprotein.

Eine interessante Perspektive wäre also auch hier die Erstellung eines stabilen Expressionssystems für *mArt4* zur Produktion ausreichender Proteinmengen, die dann ebenfalls weiteren Untersuchungen zugänglich wären. Interessant wäre zudem die Identifizierung weiterer Familienmitglieder, insbesondere beim Menschen und der Maus.

#### Perspektiven für weiterführende Untersuchungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für die Produktion von rekombinantem hART3 in E.coli und für die Herstellung stabil hART4 exprimierender Zelllinien. Mit diesen experimentellen Werkzeugen könnten einerseits mittels Enzymassays, andererseits durch Immunisierungen zur Herstellung ART-spezifischer Antikörper und durch die Generation von Knock-Out-Mäusen die Rolle dieser Ekto-Enzyme näher beleuchtet werden.

Zudem wäre es interessant weitere Mitglieder der humanen und murinen ART-Genfamilie zu identifizieren und ebenfalls weiter zu charakterisieren.

Als Fernziel ist nach wie vor die Klärung von physiologischen Funktionen dieser Proteine, wie zum Beispiel der Regulation der Immunantwort durch ADP-Ribosylierung und somit die Möglichkeit zum Beschreiten neuer therapeutischer Wege zu sehen.

85

## 6 Zusammenfassung

Nachdem es im Vorfeld dieser Arbeit gelungen war, mittels Datenbankrecherchen zwei humane Homologe zu den bis dahin bekannten mono-ADP-Ribosyltransferasen zu identifizieren und sequenzieren, war es Ziel dieser Arbeit die humanen Homologen als rekombinante Fusionsproteine verfügbar zu machen, um so hART3 bzw. hART4 näher charakterisieren zu können.

Es gelang ein stabiles Expressions- und Aufreinigungssystem für hART3 als rekombinantes Fusionsprotein (Nativprotein+FLAG-His-Tag) im prokaryontischen E. coli System zu etablieren. Hierbei wird das hART3 als Nativprotein in den periplasmatischen Spalt der Bakterien sezerniert, mittels Periplasmalysat gewonnen und aufgrund der Affinität des His-Tags des Epitopmarkers zu Talon über eine entsprechende Matrix aufgereinigt.

Die Etablierung eines ähnlichen Expressionssystems für hART4 als rekombinantes Fusionsprotein gelang im prokaryontischen E. coli System nicht. Allerdings wurde hierbei ein anderer Epitopmarker (Nativprotein+Strep-Tag) verwendet. Erfolgreich war hingegen die Klonierung und Expression des hART4 (Nativprotein-GPI-Anker-FLAG-Tag) im eukaryontischen COS-Zell-System. Es wurde so die Voraussetzung zur Isolation einer das rekombinante Fusionsprotein stabil exprimierenden Zellinie geschaffen.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden die Voraussetzungen für die Produktion größerer Proteinmengen geschaffen, die im weiteren für Immunisierungen sowie Funktionsuntersuchungen genutzt werden können.

Im Rahmen der Suche nach weiteren Familienmitgliedern der mADPdie die Ribosyltransferasen gelang Sequenzierung sowie nähere Charakterisierung von *mArt4*. Es ergaben sich Hinweise, dass es sich hierbei ebenfalls um ein GPI-verankertes Membranprotein handelt, dessen Genexpressionsmuster dem des hART4 sehr ähnlich ist. Im Unterschied zu anderen mono-ADP-Ribosyltransferasen enthalten hART4 und mART4 nicht die für Argingin-spezifische ADP-Ribosyltransferasen typischen Aminosäuren

86

im katalytischen Zentrum, so dass die Frage über eine potentielle andersartige Enzymfunktion offen bleibt. Auch hier wäre ein möglicher nächster Schritt die Etablierung eines stabilen Expressions- und Aufreinigungssystems.

## 7 Danksagung

Für die Möglichkeit, meine Dissertation unter der Supervision von Herrn Professor Dr. med. Friedrich Koch-Nolte anfertigen zu können, bin ich sehr dankbar. Während meiner Zeit im Institut für Immunologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf wurde mir eine umfassende Einführung in die Molekularbiologie und ständige Betreuung während meiner gesamten Arbeit zuteil. Durch das Engagement von Professor Koch-Nolte ist das Institut ein Ort der konstruktiven wissenschaftlichen Arbeit, aber auch der Menschlichkeit.

Den Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, die mich in der Entstehung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben, möchte ich ebenfalls herzlich danken; Maren Kühl danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der Northern Blot Analyse (Abb. 25) und der "Zoo-PCR" Analysen (Abb. 24), Gustavo Glowacki und Rickmer Braren für die Hilfe bei den Sequenz- und Hydrophobizitätsanalysen (Abb. 28, 29, 30).

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Gen- und Proteinsymbole: Gensymbole für humane Gene werden in Großbuchstaben und kursiv geschrieben (z.B. *ART4*). Bei Maus-Genen wird nur der erste Buchstabe groß geschrieben (z.B. *Art4*). Die Genprodukte = Proteine werden in Großbuchstaben und nicht kursiv geschrieben (z.B. ART4). Um die orthologen humanen und murinen Proteine zu unterscheiden, wird in dieser Arbeit der kleine Buchstabe h bzw. m vorangestellt (z.B. hART4 und mART4).

Abb.	Abbildung
a.i.	Aqua ad iniectabilia
AK	Antikörper
Anm.	Anmerkung
ART	ADP (Adenosin-Diphosphat)-Ribosyltransferase
BCCP	Biotinyl-Carboxyl-Carrier-Protein
Bgl II	Restriktionsendonuklease
BN-Ratten	Brown-Norway-Ratten
bp	Basenpaare
Bzw.	Beziehungsweise
С	Celsius
са	Circa
cDNA	Complementary DNA, komplementäre DNA
COS-Zellen	CV1 origin (African green Monkey-Zellinie), SV40
Cpm	Counts per Minute
d.h.	Das heißt
DMEM	MOD Eagle Medium, Dulbecco, Gibco BRL, 1% Natrium-Pyruvat
	100 mM, 1% Glutamat, 1% Penicillin-Streptomycin, 10% FCS
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTPs	Didesoxyribonukleotidtriphosphat

Di-Thio-Threitol
Elektrochemolumineszenz
Restriktionsendonuklease
Ethylendiamintetraacetat
Expressed-Sequence-Tag
Escherichia coli
Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
Fetales Kälberserum
Flag-His-Tag (s.u.)
Fluoreszenzfarbstoff, Fluorescin Iso Thio Cyanat
Acht Aminosäuren (DYKDDDDK), die mittels M2-Antikörper
(Kodak, IBI) detektiert werden können
Gramm
Glykosylphosphatidylinositol
Familie heterotrimerer GTP-bindender Proteine mit wichtiger
Funktion im Signaltransfer in der Zelle
Stunden
Restriktionsendonuklease
Sechs Histidine mit einer Affinität zu Talon™ (Clontech)
Wasser, zweifach destilliert
Insulin-dependent Diabetes mellitus
Immunglobulin vom Typ G
Resistenzloser E. coli Stamm
Kilodalton (atomare Masseneinheit)
Konzentration
hART4-spezifischer Vorwärtsprimer
Degenerierter humaner ART-Primer
s. L11
s. L11
hART4-spezifischer Rückwärtsprimer
Luria-Bertani-Medium, ein für Bakterien verwendetes
Nährmedium
Maus-Antikörper gegen Flag-Tag gerichtet

mA	Milliampere	
mg	Milligramm	
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid	
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat	
min	Minute	
ml	Milliliter	
mМ	Millimolar	
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure	
Mun	Restriktionsendonuklease	
NaCl	Natriumchlorid	
NAD	Nikotin-Adenin-Dinukleotid	
NADase	=NAD-Glykohydrolase, Enzym das NAD hydrolytisch in	
	Nicotinamid und ADP-Ribose spalten kann	
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid	
NaOH	Natriumhydroxid	
ng	Nanogramm	
NM522	Resistenzloser E. coli Stamm	
NOD-Maus	Nonobese-Diabetic-Maus	
NON-Maus	Nonobese-Normal-Maus	
Nsi I	Restriktionsendonuklease	
NZW-Maus	New-Zealand-White-Maus	
OD	Optische Dichte	
o.g.	Oben genannt	
OmpA	kodierende Region für das Signalpeptid des Expressionsvektors	
	pASK60	
Р	Phosphat	
pASK	Vektor zur Expression und Isolierung funktioneller Genprodukte	
	(Biometra)	
PBS	Phosphate Buffered Saline	
PBST	PBS+0,05% Tween 20	
PCR	Polymerasekettenreaktion	
pCR™II	Vektor eines für PCR-Produkte ausgearbeiteten	
	Klonierungssystems (Invitrogen)	

PFL	hART4-spezifischer Rückwärtsprimer
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase
PRL	hART4-spezifischer Vorwärtsprimer
Pst I	Restriktionsendonuklease
Puffer E	100 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 3 mM Diaminobiotin, 0,02 $\%$ w/v NaN $_3$
Puffer W	100 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,02 % w/v NaN₃
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Restriktionsendonuklease, die RNA zerschneidet
rpm	Rounds per minute, Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.	Siehe
S.	Seite
S01	mArt4-spezifischer Primer
S02	s. S01
S31	s. S01
S32	s. S01
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sec	Sekunden
SFL	hART4 spezifischer Vorwärtsprimer
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SRL	hART4 spezifischer Rückwärtsprimer
Strep-Tag	10 Aminosäuren (Ser, Ala, Trp, Arg, His, Pro, Gin, Phe, Gly, Gly),
	die mittels Streptavidin detektiert werden können
Stu I	Restriktionsendonuklease
s.u.	siehe unten
T01	hART3-spezifischer Vorwärtsprimer
T34	hART3-spezifischer Rückwärtsprimer
TAE	Tris-acetat/EDTA, ein Elektrophoresepuffer
TBE	Tris-borat/EDTA, ein Elektrophoresepuffer

TBS	Tris buffered saline
TBST	0,5% Tween 20 in TBS
TE	Tris-EDTA-Puffer
ТМ	Trademark
Tris/HCI	Tri-hydroxymethyl-aminomethan
TSS	Transformation und Storage Solution
U	Units
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
Xba I	Restriktionsendonuklease
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-ß-d-Galaktosid
XL2-Blue	Resistenzloser E. coli-Stamm
z.B.	Zum Beispiel
	Minute
	Sekunde

## 9 Literaturverzeichnis

Aktories, K. (1991). "ADP-Ribosylating Toxins" Springer-Verlag, Berlin.

Boguski M. (1995). The turning point in genome research. TIBS 20, 295-296.

Burstein D., Mordes J. P., Greiner D. L., Stein D., Nakamura N., Handler E. S., Rossini A. A. (1989). Prevention of diabetes in BB/Wor rat by single transfusion of spleen cells. Parameters that affect degree of protection. *Diabetes* **38**, 24-30.

Butcher G. W., Clarke S., Tucker E. M. (1979). Close linkage of peripheral Tlymphocyte antigen A (Pta A) to the hemoglobin variant Hbb on linkage group I of the rat. *Transplant Proc.* **11**, 1629-1630.

Fangmann J., Schwinzer R., Winkler M., Wonigeit K. (1990). Expression of RT6 alloantigens and the T-cell receptor on intestinal intraepithelial lymphocytes of the rat. *Transplant Proc.* **22**, 2543-2544.

Fangmann J., Schwinzer R., Hedrich H.-J., Wonigeit K. (1993). Modified pattern of RT6 alloantigen expression on intestinal intraepithelial lymphocytes of athymic nude rats. *Immunbiol.* **189**, 13-14.

Fowell D., Mason D. (1993). J. Exp. Med. 177, 627-636.

Greiner D. L., Mordes J. P., Handler E. S., Angelillo M., Nakamura N., Rossini A. A. (1987). Depletion of RT6.1+ T-lymphocytes induces diabetes in resistant Bio-breeding/Worcester (BB/W) rats. *J. Exp. Med.* **166**, 461-469.

Haag F., Koch F., Kashan A., Thiele H. G. (1988). Establishment of rat T cell hybridomas expressing the T cell differentiation marker RT6.1 and the rat T cell

receptor for antigen as detected by monoclonal antibody HIS.42. *Immunobiol.* **178**, 105.

Haag F., Koch F., Thiele H. G. (1990a). Nucleotide and deduced amino acid sequence of the rat T cell alloantigen RT6.1. *Nucl. Acids Res.* **18**, 1047.

Haag F., Koch F., Thiele H. G. (1990b). Polymorphism between rat T-cell alloantigens RT6.1 and Rt6.2 is based on multiple amino acid substituitons. *Transplant Proc.* **22**, 2541-2542.

Haag, F., Koch-Nolte, F., Kühl, M., Lorenzen, S., and Thiele, H.G. (1994). Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *J. Mol. Biol.* **243**: 537-546.

Haag F., Andresen V., Karsten S., Koch-Nolte F., Thiele H. G. (1995). *Eur. J. Immunol.* **25**, 2355-2361.

Haag F. and F. Koch-Nolte. (1997). ADP-ribosylation in animal tissues: structure, function and biology of mono(ADP-ribosyl-)transferases and related enzymes. *Plenum Press*. New York.

Honjo T., Nishizuka Y., Hayaishi O., Kato I. (1968). *J. Biol. Chem.* **243**, 3553-3555.

Jacobson M. K., Jacobson E. L.. <u>ADP-ribose Transfer Reactions: Mechanisms</u> and Biological Significance. Springer Verlag, New York, 1989.

Koch F., Kashan A., Thiele H. G. (1988). Production of a rat T cell hybridoma that stably expresses the T cell differentiation marker Rt6.2. *Hybridoma* **7**, 341-353.

Koch F., Haag F., Kashan A., Thiele H. G. (1990a). Primary structure of rat RT6.2, a nonglycosylated phosphatidylinositol-linked surface marker of postthymic T-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 964-967.

Koch F., Haag F., Thiele H. G. (1990b). Nucleotide and deduced amino acid sequence of the BALB/c mouse homologue of the rat T cell differentiation marker RT6. *Nucl. Acids Res.* **18**, 3636.

Koch-Nolte F., Klein J., Hollmann C., Kühl M., Haag F., Gascins H. R., Leiter E., Thiele H.G. (1995). Defects in the structure and expression of the genes for the T cell marker Rt6 in NZW and (NZBxNZW)F1 mice. *International Immunology* **7**, 883-890.

Koch-Nolte F., Petersen D., Balasubramanian S., Haag F., Kahlke D., Willer T., Kastelein R., Bazan F., Thiele H. G. (1996). Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADP)ribosyl-transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. *Journal of Biological Chemistry* **27**, 7686-7693.

Koch-Nolte F., Haag F., Braren R., Kühl M., Hoovers J., Balasubramanian S., Bazan F., Thiele H.-G. (1997). Two novel human members of an emerging mammalian gene family related to mono-ADP-ribosylating bacterial toxins. *Genomics* **39**, 370-376.

Kosuda L. L., Greiner D. L., Bigazzi P. E. (1993). Mercury induced renal autoimmunity: changes in RT6+ T-lymphocytes of susceptible and resistant rats. *Environ.-Health-Perspect.* **101(2)**, 178-185.

Lubaroff D. M., Greiner D. L., Reynolds C. W. (xx). Investigations of Tlymphocyte subpopulations in the rat using alloantigenic markers. *Transplant. Proc.* **11**, 1092-1096. Lubaroff D. M., Butcher G. W., DeWitt C. W., Gill E., Günter E., Howard J., Wonigeit K. (1983). Standardized nomenclature for the rat T-cell alloantigens report of the commitee. *Transplant Proc.* **15**, 1683.

Ludden P. W. (1994). Mol. Cell. Biochem. 138: 123-129.

Maehama T., Nishina H., Hoshina S., Kanaho Y., Katada T. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 22747-22751.

Moss J., Vaughan M. <u>ADP-ribosylating toxins and G proteins</u>: <u>Insight into</u> <u>signal transduction</u>. American Society for Microbiology, Washington DC, 1990.

Okazaki I.J., Zolkiewska A., Nightingale M.S., Moss J. (1994). Immunological and structural conservation of mammalian skeletal muscle glycosylphosphatidylinositol-linked ADP-ribosyltransferases. *Biochemistry* **33**, 12828-12836.

Pawlak A. et al. (1995). Characterization of a large population of mRNAs from human testis. *Genomics* **26**, 151-158.

Prochazka M., Leiter E. H., Serreze D. V., Coleman D. L. (1987). Three recessive loci required for insulin-dependent diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *Science* **237**, 286-289.

Prochazka M., Serreze D. V., Worthen S. M., Leiter E. H. (1989). Genetic control of diabetogenesis in NOD/Lt mice. Development and analysis of congenic stocks. *Diabetes* **38**, 1446-1455.

Prochazka M., Gaskins R., Leiter E., Koch F., Haag F., Thiele H. G. (1991). Chromosomal mapping, DNA polymorphism and expression of Mrt-6, the mouse homologue of rat T cell differentiation marker RT6. *Immunogen.* **33**, 152-156. Takada T., Lida K., Moss J. (1994). Expression of NAD glycohydrolase activity by rat mammary adenocarcinoma cells transformed with rat T-cell alloantigen RT6. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 9420-9423.

Thiele H. G., Koch F., Hamann A., Arndt R. (1986). Immunol. 59, 195-210.

Thiele H. G., Koch F., Kashan A. (1987). Postnatal distribution profiles of Thy-1+ and RT6+ cells in peripheral lymphnodes of DA rats. *Transplant Proc.* **19**, 3157-3160.

Wang J., Nemoto E., Dennert G. (1996). Regulation of CTL by ectonicotinamide adenine dinucleotide (NAD) involves ADP-ribosylation of a p56<sup>lck</sup>associated protein. *The American Assoc. of Immunol.* 

Zolkiewska A., Nightingale M. S., Moss J. (1992). Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. *Biochemistry* **89**, 11352-11356.

## **10 Nachwort**

Nach Anfertigung dieser Dissertationsschrift wurde das ART4 von zwei amerikanischen Arbeitsgruppen als Träger eines polymorphen humanen Blutgruppen-Alloantigensystem identifiziert (Dombrock, Holley, Joseph) (Gubin et al., 2000, Rios et al., 2002, Reid, 2003). Es wurde sogar eine kurze Deletion beschrieben, die zu einem Dombrock/ART4 Null-Phenotyp führt (Lucien et al., 2002). Das inzwischen vollständig sequenzierte Genom des Menschen enthält die hier beschriebenen *hART3* und *hART4* Gene auf Chromosom 4q13.1 und 12p12.2; in dem inzwischen vollständig sequenzierten Genom der Maus liegen die *mArt3* und *mArt4* Gene auf syntenischen Abschnitten (cM 5.51 und 6.70) (Glowacki et al., 2002). Die inzwischen aufgeklärte dreidimensionale Struktur der ersten Säugetier-ADP-Ribosyltransferase (ART2 der Ratte) bestätigt die enge strukturelle Verwandtschaft der Säugetier ART Familie mit ADP-ribosylierenden bakteriellen Toxinen (Müller-Dieckmann et al., 2002). In der 3D Struktur bilden die vier konservierten Cysteine tatsächlich zwei intramolekulare Disulfidbrücken aus.

Ein Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht (Braren et al. 1997; Glowacki et al., 2002).

Gubin AN, Njoroge JM, Wojda U, Pack SD, Rios M, Reid ME, Miller JL. (2000) Identification of the dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADP-ribosyltransferase gene family. Blood **96**: 2621-2627.

Rios M, Hue-Roye K, Oyen R, Miller J, Reid ME. (2002) Insights into the Holley- and Joseph- phenotypes. Transfusion **42**: 52-58.

Reid ME. (2003) The Dombrock blood group system: a review. Transfusion 43: 107-114.

Lucien N, Celton JL, Le Pennec PY, Cartron JP, Bailly P. (2002) Short deletion within the blood group Dombrock locus causing a Do(null) phenotype.

Blood 100: 1063-1064.

Mueller-Dieckmann C, Ritter H, Haag F, Koch-Nolte F, Schulz GE. (2002) Structure of the ecto-ADP-ribosyl transferase ART2.2 from rat. J Mol Biol. **322** :687-696.

Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kuhl M, Reche P, Bazan F, Cetkovic-Cvrlje M, Leiter E, Haag F, Koch-Nolte (2002) The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse.

Protein Sci. 11: 1657-1670.

Braren R, Firner K, Balasubramanian S, Bazan F, Thiele HG, Haag F, Koch-Nolte F. (1997)

Use of the EST database resource to identify and clone novel mono(ADP-ribosyl)transferase gene family members.

Adv Exp Med Biol. 419: 163-168.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

	Name:	Kathrin Firner
	Geburtsdatum/-ort:	17.6.1971 in Offenbach/Main
	Anschrift:	Gemündener Str. 20 60599 Frankfurt/Main Tel.: 069-69536877
	Familienstand:	ledig
Schul	bildung	
	September 1977 - Juni 1981	Grundschule: Carl-Orff-Schule Rodgau
	August 1981 - Juni 1983	Förderstufe: Georg-Büchner-Schule Rodgau
	August 1983 - Juni 1987	Gymnasialzweig: Georg-Büchner-Schule Rodgau

Robert Service High School, Anchorage, Alaska, U.S.A. Gymnasiale Oberstufe: Claus-von-Stauffenberg-

Abschluß: Ällgemeine Hochschulreife (Note: 1,7)

### Hochschulbildung

August 1987 - Juni 1988

August 1988 - Juni 1990

April 1992 - März 1994	Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe- Universität, Frankfurt/Main
März 1994	Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)
April 1994 - Juni 1999	Humanmedizin an der Universität Hamburg
August 1995	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
Februar/März 1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
Juni 1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)

Schule Rodgau

#### **Praktisches Jahr**

April - August 1998	Kinderheilkunde am Pretoria Academical Hospital, Südafrika Leiter: Prof. Dr. DF Wittenberg
August - Dezember 1998	Innere Medizin am Tygerberg Hospital, University of Stellenbosch, Südafrika Leiter: Dr. H. Reuter
Dezember 1998 - März 1999	Allgemein-/Unfallchirurgie am Victoria Hospital, University of Cape Town, Südafrika Leiter: Dr. Liebenberg

### Berufliche Weiterbildung

Januar 2000 - Juli 2001	Medizinische Klinik I (Kardiologie, Pneumonologie, Nephrologie) des Klinikums Aschaffenburg Leiter: Prof. Dr. R. Uebis
August 2001- September 2003	Medizinische Klinik II (Gastroenterologie, Hämatologie, Onkologie) des Klinikums Stadt Hanau Leiter: Prof. Dr. R. Teschke
Februar/März 2002	Grund- und Spezialkurs Fachkunde im Strahlenschutz für Ärzte
Dezember 2002	Fachkundenachweis Rettungsdienst
Seit Oktober 2003	Medizinische Klinik II, Schwerpunkt Pneumologie/Allergologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

### Dissertation

Februar 1996 - Oktober 2003	Thema: "Expression der humanen ecto-ADP- Ribosyltransferasen hART3 und hART4 als rekombinante Fusionsproteine im pro- und eukaryontischen System sowie Nachweis und Charakterisierung von <i>mArt4</i> , des murinen Homologen von <i>hART4</i> "; Betreuer: Prof. Dr. F. Nolte, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
Oktober 2003	Einreichung der Dissertation
	Vortrag: Modulation of T cell activation and costimulation
September 1996	by cell surface mono-ADP-ribosylation: cloning and characterization of candidate enzymes", 27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, sowie gleichnamige Veröffentlichung in ´Immunobiology´ Vol. 196, No. 1-3, 1996, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

## Auslandsaufenthalte

August 1987 - Juni 1988	Robert Service High School, Anchorage, Alaska, U.S.A.
August 1990 - Juni 1991	Au-Pair-Tätigkeit, Montpellier, Frankreich
Juli - August 1997	Famulatur Innere Medizin am District Hospital Ysbyty Gwynedd, Bangor, Wales, U.K.
April 1998 - März 1999	Praktisches Jahr an den Universitäten von Pretoria, Stellenbosch und Kapstadt, Südafrika

Frankfurt/Main, den 1.10.2003

#### **Eidesstattliche Versicherung**

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. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.