



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Entwicklung von monoklonalen Antikörpern, spezifisch für
krankheitsrelevante Lamine als neues Werkzeug zum Studium
von Laminopathien

zur Erlangung der

Magister/Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Veronika Huber
Matrikel-Nummer:	0102963
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Diplomstudium Genetik-Mikrobiologie
Betreuerin / Betreuer:	Prof. Dr. Egon Ogris

Wien, im Dez. 2009

**Für meine Oma! Du fehlst mir.
Hiermit möchte ich dir deine erste Urenkelin
vorstellen:**



Sarah Marie (geb. 12. Juli 2008)

1	Abkürzungen	5
2	Zusammenfassung	6
3	Einleitung	7
3.1	SNPs	7
3.2	Lamine	8
3.3	Laminopathien	15
3.4	Entstehung einer humoralen Immunantwort.....	18
3.4.1	Der KLH –Immunisierungsansatz	23
3.4.2	Der DnaJ –Immunisierungsansatz	24
3.4.3	Der HBc –Immunisierungsansatz	25
4	Materialien und Methoden	27
4.1	Arbeit mit DNS	27
4.1.1	Lösungen und Puffer.....	27
4.1.2	Vektoren/DNS	28
4.1.3	DNS -Minipräparation (mit RNS).....	30
4.1.4	DNS -Minipräparation durch den Qiagen Kit (ohne RNS)	30
4.1.5	DNS -Midipräparation durch Qiagen Kit.....	30
4.1.6	Phosphorylierung von Oligonukleotiden	30
4.1.7	PCR /Sequenzierungsreaktion.....	30
4.1.8	Restriktionsreaktion (Verdau von DNS mittels Restriktionsenzymen).....	31
4.1.9	Eluierung von DNS -Fragmenten aus einem Agarosegel.....	32
4.1.10	Reinigung und Präzipitierung von DNS via PCI (Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol)	32
4.1.11	Ligation von DNS -Fragmenten	32
4.1.12	Klonierungsstrategie des HBc-Ig-fold Konstruktes	33
4.1.13	Klonierungsstrategie für das Fusionsprotein DnaJ-Lap2 α	35
4.1.14	Klonierung von pVH1 (YFP-Lap2 α –R690C exprimierender Vektor für eukaryotische Zelllinien)	37
4.2	Arbeit mit Bakterien	39
4.2.1	Bakterienstämme	39
4.2.2	Lösungen, Puffer und Medien	40
4.2.3	Herstellung von 'heat shock' kompetenten XL-1 blue	42
4.2.4	Transformation von 'heat-shock' kompetenten Bakterien.....	42
4.2.5	Bakterielles Wachstum und die Expression transformierter DNS.....	42
4.3	Arbeit mit Proteinen	43
4.3.1	Lösungen und Puffer.....	43
4.3.2	SDS-PAGE (denaturierende Polyacrylamid-Elektrophorese).....	46
4.3.3	Coomassie-Färbung.....	47
4.3.4	Western- oder Immuno-Blot und Detektion.....	48
4.3.5	Proteinaffinitätsreinigung von His getaggtten Fusionsproteinen mittels Ni-NTA (Nitrilotriacetic acid) -beads.....	48
4.3.6	Aufreinigung von unlöslichen Proteinen aus der unlöslichen bakteriellen Fraktion.....	49
4.3.7	Proteinkonzentration durch die Eluierungsfalle.....	49
4.4	Arbeit mit Zellkulturen	50
4.4.1	Puffer, Lösungen und Medien	50

4.4.2	Benutzte Zelllinien.....	53
4.4.3	Mausgenotypen.....	54
4.4.4	Wachstum und Teilung von Zelllinien	54
4.4.5	Einfrieren von Zellkulturen	55
4.4.6	Auftauen von Zellkulturen	55
4.4.7	Lyse von Zellkulturen	55
4.4.8	Transfektion mit Ca-P	56
4.4.9	Immunfluoreszenz (IF).....	56
4.4.10	Immunopräzipitation (IP).....	57
4.4.11	Immunisierungen von Mäusen und Fusion von Splenocyten mit X63-Myelomzellen	57
4.4.12	Peptid -ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)/ Depletions -ELISA.....	61
4.4.13	Verdünnung eines Mischklons und Isolierung eines Hybridomeinzelklons.....	64
5	Ergebnisse	65
5.1	Arbeit mit LaminA.....	65
5.1.1	Expression des HBc-Ig-fold Fusionsprotein.....	65
5.1.2	Immunisierungen und Tests der resultierenden Mausseren.....	70
5.1.2.1	HBcAg -Ig-fold Ansatz	70
5.1.2.2	KLH-Peptid Ansatz	73
5.1.3	Fusionen mit den immunisierten Mäusen	77
5.1.3.1	HBcAg -Ig-fold Ansatz	77
5.2	Arbeit mit Lap2α	81
5.2.1	Immunisierungsansatz mit KLH-gekoppelten Peptiden	81
5.2.1.1	Tests der Immunsera.....	81
5.2.1.2	Fusionen von KLH-Lap2 α immunisierten Mäusen	90
5.2.2	3A3 – entwickelter monoklonaler Ak: Eigenschaften.....	94
5.2.3	Expression des DnaJ-Lap2 α Fusionsproteins	99
5.2.3.1	Immunisierung mit DnaJ-Lap2 α und Tests der generierten Seren	101
5.2.3.2	Fusionen mit DnaJ-Lap2 α immunisierten Mäusen.....	105
5.2.4	Transfektion von HeLa –Zellen mit pVH1	107
6	Diskussion	110
7	Danksagung	118
8	Referenzen	118
9	Lebenslauf	121

1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AB	Antibiotikum
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
C -Term.	Carboxyl –Terminus einer Peptidkette
CTD	Carboxy -terminale Domäne
DCM	dilative Kardiomyopathie
DNS/ RNS	(Desoxy)Ribonukleinsäure
EDMD	Emery Dreifuss mukuläre Dystrophie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FPLD	familiar partial lipodystrophy
HBcAg	Core –Protein von Hepatitis B
HCRS	haemolyser-resistant cells
hsp	heatshock protein
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
Lap2 α	Lamina assoziiertes Polypeptid 2 α
MCS	multiple cloning site
min	Minuten
N -Term.	Amino –Terminus einer Peptidkette
N2A	humane neuronale Zelllinie
NaAc	Natriumacetat
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate/ Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U2OS	humane Osteosarkom-Zelllinie
WT	Wildtyp

2 Zusammenfassung

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit Methoden zur Generierung monoklonaler Antikörper (Ak), die zur Detektion von spezifischen Punktmutationen eingesetzt werden könnten. Es war das gesetzte Ziel einen Ak zu isolieren der entweder an die ‚normale‘ (Wildtyp-) Form eines Proteins bindet, oder an eine Form des gleichen Proteins, die sich von der Wildtyp- (WT-) Form in nur einer einzigen Aminosäure (AS) unterscheidet.

Solche Ak könnten weiterführend eingesetzt werden um genauere Daten über manche pathogen wirkende Proteine zu erlangen. Aussagen über die zelluläre Lokalisation, Expressionslevel oder sonstige modifizierte Funktionen dieser punktmultierten Proteine wären möglich, da diese Ak in der Zelle das pathogen wirkende Protein erkennen und binden könnten.

Für diese ‚proof of principle‘ Studie wurden folgende Punktmutationen mit pathogener Auswirkung ausgewählt:

- LaminA R453W
- LaminA R482W
- Lamina associated protein (Lap) 2 α R690C

Die Auswahlkriterien waren dabei die folgenden:

Alle erzeugen so genannte Laminopathien. Diese beruhen meist auf Punktmutationen von Laminen oder assoziierten Proteinen und sind oft autosomal dominant vererbt (mutierte- und WT –Form des Proteins existierten parallel). Außerdem eignen sich die Mutationen R453W und R482W, da sie in einer Immunglobulin (Ig)-Domäne lokalisiert sind und eventuell eine Strukturänderung im nativ gefalteten Protein herbeiführen. Im Bereich der Laminopathien bot sich auch die einzigartige Möglichkeit zur hausinternen Kollaboration mit dem spezialisierten und hoch angesehenen Labor von Prof. Roland Foisner.

Durch 2 verschiedene Immunisierungsansätze wurde versucht bei Mäusen eine bereits möglichst spezifische Immunreaktion gegen die mutierte AS und deren Umgebung auszulösen. Einerseits wurde versucht über ein kurzes Peptid, welches an KLH bzw DnaJ gekoppelt war, die Immunantwort in die gewünschte Richtung zu lenken (Immunisierung mit Kopplung an KLH und DnaJ). Andererseits wurde auch die hohe Immunogenität des nativ gefalteten viralen Capsidproteins von Hepatitis B (HBcAg) genutzt, in das der Ig-fold von LaminA integriert wurde. Basierend auf der vorhergesagten Strukturänderung von LaminA mit den Mutationen R453W und R482W innerhalb der globulären Domäne (C-terminaler Ig – fold von LaminA) wurde versucht die Immunreaktion auf eben den Bereich von Interesse zu lenken und somit Ak zu generieren die das mutierte Protein aufgrund der veränderten sekundären Struktur identifizieren.

Prinzipiell waren beide Ansätze zielführend und konnten mit unterschiedlicher Effizienz eine spezifische Immunreaktion auslösen. Es gelang auch einen monoklonalen Ak gegen den C-Terminus von Lap2 α zu isolieren, der spezifisch für die Änderung einer einzigen AS war und aus diesem Grund nur die humane Form von Lap2 α detektieren konnte.

3 Einleitung

3.1 SNPs

SNP steht für ‚single nucleotide polymorphism‘ (Einzel –Nukleotid –Polymorphismus) und auf diesen Punktmutationen basiert eine Großzahl der Variationen innerhalb des menschlichen Genoms. Bei der Entstehung solcher SNPs kommt es meist zur Umwandlung eines methylierten Cysteins durch spontan auftretende Desaminierung zu einem Thymin.

Diese SNPs können in verschiedenen Regionen des Genoms auftreten und wirken sich dadurch auch ganz verschieden, wenn überhaupt, auf die Genexpression aus. Sie können in nicht kodierenden Bereichen lokalisiert sein, oder in kodierenden Genomabschnitten. In beiden Fällen kann ein SNP als stille Mutation ganz ohne Konsequenzen existieren, oder er kann die Genexpression beeinflussen (sowohl die Expressionsfrequenz als auch die Primärsequenz des exprimierten Proteins).

SNPs werden auch zur Bestimmung von Verwandtschaftsverhältnissen genutzt, da sie häufig auftreten und nur bei einem nahen Verwandtschaftsverhältnis ähnlich oder ident sind. Basierend auf einem SNP im kodierenden Bereich des Genoms, ergeben sich wiederum mehrere Möglichkeiten der Auswirkung auf die Funktionalität des Proteins. Die Substitution kann ganz ohne Folgen bleiben, oder bis zu einem ‚loss of function‘ (Verlust der Funktionalität) des Proteins führen, was wiederum ein breites Spektrum unterschiedlicher pathogener Auswirkungen hat.

Eine durch einen SNP hervorgerufene Änderung des Proteins kann direkt Auslöser der Krankheit sein, oder zumindest ein weiterer Faktor sein, der die Neigung zur Entwicklung einer Krankheit unterstützt. Ein kleiner Auszug, der die Variabilität der durch SNPs ausgelösten Krankheiten unterstreichen soll: Sichelzellenanämie, unterschiedliche Krebsformen, Laminopathien, Alzheimer, Parkinson, Diabetes, ...

SNPs werden mittels PCR identifiziert, ein Prozess der auch bei der erwähnten Verwandtschaftsanalyse genutzt wird. Im Falle von autosomal dominanten Erkrankungen koexistieren die mutierte und die WT-Form eines Proteins nebeneinander in der Zelle. Generell kann die PCR nichts über die Auswirkungen des SNPs aussagen. Weder über die zelluläre Lokalisation des mutierten Proteins, die eventuell veränderte enzymatische Aktivität, noch Interaktionen mit anderen Proteinen oder den Expressionslevel.

Der Ansatz dieses Projektes war es daher, monoklonale Ak zu isolieren die zwischen Proteinen unterscheiden können die sich einzig durch eine, durch einen SNP ausgelöste, Punktmutation in der Primärsequenz unterscheiden!

Im Falle eines SNPs existieren die WT –Form und die mutierte Form des Proteins in betroffenen Zellen Seite an Seite. Könnte nun ein Ak ganz spezifisch nur die mutierte Form des Proteins erkennen, könnte dies viele neue Informationen über die Auswirkung des SNPs und über die eventuell einhergehenden pathogenen Mechanismen geben. Besonders die Lokalisation und der Expressionslevel des mutierten Proteins wären zum Beispiel über Immunfluoreszenz (IF) schnell und einfach zu untersuchen.

Aufgrund der möglichen Kollaboration innerhalb der MFPL mit dem Labor von Prof. Dr. Roland Foisner, wurden als erstes Projekt zur Studie von monoklonalen Ak als Werkzeug zur Detektion von SNPs, Laminopathien ausgewählt.

Viele der Laminopathien werden durch Punktmutationen ausgelöst und wirken sich dann als autosomal dominante Krankheit in einer Vielzahl von Phänotypen aus. Das Wissen über Laminopathien und deren molekulare Pathogenese ist begrenzt, da die geeigneten Werkzeuge zu deren Untersuchung bislang fehlen.

3.2 *Lamine*

Unter Laminen versteht man eine Gruppe von Proteinen die unterhalb der, aus einer Doppelmembran bestehenden, Kernhülle ein stabiles Netzwerk, die Lamina, ausbilden. Diese Lamina dient in erster Linie der Stabilisierung der nukleären Architektur, die Funktionen von Laminen sind allerdings wesentlich breiter gefächert. Darüber hinaus bilden Lamine auch im Zellinneren kleinere komplexe Strukturen und stellen generell Kontaktpunkte zu vielen anderen nukleären Proteinen dar.

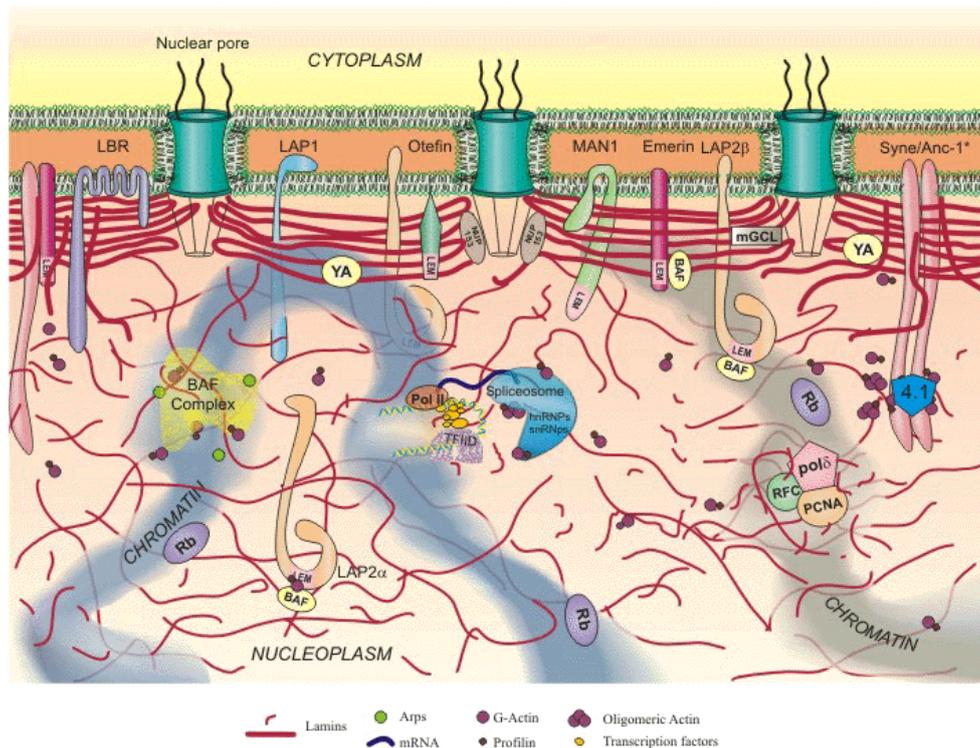


Abbildung 1¹: komplexe Darstellung der Kernhülle und der Lamina mit integrierten und laminassoziierten Proteinen. Zeigt die unterschiedliche Lokalisation von Laminen und Interaktionen mit den unterschiedlichsten Proteinen. LBR: LaminB-Rezeptor; LAP1: Lamin –associated Protein 1; LAP2α+β: Lamina –associated Protein 2α+β; YA: young arrest; Rb: Retinoblastoma Protein; BAF-complex: Chromatin remodelling complex; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen (zur DNA-Replikation); PolII: RNA-Polymerase II (auch RNAPII)

Alle Lamine (7 Spliceformen) werden von den folgenden drei Genen kodiert: *LMNA*, *LMNB1* und *LMNB2*. Entsprechend dem zugrunde liegenden Gen werden die Lamine in A-Typ und B-Typ Lamine unterteilt:

- A-Typ:
 - LaminA
 - LaminAΔ10
 - LaminC
 - LaminC2

¹ Goldman et al. 2002

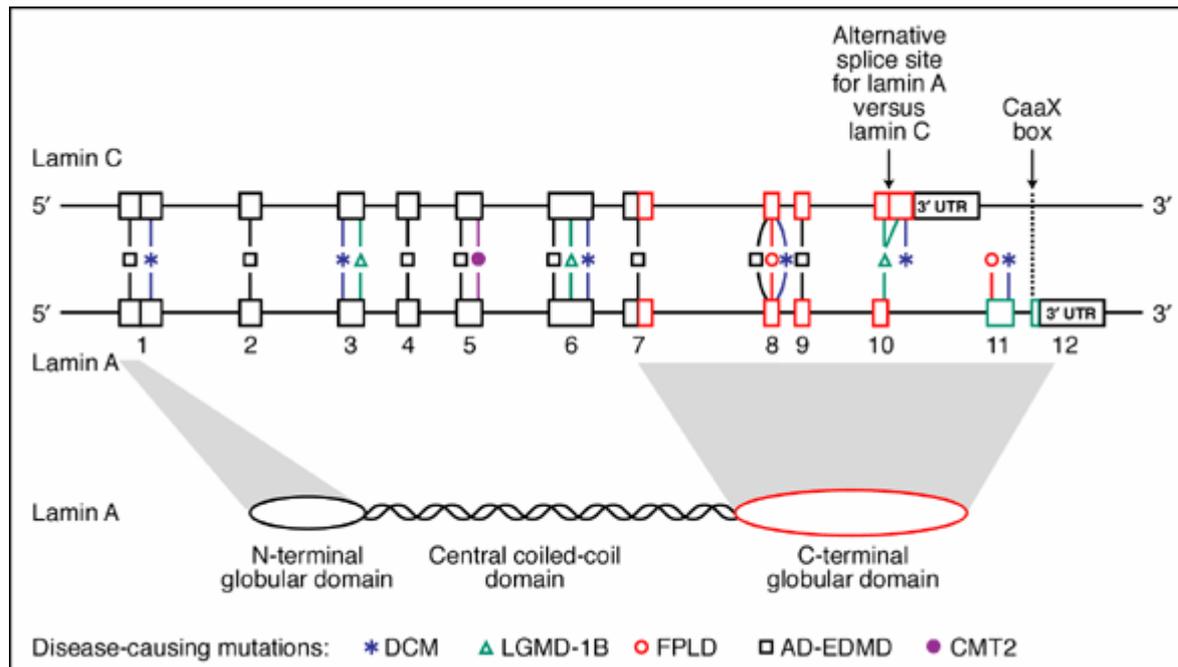


Abbildung 2²: Schema zum Aufbau von A-Typ Laminen am Beispiel von Lamin A, die zentrale α -helikale rod-Domäne wird von den globulären N- und C- terminalen Domänen umgeben. Lamin C ist eine kürzere Splicevariante von Lamin A, die sich nur in Sequenz und Länge der carboxyterminalen Domäne (CTD) unterscheidet (alternative splice site for lamin A versus lamin C). Angeführt sind auch einige Punktmutationen die Laminopathien auslösen. rot: FPLD; weiß: EDMD; blau: DCM, grün: LGMD-1B, violett: CMT => siehe Kapitel Laminopathien

Mutationen bei diesem Lamin –Typ (A-Typ) wirken sich nicht letal aus sondern führen zur Entwicklung von Laminopathien. Die Expression der A-Typ Lamine setzt im Vergleich zu B-Typ Laminen erst später im Laufe der Entwicklung ein. Es wird sogar vermutet, dass durch die beginnende Expression der A-Typ Lamine die Differenzierung der Zelle eingeleitet wird indem die Lamine Einfluss auf die Chromatinorganisation nehmen (Peter und Nigg, 1991; Krimm I. et al, 2002) und somit die Zelltyp -spezifische Expression starten. Es ist nachgewiesen, dass bei undifferenzierten Krebszellen der Expressionslevel von LaminA deutlich reduziert ist (Venables et al, 2001).

Bei Mäusen konnten auch erfolgreich LaminA knock-out Mutanten gezüchtet werden, die aber eine geringe Lebenserwartung von etwa 6-7 Wochen hatten (Stewart et al, 2007).

- B-Typ: LaminB1 (kodiert von *LMNB1*)
LaminB2 und B3 (kodiert von *LMNB2*)

Die B-Typ Lamine sind bereits in frühen Stadien der Embryonalentwicklung essentiell, und werden auch hauptsächlich während der Entwicklung exprimiert. Die vollständige Deletion, als auch jede bislang untersuchte Form der Mutation von LaminB in Mäusen, zeigt schon in frühen embryonalen Stadien bzw. wenige Minuten nach der Geburt letale Auswirkungen (Stewart et al; 2007).

² Maidment Stephen L. and Ellis Juliet A., 2002

Bei Lamin B1 konnte bislang keine Mutation der Primärsequenz einer Erkrankung beim Menschen zugeordnet werden. Die einzige bekannte Erkrankung die auf Lamin B1 zurückzuführen ist, beruht auf einer Genduplikation des B1-Gens. Es handelt sich dabei um die autosomal dominante Leukodystrophie, eine neurodegenerative Erkrankung die durch den Verlust von Myelin im zentralen Nervensystem entsteht.

Im Fall von Lamin B2 sind 3 sehr seltene Mutationen bekannt die ein humanes Krankheitsbild liefern. Alle Drei führen zu einer Form der Lipodystrophie (Stewart et al, 2007). Typ-B Lamine sind in der inneren Membran des Nukleus öfter verankert als Typ-A Lamine.

Generell zählen die Lamine zu den Intermediärfilamenten, bilden dort aber einen eigenen Typ (TypV). Wie alle Intermediärfilamente sind die Lamine aus einer zentralen, α -helikalen und konservierten rod-Domäne aufgebaut, die von variablen, nicht helikalen N- und C-Termini flankiert ist. Lamine werden sogar als die ‚Vorfahren‘ aller Intermediärfilamente angesehen (Moir R.D. und Spann T.P.). Über die rod-Domäne bilden die Lamine Dimere. Zur Bildung längerer Filamente kommt es durch die head-to-tail Anlagerung weiterer Dimere. In der variablen C-terminalen Domäne (CTD) konnten eine NLS (nuclear localisation sequence) und eine Chromatinbindungsstelle ausgemacht werden. Außerdem ist diese Domäne für die posttranslationale Modifikationen absolut essentiell. Sie enthält ein C-terminales CAAX (C steht für Cystein, AA aliphatische Aminosäuren und X steht für eine beliebige Aminosäure, meist Serin, Methionin, Cystein, Alanin oder Glutamin) –Motiv (im Fall von Prälamine A CSIM (Cystein, Serin, Isoleucin, Methionin), welches alle Lamine gemeinsam haben (Sinensky M. et al). Die Farnesyltransferase überträgt an das konservierte Cystein eine Isoprenylkette, die der Verankerung des Proteins in der inneren Membran der Kernhülle dient. Anschließend werden die überstehenden Aminosäuren (AAX) entfernt und das nun terminale Cystein wird mit einer Methylgruppe verestert. Im letzten Schritt wird durch das Enzym Zmpste24 eine endoproteolytische Spaltung herbeigeführt, wodurch die letzten 15 Aminosäuren samt der Isoprenylkette und der C-terminalen Methylgruppe entfernt werden (siehe Abb.3).

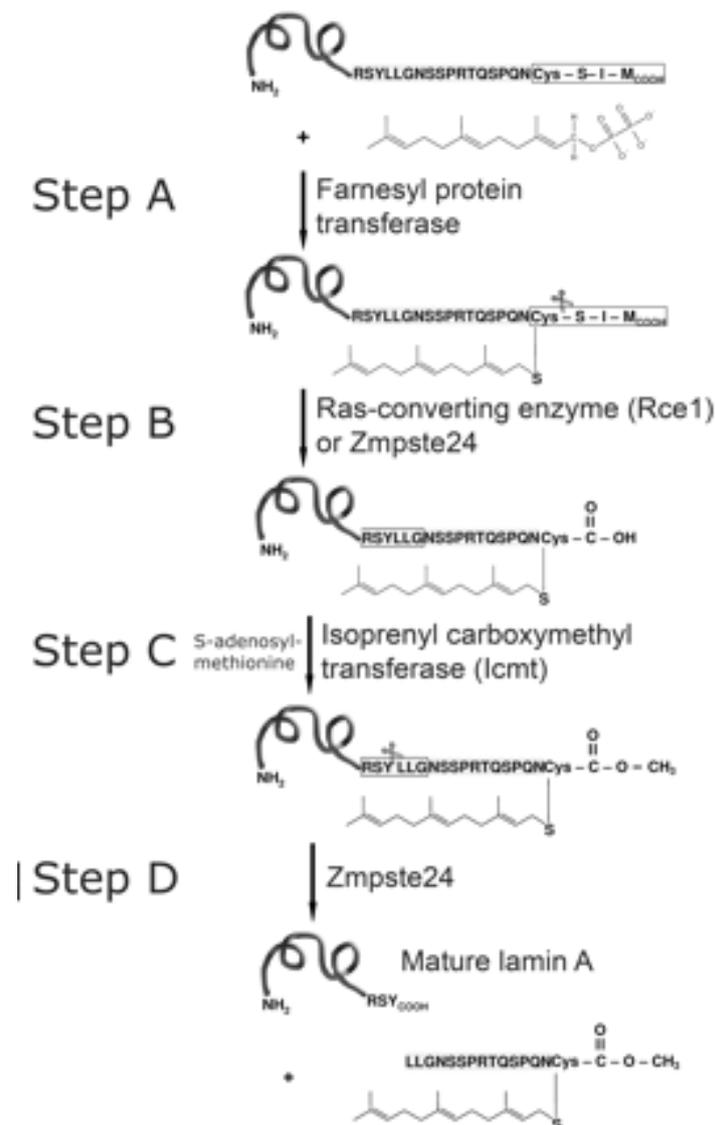


Abbildung 3³: posttranslationale Prozessierung von Laminen am Beispiel von PrälaminaA.

Bei B-Typ Laminen kommt es nicht, wie in der Abbildung für LaminA sichtbar, zur proteolytischen Entfernung der letzten 18 AS durch die Protease ZMPSTE24. Dadurch bleibt die starke Bindung an die IM bestehen, bis auf diesen Schritt ist die Prozessierung für alle Lamine gleich.

Die CTD aller A-Typ Lamine (AS 430-545) hat eine einzigartige Sekundärstruktur (Krimm et al. 2002). Sie besteht ausschließlich aus 2 β -Faltblättern die über loops miteinander verbunden sind, eines dieser β -Faltblätter besteht aus 5 β -Strängen, das andere aus 4 β -Strängen. Diese β -Faltblätter legen sich zu einem β -Sandwich zusammen. Jener β -Sandwich wird in die Klasse der Immunglobuline (Ig) eingeordnet und bildet dort eine eigene Untergruppe (Dhe-Paganon S. et al. 2002). Generell fungieren Ig-artige Domänen als strukturgebend oder sie vermitteln Kontakte zu anderen Proteinen, DNS oder

³ Rusiñol Antonio E. and Sinensky Michael S.

Phospholipiden. Daher gilt bei den Laminen diese Domäne als potentielle Kontaktstelle zu Lamin -assoziierten Proteinen und auch zu Chromatin.

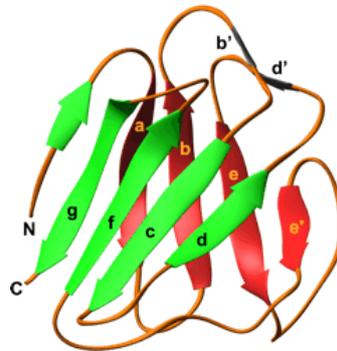


Abbildung 4⁴: 3-dimensionale Darstellung des β -Sandwich innerhalb der CTD von LaminA/C. Die Pfeile entsprechen β -Strängen die sich erst zu zwei β -Faltblättern zusammenlagern die ihrerseits einen β -Sandwich bilden.

Aufgrund der Dimerbildung via rod-Domäne, und der netzartigen Verknüpfung der entstandenen Dimere, dienen die Lamine der mechanischen Stabilisierung der Kernhülle (Shumaker et al), doch die Aufgaben der Lamine gehen über diese Stützfunktion weit hinaus. Grundlegende Funktionen beim Aufbau der Kernhülle, der DNS –Synthese, der Transkription als auch bei der Apoptose konnten den Laminen zugeschrieben werden (Moir RD und Spann TP).

Außerdem stellen die Lamine über Nesprine auch eine Verbindung zum normalen Zytoskelett der Zelle her (Parnaik V.K. and Manju K.) und spielen somit auch eine Rolle in der Positionierung des Kerns innerhalb der Zelle.

Für die später angeführten Versuche wurden nun Punktmutationen innerhalb von Laminen gesucht die eine Laminopathie auslösen, heterozygot dominant vererbt werden und daher medizinisch relevant sind. Außerdem sollte die Mutation im nativ gefalteten Protein zugänglich sein und an der Oberfläche lokalisiert sein. Dies war für den gewählten Versuchsaufbau über die Expression im HBC-Ag essentiell (siehe Kapitel Der HBC-Immunsierungsansatz). Außerdem sollte die Mutation eine deutliche Änderung in der Seitenkette der resultierenden Aminosäure bewirken.

Die folgenden Mutationen innerhalb der globulären CTD von LaminA entsprachen den angeführten Kriterien und wurden daher für die späteren Experimente ausgewählt:

- R453W
- R482W

⁴Dhe-Paganon S. et al. 2002

Darüberhinaus wurden diese Mutationen gewählt, da das kollaborierende Labor von Prof. Dr. Roland Foisner zu den angeführten Mutationen Materialien wie Vektoren und Zelllinien zur Verfügung stellen konnte.

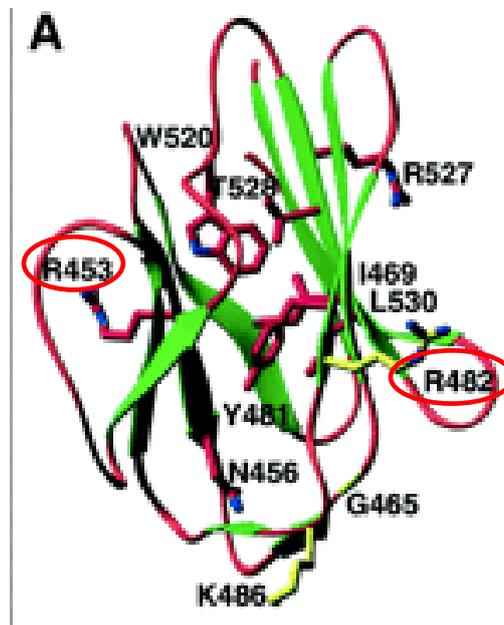


Abbildung 5⁵: 3-D Darstellung der Lokalisation der gewählten Punktmutationen R453W und R482W. Mutationen die zu den Laminopathien EDMD oder LGMD führen sind rot gefärbt und weisen hauptsächlich in das Zentrum des Proteins, Ausnahmen sind R453 und R527 deren Seitenketten nach außen gewandt sind. Mutationen die zu FPLD führen sind gelb gefärbt und liegen exponiert an der Oberfläche des Proteins.

EDMD: Emery-Dreifuss-Muscular Dystrophy

LGMD: LimbGirdle Muscular Dystrophy

FPLD: familial partial lipodystrophy of the Dunningan-type

Lamine sind stets mit einer Vielzahl von anderen Proteinen assoziiert (siehe Abb. 1), diese sollen oder können daher bei einer Besprechung von Laminen nicht ausgelassen werden. Erst über diese Proteininteraktionen wird der weite Wirkungsgrad von Laminen ermöglicht. Lamin-Proteinkomplexe ermöglichen unter anderen die Interaktion zur DNS. Grundlegend werden die assoziierten Proteine in zwei Gruppen unterteilt (Goldman et al. 2007): Proteine die hauptsächlich in die innere Membran der Kernhülle integriert sind und solche die frei im Nukleoplasma vorliegen. Zur ersten Gruppe zählen zum Beispiel: alle 6 Isoformen von Lap2 (Lamina associated protein).

Auch Mutationen in diesen Proteinen können aufgrund der engen Interaktion mit den Laminen Laminopathien auslösen.

In den später angeführten Versuchen wurde auch an einer der Isoformen von Lap2, nämlich Lap2 α , gearbeitet. Hier löst die Mutation R690C DCM (dilative Kardiomyopathie) aus (siehe Kapitel Laminopathien, Taylor et al; 2005). Alle Isoformen von Lap2 haben einen gemeinsamen N-Terminus und teilen auch die LEM-Domäne (Lap2, Emerin, MAN1), über die eine Interaktion zu BAF (Barrier to autointegration factor) möglich ist (Gotzmann und

⁵ Dhe-Paganon S. et al. 2002

Foisner, 2004). BAF wiederum ist ein wichtiger Bestandteil des Chromatin-remodelling Komplexes. Außerdem kann der LaminA-Lap2 α –Komplex auch Rb (Retinoblastoma protein) binden und es dadurch im Kern fixieren (Brett et al; 2004).

Lap2 α hat keine, wie die meisten anderen Lap2-Isoformen, transmembrane Domäne und wird daher nicht in der IM verankert sondern liegt frei im Kerninneren vor. Generell unterscheidet sich Lap2 α von den anderen Lap2-Isoformen wesentlich und teilt mit ihnen nur den erwähnten N-Terminus mit der LEM –Domäne (Taylor et al; 2005).

3.3 Laminopathien

Laminopathien sind Krankheiten, die auf Mutationen von A-Typ Laminen oder Lamina assoziierten Proteinen beruhen.

Es sind keine B1-Typ Laminopathien bekannt (ausgenommen, beruhend auf einer Genduplikation). Und für Lamin B2 sind 3 äußerst seltene Mutationen bekannt, die zu acquired partial Lipodystrophy (APL, teilweise erworbene Lipodystrophie) führen. Generell sind B-Typ Laminopathien sehr selten, da B-Typ Lamine schon früh in der Entwicklung exprimiert werden und sich daher, wie in Mausversuchen gezeigt, bereits in der frühen Embryonalentwicklung letal auswirken (Stewart et al; 2007).

Generell sind Laminopathien (beruhend auf A-Typ Laminen oder assoziierten Proteinen) seltene Erbkrankheiten die sich in 9 bekannten Krankheitsbildern auswirken (Gotzmann und Foisner; 2004):

- Muskeldystrophie (Muskelabbau)
- Kardiomyopathie (Herzmuskelentzündung)
- Neuropathie
- Lipodystrophie (Verlust von Fettgewebe)
- Diabetes aufgrund von Insulinresistenz
- Leberverfettung (Steatose)
- Knochenfehlbildungen (bone dysplasia)
- Osteolyse (Abbau von Knochensubstanz)
- frühzeitiges Altern

All diese Erscheinungsbilder können einzeln oder in verschiedenen Kombinationen auftreten.

Die angeführten Erscheinungsbilder werden in 3 Klassen von Laminopathien zusammengefasst (Broers et al; 2004):

- die Neuromuskulären (EDMD: Emery- Dreifuss- Muskuläre Dystrophie, LGMD: limb-girdle muscular dystrophy, DCM: dilative Kardiomyopathie), zugrunde liegende Mutationen sind über die gesamte Länge der LaminA -Primärsequenz verteilt

- Fettgewebe betreffende (FPLD: familiäre partielle Lipodystrophie, MAD: mandibular acral dysplasia), zugrunde liegende Mutationen in LaminA konnten nur in der CTD lokalisiert werden
- das periphere Nervensystem involvierende (CMT2: Charcot Marie Tooth disorder Typ2)

Die erste beschriebene Laminopathie war die X-chromosomal vererbte Emery-Dreifuss-Muskuläre Dystrophie (X-EDMD). Diese konnte auf eine Mutation von Emerin zurückgeführt werden wodurch dieses Lamina -assoziierte Protein fälschlich ins Endoplasmatische Reticulum (ER) migriert. Die Expression von Emerin ist in allen Geweben gleich, doch von den pathogenen Auswirkungen der EDMD sind nur Herz- und Skelettmuskulatur betroffen. Diese Form der Auswirkung konnte nur über eine, durch die Mutation veränderte, Interaktion mit gewebsspezifischen Proteinen erklärt werden. Später wurde entdeckt, dass EDMD auch durch Mutationen in LaminA hervorgerufen werden kann. Allerdings werden diese Mutationen in autosomal dominanter oder rezessiver Form vererbt (AD-EDMD und AR-EDMD). EDMD äußert sich in allen angeführten Formen durch eine frühe Kontraktur der Achillessehne, des Ellenbogen und der Rückgrat- sowie post cervicalen Muskulatur. Der früh beginnende und unaufhaltsame Muskelrückgang beginnt an den Oberarmen und den Unterschenkeln. Im fortgeschrittenen Stadium kommt eine Kardiomyopathie hinzu und zum frühen Tod kommt es meist durch einen Herzinfarkt (Gotzmann und Foisner; 2004). Für die meisten Mutationen in LaminA, die bislang für die Entwicklung von EDMD verantwortlich gemacht werden konnten, gilt, dass sie die 3-D Struktur des C-terminalen Ig-folds in LaminA destabilisieren (Krimm et al; 2002).

124 verschiedene Mutationen wurden bis heute in LaminA beschrieben, die für 6 unterschiedliche Krankheitsbilder verantwortlich zu machen sind. Die häufigsten davon sind die Mutationen R453W (bei 11% aller auftretenden Laminopathien) und R482W/Q/L (bei 13% aller auftretenden Laminopathien; Gotzmann und Foisner; 2004). Beide liegen im Ig-fold der C-terminalen Domäne von LaminA, lösen aber vollständig unterschiedliche Krankheitsbilder aus. R453W führt zur schon beschriebenen AD-EDMD wohingegen R482W zu FPLD führt.

FPLD wird ebenfalls autosomal dominant vererbt und alle auslösenden Mutationen sind im Ig-fold der CTD von LaminA lokalisiert, ändern dabei aber vermutlich nicht die 3-D Struktur der Domäne sondern führen eine Verminderung der positiven Oberflächenladung herbei (Krimm et al; 2002). Diese partielle Lipodystrophie wird begleitet durch eine Insulinresistenz und kommt erst in der Pubertät zur Ausprägung. Dabei kommt es zum Verlust von normalen Fettdepots, jedoch zur gehäuften Anlagerung von Fett im Gesicht, dem Nacken und im intra-abdominalen Bereich. Wegen der Insulinresistenz kommt es zu einer Glukoseintoleranz und

Diabetes mellitus die von einem sehr hohen Cholesterinspiegel begleitet werden (Gotzmann und Foisner; 2004).

Einen besonderen Stellenwert innerhalb der Laminopathien nimmt auch das Hutchinson – Gilford Progeria Syndrom ein (HGPS). In 18 von 20 Fällen wird diese schwere Form des frühzeitigen Alterns durch eine stille Mutation ausgelöst (G608G: GGC->GGT), die jedoch zur Entstehung einer neuen Splicestelle führt. Über diese Splicestelle werden 150bp aus dem noch untranslatierten PrelaminA entfernt und es kommt zu einer um 50AS verkürzten Form von PrelaminA. Die letzten C-terminalen Aminosäuren (AS) bleiben von diesem Vorgang unbeeinflusst und die posttranslationale Modifikation wird normal eingeleitet. Die Isoprenylkette wird angehängt und die letzten 3 AS werden abgespalten, doch der finale Schritt, indem die letzten 18 AS inklusive des Isoprenylankers entfernt werden, ist nicht möglich. Die nötige ZMPSTE24-Erkennungssequenz fehlt. Diese mutierte LaminA-Form (Progerin) bleibt in der Kernhülle verankert und kann auch noch über die intakte rod-Domäne nativ prozessiertes LaminA binden und wirkt sich somit negativ dominant aus (Capell et al; 2005).

Die Krankheit äußert sich durch einen beschleunigten Alterungsprozess, Verlust von subcutanem Fett und einem Pseudohydrocephalus. Außerdem sind die Patienten durch stark vermindertes Wachstum gezeichnet und erreichen meist nur ein Alter von 10-13 Jahren. Der Tod tritt durch Herzinfarkt oder Schlaganfall ein (Gotzmann und Foisner, 2004). Eine weitere Laminopathie die hier auch im Detail zu erwähnen ist, ist die dilative Kardiomyopathie (DCM) und zählt zu den neuromuskulären Laminopathien. Sie wird autosomal dominant vererbt und betrifft ausschließlich den Herzmuskel. Hierbei kommt es schon früh zu einer krankhaften Erweiterung des Herzmuskels, die schnell zu einer Herzinsuffizienz führt. Sie wird durch Mutationen in LaminA und auch durch die Mutation R690C in Lap2 α ausgelöst. Die R690C Mutation liegt im äußersten C-Terminus von Lap2 α .

Wie anfangs erwähnt wirken sich die Mutationen von LaminA gewebsspezifisch aus, wofür es aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsbereiche von Laminen auch zwei Hypothesen gibt (Broers et al, 2004):

- Mechanische Schwächung der Zelle: basierend auf der Funktion von Laminen zur mechanischen Stabilisierung und Fixierung des Nukleus, wird diese Hypothese dadurch unterstützt, dass in jeder bekannten Form einer Laminopathie unnatürliche Verformungen von Nuklei in unterschiedlichen Stadien beobachtbar sind. Vor allem bei der Entwicklung von Laminopathien, die die gestreifte und Herzmuskulatur betreffen, wird vermutet, dass die erhöhte mechanische Belastung bei diesem Zelltyp zu einem schnelleren und vermehrten Zelltod führt, da die Zellen nicht so belastbar sind. Dies wurde auch anhand von *LMNA*^{-/-} Fibroblasten nachgewiesen, die sowohl

eine verminderte Dehnfähigkeit als auch eine geringere Belastbarkeit, verglichen mit WT-Zellen, zeigten (Lammerding et al. 2004; Broers et al. 2004). Mutationen von LaminA/C oder Emerin schwächen dabei die Interaktion der nuklären Lamina zum Zytoskelett und vermindern dadurch die Belastbarkeit der Zelle.

- Genexpressions Hypothese: diese Hypothese basiert auf der Funktion von Laminen zur Steuerung der gewebsspezifischen Expression durch Interaktion mit spezifischen Transkriptionsfaktoren. Durch eingebrachte Mutationen wird diese Interaktion geschwächt, oder zumindest verändert (Wilson et al. 2001; Cohen et al. 2001). Generell sind lamin-interagierende Transkriptionsfaktoren (TF) transkriptionelle Repressoren, was die Umgebung der nukleären Hülle zu einer ‚silencing region‘ macht (Hutchison 2002). Ein Beispiel eines solchen Repressors ist pRB (Retinoblastoma Protein) welcher eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Myocyten und Adipocyten hat und Einfluß auf den Zellzyklus nimmt. Ist die Bindung von Laminen zu pRB durch Mutationen nicht mehr möglich geht die Wirkung des Transkriptionsfaktors verloren, da er verstärkt degradiert wird und mislokalisiert (Johnson B.R. et al. 2004). Die proliferierenden Stammzellen verlieren dadurch ihr Potenzial zur Differenzierung. Zerstörte Zellen können nicht mehr ersetzt werden. Über diese Hypothese werden vor allem FPLD (gewebsspezifischer TF ist hier SREBP1; Lloyd et al. 2002) und HGPS erklärt.

3.4 *Entstehung einer humoralen Immunantwort*

Die Definition einer humoralen Immunantwort ist (lt. Campbell; Biologie; 1997 Spektrum Verlag): Form der Immunität, die darauf beruht, dass in Blutplasma und Lymphe zirkulierende Antikörper Bakterien und Viren bekämpfen.

Der zentrale Faktor einer humoralen Immunantwort sind also die Antikörper, die diese Form der Immunität vermitteln.

Prinzipiell zählt man die humorale Immunantwort zur adaptiven oder erlernten Immunität, im Gegensatz zur angeborenen Immunität. Einer der Vorteile der adaptiven Immunität ist, dass diese im Stande ist ein zelluläres Gedächtnis zu bilden, um bei wiederholter Exponierung verstärkt und schneller auf das auslösende Antigen reagieren zu können.

Das adaptive Immunsystem (IS) gliedert sich seinerseits wiederum in die erwähnte humorale Immunität und die zelluläre Immunität. Nur die humorale Immunität ist allerdings in der Lage Antikörper frei zu setzen.

Wird ein neues, unbekanntes Antigen von Teilen des angeborenen IS erkannt wird es aufgenommen und von APCs (Antigen präsentierende Zellen) erst prozessiert und dann spezialisierten Zellen (T-Lymphozyten oder T-Zellen) des adaptiven IS präsentiert.

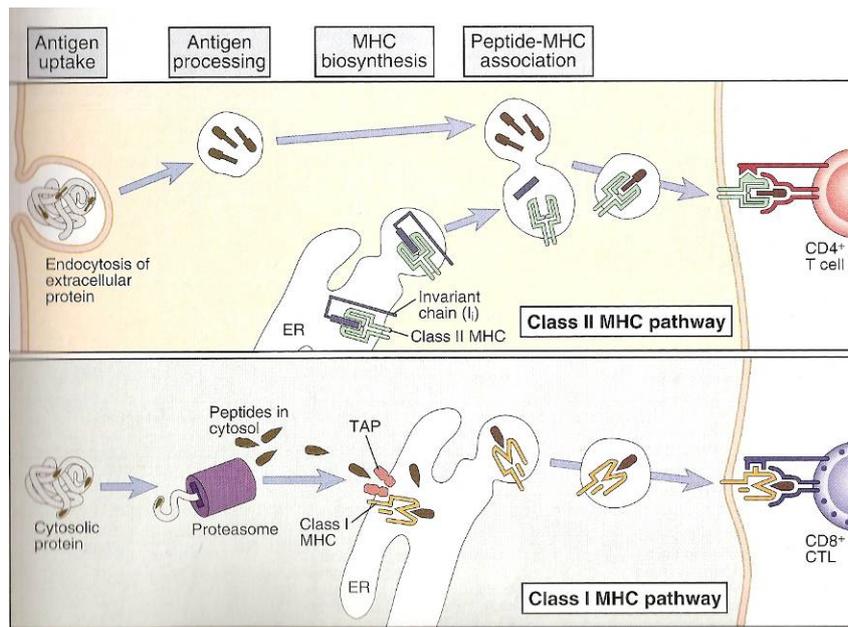


Abbildung 6: Die Antigenpräsentation erfolgt über den MHC- Komplex. Zur Präsentation zytoplasmatischer Antigene dient der MHC I-Komplex, für extrazelluläre Antigene wird der MHC II-Komplex genutzt. Die verschiedenen MHC- Komplexe sprechen auch unterschiedliche Effektorzelltypen an. Abb. aus Cellular and molecular Immunology; Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman; fifth Edition 2003; Saunders Verlag

Diese Präsentation erfolgt durch Bindung des prozessierten Antigens an den MHC (major histocompatibility complex) –Komplex, welcher dann an der APC membrangebunden vorliegt. Zur APC können viele Zelltypen werden, z.B. Dendritische Zellen, Makrophagen aber auch B-Zellen (siehe später). Wie in Abb. 8 a) ersichtlich wird, muss ein prozessiertes Antigen nicht unbedingt ein linearer Bereich aus der Primärsequenz des auslösenden Proteins sein. Es kann sich auch aus Bereichen zusammensetzen, die auf Grund der nativen Faltung des Proteins räumlich beisammen liegen.

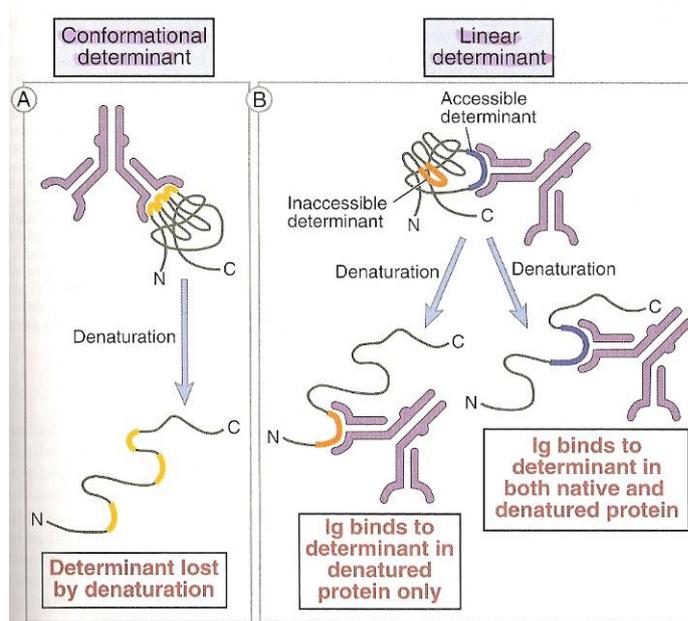


Abbildung 7: Zusammensetzungsmöglichkeiten für ein Epitop eines Antikörpers, a) das Epitop muss nicht einem

Abschnitt der Primärsequenz eines Proteins entsprechen b) das Epitop kann aus einem Bereich der Primärsequenz bestehen

Abb. aus Cellular and molecular Immunology; Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman; fifth Edition 2003; Saunders Verlag

Nicht jede T-Zelle kann von jedem präsentierten Antigen zur weiteren Funktion stimuliert werden. Jeder T-Zell-Rezeptor (TCR) hat eine ganz individuelle variable Region und erkennt somit nur ein spezielles Antigen, das MHC -gebunden von der APC präsentiert wird.

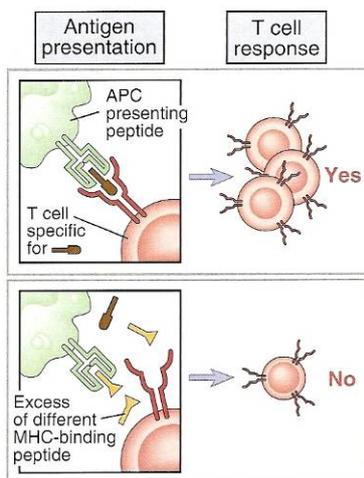


Abbildung 8: Jede T-Lymphocyte kann nur durch ein spezielles

Antigen aktiviert werden => klonale oder selektive Selektion!

Abb. aus Cellular and molecular Immunology; Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman; fifth Edition 2003; Saunders Verlag

War die Stimulation einer T-Zelle durch die Erkennung des Peptid –MHC -Komplexes auf der APC und mit Hilfe von stimulierenden Wachstumsfaktoren möglich, beginnt sich diese zu teilen und die humorale Immunantwort läuft an. Die stimulierte T-Zelle beginnt also zu proliferieren und splittet sich dabei in mehrere Subtypen auf. Einerseits entwickelt sie sich zu Effektor -T –Zellen, andererseits entwickeln sich aber auch Gedächtniszellen. Unter den Effektor –T –Zellen gibt es wieder Untergruppen: Die cytokinproduzierende T-Helfer –Zelle und die cytotoxische T-Zelle (CTL), die Teil der zellulären Immunität ist.

Für den weiteren Weg der Ak –Entstehung sind in erster Linie die cytokinproduzierenden T-Helfer –Zellen wichtig. Die von der T-Helfer –Zelle sezernierten Cytokine haben viele Aufgaben zu bewältigen, eine davon ist es B-Zellen, die bereits Kontakt zu ‚ihrem‘ Antigen haben, zur weiteren Proliferation zu stimulieren. Erst durch dieses zweite Wachstumssignal ist die B-Zelle im Stande zur Plasmazelle zu differenzieren, die ihrerseits fähig ist spezifische Ak zu sezernieren.

Mit der Spezifität von B-Zellen verhält es sich wie mit der von T-Zelle so, dass jede B -Zelle nur ein einziges Antigen erkennen kann.

Die Erkennung des passenden Antigens erfolgt bei der B-Zelle durch einen membrangebundenen Ak. Bindet ein Antigen an diesen, wird es von der B-Zelle aufgenommen und prozessiert, dadurch wird die B-Zelle selbst gegenüber der T-Zelle zur APC und

präsentiert das für sich passende Epitop über den Peptid-MHC-Komplex. Die zweifache Stimulation eines Lymphocyten (T- als auch B-Zelle) durch Antigenkontakt und Wachstumssignal, führt zur selektiven oder klonalen Selektion und garantiert, dass nur ein spezifischer und passender Lymphocyt zur Proliferation angeregt wird.

Die enorme Bandbreite der Antigenerkennung liegt also in den membrangebundenen Antigenrezeptoren von B- und T-Lymphocyten. Anhand der Struktur von Ak soll hier diese enorme Variabilität erläutert werden (verhält sich bei T-Zell Rezeptoren ganz ähnlich).

Unter Antikörpern versteht man verschiedene Gruppen von Immunglobulinen (Ig) die alle ein und dieselbe Grundstruktur haben. Sie bestehen aus jeweils zwei identischen schweren Ketten und zwei ebenfalls identischen leichten Ketten. Jede Kette setzt sich aus wiederholenden homologen Domänen zusammen, die ihrerseits aus ca. 110 AS bestehen. Diese Ig-Domänen bestehen jeweils aus einem β -Sandwich bei dem sich 2 β -Faltblätter, die wiederum aus je 3-5 antiparallelen β -Strängen bestehen, aneinander lagern. Jede Kette hat einen konstanten C-Terminus (eventuell zur Membranverankerung) und einen variablen N-Terminus. Die Antigenerkennung übernehmen natürlich die variablen N-terminalen Bereiche und hierbei besonders die 3 hypervariablen Regionen innerhalb dieser variablen Strukturen. In der endgültigen 3-dimensionalen Faltung liegen die hypervariablen Bereiche direkt aneinander und bilden so den Antigen-Erkennungsbereich. Der konstante Teil der schweren Kette ist länger als der der leichten Kette und legt die Effektorfunktionen des Antikörpers fest. Er entscheidet also darüber, ob der Ak später membrangebunden bleibt oder sezerniert wird, und wenn er abgesondert wird, gibt es wiederum unterschiedliche Aufgabenbereiche.

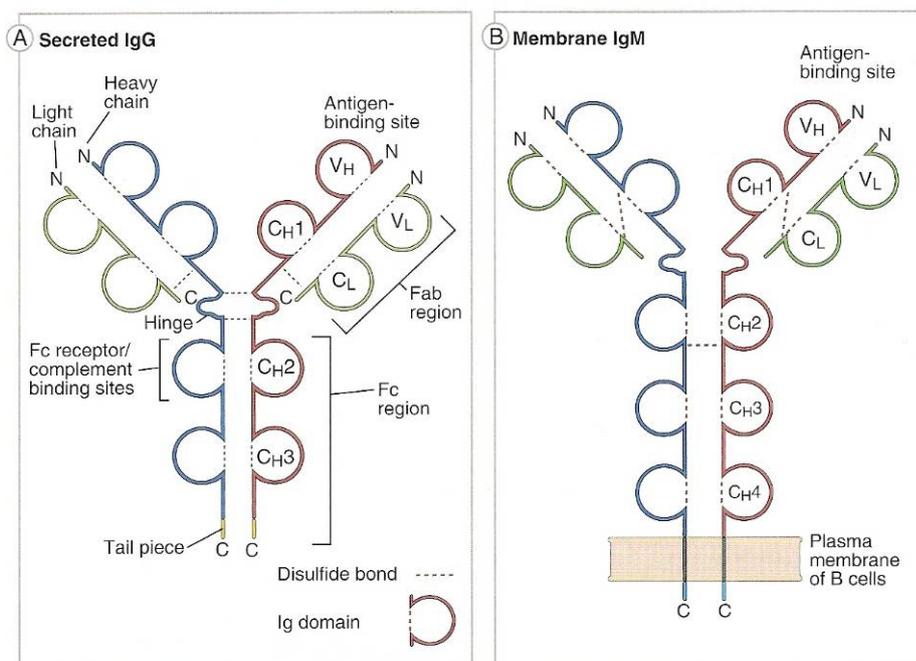


Abbildung 9: Ak (Ig)

haben viele verschiedene Isotypen, die sich im konstanten Teil der schweren Kette unterscheiden. Die variablen Bereiche bleiben unbeeinflusst von der möglichen Änderung des Isotyps (Isotyp-switch). Ansonsten setzt sich ein Ig aus 4 Ketten zusammen, zwei leichten und zwei schweren, die sich ihrerseits in

variable und konstante Bereiche gliedern. Jede Kette setzt sich aus mehreren Ig-Domänen zusammen. Abb. aus Cellular and molecular Immunology; Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman; fifth Edition 2003; Saunders Verlag

Die erreichte Variabilität ist nur möglich, da der Genlocus der dem Ig zugrunde liegt aus einer Vielzahl von kombinierbaren Elementen besteht.

Jeder Ig -Locus besteht aus multiplen Kopien der drei erforderlichen Gensegmente: V (variabel), D (diversity), J (joining) und C (konstant) -Segment. Die Zahl der variablen Elemente ist mit Abstand am höchsten (beim Menschen zwischen ~35 und 45) und alle unterscheiden sich in ihrer Sequenz voneinander. Die hypervariablen Bereiche, die besonders wichtig zur Antigen –Erkennung sind, entstehen an den ‚Schnittstellen‘ zwischen den zusammengeführten Elementen. Während die Elemente miteinander kombiniert werden kommt es zur Entfernung oder Einfügung einzelner Nukleotide (junctional diversity).

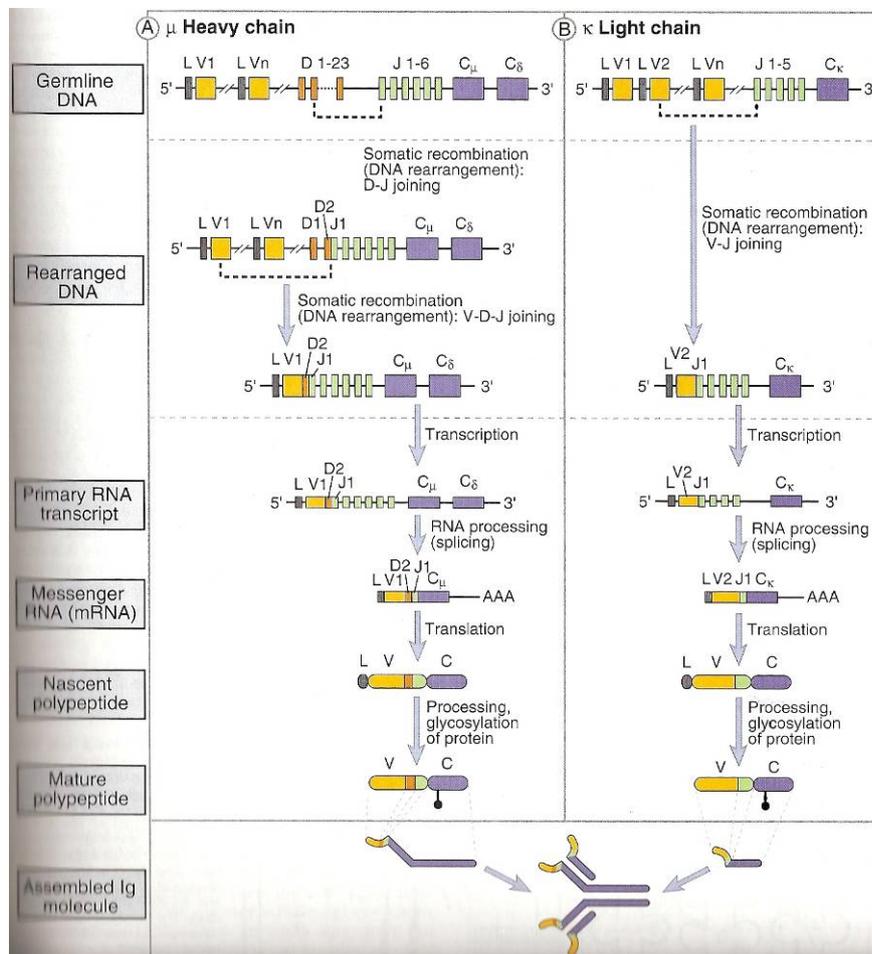


Abbildung 10: Darstellung

der Prozessierung der Ig-Loci. Durch somatische DNA-Rekombination werden V (D) und J-Elemente gewählt (Entstehung von 2 hypervariablen Elementen). Auf der Ebene des RNA-Splicings wird der konstante Bereich der Kette gewählt (=> dritter hypervariabler Bereich).

Abb. aus Cellular and molecular Immunology; Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman; fifth Edition 2003; Saunders Verlag

Die Zusammenführung eines V- Segments (D-, nur bei der schweren Kette) mit den J- Segmenten und auch die dadurch entstehenden hypervariablen Bereiche werden noch auf DNS –Ebene durch Rekombination festgelegt. Die Auswahl eines J- Segments und eines

konstanten C- Elements erfolgt dann durch splicing auf RNA -Ebene. Nur so ist es für die B-Zelle möglich die Effektorfunktion des Ak nachträglich zu ändern (Isotypswitch von membranständig auf sezernierend nach der Stimulation durch die T-Helfer Zelle).

(Alle Abbildungen dieses Kapitels stammen aus Cellular and molecular Immunology; Abul K-Abbas, Andrew H. Lichtman; fifth Edition 2003; Saunders Verlag)

3.4.1 Der KLH –Immunisierungsansatz

KLH steht für Keyhole limpet hemocyanin und ist eines der größten bekannten globulären Proteine mit einer Vielzahl von freien Lysin –Seitenketten, woran die Kopplung eines Peptides erfolgen kann.

KLH wird aus der Hämolymphe von Schlitzschnecken isoliert und ist wegen seiner hohen Immunogenität bekannt und verbreitet. Diese hohe Immunogenität wird für ein mehrfach gekoppeltes kurzes Peptid genutzt.

Diese Immunisierungen gehören zu den Standardverfahren der Ak –Produktion. Durch ein kurzes gekoppelten Peptides kann in diesen Ansatz eine hohe Spezifität für einen bestimmten Proteinbereich erreicht werden. Bei diesen kurzen gekoppelten Peptiden spricht man von Haptenen, das sind kleine organische Moleküle die erst durch die Kopplung an ein Trägermolekül als Antigen einer Immunreaktion fungieren können.

Die Kopplung des Peptides an die Lysinseitenketten des Trägermoleküls wird über ein endständiges Cystein ausgeführt, erfolgt aber unspezifisch, was bedeutet, dass auch Cysteine innerhalb der Peptidsequenz genutzt werden können.

Der wohl bedeutendste Teil bei diesem Immunisierungsansatz ist die Wahl des Peptides.

Die Peptide wurden wie folgt gewählt:

Lap2α –WT: KLH –684 CKVIKKRGNKH 694-COOH

Lap2α –R690C KLH –684 CKVIKKCGNKH 694-COOH

LaminA –WT (R482): KLH -477 CLLTYRFPPK 486-NH₂

LaminA –W482: KLH -477 CLLTYWFPPK 486-NH₂

Ganz bewusst wurde die ‚Zielmutation‘ in das Zentrum des Peptides gelegt. Die terminale COOH-Gruppe beim Lap2α –Peptid entspricht der natürlichen Sequenz und wurde daher nicht amidiert, wie beim LaminA –Peptid, welches sich im Inneren der Peptidkette befindet.

Beim Lap2α –Peptid entsprechen die gewählten Aminosäuren den letzten 11 AS der humanen Sequenz von Lap2α. Die Kopplung an das Trägermolekül erfolgte über das, in der Sequenz natürlich vorkommende, C684.

In diesem Ansatz kommt es mit einer hohen Wahrscheinlichkeit nicht zur nativen Faltung des Peptidabschnitts, da die gewählte Sequenz einfach zu kurz dafür ist. Der äußerste C-Terminus des Lap2α -Proteins liegt wahrscheinlich frei, da Fusionsproteine aus Lap2α und

mRFP (monomeric red fluorescent protein 1) und auch GFP (green fluorescent protein) weiterhin ihre native Lokalisation und Homotrimerisierung ausüben konnten. Die Sekundärstruktur des C-Terminus wurde also scheinbar nicht von dem C-terminal fusionierten Protein beeinflusst, was die Wahrscheinlichkeit für einen frei liegenden äußersten C-Terminus erhöht (Snyder et al; 2007).

Das zweite Paar von KLH gekoppelten Peptiden wurde für die Punktmutation R482W von LaminA gewählt.

Wieder wurde die Peptidsequenz so gewählt, dass sich die Mutation im Zentrum befindet. Die terminale Carboxygruppe wurde jedoch amidiert, da sie auch im natürlichen Protein nicht existent ist und durch die Ladung ein Epitop bieten würde, das im nativen Protein nicht vorhanden ist. Im natürlichen Protein war in diesem Fall kein Cystein verfügbar, dieses musste allerdings für die Kopplung angefügt werden (fett markiert).

Die Peptide wurden wie folgt gewählt:

LaminA R482 (entspricht dem WT): KLH –C 478 LLTY**R**FPPK 486-NH₂

LaminA W482 (mutierte Form): KLH –C 478 LLTY**W**FPPK 486-NH₂

Auch hier ist eine native Faltung des Peptides aufgrund der Länge unwahrscheinlich. Daher kann auch bei diesem Ansatz nur ein lineares Epitop von einem späteren Ak erkannt werden.

3.4.2 Der DnaJ –Immunisierungsansatz

Die verwendete DnaJ-Domäne (J-Domäne) entstammt dem kleinen DNA-Virus Simian Virus 40 (SV40). SV40 ist ein doppelsträngiger Polyomavirus und sein Genom (Abb. 11 A) kodiert für 7 Proteine. Diese 7 Proteine setzen sich wie folgt zusammen: drei strukturgebende, späte Proteine (VP1, 2 und 3), drei frühe Proteine (large T, small T und 17kD T Antigen) und das regulative AgNO Protein (wenig bekannt). Die drei frühen Gene des Virus kodieren für die T-Antigene, large T, small t und das 17kD (tiny) t -Antigen und sie entstehen alle durch alternatives Splicing aus dem gleichen Primärtranskript (Brodsky und Pipas, 1998). Zu den Aufgaben der T-Antigene zählen: Regulation der frühen und späten Genexpression, die Induktion der Transkription in der Wirtszelle, die virale DNA-Replikation inklusive der Rekrutierung nötiger Wirtsproteine und auch die Zusammensetzung der fertigen Virionen. Die ersten 82 N-terminalen AS (siehe Abb.11 B) sind allen drei T-Antigenen gemeinsam, sie bilden die J-Domäne. Die J-Domäne findet sich in DnaJ- Chaperonen und vermittelt dort die Interaktion mit DnaK der Wirtszelle (Brodsky und Pipas. 1998). Über diese Art der Interaktion können nun auch die viralen T-Antigene mit DnaK- Chaperonen (auch Hsc70) der Wirtszelle interagieren, worauf die hohe Immunogenität zurückgeführt wird. Diese immunogene Wirkung der T-Antigene konnte auf die ersten 77 AS der Primärsequenz eingeschränkt werden (DnaJ oder J-Domäne; Schirmbeck et al, 2002).

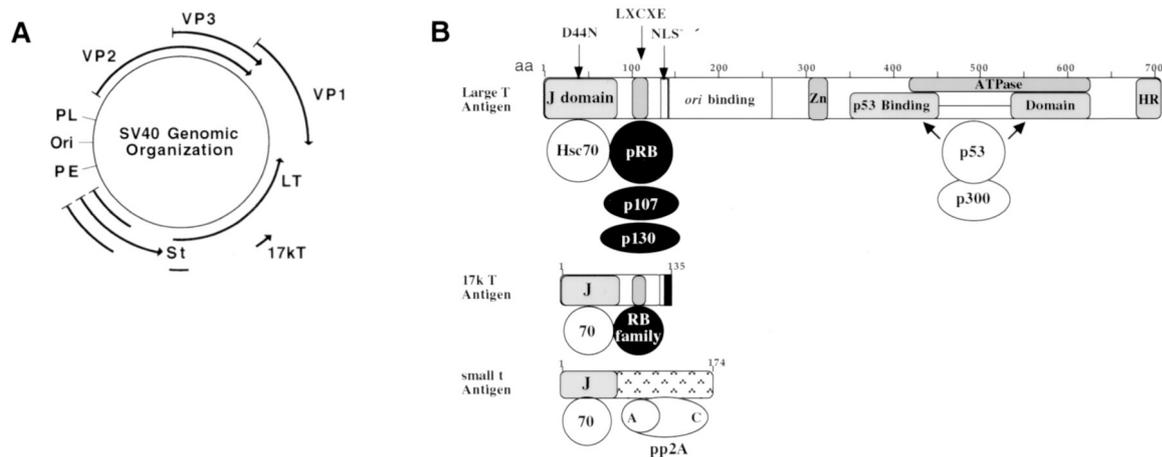


Abbildung 11: A) Organisation des Genoms von SV40, die J-Domäne ist Teil der viralen T –Antigene. B) Genprodukte der frühen Gene sind Large T, small T und 17kD Antigen, alle teilen die N-terminale J-Domäne mit der Bindungskapazität für Hsc70.

Abb. von Sullivan und Pipas, 2002

Das Prinzip dieses Immunisierungsansatzes ähnelt dem KLH –Ansatz. Auch hier wird die bekannt hohe Immunogenität eines Trägermoleküls genutzt um eine Immunreaktion gegen ein gekoppeltes oder fusioniertes kurzes Peptid zu richten. Einzig ist die J- Domäne nicht annähernd so groß wie das KLH-Protein und die erreichte Immunogenität beruht auf anderen molekularen Mechanismen (Bindung des zelleigenen Chaperons Hsc70).

Aufgrund der laborinternen Experimente mit der J-Domäne, die eine starke Immunreaktion herbeiführten (Mudrak/ Ogris, unpublizierte Daten), und der vorhandenen Materialien wurde die Fusion des Lap2 α -Peptides an die J-Domäne der T-Antigene untersucht.

3.4.3 Der HBc –Immunisierungsansatz

Anders als bei den zwei vorangegangenen Immunisierungsansätzen wird in diesem Ansatz auf die native Faltung des Antigens Wert gelegt. Das HBc-Ag kann eine hohe Immunresponse gegen ein inserierte Protein hervorrufen (Kratz et al, 2002) und eine spezifische Immunantwort auslösen. Außerdem bietet das nativ gefaltete Antigen (in diesem Fall die globuläre Ig –Domäne von LaminA) andere Epitope als die denaturierte Primärsequenz.

Die Struktur des HBc-Ag (Capsid bildendes Protein von Hepatitis B) ist geprägt durch zwei lange α -Helices die durch einen kurzen Loop an der Spitze verbunden sind. Dieses Protein (sowie die für den Ansatz genutzte verkürzte Form; AS 1-149) ist in der Lage Capsid-like Particles (CLPs) zu formen indem sich die Monomere über ihre α -Helices zu Dimeren zusammenlagern die wiederum über die C- und N-Termini multimere ikosahedrale Strukturen bilden. Bei einem solchen CLP ragen die erwähnten α -Helices wie kleine Türmchen (4 –Helix –Bündel) nach außen und die Termini weisen ins Innere des Partikels. An der Spitze der α -helikalen Türmchen befinden sich die kurzen verbindenden Loops (AS 78-83), die besonders immunogen sind und c/e1 –Epitop genannt werden (Kratz et al, 1999).

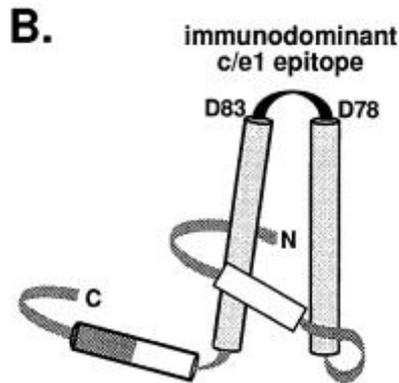


Abbildung 12: sekundäre Struktur des HBcAg; α -Helices werden durch kurzen, immunogenen Loop verbunden (c/e1 Epitop). Zur Expression im Fusionskonstrukt wurde eine verkürzte, aber noch self-assembly kompetente Version des Proteins genutzt. Abb. von Kratz et al, 1999

Bereits mehrfach konnte gezeigt werden, dass die Insertion eines kurzen Peptides in das c/e1 –Epitop eine gesteigerte Immunantwort gegen das Peptid hervorrief. Bahnbrechend war der Ansatz, mit Hilfe kurzer Linker ein ganzes globuläres Protein in die verkürzte Form des HBc-Ag zu integrieren (Kratz et al; 1999). Voraussetzung dafür war allerdings, dass das inserierte Protein die Faltung als auch die Formierung der CLPs nicht beeinflusste, bzw. verhinderte. N- und C- Termini sollten bei dem inserierten Protein in räumlicher Nähe liegen und dieses sollte auch nicht zur Dimerisierung fähig sein (Vogel et al. 2005), da dies die Partikelformierung (CLPs) des HBc-Ag stören würde.

Basierend auf diesen Voraussetzungen schien der Ig-fold von LaminA/C zur Integration in das c/e 1 –Epitop geeignet. N- und C- Terminus sind laut einer Strukturanalyse in räumlicher Nähe. Zwar ist eine der Funktionen der Ig-Domäne die Interaktion zu anderen Proteinen, doch konnte bisher keine Homodimerisierung nachgewiesen werden.

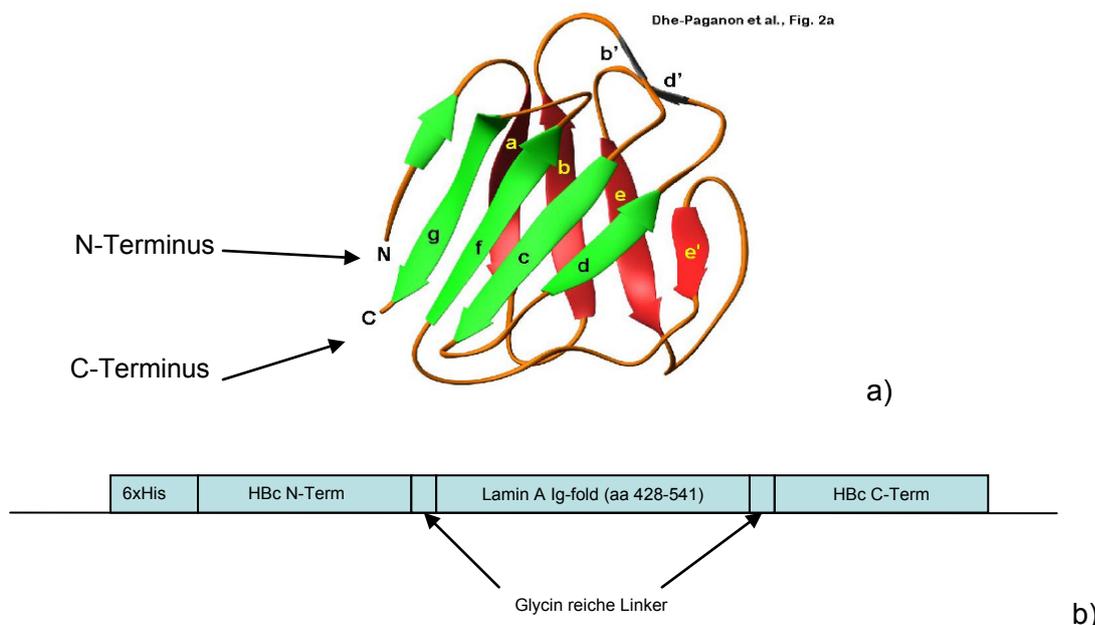


Abbildung 13: a) sekundäre Struktur des Ig-folds von LaminA/C; N- und C- Terminus sind in räumlicher Nähe b) Skizze des Fusionskonstrukts aus HBcAg und dem, in das c/e1 –Epitop inserierten, Ig-fold von LaminA/C

Abb. a) aus Dhe-Paganon et al, 2002

Trotz Insertion des Ig-folds in das immundominate c/e1 –Eptiop sollte das HBc-Ag noch im Stande sein seine native Faltung einzunehmen und somit Di- und Multimere bilden zu können. Die Entstehung von CLPs ist daher theoretisch möglich, wurde aber nicht nachgewiesen.

4 Materialien und Methoden

Im Allgemeinen sind die folgend beschriebenen Methoden Standardprotokolle und mussten im Laufe der praktischen Anwendung adaptiert werden. Sollte dies der Fall sein wurde es im Abschnitt der Ergebnisse angeführt.

4.1 Arbeit mit DNS

4.1.1 Lösungen und Puffer

Minipräparations Lösungen:

I (resuspension solution): 50mM Glucose
 25mM Tris pH 8,0
 10mM EDTA pH 8,0

die Lösung wird autoklaviert und bei 4°C gelagert.

II (lysis solution): 0,2M NaOH
 1% SDS

kann direkt bei RT gelagert werden

III (neutralization solution): 3M Kaliumacetat
 2M geeiste Essigsäure

die Lösung kann direkt bei RT gelagert werden

RNase:

RNaseA (Sigma #R-5125) wird in einer Konzentration von 10mg/ml in 0,01M NaAc pH5,2 gelöst. Die Lösung wird für 15 min auf 100°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Der pH der Lösung wird durch Zugabe von 1M Tris-HCl auf einen Wert von 7,4 eingestellt. Die Aliquote werden bei -20°C gelagert.

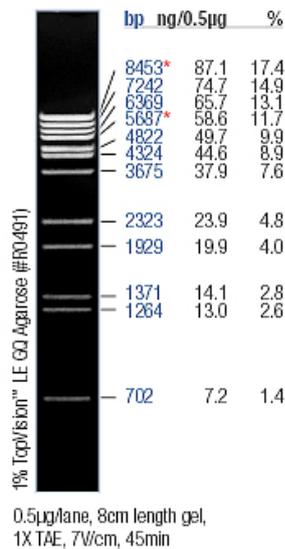
PCI:

Eine Lösung im Verhältnis von 1:1 aus Phenol und Chlorophorm wird hergestellt. Diese Lösung wird weiters in einem Verhältnis von 24:1 mit Isoamylalkohol versetzt. Die fertige Lösung wird, überschichtet mit 0,1M Tris pH 8,0, in Dunkelheit bei 4°C gelagert.

Lambda DNA-Marker:

Der Marker (von Fermentas) wird mit TE (pH 8,0) auf eine Endkonzentration von 1µg/10µl verdünnt. Um eine Trennung der obersten Banden zu garantieren wird die fertige

Verdünnung für 5 min auf 65°C erhitzt und sofort auf Eis gekühlt. Aliquote werden bei -20°C gelagert.



(die markierten Banden können sich auf Grund ihrer kohesiven Enden aneinander lagern und weitere Banden erzeugen, durch das Erhitzen auf 65°C wurde dem jedoch vorgebeugt)
Im Normalfall werden 5µl dieses Gemisches auf ein Agarosegel geladen. Anhand dieser Konzentration sind spätere Abschätzungen der Quantität von Vergleichsproben zulässig.

Abbildung 14: Darstellung des Laufschemas der benutzten DNA- Lambda - Markers
Abb von Fermentas

5x DNA loading dye (Färbemittel und LadePuffer):

fertige Lösung von Fermentas

50x TAE:

Tris	484g
Essigsäure (100%)	114ml
0,5M EDTA pH 8,0	200ml

Alle Bestandteile in H₂O lösen und auf ein Endvolumen von 2000ml auffüllen. Die fertige Lösung kann bei RT gelagert werden.

4.1.2 Vektoren/DNS

pET28a2:

bakterieller Expressionsvektor mit Gen für die Penicillinresistenz. Enthält N- und C- Termini des verkürzten HBc-Ag (AS 1 –149). Insetiert sind zwei Glycin -reiche Linker als auch die GFP –Sequenz. Wurde dankenswerterweise von zur Verfügung gestellt vom Labor Michael Nassal (verwendet im Referenzpaper Kratz P.A. et al.).

pB'His-NP:

bakterieller Expressionsvektor mit Gen für die Ampicillinresistenz.

N-terminaler His-Tag (6xHis) mit anschließender ‚multiple cloning site‘ (MCS) und dreifachem Stopp -Codon in allen möglichen ORFs. ~4kb (kloniert von Mudrak + Ogris)

pB'His HBcAg N-term:

basierend auf pB'His-NP wurde der N-Terminus des HBc-Ag inklusive einem Gly-reichen Linker (G₄SG₄T) und einem kurzen Adapter über NcoI – KpnI/SphI eingefügt. ~4,2kb (kloniert von Stefan Schüchner)

Vektor war nur ein Zwischenschritt der Klonierung des Vektors pB'His HBC-Ag-linker
detaillierte Klonierungsstrategie, siehe Kap. 4.1.12

pB'His HBCAg-linker:

Vektor beinhaltet einen His-Tag (6xHis), HBC-N-Terminus, zwei Linker (getrennt durch kurze MCS) und C-Term des HBCAg. Abgeschlossen durch 3-fach Stopp; ~4,5kb (kloniert von Stefan Schüchner)

detaillierte Klonierungsstrategie, siehe Kap. 4.1.12

pB'His HBC-Ag-WT:

basierend auf pB'His HBCAg linker. WT- Ig- fold von LaminA wurde integriert. ~4,8kb (kloniert von Veronika Huber)

detaillierte Klonierungsstrategie, siehe Kap. 4.1.12

pB'His HBC-Ag-R453W:

siehe pB'His HBC-Ag-WT; nur mit Punktmutation R453W (kloniert von Veronika Huber)

detaillierte Klonierungsstrategie, siehe Kap. 4.1.12

pB'His HBC-Ag-R482W:

siehe pB'His HBC-Ag-WT; nur mit Punktmutation R482W (kloniert von Veronika Huber)

detaillierte Klonierungsstrategie, siehe Kap. 4.1.12

pB'His-NP e-dest:

basierend auf pB'His-NP wurde die EcoRI-Stelle vor dem His-Tag zerstört. (kloniert von Veronika Huber)

pFOA-DnaJ intermediate:

basiert auf dem Hefe-Expressionsvektor pYES; der Uracil -Marker wurde durch einen Tryptophan -Marker und eine Ampicillin- Resistenz ersetzt. MCS steht unter der Kontrolle eines Galaktose -Promoters.

Inseriert wurde die DnaJ-Domäne von SV40 (mittels PCR isoliert) (kloniert von Hua Wang)

pB'His-DnaJ:

basiert auf pB'His-NP e-dest. DnaJ-Domäne wurde eingefügt (kloniert von Veronika Huber)
~4,3kb

detaillierte Klonierungsstrategie, siehe Kap. 4.1.13

pB'His-DnaJLap2 α -WT:

basiert auf pB'His-DnaJ; die 11 C-terminalen AS der humanen Lap2 α -Sequenz wurden in frame über ein Oligonukleotid an die DnaJ-Domäne angeschlossen. (kloniert von Veronika Huber) ~4,3kb

detaillierte Klonierungsstrategie, siehe Kap. 4.1.12

pB'His-DnaJLap2 α -DCM (R690C):

ident mit pB'His-DnaJLap2 α -WT bis auf die Punktmutation R690C (kodiert durch TGT).

detaillierte Klonierungsstrategie, siehe Kap. 4.1.12

pVH1 (YFP-Lap2 α R690C):

eukaryotischer Expressionsvektor, basierend auf pTD80 (Kan/Neo-Resistenz und unter CMV-Promoter die humane Lap2 α -Sequenz mit modifiziertem C-Terminus). Über eine Tripelligation wurde die vollständige humane Lap2 α -Sequenz mit der Punktmutation R690C rekonstruiert. N-terminal ist diese Sequenz mit YFP getaggt (kloniert von Veronika Huber); Detail siehe Klonierungsstrategie. ~6,7kb

4.1.3 DNS -Minipräparation (mit RNS)

1-2ml einer Übernachtskultur von XL-1 blue wird für 5min bei 5000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 100 μ l Puffer 1 auf Eis resuspendiert. Danach werden 200 μ l Puffer 2 zugegeben und das Reaktionsgefäß sofort stark geschüttelt um eine optimale und gleichwertige Zellyse zu garantieren. Die Lösung wird für 5min auf RT inkubiert. Anschließend werden 150 μ l Puffer 3 zugegeben und wird wieder stark geschüttelt. Durch den Puffer 3 sollte der Proteinanteil des Lysats ausflocken. Um diesen Anteil zu fällen wird nun für 10min bei 14000rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein neues Eppendorf überführt. Durch Zugabe von 300 μ l Isopropanol gefolgt von starkem Schütteln werden DNS und RNS gefällt. Um ein DNS/RNS -Pellet zu erhalten wird für 15min bei 14000rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird nun mit 70%igem EtOH gewaschen und nach der Trocknung in einem angemessenen Volumen H₂O gelöst (standardmäßig 40 μ l). Sollte die RNS nicht benötigt werden kann die DNS-Lösung noch zusätzlich für ½ h bei 37°C mit 0,5-1 μ l RNase inkubiert werden. Die gewonnene DNS wird dann bei -20°C gelagert.

4.1.4 DNS -Minipräparation durch den Qiagen Kit (ohne RNS)

Die DNS -Präparation wurde der beiliegenden Anleitung entsprechend ausgeführt.

4.1.5 DNS -Midipräparation durch Qiagen Kit

Die DNS -Präparation wurde der beiliegenden Anleitung entsprechend ausgeführt.

4.1.6 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

20pmol Oligonukleotid (bereits doppelsträngig)

4 μ l ATP (10mM)

3 μ l T4 PNK Puffer

2 μ l T4 Polynukleotidkinase

Das vollständige Gemisch wird für 90min bei 37°C inkubiert.

4.1.7 PCR /Sequenzierungsreaktion

Im Allgemeinen werden 500ng DNS als template für eine Standard -PCR eingesetzt.

Außerdem sind noch folgende Bestandteile notwendig:

Puffer der eingesetzten Polymerase (meist Pfu wegen der Fähigkeit des 'Kontroll-Lesens') 10x Konzentrat wird auf 1x verdünnt
1µl dNTPs (10mM)
2µl Primermix (besteht aus Vorwärts- und Rückwärtsprimer gelöst in Wasser)
ddH₂O

=> all diese Bestandteile werden zum Mastermix vereint und mit der Ziel -DNS in PCR-Röhrchens aliquotiert.

Die PCR wird mittels 'hot-start' eingeleitet. Das PCR-Programm orientiert sich an der eingesetzten Polymerase (arbeitet optimal bei 72°C) den Primern und der Länge des erwarteten Amplikons. Die Denaturierungstemperatur von 96°C zwischen den Zyklen ist konstant. Meist werden zwischen 30 und 35 Zyklen gefahren, was bereits eine hohe Ausbeute an Amplikon erwarten lässt.

Für eine einfache Sequenzierungsreaktion kann das Protokoll auf die folgenden Punkte reduziert werden:

4µl Primer (1pmol/µl)

2µl big dye 3.0 (fertige und aliquotierte Mischung aus Polymerase und dNTPs)

3µl 5x Sequenzierungspuffer

500ng Template -DNS

Alle Ingredienzien werden in einem PCR-Röhrchen vereint. Das Sequenzierungsprogramm sieht einen Denaturierungszeitraum von 30sec vor, gefolgt von 10sec bei 50°C für die Anlagerung der Primer. Die Elongation erfolgt über eine Periode von 4min bei 60°C. 30 Zyklen werden unter diesen Konditionen ausgeführt. Das PCR-Röhrchen ist anschließend 'ready-to-go' für die Sequenzierungsreaktion.

4.1.8 Restriktionsreaktion (Verdau von DNS mittels Restriktionsenzymen)

Für einen Kontrollverdau werden standardmäßig 500-1000ng an DNS eingesetzt und mittels 1-5 Einheiten des gewünschten Enzyms verdaut.

Das Endvolumen einer solchen Reaktion ist meist 20µl und diese setzen sich zusammen aus: Ziel -DNS, Restriktionsenzym, zugehöriger Puffer und Wasser. Der Standardverdau wird für 2-3 h bei 37°C inkubiert (Temperatur hängt vom Enzym ab).

Werden die generierten DNS -Fragmente weiterführend über ein Agarosegel eluiert, muss die Menge an eingesetzter DNS und Enzym entsprechend erhöht werden.

Im Falle eines Doppelverdaus muss der optimale Puffer, unter dem beide Enzyme arbeiten können, ermittelt werden. Ist das in der benötigten Enzymkombination nicht möglich, muss erst mit einem Enzym verdaut werden, gefolgt von einer Aufreinigung der verdauten DNS per Agarosegel oder Präzipitierung mittels PCI.

Die Analyse des Restriktionsverdaus erfolgt über ein Agarosegel der passenden Konzentration (1-3%).

4.1.9 Eluierung von DNS -Fragmenten aus einem Agarosegel

Um ein DNS -Fragment bekannter Größe aus einem Agarosegel isolieren zu können, muss es erst mittels Elektrophorese deutlich von anderen Fragmenten separiert werden. Danach kann das Fragment über das eingelagerte EtBr und Anregung des Farbstoffes mittels UV sichtbar gemacht werden. Unter schwacher UV-Bestrahlung wird das gewünschte Gelstück mit der gesuchten Bande mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die eigentliche Trennung von DNS und Agarosegel erfolgt durch den extraction Kit von Qiagen (der Anleitung folgend).

4.1.10 Reinigung und Präzipitierung von DNS via PCI (Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol)

Die zu fällende DNS wird auf ein Endvolumen von 100µl mit H₂O aufgefüllt. Dazu werden nun 50µl des PCI-Reagenz zugegeben und gevortext (~30sec). Die entstandene Emulsion wird anschließend für 1min mit 10000rpm zentrifugiert. Die wässrige und DNS enthaltende Phase wird abgehoben und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Der Prozess wird mit 50µl frischem PCI wiederholt. Zuletzt werden die ~100µl der wässrigen Phase mit 1/10 3M NaAc (pH 5,2) und dem 2 ½ fachen Volumen an eiskaltem 96%igem EtOH versetzt, was zur Fällung der gereinigten DNS führt. Die Mischung wird gut geschüttelt und für einige Stunden (oder über Nacht) bei -20°C inkubiert. Anschließend wird die DNS durch Zentrifugation bei 14000rpm für 15min pelletiert. Das gewonnene DNS -Pellet wird mit kaltem 70%igem EtOH gewaschen und letztendlich in einem passenden Volumen H₂O gelöst.

4.1.11 Ligation von DNS -Fragmenten

Die verdauten und gereinigten DNS -Fragmente (Zielvektor und Insert) werden in einem angemessenen molekularen Verhältnis vereint (das Verhältnis ist meist 3:1 zugunsten des Inserts). Zu den erforderlichen Mengen an DNS (abhängig von Konzentration und Größe der Fragmente) werden nun LigasePuffer (der verwendeten Ligase), Ligase, ATP und Wasser beigefügt. Ein Endvolumen von 20µl sollte erreicht werden (mit H₂O wird entsprechend aufgefüllt). Die Ligation wird über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

Vor der Transformation in XL-1 blue ist eine Inaktivierung der Ligase mittels Erhitzen optional.

4.1.12 Klonierungsstrategie des HBc-Ig-fold Konstruktes

Der Ausgangsvektor war der Vektor pET28a-c149GFP, dieser bestand aus dem N- und C-Terminus des HBc-Antigens gekoppelt an Linker (G₄SG₄T). Außerdem beinhaltet dieser Vektor GFP, das innerhalb der Linker zwischen N- und C- Terminus kloniert wurde.

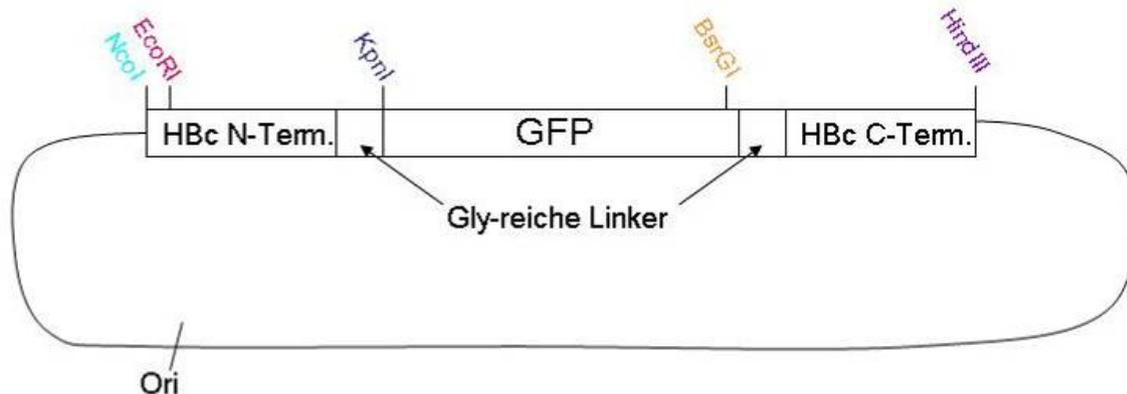


Abbildung 15: pET28a-c149GFP

Für die spätere Aufreinigung des Proteins liegt in diesem Vektor kein geeigneter Tag vor, weswegen die, für die N- und C-Termini kodierende, DNA in den Vektor pB'His-NP umkloniert wurde. Dazu wurde zunächst die N-Terminus kodierende DNA samt Linker durch Verdau mit NcoI und KpnI aus dem Vektor pET28a-c149GFP entfernt. Der Zielvektor pB'His-NP wurde mit NcoI und SphI verdaut (entfernt die MCS vollständig). Durch eine 3-Faktorligation, mit dem folgend dargestellten Adapter, entstand das Konstrukt: pB'His-HBc-Ag N-Term.

fwd. Adapter:



rew. Adapter:



pB'-His HBc-Ag N-Term.

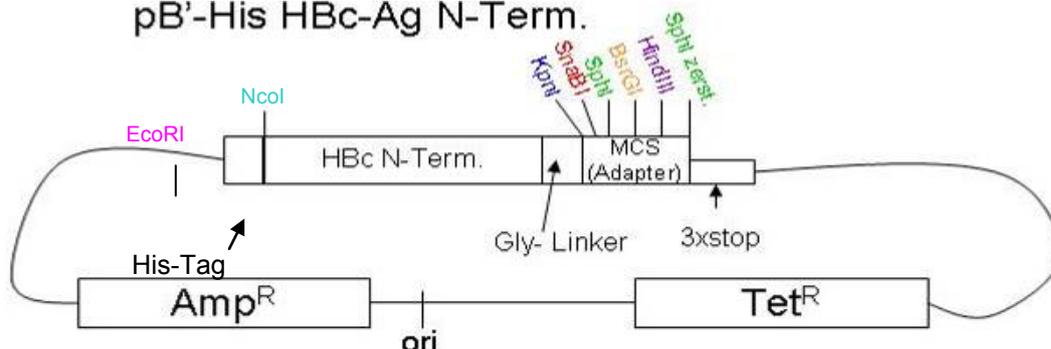


Abbildung 16: pB'-His HBc-Ag N-Term.

Die Vektoren sind bis auf eine einzige Base ident, mit einer Größe von ~4,8kb. Das finale Konstrukt setzte sich wie folgt zusammen:

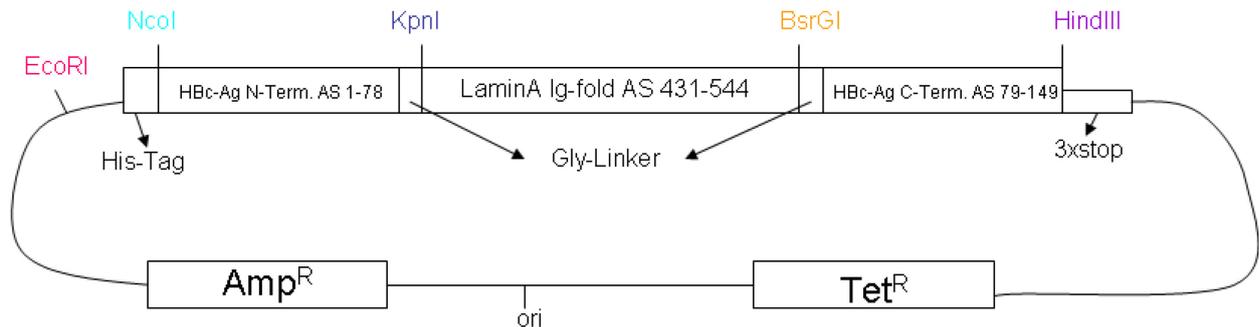


Abbildung 18: Ausschnitt der Zusammensetzung aus dem fertig klonierten Vektor pB'His HBC-Ag Ig-fold, drei Varianten des Ig-folds führen zu den Vektoren pB'His HBC-Ag –WT, –R453W und –R482W.

4.1.13 Klonierungsstrategie für das Fusionsprotein DnaJ-Lap2 α

Die DnaJ –Domäne wurde durch einen NcoI – XhoI Verdau aus dem Vektor pFOA-DnaJ intermediate isoliert. Der Zielvektor pB'His NP e-dest. wurde durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen NcoI und Sall vorbereitet. Dieser Verdau entfernte ~20bp und somit den Großteil der verfügbaren MCS und der Vektor wurde anschließend mit CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) behandelt. Die Sall- und XhoI-Enden waren für die Ligation kompatibel, die Erkennungssequenzen wurden dabei beide zerstört.

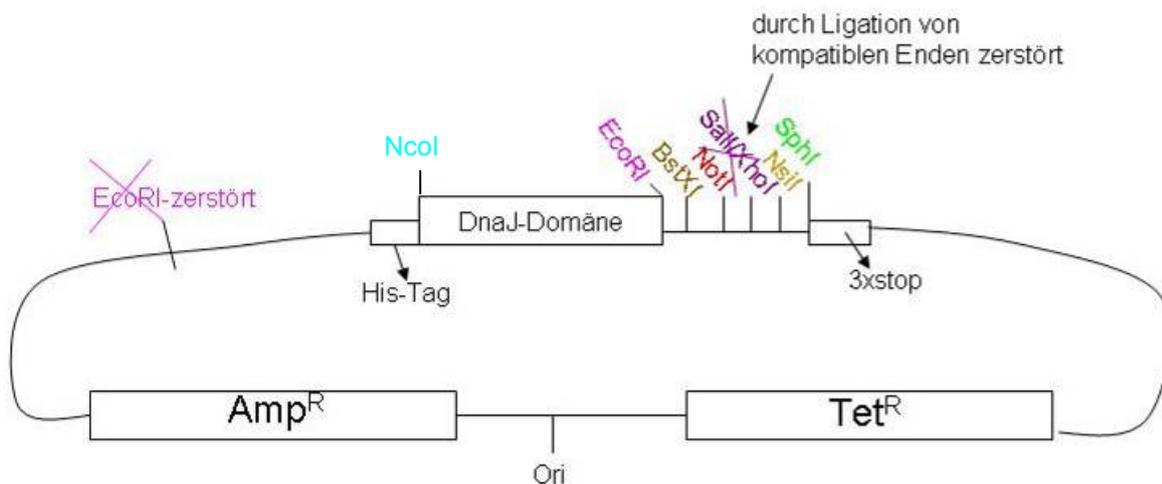


Abbildung 19: pB'His NP-DnaJ

Die Lap2 α -Peptidsequenz wurde durch ein Oligonukleotid in den Vektor an die DnaJ – Domäne ligiert. Durch zwei Oligonukleotide wurde dies für die zwei Formen des C-terminalen Lap2 α -Peptides (WT und R690C) parallel durchgeführt, so entstanden die Konstrukte pB'His DnaJ- Lap2 α WT und pB'His DnaJ- Lap2 α R690C.

Die genauen Peptidsequenzen waren:

WT-Sequenz:

EcoRI
 -Überhang cys⁶⁵³ lys⁶⁵⁴ val⁶⁵⁵ ile⁶⁵⁷ lys⁶⁵⁸ lys⁶⁵⁹ arg⁶⁹⁰ gly⁶⁹¹ asn⁶⁹² lys⁶⁹³ his⁶⁹⁴ stopp XhoI SphI
 -Überhang
 5'-AA TTC TGC AAA GTA ATT AAA AAG CGT GGA AAT AAA CAC TAG CTC GAG CAT G-3'
 3'-G ACG TTT CAT TAA TTT TTC GCA CCT TTA TTT GTG ATC GAG CTC-5'

DCM-Sequenz:

EcoRI
 -Überhang cys⁶⁵³ lys⁶⁵⁴ val⁶⁵⁵ ile⁶⁵⁷ lys⁶⁵⁸ lys⁶⁵⁹ cys⁶⁹⁰ gly⁶⁹¹ asn⁶⁹² lys⁶⁹³ his⁶⁹⁴ stopp XhoI SphI
 -Überhang
 5'-AA TTC TGC AAA GTA ATT AAA AAG TGT GGA AAT AAA CAC TAG CTC GAG CAT G-3'
 3'-G ACG TTT CAT TAA TTT TTC ACA CCT TTA TTT GTG ATC GAG CTC-5'

Diese Oligonukleotide unterschieden sich einzig in der Kodierung für die AS R/C690.

Abgeschlossen werden sie von EcoRI- und SphI- Enden kompatiblen Sequenzen. Außerdem sind sie so gestaltet, dass nach der Peptidsequenz ein Stopp- Codon gesetzt wurde und dahinter eine neue XhoI- Erkennungsstelle.

Die Ligation dieser Oligonukleotide erfolgte in den EcoRI – SphI vorverdauten Zielvektor pB'His -DnaJ.

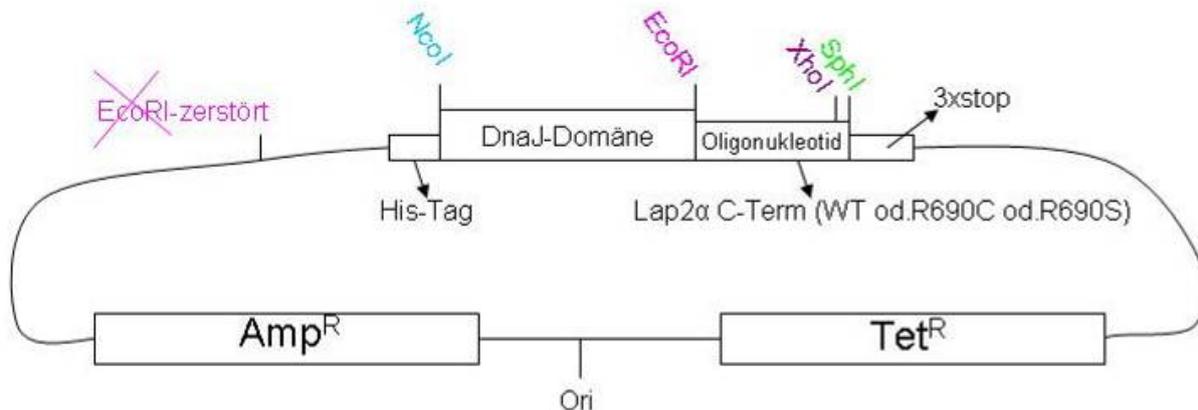


Abbildung 20: pB'His-DnaJLap2α-WT/DCM/R690S

Es bestand die Vermutung, dass das Cystein in der mutierten Form des Peptides durch die Bildungen von Disulfidbrücken für die Immunreaktion erschwert zugänglich ist, denn im Immunisierungsversuch mit dem generierten Fusionsprotein (DnaJ-Lap2α R690C und KLH-Lap2α R690C) konnten keine spezifischen Ak generiert werden. Eine Internetsuche ergab, dass die AS Serin oft natürlich die AS Cystein ersetzt, ohne gravierende Auswirkungen auf die Funktion eines Proteins zu haben. Außerdem sind sich die Seitengruppen dieser zwei AS sehr ähnlich, beide sind polare AS und unterscheiden sich nur in einem Atom: Cystein hat die Seitengruppe –SH und Serin –OH. Außerdem wurde vermutet, dass ein Ak der die Serinseitengruppe erkannte vielleicht kreuzreaktiv mit der Cysteinseitengruppe sein könnte. Darauf basierend wurde (nachdem Seren mit dem Immunisierungsansatz aus DnaJ-Lap2α –

WT und –R690C getestet waren) auch ein Konstrukt pB'His –DnaJ Lap2 α R690S kloniert (siehe Abb. 18).

Ausgehend von dem gleichen Zielvektor wurde nur ein neues Oligonukleotid bestellt und in den vorverdauten Vektor inseriert (alle Rahmenbedingungen gleich).

R690S-Sequenz:

```

EcoRI                               SphI
-Überhang cys653 lys654 val655 ile657 lys658 lys659 ser690 gly691 asn692 lys693 his694 stopp XhoI -Überhang
5'-AA TTC TGC AAA GTA ATT AAA AAG TCT GGA AAT AAA CAC TAG CTC GAG CAT G-3'
3'-G ACG TTT CAT TAA TTT TTC AGA CCT TTA TTT GTG ATC GAG CTC-5'
  
```

Das klonierte Endkonstrukt ergab daher das folgende Fusionsprotein:

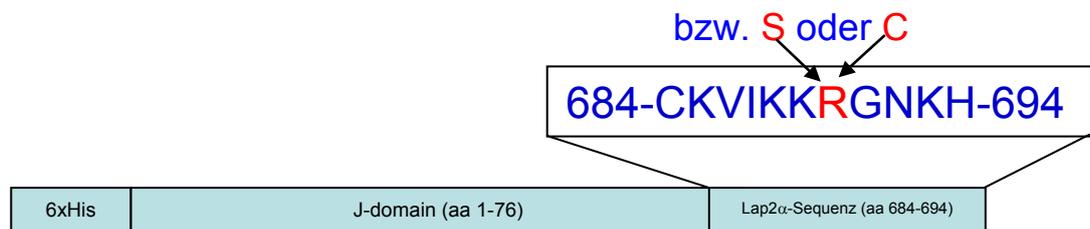


Abbildung 21: Darstellung des Fusionsproteins aus der J-Domäne der T-Antigene von SV40 mit einer Peptidsequenz von Lap2 α ; die J-Domäne besteht aus den ersten 76 AS der T-Antigene, die Lap2 α – Sequenz beinhaltet die letzten 11 AS des humanen C-Terminus von Lap2 α .

4.1.14 Klonierung von pVH1 (YFP-Lap2 α –R690C exprimierender Vektor für eukaryotische Zelllinien)

Von Beginn an bestand ein Problem darin, dass keine Zelllinie verfügbar war, die eine N-terminal getaggte Form von Lap2 α -R690C exprimierte. Die vorhandenen Konstrukte waren C-terminal getaggt, oder in den letzten AS der nativen Primärsequenz modifiziert. Daher war ein wichtiges Ziel, eine Zelllinie zu etablieren, die eine N-terminal getaggte Form von Lap2 α -R690C exprimierte.

Verfügbar waren die folgenden Konstrukte:

- pTD80: Expressionsvektor YFP-Lap2 α –WT (mit modifiziertem C-Terminus; bei einer vorangegangenen Klonierung; wurde das stopp-Codon in ein kodierendes Codon umgewandelt und 2 weitere kodierende Codons angeschlossen, kloniert von Thomas Dechat)

pTD80:

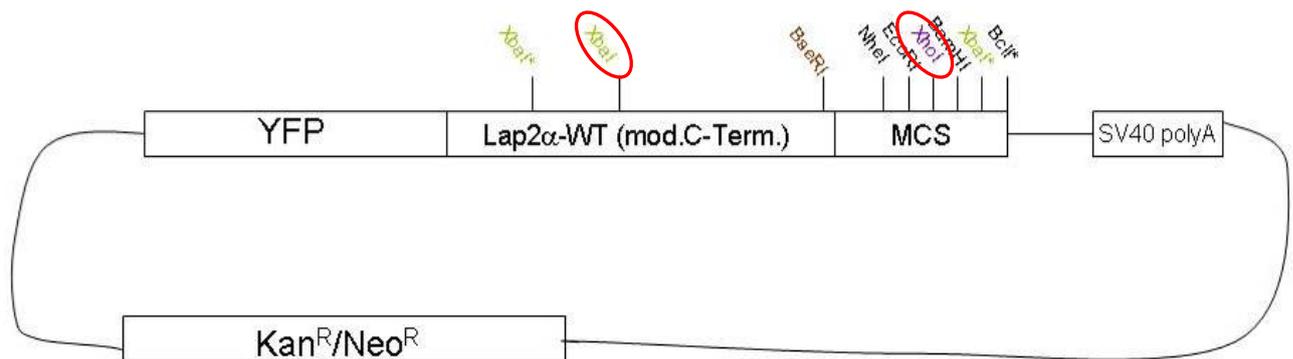


Abbildung 22: pTD80 N-Terminal getaggtes Lap2 α WT mit angeschlossener MCS (mit Stern markierte Restriktionsstellen sind durch Methylierung im bakteriellen Expressionsstamm blockiert)

- gAG 50: Gateway-Vektor mit der Originalsequenz von Lap2 α –R690C

gAG50:

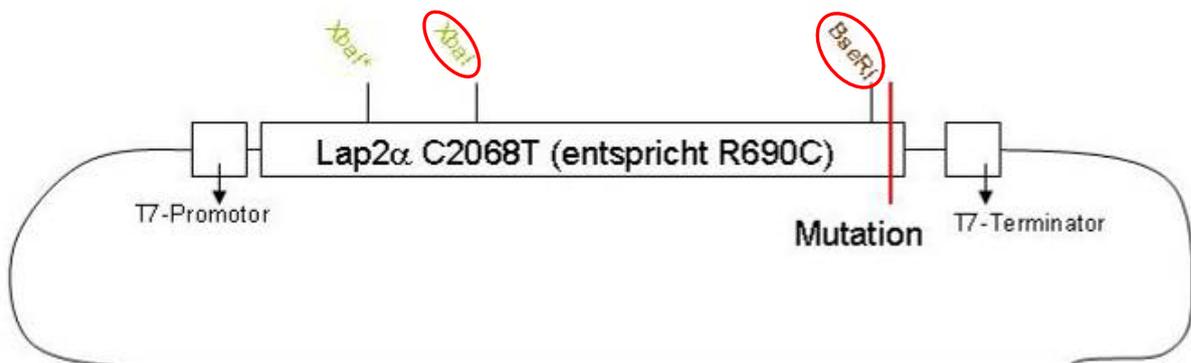


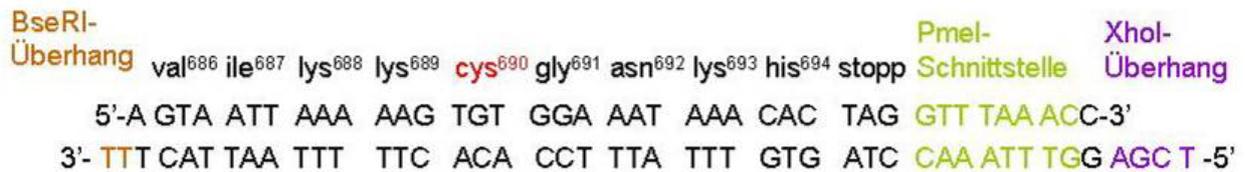
Abbildung 23: gAG50; humane Lap2 α Sequenz mit Mutation R690C die zur DCM-Mutation des kodierten Proteins führt. Relevante Restriktionsstellen eingetragen (Markierte ist durch Methylierung im bakteriellen Expressionsstamm blockiert)

pTD80 wurde mit XbaI (drei XbaI –Erkennungssequenzen, wovon aber zwei durch Methylierung blockiert sind) und XhoI doppelverdaut. Dies führte einen Schnitt innerhalb der Lap2 α –Sequenz und einen innerhalb der MCS hinter der Lap2 α -Sequenz herbei, entfernte also einen Teil der Lap2 α -Sequenz inklusive des modifizierten C-Terminus. Dieser Teil wurde aus dem Vektor gAG50 ersetzt (Lap2 α - Sequenz von XbaI – BseRI). Der äußerste C-Terminus inklusive der Punktmutation R690C sowie dem Stopp -Codon wurde durch ein Oligonukleotid ersetzt. Über eine Tripelligation wurden alle Bestandteile vereint.

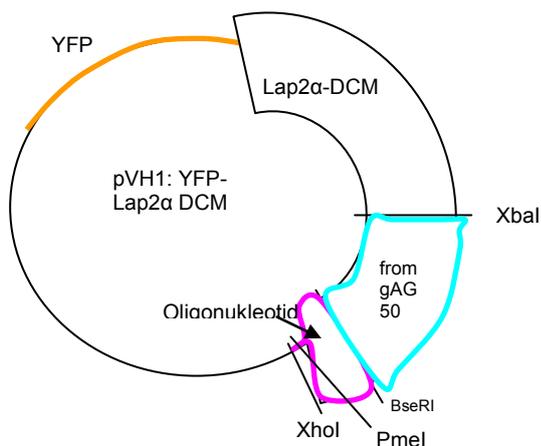
Nötige Schritte:

- Verdau von pTD80 mit XbaI und XhoI (entfernt ~680bp)
- Verdau von gAG50 mit XbaI und BseRI (schneidet in der Sequenz bei AS 684), gewünschtes Fragment mit ~630bp
- Oligonukleotide, die für die letzten 10AS von Lap2 α inklusive der Punktmutation R690C und dem Stopp –Codon kodieren, flankiert durch Sequenzen die mit den

BseRI und XhoI generierten Enden kompatibel sind (enthalten zusätzlich zur Kontrolle eine PmeI-Schnittstelle):



- Tripelligation ergibt:



Die DNS wurde in XL-1 blue transformiert und auf LB –Kan -Platten ausgestrichen. Der nächste Schritt war die Transfektion der DNS in eine HeLa –Zelllinie.

4.2 Arbeit mit Bakterien

4.2.1 Bakterienstämme

XL-1 blue:

Der XL-1 blue Stamm (weiterführend mit XL-1 bezeichnet) wird routinemäßig zur Vervielfältigung von Plasmiden genutzt. Der Stamm ist tetracyclinresistent und ihm fehlt die Endonuklease (*endA*) wodurch die Qualität der gewonnenen DNS steigt. Darüber hinaus fehlt ihm auch die Recombinase (*recA*) was eine höhere Stabilität von Inserts bedingt. Die *hsdR* (kodiert für eine Untereinheit einer Endonuklease) Mutation schützt die klonierte DNS zusätzlich vor Angriffen durch das *EcoK* Endonuclease-System.

XL1-Blue Genotype: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqΔMAUS 15 Tn10* (Tetr)].

Rosetta- (Rosetta(DE3)):

Ausgehend von dem Stamm BL21 wurden Rosetta Stämme für die eukaryotische Proteinexpression optimiert. Dafür exprimieren sie tRNAs für die folgenden Codons (normalerweise in E.coli selten): AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA. Diese tRNAs

werden auf einem Plasmid kodiert, das auch für die Chloramphenicolresistenz verantwortlich ist.

Außerdem kodieren sie für die T7-RNA Polymerase des Phagen Lambda DE3. Daher sind sie zur Induktion mittels IPTG fähig (Voraussetzung ist natürlich ein entsprechender T7-Promotor vor der zu exprimierenden DNS).

Um die Proteinstabilität zu erhöhen wurde zusätzlich die Protease *ompT* deletiert.

Genotype: $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pRARE (Cam^R)

Rosetta+ (Rosetta(DE3)pLysS):

Basiert auf dem Rosetta(DE3) Stamm. Das Plasmid (pLysS) mit den zusätzlichen tRNAs kodiert auch für das T7 Lysozym (inhibiert die T7 RNA-Polymerase). Dadurch wird die Expression der T7 RNA Polymerase vor der Induktion gehemmt, was zu einer erhöhten Ausbeute an rekombinantem Protein führen sollte.

Genotype: $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pLysSRARE (Cam^R)

Tuner (Tuner(DE3)pLysS):

Dieser Stamm basiert ebenfalls auf dem BL21-Stamm. Hier erfolgt die IPTG-Induktion besonders gleichmäßig innerhalb der Kultur. Das wird durch die Mutation der lacY-Permease gewährleistet. Durch eine gut gewählte IPTG-Konzentration könnte so die Expression von sehr gering bis zum Maximum optimal gesteuert werden.

Eine niedrige Expression kann bei schwierig zu exprimierenden Proteinen die Löslichkeit als auch die Aktivität verbessern. Die Protease *ompT* wurde auch in diesem Stamm deletiert.

DE3 bedeutet, ... siehe Rosetta-

pLysS steht für ... siehe Rosetta+

Genotype: $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1$ (DE3) pLysS (Cam^R)

Origami (Origami(DE3)pLysS)

Dieser Stamm ist ein K-12 Derivat und trägt Mutationen in der Thioredoxin (*trxB*)- und Glutathion (*gor*)- Reduktase. Dadurch wird die Häufigkeit der Disulfidbrückenbildung im Cytoplasma erhöht. Durch Studien wurde gezeigt, dass dadurch die Proteinaktivität von rekombinant exprimierten Proteinen um rund das 10-fache höher war, als in Vergleichsstämmen mit gleichem Expressionslevel.

DE3 bedeutet, ... siehe Rosetta-

pLysS steht für ... siehe Rosetta+

Genotype: $D(ara-leu)7697 DlacX74 DphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac^+ lacI^q pro]$ (DE3) *gor522::Tn10 trxB* pLysS (Cam^R, Str^R, Tet^R)

4.2.2 Lösungen, Puffer und Medien

Ampizillin (100x) Gerbu #1046:

Eine Lösung von 10mg/ml in H₂O wird hergestellt und durch Filtration sterilisiert. Aliquote von 5ml werden bei -20°C gelagert.

Kanamycin (200x) Sigma #K-4000:

Eine Lösung von 10mg/ml in H₂O wird hergestellt und durch Filtration sterilisiert. Aliquote von 5ml werden bei -20°C gelagert.

Tetracyclin (100x) Sigma#T-3383:

Eine Lösung von 5mg/ml in 96%igem EtOH wird hergestellt und bei -20°C in Aliquoten gelagert.

LB-Medium (flüssig oder zum Gießen von LB-Agar Platten):

Zur Herstellung von 1L Flüssigmedium benötigt man:

10g Tryptone

5g Hefeextrakt

5g NaCl

Alle Komponenten werden in 1000ml Wasser gelöst, die Lösung wird sofort autoklaviert.

Anschließend kann sie bei RT gelagert werden.

Um Agarplatten zur Bakterienaufzucht herzustellen werden einem halben Liter

Flüssigmedium (noch nicht autoklaviert) 25g Agar zugefügt. Die Mischung wird ebenfalls autoklaviert und anschließend auf 50°C im Wasserbad abgekühlt. Nun können eventuelle Antibiotika zur Selektion beigefügt werden. Die Platten müssen sofort gegossen werden und sollten über Nacht langsam an einem sterilen Ort abkühlen. Aufbewahrt werden sie anschließend bei 4°C.

IPTG:

9,53g IPTG werden in 200ml H₂O gelöst und die entstandene Lösung in Aliquoten bei -20°C gelagert. Die Endkonzentration beträgt hierbei 200mM.

TSS:

Für 250ml TSS benötigt man:

2,5g Tryptone

1,25g Hefeextrakt

1,25g NaCl

25g PEG 3350

12,5g MgCl₂

Sämtliche Bestandteile werden in einem Endvolumen von 237,5ml mit Wasser gelöst und nach dem Autoklavieren mit 12,5ml DMSO aufgefüllt (erst bei RT). Die entstandene Lösung kann bei 4°C gelagert werden.

100x PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride, 0,2M) Roche #10 837 091 001:

0,697g PMSF werden in 20ml Isopropanol gelöst und in Aliquoten von 2ml im Dunkel aber bei RT gelagert.

200x Aprotinin stock Sigma #A-6279:

Die fertige Lösung wird aliquotiert und in Portionen von 1ml bei 4°C im Dunkeln gelagert.

25x Complete Roche #11 836 145 001:

Eine Tablette Complete (Mischung von versch. Proteaseinhibitoren) wird in 2ml 25mM Tris gelöst und ist so für einige Tage bei 4°C in der Dunkelheit lagerbar.

1% Thimerosal:

0,5g Thimerosal werden in 50ml H₂O gelöst und bei 4°C in Dunkelheit gelagert.

4.2.3 Herstellung von 'heat shock' kompetenten XL-1 blue

Ein Aliquot von heat-shock kompetenten Bakterien wird über Nacht in 5ml LB-Tet angezüchtet. Am folgenden Tag wird die Kultur auf 200ml mit reinem LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,3 - 0,4 bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden für 10min mit 1000g bei 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wird in 20ml eiskaltem TSS resuspendiert. Die Zellsuspension wird nun während der Aliquotierung (250µl) in einem Bad aus Eis und EtOH schockgefroren. Die Bakterien werden sofort bei -80°C gelagert.

4.2.4 Transformation von 'heat-shock' kompetenten Bakterien

Ein Aliquot kompetenter Bakterien wird erst auf Eis aufgetaut und danach mit der zu transformierenden DNS vereint und für eine halbe Stunde weiter auf Eis inkubiert. Der heat-shock wird am Heizblock für 90 sec bei 42°C ausgeführt. Danach werden die Bakterien sofort wieder für 5min auf Eis inkubiert. 1ml LB-Medium wird zu den Bakterien pipettiert und die Kultur für ca. eine Stunde bei 37°C inkubiert (unter Rotation). Zuletzt werden die Bakterien durch vorsichtiges Zentrifugieren pelletiert und in einem geringeren Volumen LB wieder aufgenommen. Die entstandene Zellsuspension wird auf LB –Agar - Platten (mit passendem Selektionsantibiotikum) ausgestrichen.

4.2.5 Bakterielleres Wachstum und die Expression transformierter DNS

Verschiedene Bakterienstämme wurden für verschiedene Applikationen optimiert und für die Proteinexpression standen die folgenden Stämme zur Verfügung:

- Rosetta(DE3) (Rosetta-)
- Rosetta(DE3)pLysS (Rosetta+)
- Tuner(DE3)pLysS (Tuner)
- Origami(DE3)pLysS (Origami)

Welcher Stamm für welches Protein optimal ist, kann im Vorhinein nicht festgelegt werden. Daher sollte die Expression zu Beginn in allen verfügbaren Stämmen verglichen werden. Der im spezifischen Versuch benutzte Stamm, wird im Ergebnisteil angeführt.

Allgemeine Vorgehensweise:

Ein geringes Volumen von LB-Medium mit Selektionsantibiotikum wird mit einem Einzelklon der zu züchtenden Bakterienkultur über Nacht angeimpft. Am nächsten Tag wird diese Kultur

auf das gewünschte Endvolumen mit LB -Medium (mit AB) verdünnt. Die OD₅₅₀ wird nach der Verdünnung gemessen und bei einem Wachstum bei 37°C verfolgt, bis ein Wert von ca. 0,9-1,0 erreicht ist (die Induktion ist generell im Bereich von 0,6-1,2 möglich). Sämtliche Wachstumsschritte können für sehr schwer lösliche Proteine auch bei RT ausgeführt werden, was in den meisten Fällen die Löslichkeit positiv beeinflusst.

Anschließend wird ein Teil der Kultur mit IPTG induziert (Standardwert 1mM IPTG). Der Rest der Kultur wird als uninduzierte Kontrolle zurückgehalten. Die Inkubationszeit für die induzierte Expression beträgt unter Standardbedingungen 3 ½ h bei 37°C. Nach der Induktion werden induziertes und nicht – induziertes Aliquot für 5min bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert. Alle folgenden Schritte werden auf Eis ausgeführt. Basierend auf dem Produkt aus OD₅₅₀ und Kulturvolumen (Totale-OD₅₅₀), wird die Kultur mit dem niedrigsten Produktwert in einem Volumen von 1ml 25mM Tris-APC pro 50ml Ausgangskultur resuspendiert. Das Resuspensionsvolumen der anderen Aliquote errechnet sich wie folgt:

Für jedes Aliquot wird die Totale-OD₅₅₀ ermittelt. Die geringste Totale-OD₅₅₀ dient als Divisor für die Übrigen. Die Division ergibt direkt das Resuspensionsvolumen. Die Zellsuspensionen werden anschließend soniziert. Wie bereits beim Bakterienwachstum erwähnt, kann durch unterschiedliche Bedingungen (Temperatur, Dauer, IPTG-Konzentration) die Löslichkeit des exprimierten Proteins verändert werden. Auch die Sonikationsfaktoren können Einfluß auf die Löslichkeit haben. Diese Faktoren sind Dauer, Intensität sowie Kontinuität der Sonikation. Standardbedingungen bei einem unbekanntem Protein sind, in einem resuspendierten Volumen von 1-2ml, kontinuierliche Beschallung für 3x20sec bei einer Intensität von 75% (30sec Pause zwischen den Schritten).

Aufgrund der Erhitzung wird die Sonikation auf Eis ausgeführt. Anschließend wird ein Aliquot von 100µl entnommen und für 10min bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert. Die dabei getrennten Fraktionen (lösliche und unlösliche) werden separat mit Lade-Puffer versetzt (zu 100µl Überstand 50µl 3xLade-Puffer, Pellet in 150µl 1x Lade-Puffer resuspendieren). Expressionslevel und Induktionseffizienz können auf einem SDS-Polyacrylamid (PAA) -Gel passender Konzentration analysiert werden. Die Analyse kann mittels Coomassiefärbung (unspezifisch) oder Westerndetektion (spezifisch) erfolgen.

4.3 Arbeit mit Proteinen

4.3.1 Lösungen und Puffer

40% Polyacrylamid (PAA):

Fertige Lösung von AccuGel 29:1

1M Tris pH 8,8:

242,3g Tris werden in annähernd 2000ml H₂O gelöst und mittels HCl wird ein pH von 8,8 eingestellt. Anschließend wird auf das Endvolumen von 2L aufgefüllt und die Lösung wird

autoklaviert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

1M Tris pH 6,8:

60,5g Tris werden in annähernd 500ml H₂O gelöst und mittels HCl wird ein pH von 6,8 eingestellt. Anschließend wird auf das Endvolumen von 500ml aufgefüllt und die Lösung wird autoklaviert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

20% SDS:

40g Soduimdodecylsulfate wird in 200ml H₂O unter Rühren und schwachem Erhitzen gelöst. Die Lösung kann bei RT gelagert werden.

10% APS:

1g Ammoniumperoxodisulfat wird in 10ml H₂O gelöst und die Lösung bei 4°C gelagert.

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine):

Fertige Lösung von Fluka; #87689

10x Laufpuffer für PAA-Gele:

Für ein Volumen von 5L des 10-fachen Stocks werden 151,25g Tris, 748g Glycin und 50g SDS in Wasser gelöst. Für den Arbeitspuffer wird die Lösung 1:10 mit Wasser verdünnt.

Transferpuffer mit MeOH (10l):

besteht aus 25mM Tris, 190mM Glycine und 20v/v Methanol; Für ein Endvolumen von 10l sind nötig: 30,24g Tris, 144,2g Glycine. Diese werden in 8l Wasser gelöst und mit 2l MeOH auf 10l aufgefüllt. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

10xPBS:

Für 5l werden in Wasser gelöst:

400g NaCl

10gKCl

10g KH₂PO₄

72g Na₂HPO₄·2H₂O

danach wird die Lösung autoklaviert; für den ArbeitsPuffer wird das Konzentrat 1:10 mit Wasser verdünnt

10x Ponceau S:

2g des Ponceau S Pigments werden mit 30g Trichlor -Essigsäure und 30g Schwefelsäure in einem Endvolumen von 100ml gelöst. Die fertige Lösung kann bei RT gelagert werden. Für die Arbeitslösung wird dieses Konzentrat 1:10 mit Wasser verdünnt.

20% Natrium-Azid:

2g Natrium Azid werden in 10ml H₂O gelöst und bei 4°C in der Dunkelheit gelagert.

1% Thimerosal:

0,5g Thimerosal werden in 50ml Wasser gelöst und bei 4°C in der Dunkelheit gelagert.

PBS-Tween (PBS-T):

Zu 2l fertige 1xPBS wird 1ml Tween-20 zugefügt und für einige Minuten gerührt.

3% NFDM (non fatty dry milk powder):

Für 1l der Lösung werden 30g Milchpulver in 1l PBS-T unter rühren gelöst und mit 100µl 20% Natrium-Azid versetzt. Die fertige Lösung wird bei 4°C gelagert.

0,5% NFDM:

5g Milchpulver werde in 1l PBS-T unter rühren gelöst und mit 1ml 1% Thimerosal versetzt. Die fertige Lösung wird bei 4°C gelagert.

ECL Detektionsreagenz (Standard):

Stock 1: 100mM Tris 8,8

Stock 2: 80mM p-Cumarsäure in DMSO (Aliquote von 500µl, gelagert bei -20°C)

Stock 3: 200mM Luminol in DMSO (Aliquote von 1ml, gelagert bei -20°)

Stock 4: 3% H₂O₂ in H₂O gelagert bei 4°C in der Dunkelheit

Für die Arbeitslösung werden ein Aliquot p-Cumarsäure und ein Aliquot Luminol in 20ml 100mM Tris pH8,8 gelöst. Mit Wasser wird auf ein Endvolumen von 200ml aufgefüllt. Für die enzymatische Reaktion werden pro benötigtem ml ECL-Reagenz 3µl H₂O₂ beigefügt.

3x (Protein-) Ladepuffer:

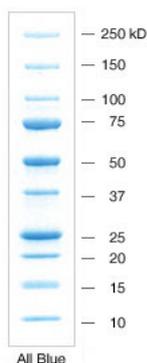
3,1g DTT

20ml H₂O

20ml 20%SDS

20ml Glycerol

alle Bestandteile werden vereint und mit ein wenig Bromphenolblau versetzt; mit wenigen Tropfen 1M Tris pH6,6 wird eine optimale Färbung eingestellt. Aliquote von 2ml werden bei -20°C gelagert.

gefärbter Proteinmarker:

Der 'precision all blue prestained marker' von Biorad wurde in allen Fällen eingesetzt und für ein großes PAA-Gel wurden 10µl geladen.

Abbildung 24⁶: Darstellung des Laufmusters des eingesetzten Proteinmarkers von Biorad

Coomassie-Färbelösung (Konzentrat):

2,5g Coomassie (Farbpigment) werden in 500ml MeOH durch Rühren über Nacht gelöst und mit 500ml H₂O verdünnt. Die Lösung kann bei RT gelagert werden. Für die Arbeitslösung werden 30% des Konzentrats mit 30% EtOH, 10% Essigsäure und 30% Wasser verdünnt.

⁶ www.bio-rad.com

Entfärbelösung nach Coomassiefärbung:

30% EtOH, 10% Essigsäure und 60% Wasser

Coomassie Lösung ohne MeOH für Proteineluierung:

90% H₂O, 10% Essigsäure und 0,1% Coomassie-Pigment, Lagerung ebenfalls bei RT

10x Eluierungspuffer für Elektroelution:

150mM (NH₄)₂CO₃ mit 1%SDS in Wasser lösen; kann unter Luftausschluß bei RT gelagert werden. Für die einfache Arbeitslösung wird das Konzentrat 1:10 mit Wasser verdünnt.

Puffer für His- Ni-Affinitätsreinigung unter denaturierenden Konditionen:*Puffer A (pH8,0):*

6M Guanidine hydrochloride

0,1M NatriumPhosphat

0,01M Tris

Die Bestandteile werden in etwas weniger als 1000ml H₂O gelöst und dann durch Zugabe von Natriumphosphat ein pH von 8,0 eingestellt. Danach wird mit Wasser auf das Endvolumen von 1000ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

Puffer B (pH8,0):

8M Harnstoff

0,1M Natriumphosphat

0,01M Tris

Die Bestandteile werden in etwas weniger als 500ml H₂O gelöst und dann durch Zugabe von Natriumphosphat ein pH von 8,0 eingestellt, danach wird mit Wasser auf das Endvolumen von 500ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

Puffer C (pH6,3):

8M Harnstoff

0,1M Natriumphosphat

0,01M Tris

Die Bestandteile werden in etwas weniger als 500ml H₂O gelöst und dann durch Zugabe von Natriumphosphat ein pH von 6,3 eingestellt, danach wird mit Wasser auf das Endvolumen von 500ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

Puffer zur Proteinreinigung unter nativen Konditionen (Waschpuffer):

50mM Natriumphosphat pH 6,0

300mM NaCl

10% Glycerol

Die Bestandteile werden in 500ml H₂O gelöst.

4.3.2 SDS-PAGE (denaturierende Polyacrylamid-Elektrophorese)

Komponenten eines SDS-PAA-Gels:

Trenngel (7,5%):	40% PAA	7,5ml
	1M Tris pH8,8	15ml
	20% SDS	200µl
	H ₂ O	17,05ml
	10% APS	200µl
	TEMED	40µl
Sammelgel:	40% PAA	1,25ml
	1M Tris pH 6,8	1,25ml
	20% SDS	50µl
	H ₂ O	7,4ml
	10% APS	50µl
	TEMED	10µl

Zunächst werden alle Komponenten des Trenngels vereint (ohne TEMED und APS) und gut gemischt. Für einige Minuten wird die Lösung entgast, die fehlenden Bestandteile werden hinzugefügt und die Flüssigkeit in die vorbereitete Gelapparatur gegossen. Zum Glätten der Oberfläche wird diese mit ca. 1ml Isopropanol überschichtet. Während der radikalischen Polymerisationsreaktion werden die Komponenten des Sammelgels vereint (wieder abgesehen von APS und TEMED) und ebenfalls entgast. Wenn das Trenngel auspolymerisiert ist wird das Isopropanol abgeleert und die Oberfläche mit Wasser gewaschen. APS und TEMED werden dem entgasten Sammelgel beigefügt und die Mischung wird auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Solange das Sammelgel noch flüssig ist wird ein passender Kamm in die Flüssigkeit geschoben.

Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert ist wird der Kamm entfernt und die entstandenen Geltaschen werden mit Wasser ausgespült. Nach Entfernung der Dichtung und der Klammern der Gussapparatur werden die Glasplatten mit dem Gel in die Laufapparatur eingespannt. Die Apparatur wird mit Laufpuffer gefüllt und danach können die Proben und der Proteinmarker in die Slots geladen werden.

Ein solches SDS-PAA-Gel wird über Nacht bei 6-9mA laufen gelassen.

4.3.3 Coomassie-Färbung

Aufgetrennte Proteine in einem SDS-Polyacrylamid -Gel (PAA -Gel) können mittels Coomassie unspezifisch gefärbt werden. Die Methode resultiert in der Färbung aller aufgetragenen Proteine. Jedoch kann durch die Intensität der Färbung eine quantitative Aussage über die Menge an geladenem Protein getroffen werden.

Für diese Standard-Färbemethode wird das SDS-PAA-Gel direkt in die Färbelösung für mindestens eine Stunde eingelegt. Das Färbemittel wird wieder abgeleert. Durch die Inkubation mit der Entfärbelösung für mehrere Stunden wird ein optimaler Kontrast zwischen

Hintergrund und gefärbten Proteinen erarbeitet. Um den Kontrast noch zu optimieren kann das Gel optional über Nacht in Wasser eingelegt werden.

4.3.4 Western- oder Immuno-Blot und Detektion

Dabei werden die elektrophoretisch getrennten Proteine vom SDS-PAA-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (NC) übertragen. Dieser Vorgang geschieht durch Elektrophorese in einer wässrigen Umgebung. Ein Blotting-Sandwich (bestehend aus dem Trenngel, der NC sowie Schwämmen und 3MM Papier als Druckkörper) wird für 3-4h in Transferpuffer einer Stromstärke von ~500mA ausgesetzt.

Nach dem Transfer kann die NC zur Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern (Ak) inkubiert werden. Hierzu werden die Ak in 0,5%iger NFDM verdünnt. Zuvor werden freie und unspezifische Bindungsstellen der NC durch die Proteine einer 3%igen NFDM blockiert (Inkubation für eine Stunde).

Die Inkubation mit dem primären Ak wird über Nacht unter Schwenken bei 4°C ausgeführt. Die NC wird danach mit PBS-T dreimal für je ~10min gewaschen. Auch der sekundäre Ak wird in 0,5%iger NFDM verdünnt (1:5000) und auf der NC für 1h bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation wird die NC wiederholt gewaschen und ist bereits fertig für die Detektion des Komplexes aus Antigen, primären und sekundären Ak mittels ECL-Reagenz.

Dies ist möglich, da an den sekundären Ak das Enzym HRP (Horse Radish Peroxidase/ Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist, das wiederum das ECL-Reagenz zu optisch aktiven Hydroperoxiden umsetzen kann.

Das von der Reaktion entwickelte Licht wird auf Röntgenfilmen dokumentiert. Der Röntgenfilm für wird verschiedene Inkubationsdauern auf dem Blot belassen.

4.3.5 Proteinaffinitätsreinigung von His getaggtten

Fusionsproteinen mittels Ni-NTA (Nitrilotriacetic acid) -beads

Die Äquilibrierung der errechneten Menge an Ni –NTA -beads erfolgt in 25mM Tris+AP. Die eigentliche Inkubation der Beads im bakteriellen Überstand erfolgt für einige Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C.

Dazu werden die gelösten His-getaggtten Proteine direkt mit den äquilibrierten Ni –NTA beads inkubiert. Ni -NTA beads haben die Kapazität ein 6xHis-getaggttes Protein aus einer Suspension zu immobilisieren (Interaktion zwischen Ni²⁺ und dem His-tag).

Die geeignete Menge an Ni-NTA beads ist von Fall zu Fall verschieden und muss ausgetestet werden.

Anschließend werden die Beads von der Suspension durch Zentrifugation bei 1000rpm, RT und 1min getrennt. Der Überstand nach der Inkubation wird als Kontrolle zurückgehalten. Die isolierten Beads werden 4mal mit 25mM Tris+AP und 5mal mit Waschpuffer +AP

gewaschen. Um die immobilisierten Proteine wieder von den Beads zu lösen gibt es nun folgende Varianten:

- Inkubation mit Ladepuffer bei 95°C für ~10 min => zerstört die native Struktur
- Eluierung mittels Verdrängung durch Imidazol (250 oder 500mM) => erhält die native Struktur

Generell wird jede Eluierungsmethode 3mal wiederholt. Die Effizienz der Methode wird durch ein SDS-PAA -Gel analysiert.

4.3.6 Aufreinigung von unlöslichen Proteinen aus der unlöslichen bakteriellen Fraktion

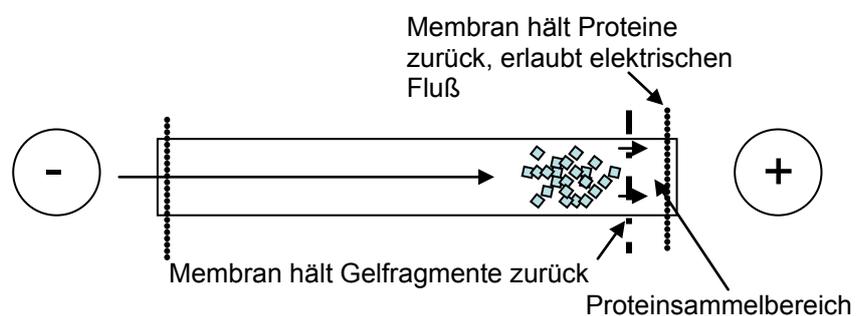
Die Proteinaufreinigung kann auch aus der unlöslichen Proteinfraction stattfinden, allerdings nur unter denaturierenden Bedingungen. Denn der Aufschluss dieser Fraktion erfolgt mit Puffern mit hochkonzentriertem Guanin -Hydrochlorid und Harnstoff, was zu einem Aufbruch sämtlicher nicht -kovalenter Bindungen im Protein führt.

Dazu wird das Pellet in Puffer A resuspendiert (1ml pro 100ml Ursprungskultur) und in Aliquote von maximal 2ml separiert. Diese werden nun für eine halbe Stunde bei RT inkubiert währenddessen aber alle 5min für ca. 30 sec gevortext. Anschließend wird die Suspension für 10min bei RT mit 14000rpm zentrifugiert und die Prozedur wiederholt. Sämtliche gewonnene Überstände können vereint und direkt mit einer adäquaten Menge an Ni -NTA -Beads für einige Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Nach der Inkubation werden die Beads 4x mit Puffer A, 3x mit Puffer B und abschließend noch 2x mit Puffer C gewaschen. Die Beads werden danach direkt mit Ladepuffer 3x für 10min auf 95°C erhitzt.

4.3.7 Proteinkonzentration durch die Eluierungsfalle



A)



B)

Abbildung 25: A) Eluierungsfalle mit benötigten Membranen B) schematische Darstellung einer einzelnen Eluierungskammer

Abb. A) von www.whatman.com

Die SDS-PAA -Gele, auf denen die bereits vorgereinigten Proteine über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt wurden, werden für einige min mit der Coomassie -Lösung

ohne MeOH gefärbt und durch Wasser wieder entfärbt. Mithilfe und unter Vergleich mit einem vorab gefertigten SDS-PAA -Gel wird die Bande des Proteins von Interesse identifiziert und ausgeschnitten. Die entstandenen Gelfragmente (ca. 1mm²) werden nun vor die erste Membran innerhalb der Apparatur platziert. Die vollständige Apparatur wurde zuerst mit Eluierungspuffer gefüllt. Für eine Dauer von 3h wird nun eine Spannung von 200V angelegt, dies bewirkt die elektrophoretische Wanderung der Proteine aus den Gelfragmenten in die Pufferlösung des mit Membran abgeteilten Sammelbereichs. Nach Ablauf der 3 Stunden wird der Sammelbereich so schnell wie möglich entleert (nachströmender Puffer führt zu einer Verdünnung des Proteins) und der Eluierungspuffer wird nahezu vollständig gewechselt. Diese Prozedur wird wiederholt. Die gewonnenen Proteineluate können vereint werden.

Durch den Vergleich bestimmter Volumina der Proteinlösung unbekannter Konzentration mit bekannten Mengen an einem Vergleichsprotein (zB.: BSA) kann die erreichte Konzentration des Proteins von Interesse ermittelt werden. Dies geschieht durch Auftragen bestimmter Volumina des Eluates und des Vergleichsproteins auf ein SDS-PAA –Gel, gefolgt von einer Coomassiefärbung.

4.4 Arbeit mit Zellkulturen

4.4.1 Puffer, Lösungen und Medien

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium):

DMEM ist das Basismedium für alle verwendeten Zelllinien.

Für anspruchsvollere Zellen (wie zB.: X63 und Fusionsklone) wurde nicht selbst hergestelltes DMEM verwendet sondern fertig abgefülltes DMEM von Sigma (#D5671). Dieses beinhaltet 4500mg/L Glukose.

Generell besteht DMEM aus anorganischen Salzen, Vitaminen und Aminosäuren die für den Stoffwechsel der Zellen essentiell sind. Darüber hinaus beinhaltet es auch D-Glucose und Natriumpyruvat, beides zentrale Bausteine des Anabolismus, und Phenolrot als pH-Indikator. Entsprechend der Zelllinie werden dem Medium noch FCS (fetal calf serum) und Selektionsmittel zugesetzt.

Zur Aufzucht weniger anspruchsvoller Zelllinien wurde DMEM selbst hergestellt:

Eine Packung DMEM-Pulver (Gibco #31600-083) werden in 5l H₂O unter Rühren gelöst. Dazu werden 30g NaHCO₃ zugegeben und ebenfalls durch Rühren gelöst. Die Lösung wird auf ein Endvolumen von 10l aufgefüllt und durch Filtration sterilisiert. Aliquote werden bei 4°C gelagert. Nach 2 Wochen muss nachträglich Glutamin zugesetzt werden.

FCS (fetal calf serum) Gibco #4023696J:

Aliquote von 50ml werden bei -20°C gelagert.

AB:

0,6g Penicillin-G und 1,0g Streptomycin –Sulfat werden in 10ml PBS gelöst und aliquotiert bei -20°C gelagert

Trypsin:

250mg Trypsin werden in 25ml 10xPBS gelöst und mit Wasser auf ein Endvolumen von 250ml gebracht. Die Lösung wird für ca. 2h gerührt und Aliquote bei 4°C gelagert.

Hygromycin (Calbiochem #400 051):

wird in einer Endkonzentration von 50mg/ml in Wasser gelöst und durch Filtration sterilisiert. Aliquote von 5ml werden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

G418; Geneticin (Gibco #11811-098):

1,2g G418 werden in 100ml DMEM+AB gelöst und durch Filtration sterilisiert. Aliquote von 5ml werden bei -20°C gelagert.

2,5M CaCl₂:

36,76g CaCl₂ werden in einem Volumen von 100ml mit Wasser gelöst und nach dem Autoklavieren bei 4°C gelagert.

2xHBS:

50mM HEPES

280mM NaCl

1,5mM Na₂HOP₄·2H₂O

Die fertige Lösung wird in Wasser hergestellt und mit NaOH wird ein pH von 7,12 eingestellt.

Nach dem Autoklavieren wird die Lösung bei 4°C in der Dunkelheit gelagert.

DMSO (Dimethylsulfoxide, Applichem #A3672.0250)IP-Waschpuffer:

10% Glycerol

20mM Tris pH 8,0

135mM NaCl

Adäquate Mengen werden in Wasser gelöst und durch Filtration sterilisiert. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

IP-Lysepuffer:

Zu 450ml IP-Waschpuffer werden 50ml 10% (w/v) NP-40 zu gesetzt. Die Lösung kann direkt bei 4°C gelagert werden.

Penicillin/ Streptomycin (P/S):

AB für die Anwendung bei Medien zur Fusion; Sigma #P4333

L-Glutamin:

Sigma #G2150

Pyruvat:

Sigma #S8636

Condimed:

Besteht aus RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) mit:

15% FCS

1mM Oxalacetat

1mM Natriumpyruvat

0,2µg/ml Insulin

1ng/ml hIL-6

10ng/ml PMA

zugesezt ist außerdem Phenolrot als pH-Indikator. Condimed ist ein 20-faches Konzentrat und ist essentiell für Medien zur Aufzucht von Fusionsklonen. Wichtigster Baustein dabei ist das Interleukin-6 als wichtiger Botenstoff, der das Wachstum der Hybridomzellen stimuliert. Fertig von Roche (#11 088 947 001).

X63 -Medium:

435ml DMEM (Sigma)

50ml FCS

5ml P/S

5ml L-Glutamin

5ml Natriumpyruvat

Lagerung wie für alle Medien bei 4°C.

HAT -Medium (Hypoxanthine Aminopterin Thymidine Medium):

Dieses Medium dient als Selektionsmedium für fusionierte Hybridomzellen aus Milz- und *HGPRT*-/- Myelomzelle (X63).

Aminopterin blockiert die normale Nukleotidsynthese, damit die Zellen auf den Syntheseweg ausweichen müssen, der auf Hypoxanthin und Thymidin sowie dem Enzym *HGPRT* (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) beruht. Zur Nutzung dieser alternativen Nukleotidsynthese sind dann nur Hybridome und unfusionierte Milzzellen im Stande. Gegen unfusionierte Milzzellen wird nicht aktiv selektioniert, da sie nach wenigen Tagen von selbst sterben. Nach spätestens 5 Tagen sollten nur noch Hybridomzellen proliferieren.

Basierend auf 400ml DMEM werden noch die folgenden Zusätze beigefügt:

FCS (HyClone) 50ml

Condimed 25ml

P/S 5ml

L-Glutamin 5ml

Pyruvat 5ml

HAT-Zusatz 10ml

HAT-Zusatz:

GIBCO #21060; Ref.# 21060-017

0,5% Gelatine in PBS zum Blocken bei der IF:

Die nötige Menge an Gelatine wird in 1xPBS unter Erhitzen und Rühren gelöst. Über Nacht wird die Lösung abgekühlt und kann dann bei RT gelagert werden.

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole):

Fluoreszenzfarbstoff der dem Einbettungsmedium nach einer IF beigefügt werden kann und durch Einlagerung in die DNA zu einer unspezifischen Kernfärbung führt.

Vectashield:

Einbettungsmedium nach durchgeführter IF. Vector Labs, Inc. #H-1000; wird in Dunkelheit bei 4°C gelagert.

Protein -A beads:

1,5g Protein A Sepharose CL-4B (GE Healthcare #17-0780-01) werden in Coating-Puffer für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wird für 1min bei 1000rpm zentrifugiert und die Sepharose 5-6x mit Wasser (zuletzt Wasser mit Azid) gewaschen. 1:1 Suspensionen werden in 2ml Aliquoten bei 4°C gelagert.

TBS:

8g NaCl
0,2g KCl
3g Tris

Alle Komponenten werden in Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von 7,4 mit HCl eingestellt. Die Lösung wird auf ein Endvolumen von 1000ml aufgefüllt und autoklaviert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Gefriermedium:

Lösung von 10% DMSO in FCS, gelagert wird es bei -20°C.

3% BSA in PBS:

30g BSA werden in 1000ml 1xPBS durch Rühren über 1-2h gelöst. Nach dem Sterilisieren durch Filtration kann die Lösung bei 4°C gelagert werden.

H₂O₂:

Aldrich; #S00551-080; Cat# 21,676-3

TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine):

Sigma; #T2885-100MG

20% Natrium-Azid:

2g Natrium-Azid werden in 10ml H₂O gelöst und bei 4°C in der Dunkelheit

4.4.2 Benutzte Zelllinien

X63 Ag-8.653 (weiterführend X63):

Die Maus-Myelomzelllinie X63AG8.653 entstammt einem nicht sezernierenden Klon von P3X63AG8 (ein Balb/c -Myelom) und wird als Fusionspartner zur Produktion von Hybridoma genutzt (freie Übersetzung).

Diese Standardzelllinie wird mit X63-medium aufgezogen und nach der Fusion mit Milzzellen einer Maus durch HAT-Medium selektioniert. Die Kultivierungsbedingungen sind 37°C bei 5%CO₂. *HGPRT*^{-/-} Myelomzelllinie.

HeLa (Zervixkarzinomzellen von Henrietta Lacks):

humane Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie, infiziert mit HPV (Typ 16)

4.4.3 Mausgenotypen

RBF (cBy.RBF-Rb(8.12)5Bnr/J):

Dieser Mausstamm ist homozygoter Träger der natürlich vorkommenden Robertsonian-Translokation. Durch diese Translokation kommt es zur Entstehung des Robertsonian Chromosoms Rb(8,12)5Bnr.

Eigentlich wurde dieser Stamm für eine Fusion mit einer *APRT* (Adenin-Phosphoribosyl-Transferase) negativen Myelomzelllinie (Fox-NY) gezüchtet. Bei der angeführten Translokation kommt es zur Vereinigung des Ig-Lokus (Ig-heavy chain Locus der Maus von Chromosom 12) und des Selektions-Lokus (*APRT*-Gen von Chromosom 8) auf einem Chromosom. Durch das passende Selektionsmedium und nur unter der Voraussetzung einer erfolgreich fusionierten Zelle, würde durch eine erfolgreiche Selektion auch die Produktion von Ak garantiert werden.

Aufgrund früherer Ergebnisse mit der Fox-NY Zelllinie wurde diese jedoch nicht für weitere Fusionen herangezogen. Die bereits immunisierten Mäuse konnten jedoch sehr wohl auch für Fusionen mit der X63-Zelllinie genutzt werden.

Balb/c:

Wurde zur Fusion mit einer *HGPRT*^{-/-} Myelomzelllinie gezüchtet (X63). Im Allgemeinen ist dieser kleinwüchsige Albino-Stamm in vielen Bereichen der medizinischen Forschung verbreitet und zeichnet sich durch günstige Zuchteigenschaften aus.

4.4.4 Wachstum und Teilung von Zelllinien

Die meisten Standardzelllinien werden mit DMEM mit 10% FCS und AB kultiviert.

Entsprechend einem eventuell transformierten Expressionsvektor werden dem Medium zusätzlich Selektionsmittel beigefügt (die Selektion sollte aber frühestens einen Tag nach dem Auftauen der Zelllinie gestartet werden).

Zum Spalten adherenter Zelllinien (HeLa; NIH, U2OS, ...) wird das Medium vollständig abgehoben und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Platte wird mit so wenig Trypsin wie möglich für zirka 5 min bei 37°C inkubiert (bei 10cm Platte ca. 500µl). Die Ablösung der Zellen wird im Lichtmikroskop kontrolliert. Die abgelösten Zellen werden in einem geringen Volumen frischen Mediums wieder aufgenommen. Während der Inkubationszeit werden neue Platten mit Medium vorbereitet. Die Endvolumina an Medium pro Platte sollten ungefähr sein:

10ml auf einer 10cm Platte

20ml auf einer 15cm Platte

Die gelösten und resuspendierten Zellen werden nun im gewünschten Verhältnis in den Medien der neuen Platten verteilt.

Auf X63-basierende Zelllinien müssen zum Spalten oder Umbetten nicht mit Trypsin behandelt werden. Bei dieser Zelllinie genügt es die Zellen direkt im Medium (wird zuvor teilweise abgesaugt) zu resuspendieren. Auch der Waschschrift mit PBS wird übersprungen. Um Zellzahlen zu bestimmen werden 5µl einer Zellsuspension in die Zählkammer überführt. Entsprechend der Zelldichte werden mind. 4 große oder kleine Quadrate der Kammer ausgezählt und der Durchschnitt ermittelt. Zur Ermittlung der Zellzahl pro ml wird der Durchschnittswert eines großen Quadrates (entspricht 16 kleinen) mit 10^4 multipliziert.

4.4.5 Einfrieren von Zellkulturen

Zum Einfrieren muss das Nährmedium vollständig entfernt werden. Danach kann die Kultur direkt in einem passenden Volumen Gefriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt werden. Dieses Röhrchen wird dann für ca. für 15min auf Eis gelagert bevor es auf -80°C gebracht werden kann. Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgt unter flüssigem Stickstoff, wohin das Röhrchen nach einigen Tagen transferiert wird.

4.4.6 Auftauen von Zellkulturen

Eine Zellkultur wird vom flüssigen Stickstoff oder -80°C direkt in ein Wasserbad mit 37°C überführt. Kurz davor wird eine 10cm Platte mit passendem Medium im Inkubator unter den benötigten Konditionen vorinkubiert. Ein weiteres Aliquot Medium wird in einem Röhrchen bereitgestellt. Ist die Zellsuspension fertig aufgetaut, wird diese so schnell wie möglich in das Röhrchen mit dem vorbereiteten Medium transferiert und für 5min bei 1500rpm abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird nun endgültig im vorinkubierten Medium der 10cm Platte resuspendiert. Eine eventuell nötige Selektion sollte frühestens am folgenden Tag gestartet werden.

4.4.7 Lyse von Zellkulturen

Das Nährmedium wurde von den Zellen entfernt und einmal mit kaltem PBS sowie kaltem IP-Waschpuffer gewaschen. Rückstände des Puffers werden möglichst vollständig abgesaugt. Anschließend werden die Zellen mit angemessenen Mengen (500-1000µl) an IP-Lysispuffer +APC für ~20 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird das fertige Lysat direkt von der Platte abgehoben und die Proteinkonzentration kann nach Bradford bestimmt werden (=> Standardmethode).

Die zweite Methode zu Herstellung von Zelllysaten ist das direkte Abschaben der Platte mit 1xLadepuffer. Diese Methode hat sich für die Analyse von Laminen am geeignetsten

herausgestellt. Dazu werden die Zellen einer dicht bewachsene 15cm Platte direkt mittels 2ml heißem 1x Ladepuffer abgeschabt. Zuvor wird von der Platte ebenfalls das Medium abgesaugt und einmal mit kaltem PBS gewaschen.

Von dem entstandenen Lysat (~2ml) sind 500µl genug um ein großes präparatives SDS-PAA-Gel zu laden.

Sämtliche Lysate werden bei -20°C gelagert. Vor dem Auftrag auf ein SDS-PAA-Gel werden die Lysate noch für 10min auf 95°C erhitzt.

4.4.8 Transfektion mit Ca-P

Für eine effiziente Transfektion werden $\sim 10^6$ Zellen auf einer 10cm Platte ausgesät. Am folgenden Tag wird die zu transfektierenden DNS (10-20µg) mit Wasser auf 450µl aufgefüllt und mit 50µl 2,5M CaCl_2 versetzt. In einem weiteren Reaktionsgefäß (mind. 2ml Fassungsvermögen) werden 500µl 2xHBS vorgelegt. Die vorbereitete DNS -Lösung wird unter Sprudeln zugetropft. Ziel ist es ein möglichst feines DNS -Präzipitat zu schaffen. Dieses wird nun für eine halbe Stunde bei RT inkubiert, bevor es direkt in das Medium der tags zuvor ausgesäten Zellen getropft wird. So werden die Zellen für mind. 10h (besser über Nacht) mit der Transfektionslösung inkubiert, bevor das Medium wieder gewechselt und eine Selektion für das transfektierte Plasmid gestartet wird.

Um Einzelklone zu isolieren, muss eine sehr hohe Spaltung vorgenommen werden ($\sim 1:200$). Nach wenigen Tagen werden die Klone unter dem Lichtmikroskop sichtbar. Um diese endgültig zu isolieren, wird das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und dieses so vollständig wie möglich abgesaugt. Auf die markierten Kolonien wird nun ein minimales Volumen an Trypsin aufgetragen. Nach kurzer Inkubationszeit werden die Kolonien einzeln in einem geringen Volumen an Selektionsmedium resuspendiert und so auf ein Well einer 24-well Platte überführt.

4.4.9 Immunfluoreszenz (IF)

Ein bis zwei Tage vor der eigentlichen IF müssen Zellen, der zu färbenden Zelllinie, auf Objektgläsern ausgesät werden. Haben die Zellen die gewünschte Dichte, werden diese mit PBS gewaschen und durch eine 10 -minütige Inkubation bei RT mit einer Lösung aus 4% Formaldehyd (oder Paraformaldehyd) in PBS auf den Objektgläsern fixiert. Anschließend werden die Objektträger mit einer frischen Lösung aus 50mM NH_4Cl gespült. Durch die folgende Inkubation der Zellen mit einer Lösung aus 0,5% Triton 100 in PBS werden die Zellmembranen permeabilisiert. Anschließend werden die Zellen mit einer Lösung aus 0,5% Gelatine in PBS für 15 min bei RT inkubiert (geblockt).

Für die Inkubation mit dem primären Ak wird dieser in der Blocklösung (0,5% Gelatine in PBS) verdünnt und für 45min bei RT auf den Zellen belassen. Anschließend wird überschüssiger Ak durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Auch der nun folgende

sekundäre Ak wird in der Blocklösung 1:500 verdünnt und für 45min bei RT und Dunkelheit auf den Zellen belassen. Wieder wird 3mal mit PBS gewaschen. Der sekundäre Ak kann mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sein.

Nach der Inkubation mit dem sekundären Ak ist das Präparat fertig zum Eindecken mit dem Einbettungsmedium Vectashield. Direkt zu diesem Medium kann optional auch DAPI zugesetzt werden, was eine unspezifische, blaue DNS-Färbung herbeiführt.

Bei der Benutzung von Vectashield ist es nötig das Präparat mit Nagellack auf dem Objektträger zu umranden um ein Austrocknen zu verhindern.

Nachdem die Präparate einmal über Nacht bei 4°C gelagert wurden, sind sie fertig für die Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

4.4.10 Immunopräzipitation (IP)

Relativ dichte Kulturen (ca. 80% konfluent) der zu lysierenden Zelllinie werden angezchtet und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Danach werden die Zellen in 2ml eiskaltem PBS durch Abschaben der Platte von dieser gelöst und in Suspension gebracht. Die PBS –Zell – Suspension wird für 10min bei 1000rpm und 4°C abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird nun in einem ‚angemessenen‘ Volumen IP-Lysepuffer mit den folgenden Zusätzen: APC, RNase, DNase, 0,5% SDS und 1mM DTT resuspendiert. Die entstandene Suspension wird für 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit IP -Lyse+APC auf eine Endkonzentration von 0,1% SDS verdünnt. Danach wird das Lysat weiter für 10min auf Eis inkubiert. Das Lysat wird nun für 10min bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstands wird nach Bradford bestimmt.

Pro durchzuführender IP werden nun ~1,5mg an Protein benötigt. Zum ermittelten Volumen an Proteinlysate wird der primäre Ak zugegeben (die Konzentration sollte dabei ungefähr 5mal höher sein als für den Einsatz bei der Immundetektion) und unter Rollen für 50min und 4°C mit dem Lysat inkubiert. Währenddessen werden pro IP 100µl einer 1:1 Suspension von ProteinA-Beads vorbereitet. Die Beads können direkt, ohne Äquilibrierung, mit dem Lysat für 30min bei 4°C, ebenfalls unter Rollen, inkubiert werden.

Abschließend werden die Beads durch Zentrifugation für 1 min bei 1000rpm vom Lysat getrennt. Die 50µl ProteinA -Beads werden nun einmal mit IP -Lysepuffer+APC und dreimal mit TBS gewaschen. Um die gebundenen Proteinkomplexe von den Beads zu trennen werden diese nun direkt mit 50µl Ladepuffer für 5min auf 95°C erhitzt.

4.4.11 Immunisierungen von Mäusen und Fusion von Splenozyten mit X63-Myelomzellen

Ziel einer Fusion von Maus-Milzzellen (Splenozyten) und der Maus –Myelom -Zelllinie X63 ist es, eine unsterbliche, polyploide Zelllinie zu generieren, die die Fähigkeit zur Ak – Sezernierung hat.

Zuvor ist allerdings die Immunisierung der Mäuse nötig (sämtliche Injektionen des Antigens erfolgen subkutan im Bauchbereich, Blut wird über die Schwanzvene entnommen):

Tag 1	präimmunes Blut wird entnommen und die Immunisierung startet mit 50µg Antigen mit Adjuvant
Tag 14	2te Immunisierung mit 50µg Antigen mit Adjuvant (so wie für alle folgenden)
Tag 28	erstes Blut wird genommen
Tag 42	wiederholte Immunisierung
wieder 14 Tage später, nächste Blutabnahme, 14 Tage später wieder Immunisierung, ...	dieses Schema der Immunisierung und Blutabnahme wird so lange wie nötig verfolgt bis eine stabile und möglichst hohe Immunreaktion nachweisbar ist (falls dies generell erreichbar ist)
4 Tage vor der Fusion	50µg Antigen werden ganz ohne Adjuvant in die Bauchhöhle injiziert

Tab. 1: Immunisierungsschema für Mäuse mit benötigten Mengen an Antigen und Zeitablauf.

Die Aufbereitung des Antigens zur Immunisierung ist eine Homogenisierung der wässrigen Proteinlösung mit dem öligen Adjuvant zu einer zähflüssigen Emulsion. Die daraus folgende langzeitige Stimulation (Antigen bildet ein subkutan Depot) des Immunsystems sollte die Immunantwort optimieren.

Nach der eigentlichen Fusion kommt es zur Entstehung polyploider Hybridomzellen.

Aufgrund dessen tendieren die Zellen dazu ihren Chromosomensatz bei jeder Teilung zu reduzieren, indem sie einzelne Chromosomen einfach ‚abstoßen‘. Auf diesem Phänomen beruht die Tatsache der Instabilität von Hybridomzellen, denn es ist möglich, dass die Zellen das Chromosom mit dem Ig-Locus verlieren und somit die Fähigkeit Ak zu produzieren. Der Klon existiert weiter, da er weiterhin gegen das Selektionsmittel resistent ist, da das entsprechende Markergen auf einem anderen Chromosom liegt. Leider gibt es bisher keine Möglichkeit direkt auf die Produktion von Ak zu selektieren.

Die durchgeführte Selektion erfolgt durch das HAT-Medium (siehe HAT –Selektionsmedium).

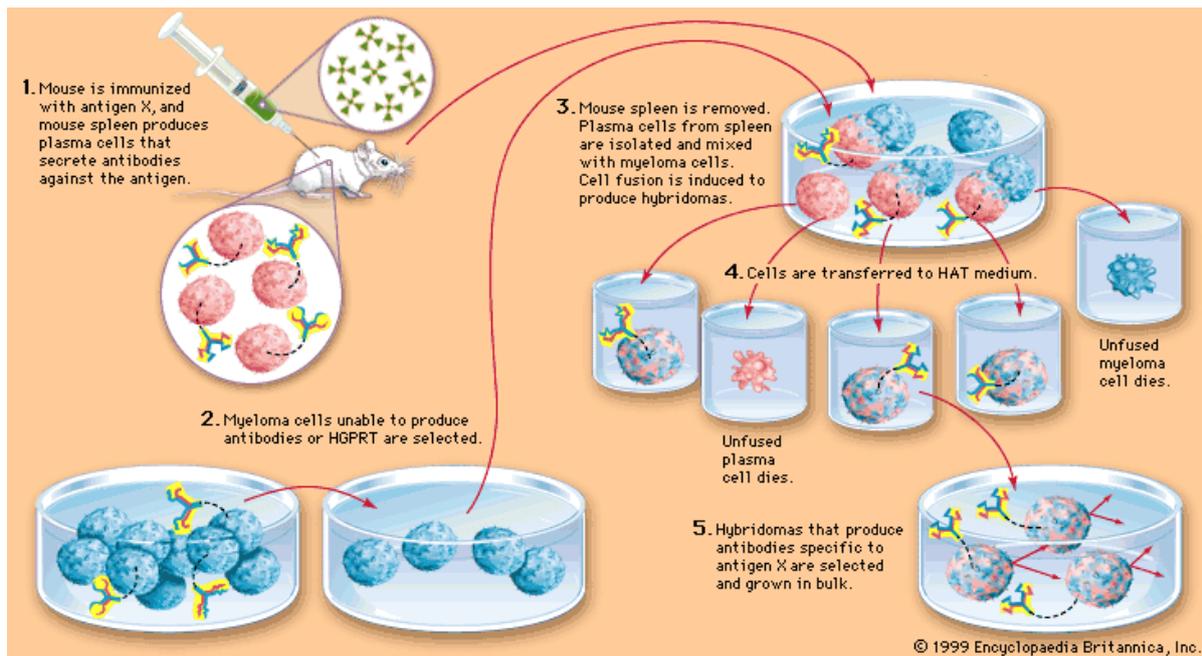


Abbildung 26: schematische Darstellung der Fusion zwischen Mausmilzzellen und Myelomzellen mit einem Defizit in der HGPRT-Produktion (wie bei X63). Selektion fusionierter Zellen erfolgt durch HAT-Medium.

Das eigentliche Fusionsprotokoll läuft wie folgt ab:

Entsprechend dem gewünschten Verhältnis von X63 und Milzzellen muss die X63-Linie 3-5 Tage vor der Fusion angezüchtet und täglich expandiert werden um eine Zellzahl von ungefähr 10^8 Zellen zu erreichen. Am Tag der Fusion sollten mindestens 8x 15cm Platten dicht bewachsener X63-Zellen verfügbar sein. Während der Expansion werden die Zellen in X63 Medium kultiviert.

Am Tag vor der Fusion werden die Platten mit HAT-Selektionsmedium zum Austropfen der Fusion vorbereitet und über Nacht vorinkubiert (37°C bei $5\%\text{CO}_2$). Außerdem werden zwei 10cm Platten mit DMEM-Medium zur Reinigung und Aufnahme der isolierten Milz vorbereitet und ebenso über Nacht vorinkubiert.

Tag der Fusion:

Unter einem sterilen Abzug werden folgende Materialien vorbereitet:

- 2x 50ml Falcons, ca. zur Hälfte mit 70%igem EtOH gefüllt
- 2x Boxen Sezierbesteck (1x Scheren, 1x Pinzetten)
- ein Eppendorf-Röhrchen für das letzte Blut
- eine 5ml Einwegspritze mit passender Nadel
- eine Korkunterlage umhüllt mit Alufolie
- Stecknadeln
- ein Abfallbehälter mit Papiersack (für Kadaver)
- eine trockene 10cm Platte
- zwei Objektträger

noch vor dem Sezieren der Maus müssen in der Zellkultur folgende Utensilien bereitstehen:

- Gefriermedium mit 2 Kryoröhrchens
- die Platten zum Austropfen der Fusion (24-Well oder 96-Well)
- die Zählkammer
- 6x 50ml Falcons
- 1ml PEG, DMEM-Medium und Selektionsmedium im Wasserbad bei 37°C
- Pipett boy, Gilson-Pipetten und passende Spitzen
- Stoppuhr
- 100µm Zellsieb

Zur Präparation wird die 4 Tage zuvor mit Antigen geboostete Maus durch Genickbruch getötet und in 70%igem EtOH gewaschen. Mit Stecknadeln an Extremitäten fixiert, wird zunächst das Bauchfell angehoben, durchtrennt und lateral ebenfalls mit Stecknadeln fixiert. Das Brustbein wird angehoben und durch einen Schnitt durch die Rippen entfernt. Nun liegen Herz und Lunge frei. Mit Spritze und Nadel wird nun das Herz punktiert um so viel Blut wie möglich aufzunehmen. Oft tritt auch Blut an der Stelle des Genickbruchs aus, dieses kann anschließend an das Sezieren gesammelt werden.

Nachdem das letzte Blut entnommen wurde, kann die Bauchdecke geöffnet werden. Diese wird ebenfalls seitlich mit Stecknadeln fixiert. Um möglichst sterile Bedingungen zu erhalten, muss nach diesem Schritt unbedingt das Besteck gewechselt werden. Schiebt man nun den Dünndarm von der rechten Seite nach links wird die Milz als längliches, dunkelrotes Organ im rechten Rückenbereich sichtbar. Vorsichtig wird sie vom Bindegewebe und eventuellen Fettverunreinigungen befreit und frei gelegt. Sobald die Milz zugänglich ist, kann sie entfernt werden und in die leere Petrischale gelegt werden. Spätestens jetzt sollten noch eventuelle Reste von Fett- und Bindegewebe entfernt werden. Die von Fett und Bindegewebe befreite Milz wird nun einmal kurz in einer der mit Medium vorbereiteten Schalen abgewaschen. In der zweiten Schale mit 10ml DMEM wird die saubere Milz nun in möglichst kleine Teile zerschnitten und diese werden zwischen den rauen Beschriftungsfeldern von 2 Objektträgern zermahlen. Dabei wird das Medium in der Schale deutlich trüb, da die Milzzellen und verbliebene Bindegewebszellen freigesetzt werden. Die Platte mit den freien Milzzellen wird so schnell wie möglich in die Zellkultur überstellt, wo es zur eigentlichen Fusion mit den Myelomzellen kommt.

Die Myelomzellen werden von den Platten abgelöst und in den 50ml Falcons gesammelt, zentrifugiert und schlussendlich in 30ml DMEM vereint.

Parallel werden die Milzzellen durch das Zellsieb von den letzten groben Verunreinigungen und dem restlichen Milzgewebe getrennt. Platte und Zellsiebe werden je mit 10ml DMEM nachgewaschen, was ein Endvolumen von 30ml der Milzzellen in DMEM bedingt. Beide Zelltypen werden insgesamt 3mal gewaschen und gezählt.

Entsprechend dem gewünschten Verhältnis zwischen Milz- und Myelomzellen und der errechneten Zellzahl werden die Zellpellets nach der letzten Zentrifugation in adäquaten Volumina an DMEM aufgenommen und in einem Falcon vereint. Die Zentrifugation bei jedem Waschschrift wird dabei mit 1500rpm und für 5min bei RT ausgeführt.

Die vereinten Zellen werden nun gemeinsam zentrifugiert bevor die eigentliche Fusion stattfindet: das dadurch entstandene Zellpellet wird nach dem Absaugen des Mediums manuell gelöst. Die nun folgende Fusion der Zellmembranen wird durch das Zutropfen von 1ml PEG über 1min ermöglicht. Um eine optimale und gleichmäßige Zugänglichkeit aller Zellen zu garantieren, wird während des gesamten Vorganges das Falcon mit der entstehenden Zellsuspension in der Hand gehalten und vorsichtig geschüttelt.

Nach der Zugabe des PEG wird nun in den folgenden Schritten DMEM zugetropft.

- 1ml über eine min
- 5ml über 2 min
- 10ml über 2-3 min

Die Zellsuspension wird nun für 5min bei 37°C inkubiert und schließlich wieder abzentrifugiert. Entsprechend den gewählten Austropfkonditionen (24-Well und/oder 96-Well) wird das Resuspensionsvolumen mit HAT-Selektionsmedium angepaßt. In allen Fällen muss das Resuspensionsvolumen so gewählt werden, dass auch nach dem Austropfen Zellsuspension zurückbleibt, die als Rücklage eingefroren wird.

3-4 Tage nach der Fusion sollten ~2/3 des Selektionsmediums entfernt und durch frisches ersetzt werden. Dadurch werden auch unfusionierte und tote B-Zellen entfernt und den fusionierten Zellen durch die Zugabe des frischen Selektionsmediums bessere Wachstumsbedingungen geboten.

Frühestens eine Woche nach der Fusion werden die Medienüberstände im ELISA -Test und in der Westernblotanalyse auf die Existenz von erwünschten Ak getestet.

4.4.12 Peptid -ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)/ Depletions -ELISA

Alle weiterhin beschriebenen ELISA -Methoden werden auf 96-Well Medisorp -Platten von NUNC ausgeführt, wobei die Bindung der Peptide durch unspezifische van der Waals-Kräfte gewährleistet wird.

Jedes Well der Platten wird über Nacht mit 50µl einer Protein- oder Peptid-Lösung von 5µg/ml in 10mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 bei 4°C inkubiert. Ungebundene Proteine werden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Noch unbesetzte Bindungsstellen werden durch eine Inkubation von 2 Stunden bei RT mit einer Lösung aus 3%BSA in PBS blockiert (wieder gefolgt von 2 Waschschriften mit PBS).

Im nächsten Schritt erfolgt bereits die Inkubation mit dem primären Ak. Dieser Schritt richtet sich nach der Art des ELISA. Einerseits kann die Inkubation mit Mediumsüberständen aus der Zellkultur für 2h bei RT erfolgen, andererseits können aber auch verdünnte Immunsera verwendet werden (1h Inkubation gefolgt von 2 Waschschrritten mit PBS). In beiden Fällen wird der Überstand nach der Inkubationszeit wieder entfernt. Basierend auf den primären wird nun der passende sekundäre, HRP (horse radish- Peroxidase) –gekoppelte, Ak gewählt. Dieser wird 1:10 000 in der 3%igen BSA-Lösung in PBS gelöst und ebenfalls bei RT für eine Stunde auf den Platten belassen.

Nach diesem letzten Inkubationsschritt werden die Platten 3x mit PBS gewaschen. Als Substrat zur Entwicklung der Platten dient ein Gemisch aus TMB und DMSO (0,3mg in 100µl) 1:100 verdünnt in 0,1M Natrium Acetat pH 6,0. Dem wird H₂O₂ in einer Konzentration von 0,1% zugesetzt. Dieses Substrat kann von der HRP umgesetzt werden, wodurch sich eine schwach-blaue Färbung ergibt. Die Reaktion sollte gestoppt werden, wenn der Unterschied zwischen unspezifischer Färbung (abzulesen an den negativen Kontrollen) und spezifischer Farbreaktion maximal ist, spätestens allerdings nach einer halben Stunde, da dann die unspezifische Färbung überhand nimmt.

Die Stopplösung ist 1N H₂SO₄, von der 50µl pro Well aufgetragen werden. Bei dieser Zugabe schlägt das Färbeergebnis von einem schwachen Blau in ein intensives Gelb um.

Die Färbungen werden schlussendlich von einem Plattenlesegerät bei 450nm eingelesen.

Positivkontrollen sind:

- letztes Serum der Maus (eventuell auch ein früheres Serum)
- ein bekannter Ak, der das Beschichtungprotein erkennt

Negativkontrollen:

- Präimmuserum der Maus
- HAT -Medium (wenn es sich um einen ELISA zum Testen der Fusionsklone handelt, entfällt beim Depletions -ELISA)
- PBS

Sollten auf den ELISA -Platten deutlich positive Fusionsklone identifizierbar sein (mind. das 1 ½ fache des Hintergrundsignals), muss dieses Ergebnis im Westernblot verifiziert werden.

Dazu wird der jeweilige Überstand ~1:5 mit 0,5% NFDM verdünnt und ein Westernblot, auf dem sich das entsprechende Antigen befindet, mit dieser Lösung inkubiert. Erst wenn der Überstand Ak enthält, die das spezifische Antigen im Westernblot erkennen, wird der entsprechende Mischklon verdünnt und zur Einzelklonisolierung herangezogen.

Der Depletions-ELISA basiert auf der Technik des normalen Peptid -ELISA, hat jedoch das Ziel durch viele aufeinander folgende Inkubationsschritte eine bestimmte Ak- Fraktion eines Mausserums von anderen zu trennen.

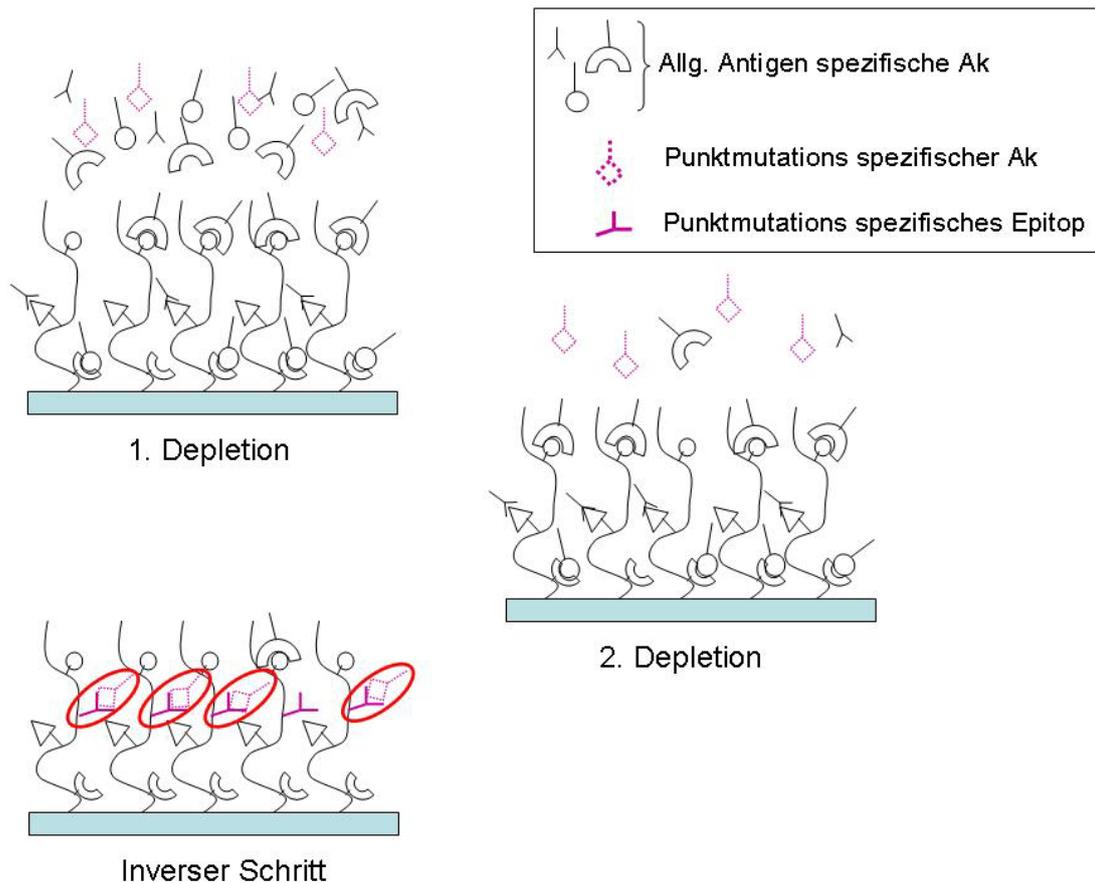


Abbildung 27: schematische Darstellung eines Depletion-ELISA mit 2 Depletions-Schritten und dem inversen Schritt. Serum einer Maus, die mit dem mutierten Antigen immunisiert wurde, wird erst über das WT-Peptid geführt und im inversen Schritt auf dem mutierten Peptid inkubiert.

Das Problem zum Nachweis mutationsspezifischer Ak war jenes, dass das gebotene Antigen stets viele Epitope bietet und folglich viele Ak während der Immunisierung entstehen. Die meisten dieser Ak erkennen somit die WT- als auch die mutierte Form des Peptides (peptidspezifisch) und die Signale eventuell punktmutationsspezifischer Ak werden bei den üblichen Tests (ELISA und Westernblot) von den Signalen der generell peptidspezifischen Ak überlagert.

In folgendem Beispiel sollte das Prinzip begreiflich werden:

Eine Maus wurde mit punktmutiertem Ag immunisiert. Deren Antiserum wird nun über eine Serie von WT -Ag geführt, wobei all jene Ak ausgefiltert (gebunden) werden, die ihr Epitop nicht im Bereich der Punktmutation haben und somit beliebig im Peptid binden. Im inversen Schritt wird nun erstmals das Epitop mit der Punktmutation dargeboten.

Die Wells dieses Inkubationsschrittes sind nun mit dem Peptid beschichtet mit dem die Maus wirklich immunisiert wurde (im Beispielfall mutiertes -Peptid). Nun können all jene Ak des Mausserums binden denen bislang das passende Epitop fehlte. Diese bislang nicht ermöglichte Antigenerkennung sollte einen Wiederanstieg des Signals bewirken.

Im Idealfall werden die unspezifischen Ak durch die Depletions -Schritte aus dem Serum entfernt. Im letzten Inkubationsschritt, dem inversen Schritt, sollte das Signal wieder deutlich ansteigen, da jetzt die spezifischen Ak binden können.

Die Inkubation mit sekundärem Ak ist für alle Wells gleich und wird für eine Stunde bei RT ausgeführt. Auch die Inkubation mit Substrat und das Stoppen der Reaktion sind gleich wie in der zuvor beschriebenen Prozedur beim Peptid –ELISA.

4.4.13 Verdünnung eines Mischklons und Isolierung eines Hybridomeinzelklons

Um einen Einzelklon zur Produktion von monoklonalen Ak zu isolieren ist es nötig einen Mischklon zu verdünnen, der sowohl im ELISA als auch Western Signale gab. Dazu wird von diesem Mischklon erst der Überstand abgehoben und als Positivkontrolle für folgende Tests zurückbehalten (Lagerung mit 0,02% Na-Azid bei 4°C).

Die Zellen dieses Wells werden in einem passenden Volumen an Selektionsmedium (1-2ml) resuspendiert und die Zellzahl wird bestimmt.

Meist werden die folgenden Verdünnungsschritte auf 96 Well Platten gewählt:

- 25 Zellen/Well entspricht \approx 2500 Zellen/Platte
- 12,5 Zellen/Well entspricht \approx 1250 Zellen/Platte
- 6 Zellen/Well entspricht \approx 600 Zellen/Platte
- 3 Zellen/Well entspricht \approx 300 Zellen/Platte
- und 2x 1,5 Zellen/Well entspricht \approx 150 Zellen/Platte

In 50ml Falcons werden nun je 30ml Selektionsmedium vorgelegt und die entsprechende Menge an Zellsuspension zugegeben. Die entstandene Suspension enthält nun so viele Zellen wie für die jeweilige Verdünnungsstufe vorgesehen sind. Dann werden 300 μ l dieser Suspension pro Well zugegeben.

Diese Zellen werden nun für mindestens eine Woche bei 37°C inkubiert bevor die Überstände wieder mittels ELISA auf die gewünschten Ak überprüft werden. Die im ELISA positiv getesteten Überstände werden folgend weiter getestet um das gewünschte Antigen im Westernblot zu erkennen (Verdünnung \sim 1:10). Diese Prozedur wird so lange wiederholt, bis ein mikroskopisch identifizierter Einzelklon eindeutig positive Signale im ELISA (mind. 1 $\frac{1}{2}$ faches Hintergrundsignal) als auch im Westernblot liefert.

Der isolierte Einzelklon wird expandiert und auf mehreren 10cm Platten ausgesät. Parallel wird er in einer hohen Verdünnung (1-2 Zellen/Well) auf einer 96-Well Platte ausgesetzt um den Einzelklon in einem weiteren ELISA zu bestätigen. 3-4 dieser 10cm Platten werden so lange inkubiert bis der Klon abgestorben ist. Der Zellüberstand enthält nun eine hohe Ak - Konzentration. Parallel dazu muss der Klon auch vom HAT -Selektionsmedium entwöhnt werden. Zunächst wird er auf HT-Medium gesetzt (ohne Aminopterin) und dann auf reines

DMEM mit 10%FCS. Zuletzt muss die Ak -Produktion unter diesen Konditionen durch ein positives Westersignal bewiesen werden. In sämtlichen Stadien der Isolierung sollten Sicherheitsgefrierücklagen des Klons gemacht werden.

5 Ergebnisse

5.1 Arbeit mit LaminA

5.1.1 Expression des HBc-Ig-fold Fusionsprotein

Bei der Expression des HBc -LaminA Ig -fold Konstruktes war im Allgemeinen darauf zu achten, dass die natürliche Faltung des Proteins in Hinblick auf die zukünftige Immunisierung erhalten bleiben sollte. Daher war die Reinigung nur aus der löslichen Proteinfraction des bakteriellen Lysats möglich. Dazu musste der Anteil an löslichem Protein in dieser Fraction optimiert werden. Zu diesem Zweck wurden die folgenden Expressionsvektoren in 4 verschiedene bakterielle Expressionsstämme transformiert. Die berechnete Größe des exprimierten Fusionsproteins betrug 32,2kDa.

- pB'His HBc-Ag -Ig-fold WT
- pB'His HBc-Ag -Ig-fold R453W
- pB'His HBc-Ag -Ig-fold R482W

Im ersten Stadium wurde die Proteinexpression (in einem Volumen von ges. 100ml LB-Amp Medium) für die Rosetta -Stämme untersucht (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigte sich die Expression des Fusionsproteins im Stamm Origami am besten induzierbar:

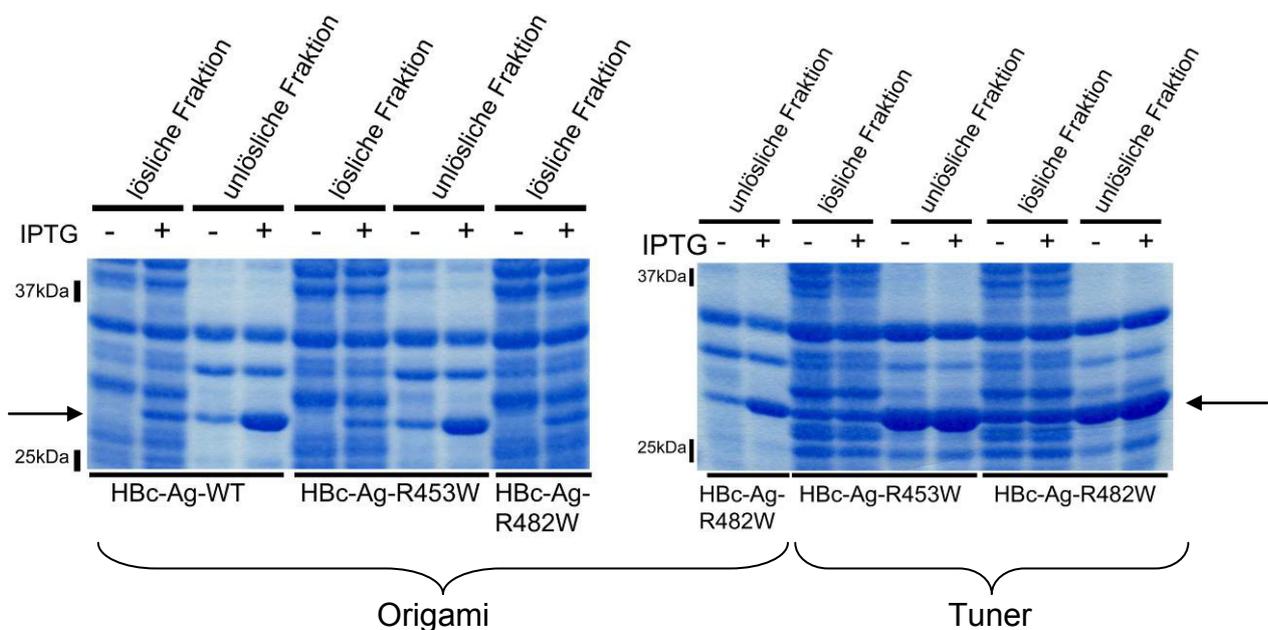


Abbildung 28: Expressionsschema der Antigene HBc-Ag -WT, -R453W und -R482W im Origami- und Tuner- Stamm. Lösliche und unlösliche Fraktionen sind jeweils in IPTG induziert und uninduziert getrennt. 1/50 des gesamten Volumens wurde von jeder Fraktion aufgetragen, was jeweils einem Kulturvolumen von ungefähr 2ml entspricht. 10% SDS-PAA-Gel

Im Tuner-Stamm war das Expressionslevel generell höher und auch der Anteil an löslichem Protein schien höher, jedoch war fast kein Unterschied zwischen uninduziertem und induziertem Zustand festzustellen. Deutlich induzierbar hingegen erschien die Expression im Origami –Stamm im Gegensatz zum Tuner-Stamm. Zwar war auch hier ein großer Teil des produzierten Proteins in der unlöslichen Fraktion des Lysats zu finden, jedoch war der Anstieg an löslichem Protein gegenüber dem uninduzierten Zustand am höchsten. Daher wurden die Induktionsbedingungen wie folgend angepasst und die Expression im Origami – Stamm optimiert: Induktion über Nacht mit 0,1mM IPTG bei RT.

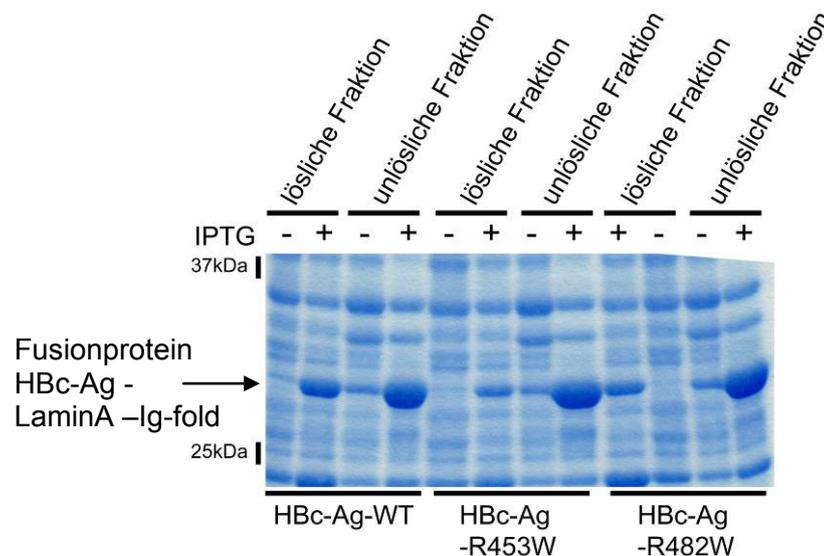


Abbildung 29: Expression im Origami-Stamm, unter geänderten Induktionsbedingungen: 0,1 mM IPTG o/n. 1/200 des Volumens wurde geladen und die geladene Menge entspricht somit ungefähr 250µl der Ursprungskultur. 10% SDS-PAAA-Gel; beim Laden der unlöslichen Proteinfraction des Fusionsproteins HbC-Ag-R482W wurden IPTG- induzierter und uninduzierter Zustand verwechselt

Beim Laden des Geles mit den Fraktionen des Origami -Stamms geschah eine Verwechslung, die induzierte und uninduzierte lösliche Fraktion des Proteins HbC-Ag – R482W wurden vertauscht (in der Abbildung vermerkt).

Unter den geänderten Induktionsbedingungen (Induktion über Nacht bei 0,1mM IPTG, Abb. 29) war die Verteilung des exprimierten Proteins zwischen den Fraktionen nicht mehr bei allen drei Formen gleich. Im induzierten Überstand zeigte das –WT Protein den höchsten Anteil an löslichem Protein gefolgt vom –R482W Protein und am wenigsten löslich war das – R453W Protein.

Auf das Gel wurde nur 1/200 des Lysatvolumens aufgetragen, was wiederum 250µl der ursprünglichen Bakterienkultur entsprach. Der Gesamtgehalt an löslichem Protein in den Fraktionen des induzierten Überstandes schien daher hoch genug um die weitere Proteinreinigung mittels Ni-NTA-beads zu versuchen.

Über Nacht bei 4°C wurden die löslichen Fraktionen des induzierten Zustandes des Origami-Stamms aller drei Proteinformen mit den Ni –NTA -Beads inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Eluierung des gebundenen Proteins von den Ni-NTA beads mittels Verdrängung

durch 250mM Imidazol (3x10min 37°C 500rpm) und danach als Kontrolle durch Erhitzen für 5min auf 95°C in SDS-Ladepuffer.

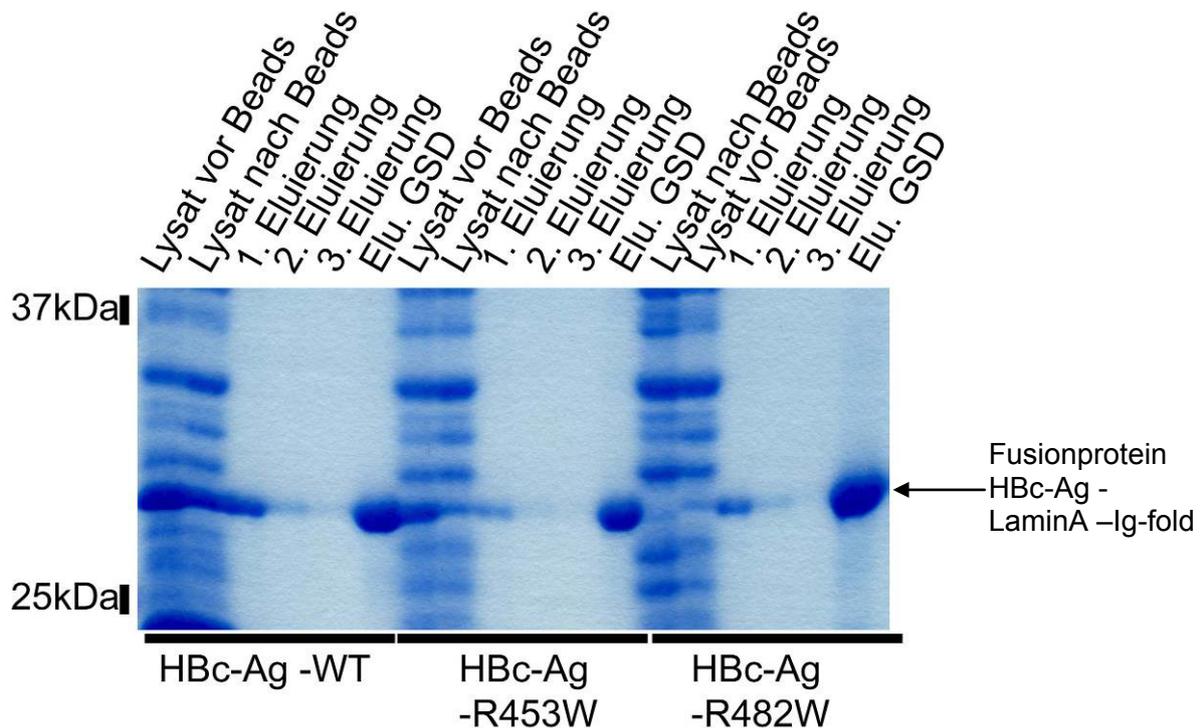


Abbildung 30: Eluierung von Ni-NTA-Beads mittels Verdrängung durch 250mM Imidazol. 1/15 jedes Eluates und 1/115 der Überstände wurde geladen. Beim Protein HbC-Ag-R482W wurden die Aliquote der Lysate vor bzw. nach der Inkubation mit den Ni-NTA-beads vertauscht. 10% SDS-PAA-Gel

Als Kontrolle wurden Aliquote der Überstände vor und nach der Inkubation mit den Ni-NTA-beads geladen. 1/15 eines jeden Eluats (alle 3 Eluierungen mit Imidazol als auch mit Ladepuffer) wurde auf das Gel geladen, dies entspricht ~1,5ml der Ursprungskultur. Von den Überständen hingegen wurde nur 1/115 geladen, was den scheinbaren Anstieg in den eluierten Fraktionen erklärt (vor allem bei HbC-Ag-R482W).

Im Falle der löslichen, induzierten Fraktion des HbC-Ag-WT Proteins wurden zu wenig Beads eingesetzt, da auch im Überstand nach der Inkubation mit den Beads reichlich Protein vorhanden war. Ähnlich das Ergebnis für das -R453W Proteins, auch hier war nach der Bead-Inkubation noch eine Proteinbande erkennbar, was bedeutet, dass nicht 100% des Proteins an die Beads binden konnten. Im Fall des HbC-Ag-R482W wurden die Lysate vor und nach der Inkubation vertauscht (in Abb.30 vermerkt).

Für alle drei Fusionsproteine gilt, dass die Eluierung mit dem Puffer mit 250mM Imidazol nicht sehr effizient war. Im Vergleich mit der Eluierungsmethode, bei der die Beads mit Ladepuffer erhitzt werden, liegt die Effizienz maximal bei geschätzten 20%. Weitere Eluierungsmethoden bei der die native Sekundärstruktur des Proteins erhalten bleiben sollte, wurden erprobt, (500mM Imidazol und pH-Wechsel auf 4,6) zeigten aber eine noch geringere Ausbeute (Daten nicht gezeigt). Deswegen wählte ich für die weitere Proteingewinnung die

Eluierungsmethode mit 250mM Imidazol. Schließlich war der Erhalt der Sekundärstruktur für den weiteren Immunisierungsansatz unerlässlich.

Um ausreichend Protein für die Immunisierung der Mäuse zu bekommen wurde unter den optimierten Expressionsbedingungen eine Origami – Kultur von 1,1L Volumen angezchtet (Induktion über Nacht mit 0,1mM IPTG, 50ml uninduzierte Kontrolle).

Aufgrund des hohen Anteils an Protein in der unlöslichen Fraktion wurde versucht durch weitere Sonizierung, mehr Protein zu lösen. Bei der zweiten Sonizierung wurden sowohl Dauer als auch Intensität erhöht (zuvor 3x40sec. 75% und 2x40sec bei 90% auf 5x50sec bei 100%).

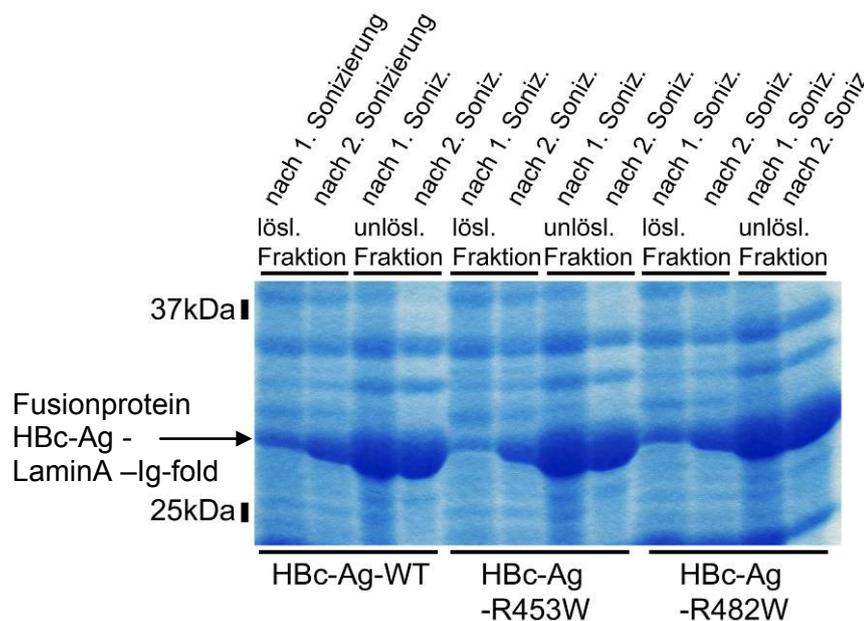


Abbildung 31: lösliche und unlösliche Fraktionen aus einer Origamikultur. Proteinverteilung nach erster Sonizierung (bei 3x40sec 75% und 2x40sec 90%) und zweiter Sonizierung (5x50sec bei 100%). Von jedem Überstand wurde ~1/600 aufgetragen, was ungefähr 1,8ml der Ursprungskultur entspricht. 10% SDS-PAA-Gel

Durch die wiederholte Sonizierung konnte der Anteil an löslichem Protein im Überstand mehr als verdoppelt werden.

Nachdem der erste Überstand bereits mit Ni –NTA -Beads inkubiert wurde konnte nun auch der zweite Überstand für die Proteingewinnung auf gleichem Weg benutzt werden.

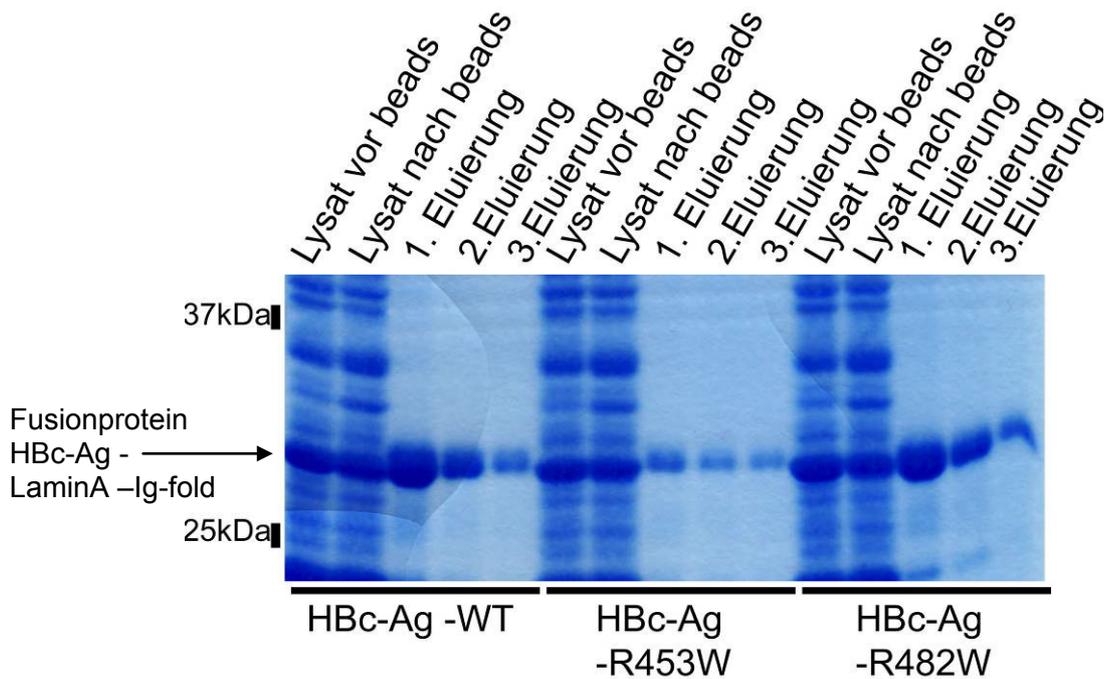


Abbildung 32: Eluierung des Fusionsproteins HbC-Ag-LaminA Ig-fold von Ni-NTA-beads mittels Waschpuffer mit 250mM Imidazol. 1/50 von jedem Eluat wurde geladen, von den Überständen jedoch nur 1/900. 10% SDS-PAA-Gel

Abermals wurden zuwenig Ni-NTA-Beads eingesetzt, denn die Proteinbande ist im Überstand nach der Inkubation mit den Beads noch deutlich vorhanden, bzw. kaum geschwächt. Deutlich war auch, dass die erreichte Proteinkonzentration in den Eluaten für das HbC-Ag-R453W Fusionsprotein mit Abstand am geringsten war. Diese Unterschiede in der Proteingewinnung könnten dadurch erklärt werden, dass für die Punktmutation R453W eine Änderung in der Sekundärstruktur vorausgesagt wurde. Die erzielte Konzentration der Eluate wurde anschließend im Vergleich mit definierten Mengen an BSA wie folgt geschätzt:

-WT:	1. Fraktion => 2mg/ml
	2. Fraktion: => ~1mg/ml
-R453W:	1. Fraktion: => 0,4mg/ml
-R482W:	1. Fraktion: => 1,5mg/ml
	2. Fraktion: => 0,9mg/ml

Die Konzentration des Proteins HbC-Ag-R453W war auch in der ersten Fraktion zu gering um es zur Immunisierung zu nützen, da die Volumen für Immunisierungen zu hoch gewesen wären. Deswegen wurden die Immunisierungen nur mit den Proteinen HbC-Ag-WT und -R482W gestartet.

Basierend auf den Expressionsresultaten des HbC-Ag-Ig-fold Proteins wurde auch das Plasmid pB'His-HbC-Linker zur Expression im Origami-Stamm bei Induktion über Nacht und RT mit 0,1mM IPTG genutzt. Auch hier fand die Eluierung mit 250mM Imidazol jeweils aus der löslichen Fraktion nach erster und zweiter Sonizierung statt. Dieses Protein diente als Kontrolle bei ELISA und nicht der Immunisierung.

Wenn später Überstände fusionierter Hybridomzellen mittels ELISA und Western getestet werden, wären jene von Interesse, deren Antikörper zwar Signale auf dem entsprechenden HBc-Ag Ig-fold Protein geben, nicht aber auf dem HBc-Ag ohne integrierten LaminA Ig-fold (exprimiert vom Konstrukt pB'His HBc- Linker).

5.1.2 Immunisierungen und Tests der resultierenden Mausseren

Wie bereits erwähnt wurde, konnte die Immunisierung der Mäuse nur mit den Antigenen HBc-Ag Ig-fold WT und HBc-Ag Ig-fold R482W gestartet werden. Parallel wurden auch die Peptid-Immunisierungen mit KLH-R482 und KLH-W482 gestartet. Mit jedem Antigen (HBc-Ag –WT; HBc-Ag –R482W; KLH-R482; KLH-W482) wurden jeweils 4 Mäuse immunisiert, zwei davon vom Genotyp balb/c und zwei vom Genotyp RBF.

Wir testeten die Mausseren auf das Vorhandensein spezifischer Ak mittels ELISA (Verdünnungs- und Depletions-ELISA) und mittels Immuno- (Western-) blots.

Um die Immunseren der Mäuse in der Westernanalyse zu testen waren Lysate von Zelllinien nötig die eine getaggte Form von LaminA –WT als auch R-482W exprimierten. Zur Verfügung standen zwei Zelllinien, die Flag-LaminA WT und Flag-LaminA R482W exprimierten. Zusätzlich zu dieser exogen exprimierten Form liegt LaminA, als essentielles Protein, natürlich auch endogen (natürlich WT -Form) vor. Zusätzlich ist der Ig -fold von LaminA auch Bestandteil von LaminC. Daher wurde für jede Maus, die Antikörper gegen den Ig-fold gebildet hatte, ein Erkennungsmuster von 3 Banden erwartet (Flag-LaminA, endogenes LaminA und LaminC). Aufgrund der Tatsache, dass sich die Immunisierungsproteine nur in einer Aminosäure unterschieden, war weiters zu erwarten, dass das Serum –WT immunisierter Tiere (R482) die R482W (W482) mutierte Form erkennen würde und umgekehrt (betrifft auch ELISA).

5.1.2.1 HBcAg -Ig-fold Ansatz

In der ersten durchgeführten Testreihe wurden die ersten 2 Immunsere (und das jeweilige Präimmunserum) auf Westernblots auf Zelllysaten der Zelllinie HeLa flag -LaminA –WT bzw. –R482W getestet (Abb. 33 a) WT immunisierte Mäuse; 33 b) R482W immunisierte Mäuse).

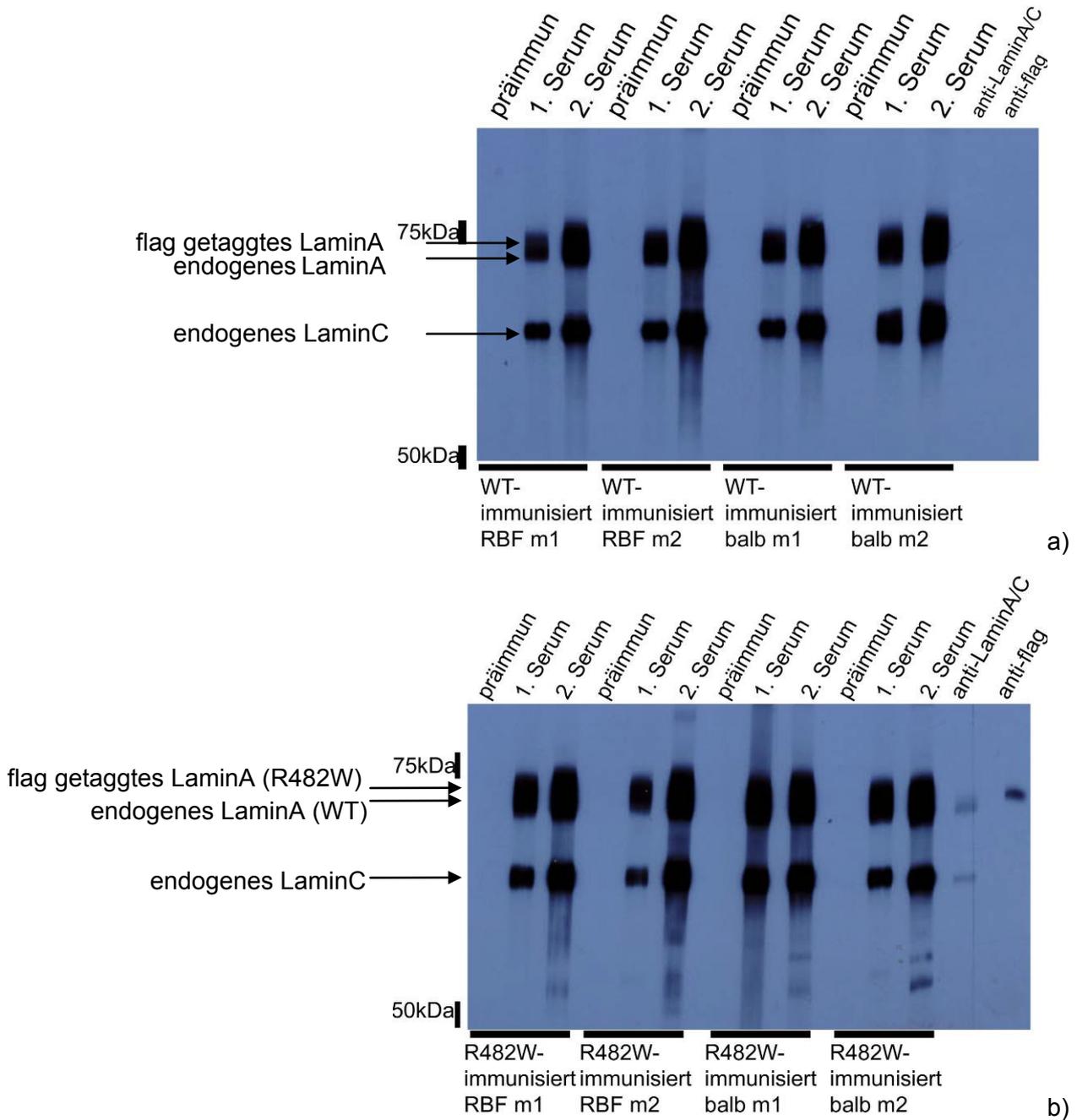


Abbildung 33: Westernblot a) erstes und zweites Serum der HBc-Ag –WT immunisierten Mäuse auf Streifen eines HeLa flag-LaminA WT Lysats; Kontrollantikörper leider nicht ersichtlich, aber durch Abgleich mit b) wird die Richtigkeit der Banden verifiziert. b) erstes und zweites Serum der HBc-Ag –R482W immunisierten Mäuse auf Streifen des HeLa flag-Lamin R482W Lysats. Alle Seren 1:1000 verdünnt, Anti LaminA/C 1:2000, Anti-flag 1:10 000 auf 7,5% SDS-PAA-Gel

Die Sera aller mäuse erkannten spezifisch den Ig-fold von LaminA/C (kaum Hintergrundbanden). Wie erwartet, war aber aufgrund der Sequenzhomologien zwischen den Mutationsformen kein spezifischer Titer auszumachen. Aufgrund der Größe des flag -Tags (~1,6kDa) ist die Bande der exogenen LaminA -Form nicht klar von der endogenen WT - Form zu differenzieren. Das erwartete 3 – Banden Muster war aber trotzdem ersichtlich, wenn auch nur schemenhaft. Weiters ist auch die erwartete Kreuzreaktivität sichtbar, denn auch die mit HBc-Ag –R482W immunisierten Tiere erkannten die endogenen Proteine LaminA

und C. Ein Test auf Kreuzreaktivität der HBc-Ag –WT immunisierten Tiere gegen die mutierte Form von LaminA war hier noch nicht inkludiert.

Um zu testen, ob die Mausseren auch Ak gegen das Epitop um R bzw. W482 enthalten, wurden sie folgend im ELISA getestet. Dazu wurden die Platten mit den ungekoppelten Peptiden (AS) aus der KLH -Immunisierungsreihe beschichtet. Dieser Test zeigte überraschend keine Signale, auf allen Verdünnungsstufen war das Signal der Seren auf Hintergrundniveau (Daten nicht gezeigt). Da der Peptid –ELISA keinen Schluss zuließ, ob die Antiseren auch spezifische Ak gegen R oder W482 enthalten, führten wir einen Depletions –ELISA durch. Dabei wurden die Seren der Tiere zunächst in 5 aufeinander folgenden Schritten auf dem Partnerfusionsprotein (für WT-immunisierte Tiere R482W und umgekehrt) inkubiert, um all jene Ak aus dem Serum zu entfernen, deren Epitope die AS 482 (R oder W) nicht enthielten.

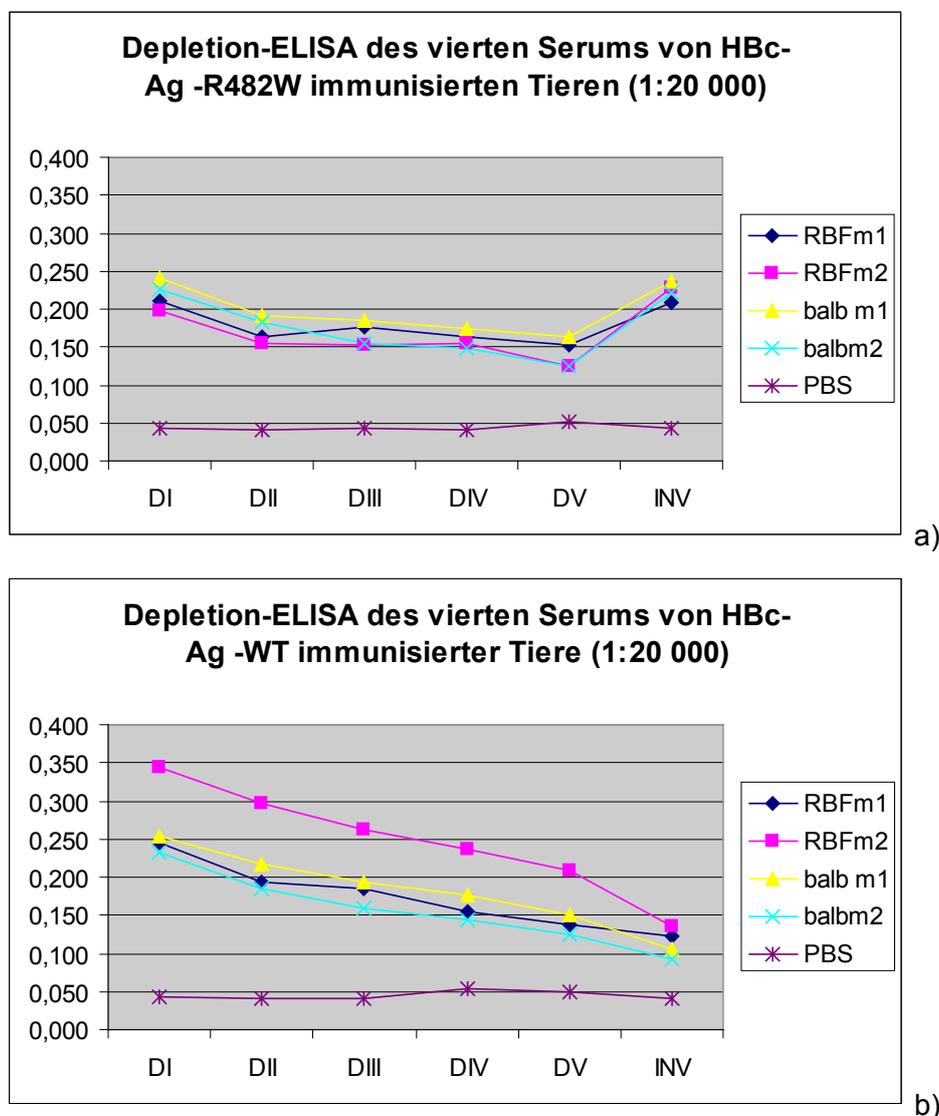


Abbildung 34: Depletion-ELISA des vierten Serums von HBC-Ag –Ig-fold immunisierten Tieren a) – R482W immunisierte Tiere b) –WT immunisierte Tiere. DI-V steht für die Depletions-Schritte (auf R482W Protein) und INV für die inverse Kontrolle (auf dem WT-Immunisierungsprotein)

Zunächst zu den HBc-Ag –WT immunisierten Tieren (Abb. 34 b)). Die RBF Maus 2 zeigte auf HBc-Ag –R482W Protein einen deutlich höheren Titer als die anderen drei Tiere, nach 5 Depletions -Schritten war auf dem WT-Protein kein Signalanstieg zu verzeichnen. Trotz der hohen Verdünnung der Antisera von 1:20 000 konnte auch in fünf Depletions -Schritten nicht das Hintergrundniveau von PBS erreicht werden, was generell den hohen Titer der generierten Immunantwort unterstreicht. Allerdings wäre die Depletion schon weit genug fortgeschritten um bei einem bestehenden spezifischen Titer einen Anstieg des Signals im inversen Schritt zeigen zu können.

Bei den HBc-Ag –R482W immunisierten Mäusen war das Bild ein anderes (Abb. 34 a)). Alle vier Mäuse zeigten einen vergleichbaren Titer, der im Zuge der Depletions -Schritte nur wenig abnahm. Im inversen Schritt ist aber der erwartete Anstieg des Signals trotzdem deutlich sichtbar. Alle vier Mäuse schienen eine vergleichbare spezifische Immunantwort entwickelt zu haben. Für eine Fusion wurde die HBc-Ag –R482W immunisierte Maus balb 2 gewählt. Im direkten Vergleich mit den anderen Mäusen zeigte sie den höchsten Wiederanstieg des Signals.

5.1.2.2 KLH-Peptid Ansatz

Wie bereits erwähnt wurde parallel zu dem Immunisierungsansatz mit den HBc-Fusionsproteinen gestartet und auch jener mit KLH gekoppelten Peptid gestartet. Die zugehörigen Peptidsequenzen waren daher:

- WT-Form: Ac- 477 C L L T Y R F P P K 486 -NH₂
- mutierte Form: Ac- 477 C L L T Y W F P P K 486 -NH₂

Beide Peptide waren über das N-terminale Cystein an das Trägerprotein KLH gekoppelt. Die Seren der mit KLH-R482 (= WT) immunisierten Tiere wurden in der Westernblotanalyse auf Lysaten von HeLa flag-LaminA-WT auf das Vorhandensein von Ak gegen die WT-Form des LaminA Ig-fold getestet. Die Seren der mit KLH-W482 (= Mutante) immunisierten Tiere wurden in der Westernblotanalyse auf Lysaten der Zelllinie HeLa flag-LaminA-R482W getestet. Für jedes Tier wurden sowohl präimmun, erstes als auch zweites Serum getestet.

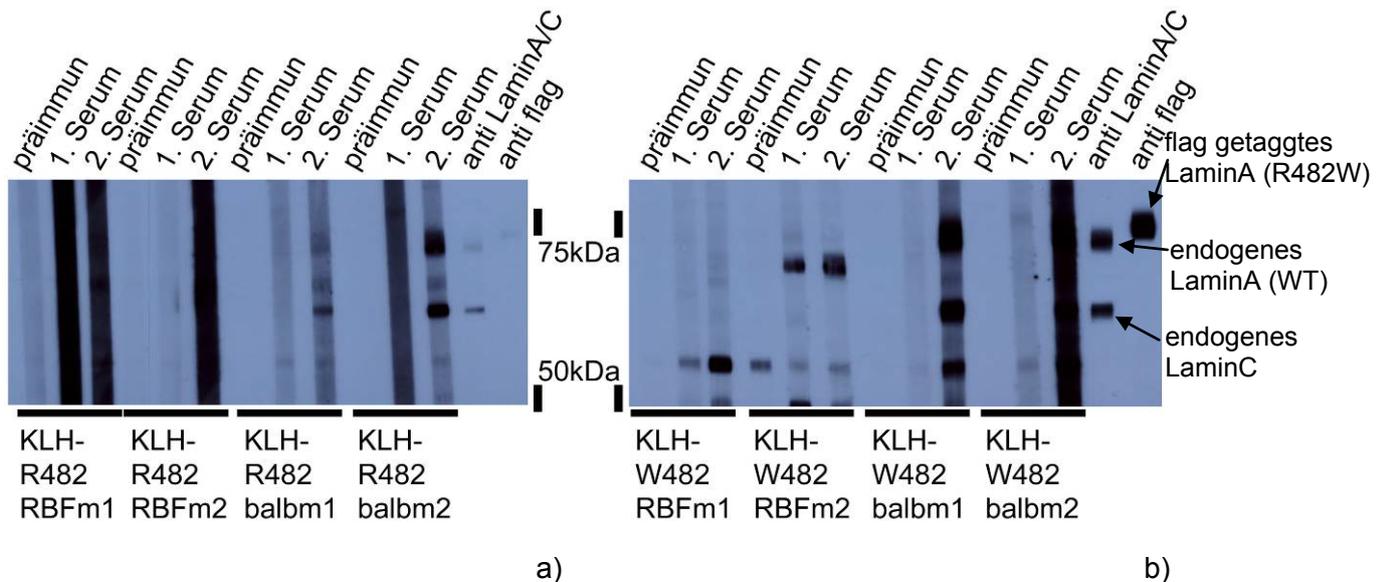


Abbildung 35: Westernblot a) zeigt die ersten Seren der mit KLH-R482 immunisierten Mäuse auf Streifen des HeLa flag-LaminA WT Lysat. b) erste Seren der mit KLH-W482 immunisierten Mäuse auf Streifen des HeLa flag-LaminA -R482W Lysat. Alle Seren 1:1000 verdünnt, Anti LaminA/C 1:2000, Anti-flag 1:10000 auf 7,5% SDS-PAA-Gel

Die Immunantwort auf die KLH gekoppelten LaminA -Peptide war deutlich schwächer als die Immunantwort gegen das Fusionsprotein mit dem HbC-Ag, wo die Seren ausnahmslos aller Tiere Ig-fold spezifische und starke Signale zeigten. In diesem Immunisierungsansatz zeigten bei den WT-immunisierten Tieren (R482; Abb. 35 a)) nur die zweiten Seren der balb Mäuse Ig-fold spezifische Signale. Wobei das Signal des Antiserums der balb Maus 2 jenes der balb Maus 1 um ein Vielfaches überragte. Bemerkenswert dabei war auch die deutliche Zunahme des Titers verglichen mit dem 1. Serum. Die Streifen der RBF -Mäuse sind teilweise überbelichtet, doch auch bei kürzeren Belichtungszeiten waren keine Ig-fold spezifischen Banden sichtbar.

Bei den KLH-W482 immunisierten Tieren (Abb. 35 b)) zeigte nur das Antiserum der balb Maus 1 im 2ten Serum Ig-fold spezifische Banden. Allerdings reagierte auch dieses Antiserum sowohl mit der endogenen WT -Form von LaminA als auch mit der mutierten R482W -Form.

Die Proteine, die in dem Hela-Lysat von dem Antiserum der W482 RBF Maus 2 erkannt wurden, hatten eine andere molekulare Masse als LaminA.

An diesem Bandenmuster, welches die Mausseren erkannten, änderte sich auch bei den Tests späterer Seren nichts (Daten nicht gezeigt).

Um Hinweise auf das Vorhandensein mutations- oder WT-spezifischer LaminA -Ak in den Mausseren zu erhalten, wurde mit dem dritten Serum ein ELISA in den Verdünnungsstufen 1:1000 – 1:32000 gemacht. Getestet wurden die Seren dabei auf beiden ungekoppelten Peptiden (R482 und W482).

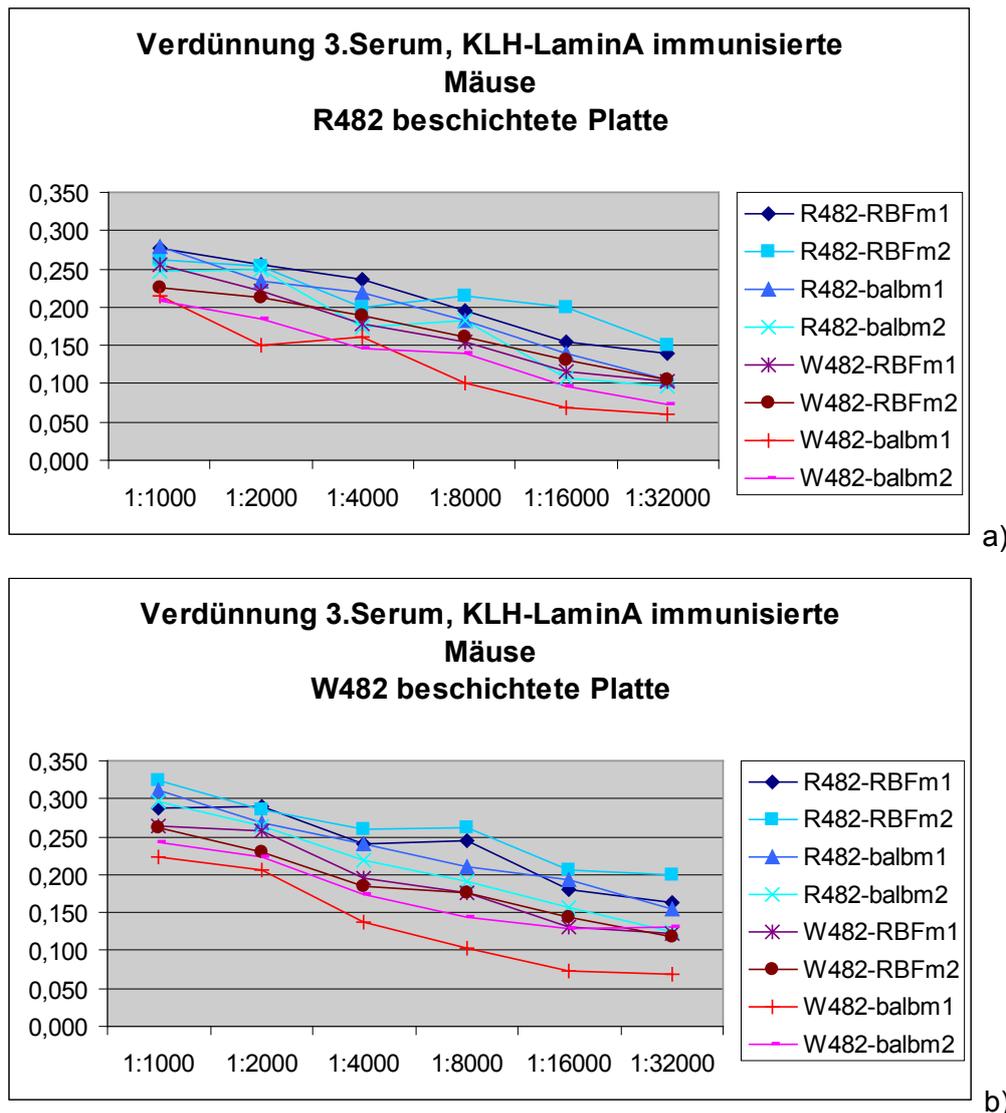


Abbildung 36: Verdünnungs -ELISA der dritten Seren aller KLH-LaminA-Peptid immunisierten Mäuse auf beiden ungekoppelten Peptiden. KLH-R482 immunisierte Mäuse in Blau-Tönen; KLH-W482 immunisierte Mäuse in Rot-Tönen. Platten mit ungekoppeltem Peptid beschichtet a) R482 b) W482

Die Titer der Mausseren waren auf beiden Peptid-Formen sehr ähnlich, leider war es nicht so, dass dieser ELISA bereits Hinweise auf eine spezifische Immunreaktion einer bestimmten Maus geben konnte. Im Durchschnitt zeigten die mit KLH-R482 immunisierten Mäuse einen leicht höheren Titer gegenüber den KLH-W482 immunisierten Mäusen. Auch in den hohen Verdünnungsstufen zeigte keines der Mausseren ein deutlich höheres Signal auf dem spezifischen Peptid. Auffällig ist aber, dass die Westernblotdaten nicht bestätigt werden konnte, da dort ja nur zwei KLH-R482 immunisierten Mäuse (balb Maus 1 und Maus 2) auf dem HeLa –Lysat (exogen flag –LaminA WT exprimiert) Ig-fold spezifische Signale zeigten. Bei den KLH-W482 immunisierten Mäusen zeigte überhaupt nur eine Maus (balb Maus 1) auf dem Lysat (exogen flag –LaminA R482W exprimiert) Ig-fold spezifische Banden. Im Gegensatz dazu zeigten auf den ELISA –Platten, die mit dem ungekoppelten kurzen Peptid beschichtet waren, alle der immunisierten Mäuse eine Peptid –spezifische Immunreaktion.

Mit dem vierten Serum der Mäuse wurde nun ein Depletions-ELISA gemacht um Aussagen bezüglich der Spezifität der erlangten Immunantwort treffen zu können.

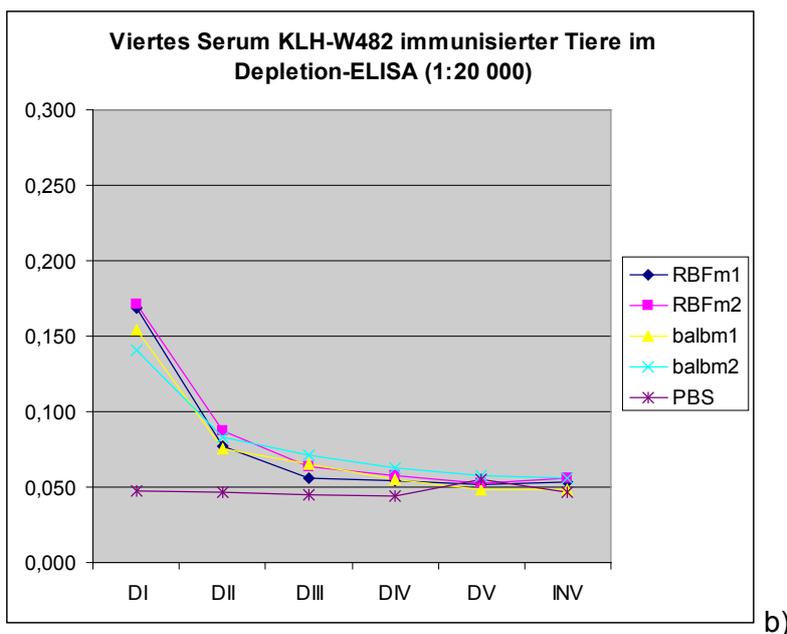
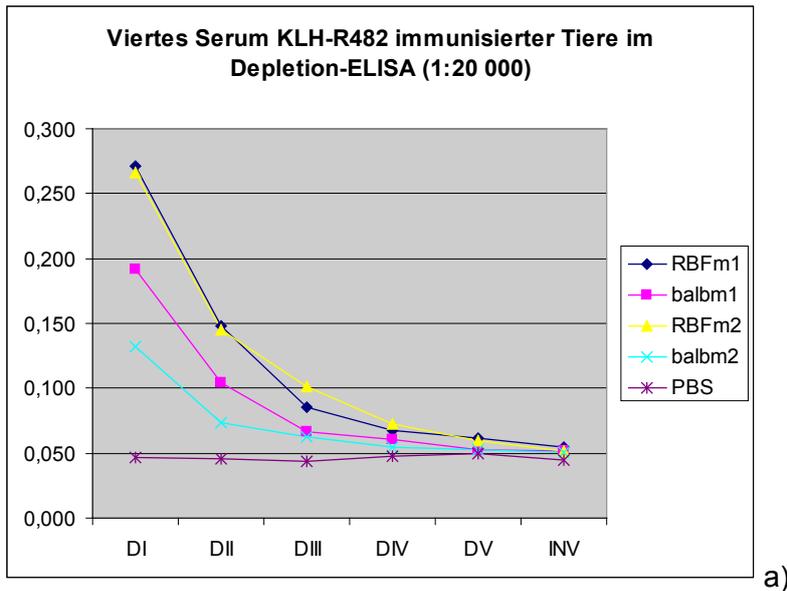


Abbildung 37: Depletion-ELISA des vierten Serums der KLH-LaminaA-Peptid immunisierten Tiere. a) KLH-R482 immunisierte Tiere b) KLH-W482 immunisierte Tiere. DI-V steht für die Depletions-Schritte und INV für die inverse Kontrolle auf dem Immunisierungsprotein

Diese Signale zeigten deutlich, dass dieser Immunisierungsansatz bei keinem der Tiere zu einer mutations (W482)- oder WT(R482)- spezifische Ak -Produktion führte. Aufgrund der hohen Verdünnung der Seren(1:20 000) fiel das Signal bereits nach der ersten Inkubation stark ab. Nachdem alle Signale auf Hintergrundniveau (Inkubation der ELISA-Platte mit PBS und sekundärem Ak) gefallen waren, konnte der inverse Test keinen Anstieg im Signal hervorrufen, was einen spezifischen Titer bedeutet hätte.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für eine weitere Fusion zur Generierung eines spezifischen Ak keine der KLH-LaminA-Peptid immunisierten Mäuse herangezogen.

5.1.3 Fusionen mit den immunisierten Mäusen

5.1.3.1 HBcAg -Ig-fold Ansatz

Basierend auf den zuvor beschriebenen Tests wurde für eine Fusion die HBc-Ag –R482W immunisierte balb Maus 2 ausgewählt.

Die eigentliche Fusion wurde in einem Verhältnis 3:1 (Milzzellen: Myelomzellen) mit der X63-Myelomzelllinie gemacht. Ausgetropft wurde die Fusion auf 6 x24-Well und 4 x96-Well – Platten.

Für den nachfolgenden ELISA war es nötig die Kulturüberstände einerseits auf dem HBc -Ag Protein zu testen und andererseits auf dem eigentlichen Immunisierungsprotein HBc-Ag – R482W, da auch eine starke Immunantwort gegen den HBcAg –Teil des Fusionsproteins zu erwarten war.

Aufgrund der hohen erwarteten Immunogenität des HBc-Ag gaben die Überstände generell starke Signale auch auf dem HBc –Ag Protein (exprimiert vom Vektor pB'His HBc-Ag linker). Für den Westerntest (erfolgte auf HeLa flag-LaminA R482W Lysat) wurden die Überstände solcher Klone genommen, deren Signal auf HBc –Ag Protein im Durchschnittsbereich lag und auf HBc-Ag –R482W Protein überdurchschnittlich war. (Das Signal von der Inkubation mit PBS und sekundärem Ak lag bei ~0,04)

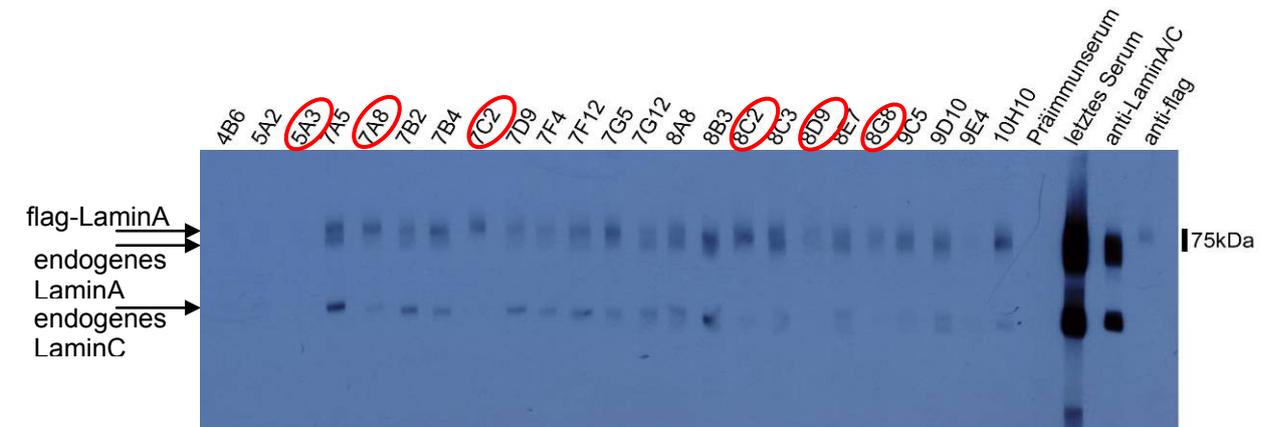
Klon#	Signal auf HBc-Ag Protein	Signal auf HBc-Ag R482W	
4B6	0,144	0,086	Klone von 24-Well Platten
5A2	0,126	0,101	
5A3	0,104	0,099	
7A5	0,211	0,114	Klone von 96-Well Platten
7A8	0,271	0,136	
7B2	0,215	0,125	
7B4	0,213	0,120	
7C2	0,272	0,133	
7D9	0,254	0,128	
7F4	0,250	0,119	Klone von 96-Well Platten
7F12	0,316	0,191	
7G5	0,250	0,128	
7G12	0,286	0,141	
8A8	0,296	0,137	
8B3	0,250	0,119	

8C2	0,254	0,121
8C3	0,249	0,122
8D9	0,273	0,141
8E7	0,289	0,150
8G8	0,269	0,153
9C5	0,259	0,133
9D10	0,266	0,141
9E4	0,250	0,121
10H10	0,251	0,113

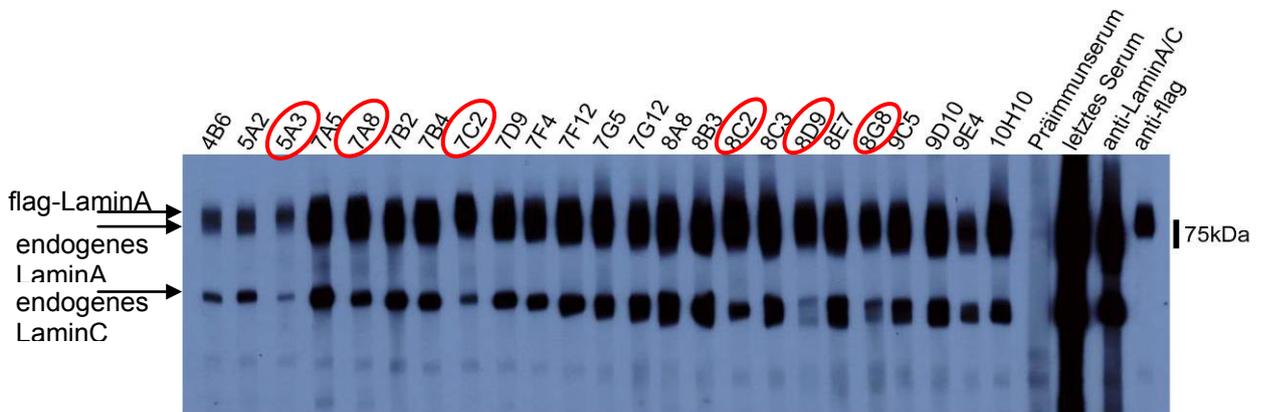
Klone von 96-Well Platten

Tab. 2: ELISA –Werte auf HBc-Ag und HBc-Ag R482W jener Klone, deren Werte das beste Verhältnis zwischen HBc-Ag R482W und HBc-Ag Protein lieferten (möglichst niedrig auf HBc-Ag und hoch auf HBc-Ag R482W)

Die Konzentrationen beider Beschichtungsproteine konnten nach der Aufreinigung nur geschätzt werden, daher sind die Signale der Überstände (auch der Kontrollen) auf den beiden Platte unterschiedlich (auf HBc-Ag Protein höher als auf HBc-Ag R482W Fusionsprotein).



a)



b)

Abbildung 38: ELISA-positive Mixklone (1:10) wurden auf einem Lysat von HeLa flag-LaminA R482W (7,5% SDS-PAA-Gel) Zellen im Westernblot getestet. a) kurze Belichtungszeit b) lange Belichtung

Kontroll- Ak: Mausseren 1:1000, anti-LaminA/C 1:2000 anti-flag 1:10 000; markierte Mixklone erkannten prädominant die flag-getaggte Form von LaminA

Alle gewählten Überstände enthielten Ak gegen den Ig-fold von LaminA/C, allerdings zeigten sie unterschiedliche Erkennungsmuster. LaminA besitzt eine molekulare Masse von 72,2kDa, welches sich durch den flag -Tag auf ~74kDa erhöht. Im elektrischen Feld wandern daher das exogene, flag- getaggte LaminA und das Endogene als Doppelbande. Die untere Bande zeigte LaminC mit einer berechneten Größe von ~65kDa. Die Klone 5A3, 7A8, 7C2, 8C2, 8D9 und 8G8 erkannten prädominant die getaggte Form von LaminA (Abb.38 a) oberer Teil der Doppelbande), was auf die Existenz mutationsspezifischer Ak hinwies.

Die Überstände aller anderen Klone gaben eindeutige Signale für den Ig -fold von LaminA bzw. LaminC, jedoch keine Hinweise auf mutationsspezifische Ak. Diese Klone wurden daher für spätere Studien eingefroren.

Die stärksten ELISA- und Westernsignale korrelierten nicht (höchster ELISA –Wert für den Überstand von 7G12, dieser gab aber im Westernblot ein schwächeres Signal).

Einige Klone erkannten auch auf der Höhe von LaminC eine nicht weiter definierte Doppelbande, es handelte sich dabei um die Klone 7G12, 8A8, 8C3, 8D9, 8E7, 9C5 und 9D10.

Von folgenden Klonen wurden Verdünnungen ausgesät:

- 5A3 (50; 25; 12,5; 6; 3 und 1,5 Zellen/Well)
- 7C2 (128, 64, 32, 16, 8 und 4 Zellen/Well)
- 7A5 (128, 64, 32, 16, 8 und 4 Zellen/Well)

Diese Mischklone wurden ausgewählt weil sie unter dem Lichtmikroskop deutlich größere Kolonien gebildet hatten als die anderen. Der Klon 5A3 war der einzige der von einem 24-Well ausgehend verdünnt wurde, daher setzte sich dieser Mischklon aus entsprechend mehr Einzelklonen zusammen (deswegen die höhere Verdünnung). Die anderen zwei Mischklone (ausgehend von 96-Well-Platten) wurden aufgrund der geringen Gesamtzellzahl weniger hoch verdünnt.

Anschließende ELISA- Tests gaben, mit wenigen schwachen Ausnahmen (lagen beim 1 ½ fachen Wert des Hintergrundes, nicht beim doppelten Wert), keine positiven Signale. Einzig bei der Verdünnung des Klons 7A5 zeigte ein Mischklon ein niedriges ELISA- als auch Westernsignal, bei den Verdünnungen der Klone 5A3 und 7C2 konnten keine Signale mehr detektiert werden (weder ELISA noch Westernblotanalyse).

Trotzdem wurden diese schwach erhöhten Überstände und Pools aus Überständen von je 8 Wells auf Westernblot getestet.

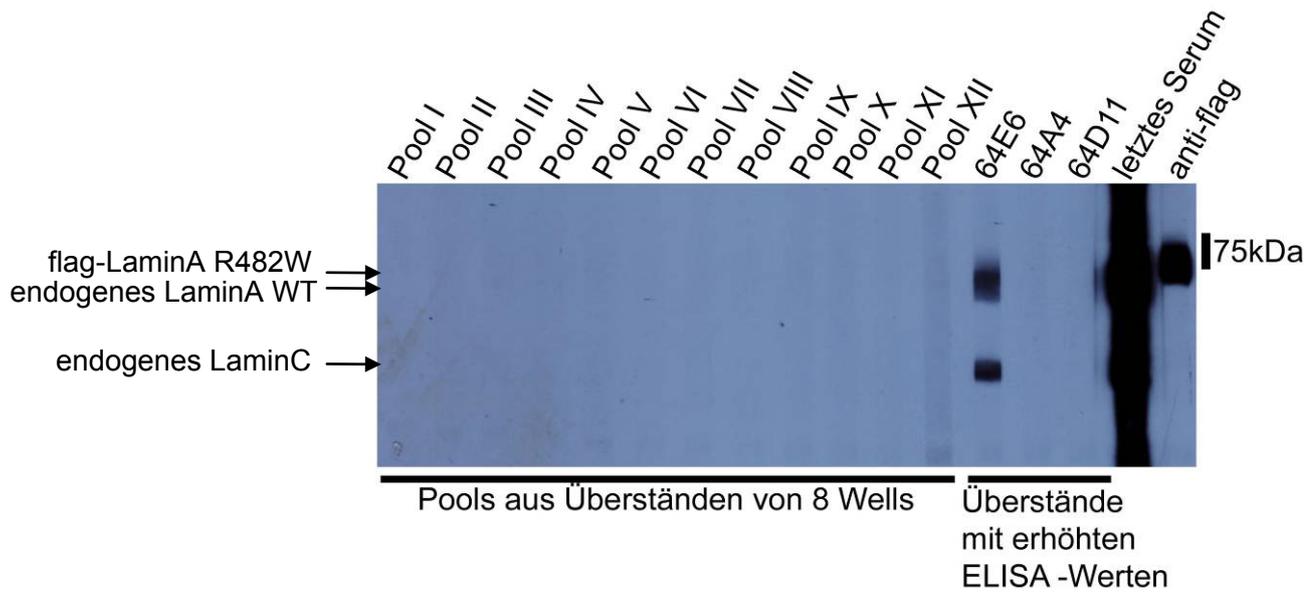


Abbildung 39: Westerndetektion von Pools und schwach ELISA positiven Mischklonen (64E6, 64A4, 64D11 alle 1:10) aus der Verdünnung des Mischklons 7A5. HeLa -Lysat mit exogenem flag -LaminA R482W auf 7,5% SDS-PAA-Gel. Mausserum 1:1000, anti-flag Ak 1:10 000.

Die Signale des Überstandes des Mischklons 64E6 entsprachen dem des Ausgangsklons und waren unspezifisch gegen den Ig -fold gerichtet, die Ak differenzierten also nicht zwischen mutierter und WT-Form von LaminA (Test auf HeLa flag-LaminA R482W Lysat). Die Verdünnungsstufen wurden in der anschließenden Verdünnung sehr hoch gewählt, da nur wenige Klone in dem Well lokalisiert waren (2x1,5 und 1x 3 Zellen pro Well). Der ELISA zeigte einige sehr schwach positive Signale für einzelne Klone die wieder im Westernblot getestet wurden (durchgeführt 1 Woche nach der erneuten Verdünnung des Mischklons 64E6).

Erst nach einer einstündigen Belichtung zeigten die Klone 1,5aC1 und 1,5aF1 schwache Banden. Deren Bandenschema hatte sich allerdings im Vergleich zum Ausgangsklon insofern verändert (Daten nicht gezeigt), dass die Klone nur die Bande auf Höhe des flag getaggten mutierten LaminA-R482W erkannten. Dies würde bedeuten, dass sich der vorhergehende Mischklon noch aus mehreren LaminA -spezifischen Klonen zusammengesetzt hatte, von denen zumindest einer wirklich für die mutierte Form spezifisch war, der auch hier isoliert wurde. Aufgrund des sehr schwachen Signals wurden die Klone weiter angezüchtet und noch nicht weiter verdünnt. Bei wiederholten Western- und ELISA - Tests konnten die Signale nicht mehr bestätigt werden. Entweder starb der Klon von Interesse ab, oder er verlor seine Fähigkeit zur Ak- Produktion.

In diesem Stadium (mehrere Klone waren ja noch für weitere Studien eingefroren, sowie noch mehrere Mäuse für Fusionen verfügbar) wurde die Arbeit an den nächsten Diplomanden übergeben.

5.2 *Arbeit mit Lap2α*

5.2.1 Immunisierungsansatz mit KLH-gekoppelten Peptiden

Die zwei ausgewählten Peptide:

Lap2α homo sapiens, WT-Sequenz: 684-CKVIKKRGNKH-COOH

Lap2α homo sapiens; mutierte Sequenz (R690C): 684-CKVIKKCGNKH-COOH

Die Peptide wurden so gewählt, dass die Mutation zentral in der Mitte des Peptides lag. Diese 11 AS entsprechen der Sequenz der 11 carboxyterminalen AS des humanen Lap2 alpha. Die Kopplung des Peptides an das Trägermolekül erfolgte über ein Cystein. Allerdings war die Mutation im angeführten Fall auch eine Substitution von Arginin zu einem Cystein. Es ist also möglich, dass das Peptid auch über das interne Cystein und nicht das endständige gekoppelt wurde. In diesem Fall wäre es für die entstehende Immunantwort schwerer oder zumindest anders zugänglich. Unter diesen Bedingungen herrschten von Anfang an unterschiedliche Voraussetzungen für die Entstehung der Immunantworten zwischen den beiden Peptiden. Rückblickend hätte eine andere Mutation für diesen Immunisierungsansatz gewählt werden sollen.

Für die Immunisierung (durchgeführt laut Protokoll) mit dem gekoppelten WT -Peptid wurden 2 und mit dem R690C-Peptid 3 RBF-Mäuse herangezogen.

Das vollständige Lap2α-Protein hat eine berechnete Größe von 75,3kDa.

5.2.1.1 Tests der Immunsera

Am Beginn waren Lysate der folgenden Zelllinien für den Westernblot bestimmt.

- 3T3 GFP-Lap2α WT (Cl#91)
- HeLa GFP-Lap2α WT
- HeLa Teton Lap2α WT myc
- HeLa Teton Lap2α DCM myc

Wie die Zelllinien, wurden auch die verwendeten monoklonalen und polyklonalen Lap2α - Kontroll -Ak vom Labor Roland Foisner zur Verfügung gestellt und richten sich gegen die folgenden Epitope:

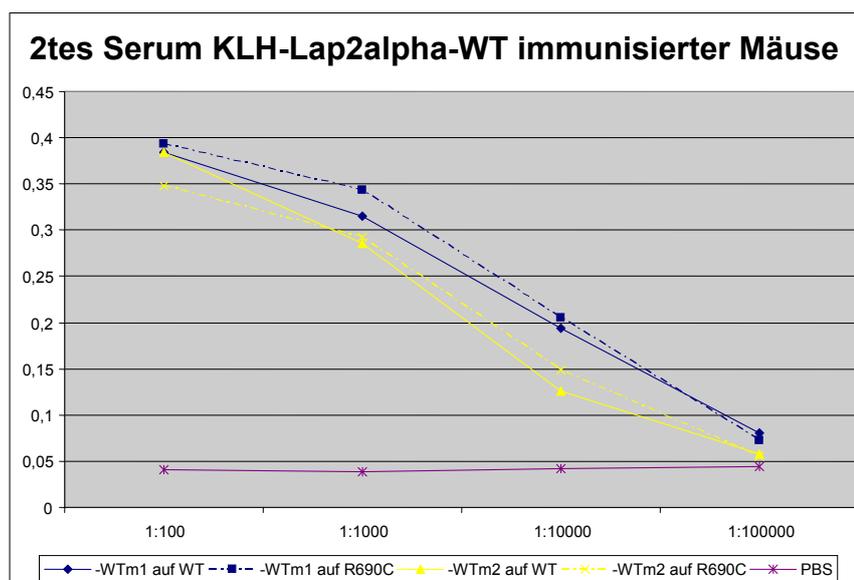
- 9: bindet im Bereich von AS 255-409
- 11/2: bindet im Bereich von AS 233-253
- 15/2: bindet im Bereich von AS 415-615
- polyklonaler Ak: gegen die ganze Sequenz von humanem Lap2α gerichtet

Die verfügbaren Zelllinien stellten sich allerdings aus folgenden Gründen als nicht geeignet zum Testen der generierten Mausseren heraus (Seren wurden getestet, lieferten aber keine eindeutigen Ergebnisse, Daten nicht gezeigt):

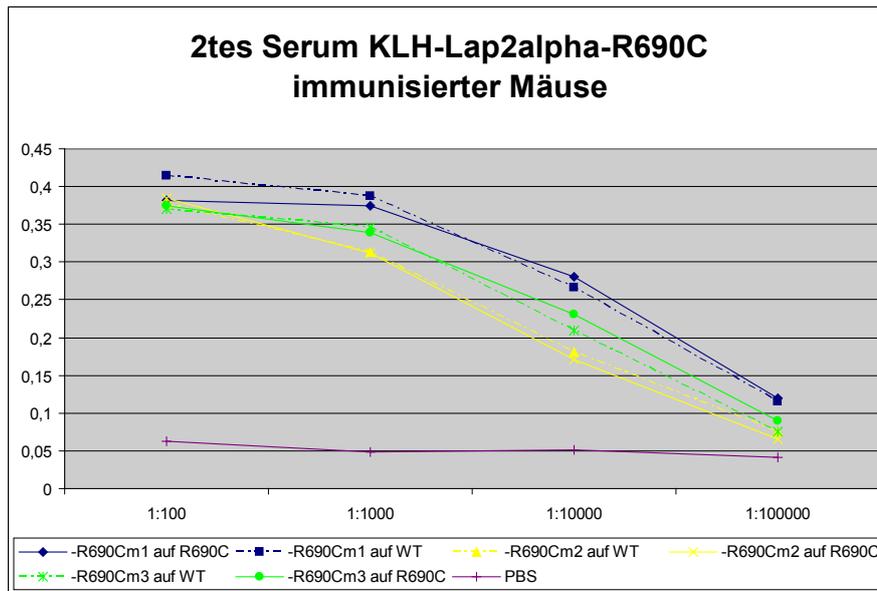
- der myc -Tag lag C -terminal von Lap2 α und daher war die, im WT vorhandene, Carboxygruppe anders lokalisiert
- um den myc -Tag C -terminal an Lap2 α zu klonieren wurde das Stopp -Codon in ein Leucin umgewandelt und ein kurzer Linker angefügt (=> ...-leu-gln-gln-phe-...), dadurch wurde die Primärsequenz des nativen Lap2 α verändert
- auch die N-terminal GFP-getaggte Zelllinie trug diesen verlängerten Carboxyterminus und präsentierte somit auch nicht die nativ vorkommende Carboxygruppe

Aufgrund der negativen Testergebnisse, die durch die oben genannten Gründe erklärbar waren, wurden die Seren im ELISA ausgetestet. Zur Beschichtung der ELISA- Platten wurden ungekoppelte Peptide (Sequenz der 11 AS die auch an KLH gekoppelt wurden) verwendet.

Zur Kontrolle wurde das 2te Serum der Mäuse in verschiedenen Verdünnungen auch auf Kreuzreaktivität mit dem jeweils inversen Peptid (für WT- immunisierte Mäuse mutiertes Peptid und umgekehrt) getestet.



a)



b)

Abbildung 40: Verdünnungen des 2ten Serums der KLH-Lap2 α -immunisierten Tiere. Linie für das Signal am Immunisierungspeptid ist durchgezogen, Linie für das Signal am inversen Peptid ist strichliert. a) Signale der -WT Peptid immunisierten Tiere b) Signale der -R690C Peptid immunisierten Tiere.

Aufgrund dieser Ergebnisse waren noch keine Rückschlüsse auf Spezifität möglich, denn in allen Fällen verliefen die beiden Linien für jede Maus nahezu parallel. Die Signale in allen Verdünnungsstufen waren auf beiden Peptiden beinahe ident. Für jedes Mausserum konnte ein Lap2 α -spezifischer Titer nachgewiesen werden.

Für die WT -immunisierten Mäuse wurde weiterführend ein Depletions -ELISA gemacht (jeweils 2tes Serum in einer Verdünnung von 1:500)

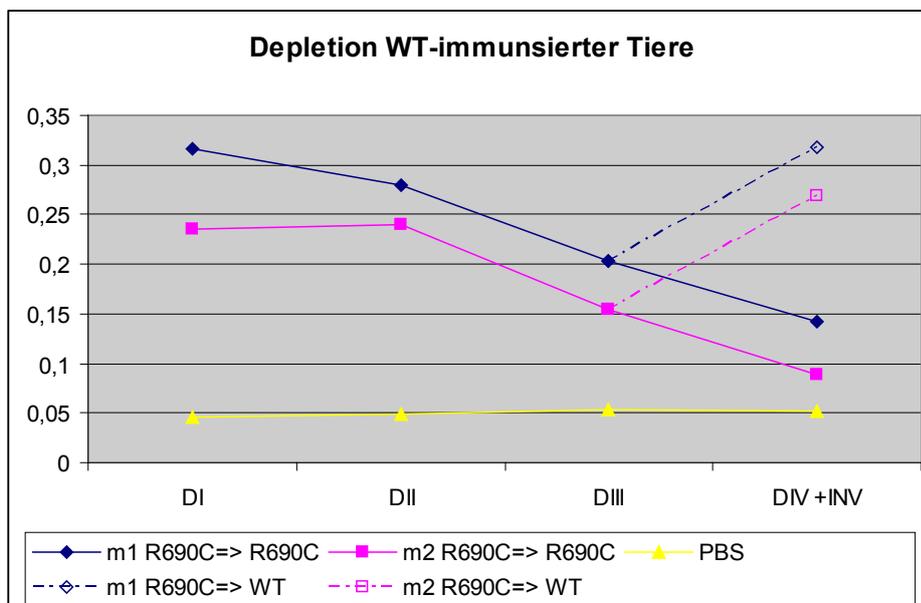


Abbildung 41: Excel-Darstellung eines Depletion-ELISA für die mit KLH-WT immunisierten Tiere. Die Antiseren beide Tiere zeigen einen deutlichen Anstieg des Signals beim inversen Schritt

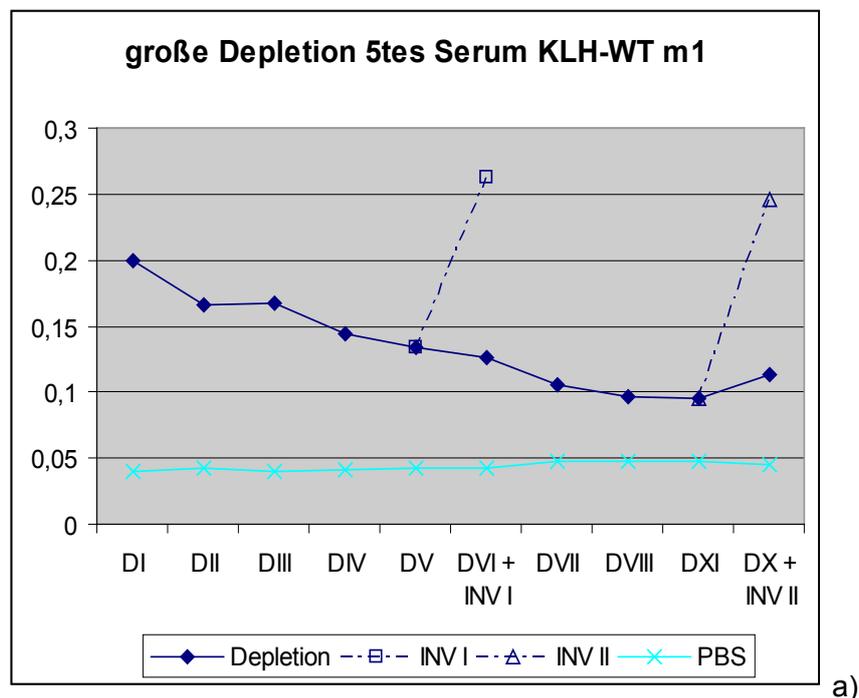
Der Test wurde nur mit 3 Depletions -Schritten durchgeführt, weswegen das Signal nicht bis auf den Hintergrundlevel sank, dennoch war der erzielte Effekt ersichtlich. Bei der Inkubation

mit dem Immunisierungspeptid stieg das Signal in beiden Fällen wieder auf den Anfangswert.

Nach dem dritten Depletions -Schritt trennen sich die Linien, da ein Teil der depletierten Überstände auf dem R690C-Peptid getestet wurden (Depletionsschritt IV, gezeigt durch durchgezogene Linie) und der andere Teil auf dem WT -Peptid (inverser Schritt, gezeigt durch gestrichelt – punktierte Linie). Ganz eindeutig enthielten die auf R690C depletierten Seren WT -spezifische Ak. Dies galt für beide Mäuse, doch Maus 1 hatte einen höheren Titer an WT -spezifischen Ak.

Dieser Versuch wurde daraufhin mit mehreren Depletions -Schritten mit dem 5ten Serum der WT -immunisierten Maus1 wiederholt, um die WT-Lap2 α spezifischen Ak auch in einem Westernblot nachzuweisen. Dazu wurden in vitro Translatate von Lap2 α WT und R690C hergestellt. Für die in vitro Translatate dienten die Vektoren gAG49 =>WT und gAG50 => R690C als Templates.

Für die depletierten Seren wurde nun auf dem R690C Protein kein Signal erwartet, da die Ak die auch dieses Protein erkennen können, durch die Depletions -Schritte aus dem Serum entfernt wurden. Hingegen sollte das depletierte Serum mit dem WT -Protein ein Signal geben, falls Ak gegen das WT- spezifische Epitop vorhanden waren.



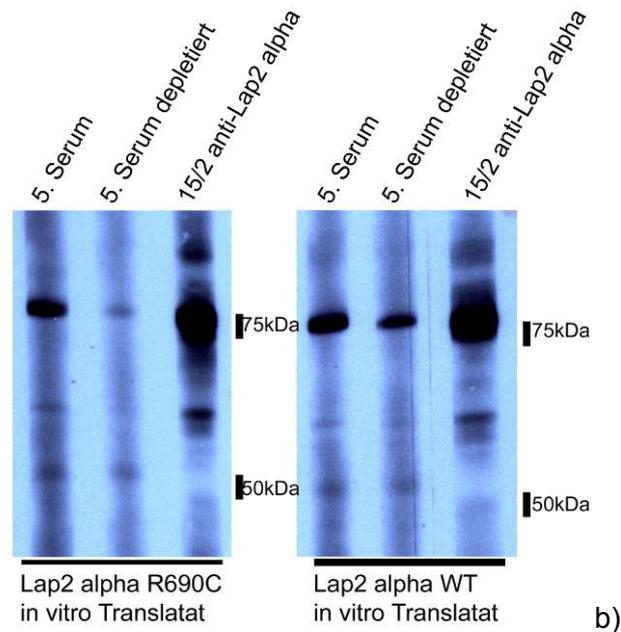


Abbildung 42: a) Excel-Darstellung der ELISA Resultate Depletion wonach das Serum für die Inkubation der folgenden Westernstreifen eingesetzt wurde. Depletion erfolgte über Lap α -R690C Protein; inverser Schritt auf WT-Lap2 α b) Westerndetektion auf in vitro Translataten von Lap2 α WT und R690C mit Serum der KLH-WT immunisierten Maus 1. Serumverdünnung 1:1000, 15/2 1:10. 7,5% SDS-PAA-Gel

Zunächst wurde eine Depletion in 10 Schritten über das R690C-Protein gemacht (Abb. 42 a)). Nach dem 5. und 9. Schritt wurde jeweils ein Well als Kontrolle auf dem WT-Protein inkubiert (in der Grafik strichliert), bei diesen zwei inversen Kontrollschritten stieg das Signal jeweils über Anfangsniveau. Der Hauptteil des Serums wurde jedoch bis zum 10ten Schritt weiter auf dem mutierten Protein geführt. Im Laufe der Depletion nahm das Signal konstant ab, erreichte aber nicht Hintergrundlevel.

Das Ausgangsserum erkannte beide in vitro translatierte Proteine, sowohl WT als auch R690C in der Westernblotanalyse (Abb. 42 b)). Dabei zeigte der Kontrollantikörper (15/2) auf beiden in vitro Translataten ein ähnlich starkes Signal, was für eine vergleichbare Menge an eingesetztem in vitro Translatat sprach. Das depletierte Serum hingegen differenzierte eindeutig zwischen der WT- und der mutierten Form des Proteins. Natürlich war die vom depletierten Serum detektierte Bande des WT -Proteins schwächer als die die vom Ausgangsserum erkannt wurde, es wurde ja nur eine kleine Fraktion der gesamten Ak isoliert. Im Vergleich zu der Inkubation auf R690C-Protein war das Signal jedoch deutlich stärker.

Die Depletion wurde nun auch für die R690C-immunisierten Tiere durchgeführt (3tes Serum, 1:500).

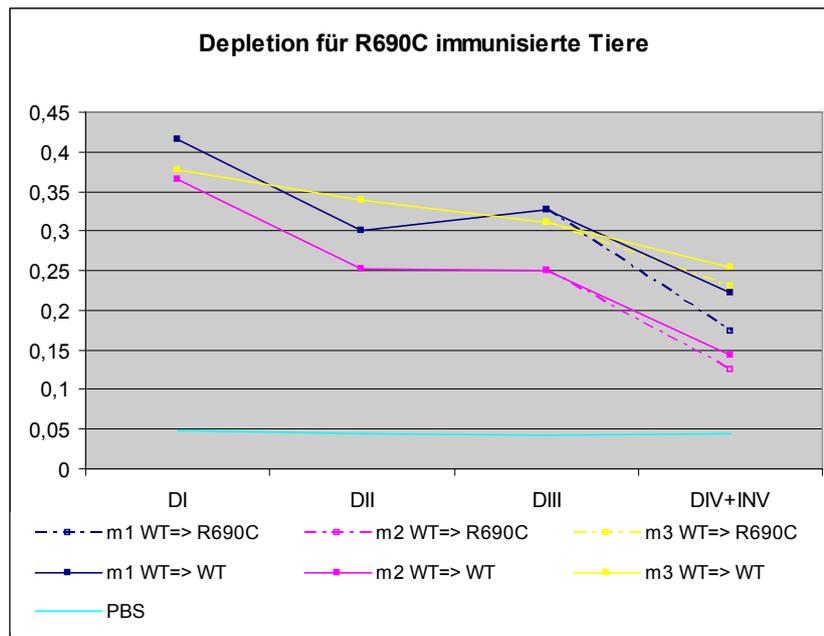


Abbildung 43: Depletions –ELISA Resultate für das 3te Serum KLH-R690C immunisierten Tiere. Die durchgezogene Linie steht wieder für einen weiteren Depletions -Schritt, die strichliert - punktierte Linie für den inversen Schritt.

Im Gegenteil zu den Seren der Tiere die mit KLH -WT Proteinen immunisiert wurden, ist bei den Tieren die mit KLH-R690C Protein immunisiert wurden kein spezifischer Titer gegen Lap2 α R690C nachweisbar. Es fiel dabei auf, dass obwohl diese Mäuse mit R690C immunisiert wurden, der Titer gegen Lap2 α R690C geringer war als gegen das WT-Peptid. Dies könnte dadurch begründet sein, dass das R690C –Beschichtungspeptid für den ELISA ein wenig geringer konzentriert war als das WT –Peptid. Dieser Rückschluss hatte auch Auswirkung auf die Testreihe mit den WT -immunisierten Tieren, da deren Seren über das wahrscheinlich schwächer konzentrierte Peptid depletiert wurden und der inverse Schritt mit dem höher konzentrierten WT -Peptid durchgeführt wurde. Doch der Anstieg des Signals beim inversen Schritt der Depletion der WT -immunisierten Tiere (Abb.41 und 42 a)) war sehr hoch und die Existenz von WT –spezifischen Ak wurde auch in der Westerblotanalyse bestätigt.

Nachdem keine R690C spezifischen Ak nachgewiesen werden konnten, wurde ein alternativer Ansatz entwickelt. Der Nachteil der Mutation zu einem Cystein in dieser Form des Immunisierungsansatzes (mögliche interne Kopplung an das Trägerprotein KLH und Komplexierung in Schwefeldisulfidbrücken) wurde durch eine Mutation zu einem Serin umgangen. Serin und Cystein sind sehr ähnliche AS und kommen auch oft als Substitutionen ohne Auswirkung vor. Daher bestand die Möglichkeit, dass ein R690S spezifischer Ak auch die R690C Mutation detektieren könnte. Dieser Ansatz wurde im Immunisierungsversuch mit DnaJ -Fusionsprotein weiterverfolgt.

Nach den gescheiterten Versuchen der Immunodetektion auf den verfügbaren Zelllysaten (3T3 GFP-Lap2 α WT (Cl#91); HeLa GFP-Lap2 α WT; HeLa Teton Lap2 α WT myc; HeLa Teton Lap2 α DCM myc) wurde nun eine neue HeLa- Zelllinie getestet (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt vom Labor von Luc Schneider). Diese exprimiert eine N-terminal mRFP getaggte Version von Lap2 α –WT und hatte im Gegensatz zu den bisher verfügbaren Zelllinien die korrekte Primärsequenz im C-Terminus von Lap2 α . Zu dieser Zelllinie stand jedoch nicht die passende R690C mutierte Zelllinie zur Verfügung.

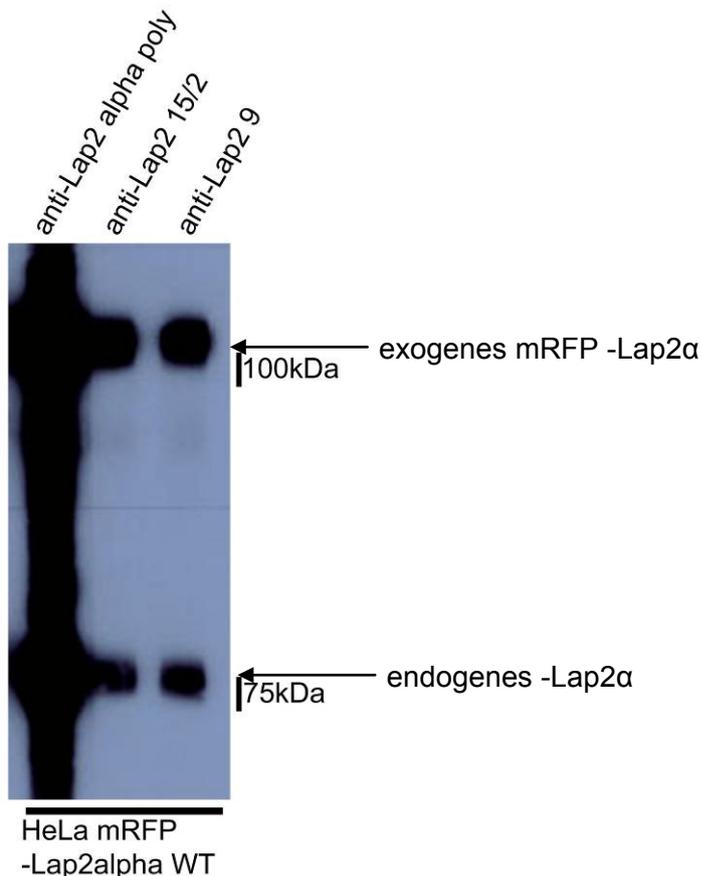


Abbildung 44: Westerntest des neuen HeLa mRFP-Lap2 α -WT Lysats mit Kontrollantikörpern (alle drei zur Verfügung gestellt vom Labor von Roland Foisner). polyklonaler anti-Lap2 α Ak (Kaninchenserum) 1:20000; monoklonale Ak 1:10 eingesetzt. 7,5% SDS-PAA-Gel

Die gewählte Belichtungszeit war für den polyklonalen Kontroll -Ak viel zu lange, beziehungsweise wurde er viel zu konzentriert (1:20 000) eingesetzt. Die Signale der monoklonalen α -Lap2 α -Ak (15/2 und 9) ließen aber eindeutig den Rückschluss auf ein gutes und hohes Expressionslevel der exogenen mRFP getaggtten Form von Lap2 α -WT zu. Der Expressionslevel des exogenen schien gering höher als der des endogenen Lap2 α . Im direkten Vergleich der beiden verfügbaren Lysate mit N-terminal getaggttem Lap2 α -WT (unterscheiden sich durch Tag und modifizierte CTD) wurde getestet, ob die Zelllinie mit mRFP getaggttem Lap2 α andere Ergebnisse im Westernblot zeigen würde. Denn durch den modifizierten C-Terminus im GFP getaggtten Lap2 α fehlte mit der versetzten Carboxygruppe ein wichtiger Teil des Antigens. In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) zeigten Tests der

Mausseren auf Westernblots mit dem GFP-getaggetem Lap2 α nicht die erwarteten Signale. Für den Test wurden zwei Mausseren und Kontrollantikörper auf den verschiedenen Lysaten Seite an Seite getestet:

- HeLa mRFP-Lap2 α WT
- HeLa GFP-Lap2 α WT, verlängerter CTD

Die verwendeten primären Ak sind dabei:

- 3A3 (monoklonaler α -Lap2 α -CTD Ak => siehe Fusion KLH-Lap2 α R690C Maus 3; siehe Kap. 5.2.2.)
- polyklonaler α -Lap2 α Ak (Kaninchenserum, generiert gegen die vollständige Lap2 α -Sequenz)
- Serum einer KLH-Lap2 α R690C immunisierten Maus
- Serum einer DnaJ-Lap2 α WT immunisierten Maus

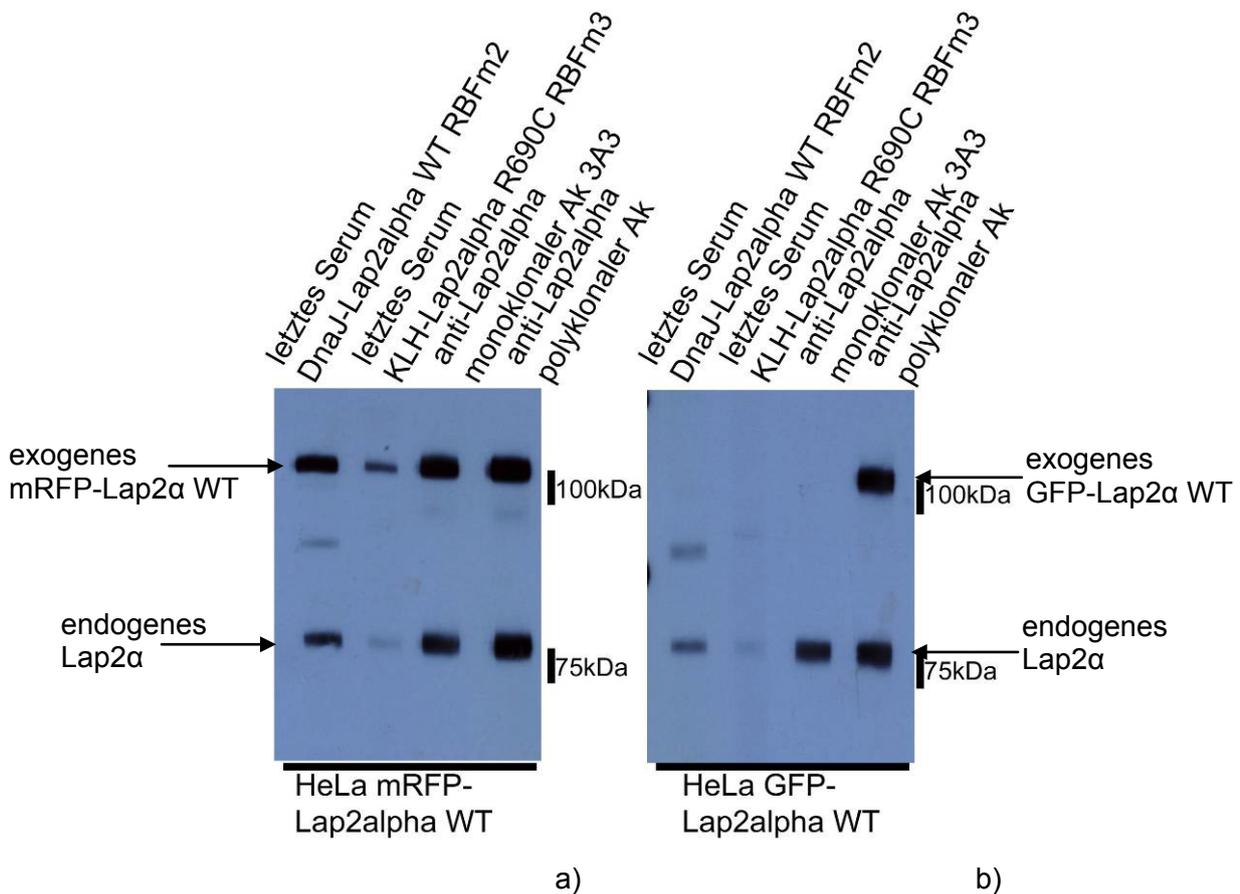


Abbildung 45: Westerndetektion von verschiedenen Lap2 α erkennenden Ak auf zwei verschiedenen Zelllysaten, Seren wurden 1:1000 eingesetzt, polyklonaler Ak 1:300 000 und der monoklonale Ak 3A3 1:100 a) HeLa –Lysat, exogen mRFP-Lap2 α –WT b) HeLa Lysat , exogen GFP-Lap2 α –WT (veränderter C-Terminus von Lap2 α). 7,5% SDS-PAA-Gel

Der polyklonale Lap2 α –Ak (der gegen die vollständige Sequenz von Lap2 α gerichtet ist; zur Verfügung gestellt vom Labor von Roland Foisner) erkannte sowohl das mRFP getaggte, das GFP getaggte als auch das endogene Lap2 α in den HeLa –Lysaten gut, was auf vergleichbare Zugänglichkeit, Expressionsverhalten und ähnliche Konzentration der Antigene

in beiden Lysaten hinwies. Die exogen exprimierten Proteine wurden von diesem Ak auch ähnlich gut erkannt, nicht aber von all den Ak die gegen den C-Terminus gerichtet waren. Sowohl die Mausseren als auch der 3A3 –Ak (beide gegen den C-Terminus von Lap2 α gerichtet) erkannten nur das mRFP getaggte Lap2 α , nicht jedoch das GFP getaggte. Der Unterschied zwischen den Fusionsproteinen lag nur in dem, gegenüber dem WT-Lap2 α , verlängerten CTD des GFP getaggten Lap2 α -WT. Im mRFP getaggten Lap2 α -WT ist der C-Terminus ident zum endogen exprimierten Protein (mit endständiger Carboxygruppe am terminalen Histidin). Im Gegensatz dazu ist der C-Terminus im GFP getaggten Protein um 4 AS verlängert und somit verändert. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass diese Veränderung in der Primärsequenz mit der Erkennung von Lap2 α interferiert. Aufgrund des guten Expressionssignals von mRFP-Lap2 α -WT wurden nun auch die zuletzt genommenen Seren der WT-immunisierten Mäuse auf diesem Lysat getestet:

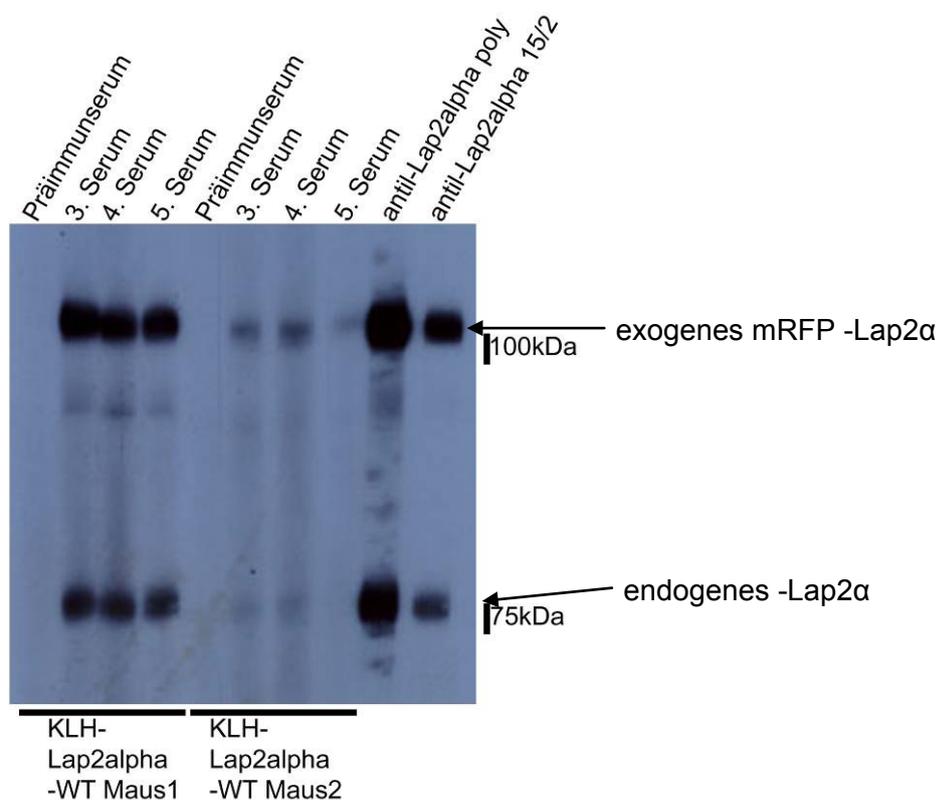


Abbildung 46:Westerblotanalyse der KLH-Lap2 α -WT Seren auf dem Lysat von HeLa mRFP-Lap2 α -WT, Seren 1:1000; polyklonales Serum 1:100 000; monoklonaler Ak 1:10 eingesetzt. 7,5% SDS-PAA-Gel

Die Antiseren beider Mäuse erkannten sowohl endogenes als auch exogenes Lap2 α , obwohl der Titer der Maus 1 deutlich besser und um ein Vielfaches höher war (deckt sich mit Ergebnissen des ELISA).

Basierend auf all diesen vorausgegangenen Ergebnissen wurde zunächst die WT-immunisierte Maus 1 für eine Fusion ausgewählt. Sie zeigte nachweislich (Depletions-ELISA Abb. 41 und 42a)) einen spezifischen Titer und war daher zur Isolierung eines Klonen zur Produktion eines punktspezifischen Ak vielversprechend. Danach wurde eine Fusion mit der KLH-R690C immunisierten Maus 3 gemacht, da sie generell einen sehr hohen Titer hatte

(ELISA-Signale deutlich über denen der WT-immunisierten Tiere). Diese Fusion wurde in erster Hinsicht mit dem Ziel gemacht einen Lap2 α -CTD spezifischen Ak zu isolieren und nicht mit dem Ziel der Gewinnung eines punktmutations spezifischen Ak.

5.2.1.2 Fusionen von KLH-Lap2 α immunisierten Mäusen

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die KLH-Lap2 α WT Maus 1 für eine Fusion ausgewählt. Entsprechend dem Protokoll wurde eine Fusion mit der X63 Myelomzelllinie gemacht in einem Verhältnis von 1:2 zugunsten der Milzzellen. Ausgesät wurden die fusionierten Hybridomzellen auf 10x24-Well-Platten.

Der ELISA wurde nur auf Lap2 α -WT Peptid beschichteten Platten ausgeführt, ließ also noch keine Rückschlüsse auf die Spezifität der positiv getesteten Mischklone zu. Eine Reihe von Mischklonen zeigte ein Signal im ELISA. Diese Klone wurden weiterführend auf dem Lysat HeLa mRFP-Lap2 α WT getestet:

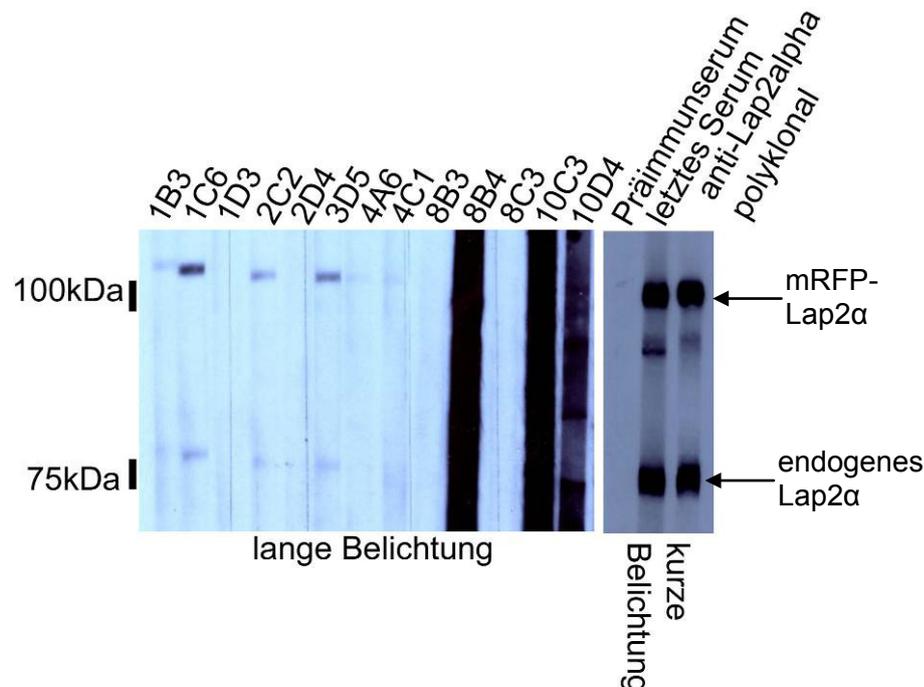


Abbildung 47: Westernblotanalyse der Überstände von Mischklonen aus der Fusion der Maus KLH-Lap2 α WT m1 auf Streifen des HeLa-Lysat mRFP-Lap2 α -WT. Klone (Überstände waren 1:4 verdünnt) 1B3, 1C6, 2C2, 3D5, 4A6 und 4C1 zeigen größtenteils schwache aber spezifische Banden (sowohl für das endogene als auch das getaggte Lap2 α). Die kurze Belichtung ermöglicht den Abgleich mit den Kontrollstreifen (unter langer Belichtung überbelichtet). Seren 1:1000, polyklonaler Ak 1:300 000. 7,5% SDS-PAA-Gel

Die Überstände der Mischklone 1B3, 1C6, 2C2 und 3D5 zeigten auch auf den Westernblots ein schwaches Signal. Für die Mischklone (8B4, 10C3 und 10D4), die in der gezeigten Abbildung keine Banden aufgrund der Überbelichtung erkennen ließen, waren auch bei kürzerer Belichtung keine spezifischen Banden nachweisbar.

ELISA- und Westernsignale korrelierten dabei nicht miteinander. Dies ist allerdings nicht ungewöhnlich, da es eine bekannte Diskrepanz zwischen diesen beiden Testmethoden gibt. Natürlich unterliegt das Antigen bei der zellulären Expression, wie sie beim Zelllysat vorliegt,

einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen, denen das ELISA präsentierte Peptid nicht ausgesetzt ist. Außerdem unterliegt das Peptid im ELISA keine denaturierenden Bedingungen, könnte also native Sekundärstrukturen annehmen.

Diese beschriebene Diskrepanz erklärt auch wieso der als Negativkontrolle gewählte Klon 1C6 ein Westernsignal gab.

Am Tag nach der Westerndetektion wurde der ELISA auf R690C Peptid wiederholt (Tab.3) um Hinweise auf Spezifität der Ak zu erhalten. Dabei wurden weitere positive Signale detektiert. Wieder wurden alle Klone auf Westernstreifen getestet (Abb. 48). Die Absolutwerte der durchgeführten ELISA sind aufgelistet, dienen aber nur als Richtlinie, da sie ja nicht am gleichen Tag entstanden. Für ein Signal auf R690C-Peptid hatten die Klone 2 Tage länger Zeit für die Ak -Produktion.

Streifen#	Zellysate in der Westernblotanalyse	Mischklon	ELISA Signal R690C (2 Tage nach ELISA auf WT -Peptid)	ELISA Signal WT
1	HeLa mRFP-Lap2 α WT	1B1	0,084	0,098
2		1B3	0,099	0,108
3		1C6	0,063	0,055
4		1D1	0,068	0,045
5		1D2	0,051	0,044
6		1D3	0,059	0,038
7		2C2	0,081	0,111
8		2D4	0,076	0,110
9		3D5	0,077	0,107
10		4A6	0,057	0,117
11		4C1	0,082	0,112
12		4D6	0,073	0,099
13		8B3	0,057	0,124
14		8B4	0,060	0,113
15		8C3	0,076	0,109
16		8D4	0,085	0,095
17		α -Lap2 α poly		
18	HeLa mRFP-Lap2 α WT (aus einer anderen Nitrocellulose)	10C3	0,089	0,100
19		10D4	0,062	0,100
20		letztes Serum WT Maus 1		

Tab. 3: ELISA -Werte der Überstände jener Klone aus der Fusion der KLH-Lap2 α -WT Maus1, die erhöhte ELISA -Werte zeigten. Der Test wurde auf Lap2 α -WT und -R690C Peptid durchgeführt. Überstände mit Lap2 α WT-spezifischen Signalen sind rot hinterlegt.

Mischklone die schon bei dem früher durchgeführten Test auf WT -Peptid ein deutlich höheres Signal gaben und daher einen Hinweis für einen WT -spezifischen Klon gaben, sind rot hervor gehoben.

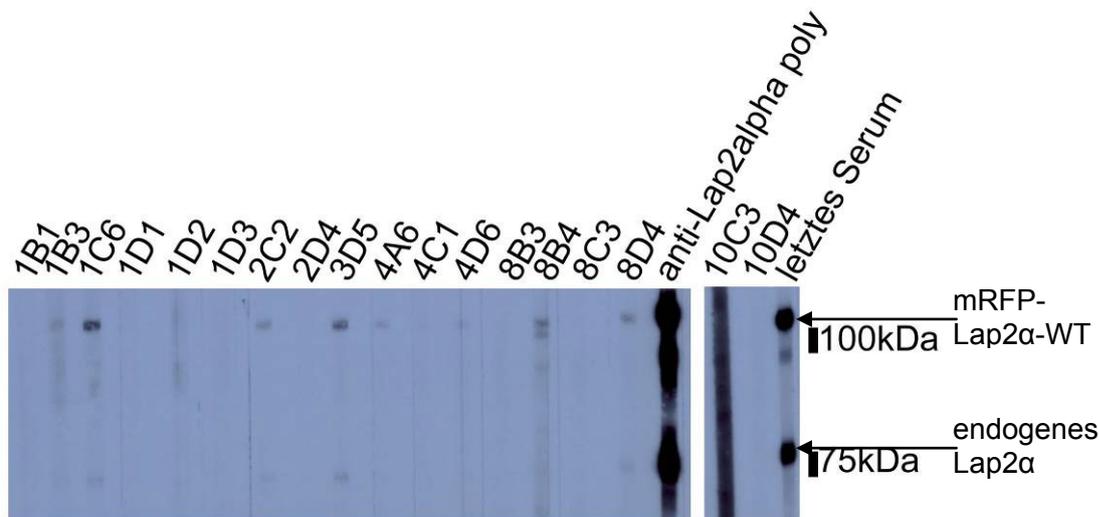


Abbildung 48: Westerndetektion der ELISA -positiven Überständen auf HeLa mRFP-Lap2 α -WT Lysat; Klone 1B3, 1C6, 2C2, 3D5, 4A6 8B4 und 8D4 zeigen auf Höhe des endogenen Lap2 α und des exogenen mRFP-Lap2 α Banden. Überstände 1:4 verdünnt, letztes Serum 1:2000. polyklonaler Ak 1:300 000. 7,5% SDS-PAA-Gel

In dieser Westernblotanalyse konnte der Klon 1C6 bestätigt werden, generell waren aber die erreichten Signale der Mischklone sehr schwach. Der Klon 1C6 erkannte das getaggte Lap2 α offensichtlich besser als das endogene Protein, was aber auch auf einen leicht erhöhten Expressionslevel des exogenen Fusionsproteins zurückzuführen war.

Aufgrund dessen, dass Western -positive Ak auch sonst ein breites Anwendungsspektrum bieten wurde der Klon 1C6, trotz des fehlenden ELISA -Signals, zwecks Einzelklonisierung verdünnt.

Die anderen signalgebenden Mischklone waren alle vergleichbar. Alle gaben sehr schwache Banden, jeweils für das exogene mRFP-Lap2 α -WT gering stärker als für das endogene Lap2 α . Ausgenommen der Klon 8B4, er gab auf Höhe des getaggtten Lap2 α eine Doppelbande, auf die jedoch nicht näher eingegangen wurde. Alle schwach Western -positiven Klone wurden eingefroren.

Die Tests, die an die Verdünnung des Klons 1C6 angeschlossen wurden, lieferten keine positiven Ergebnisse mehr. Der Klon ging wahrscheinlich aufgrund der chromosomalen Instabilität verloren.

Die nächste Fusion, mit dem Ziel einen Ak zu isolieren der allgemein den Carboxyterminus von Lap2 α erkennt, wurde mit der KLH-R690C immunisierten Maus 3 gemacht, da deren Seren in den vorausgegangenen Tests sowohl Lap2 α -WT als auch -R690C detektierten. Die Fusion wurde mit der X63-Myelomzelllinie und in einem Verhältnis von 1:1 gemacht. Ausgesetzt wurden die fusionierten Zellen wieder auf 10x24-Well-Platten.

Der ELISA auf R690C-Peptid (Werte nicht gezeigt) lieferte eine große Zahl von hoch positiven Mischklonen, die weiter auf Westernstreifen getestet wurden (HeLa mRFP-Lap2 α – WT Lysat, da noch keine Zelllinie verfügbar war, die Lap2 α R690C expremierte).

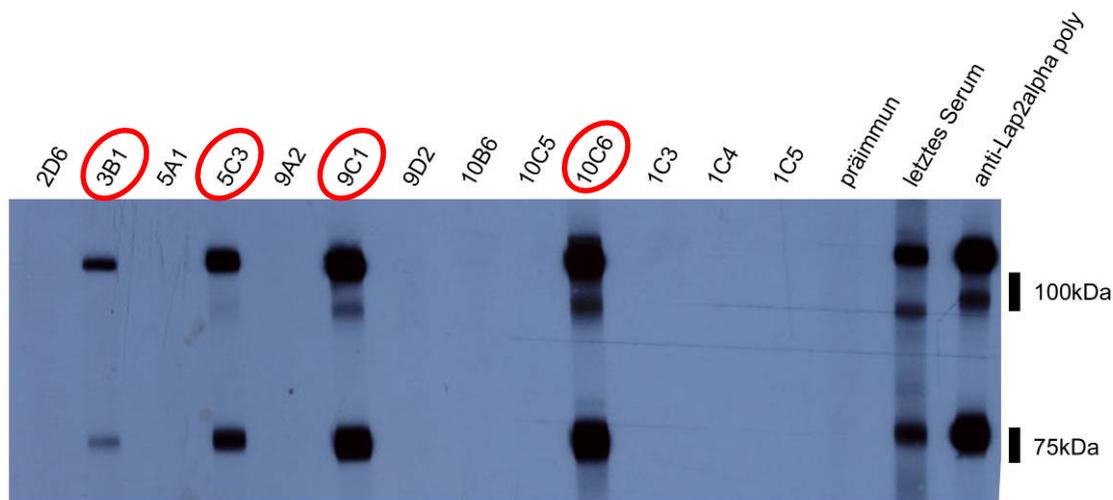


Abbildung 49: Westerndetektion der ELISA -positiven Mischklone aus der Fusion der KLH-R690C immunisierten m3. Western- und ELISA -Signale korrelieren zum größten Teil. Mausseren 1:1000, Überstände 1:5, polyklonaler Ak 1:300 000. 7,5% SDS-PAA-Gel

Die Überstände vieler Mischklone zeigten schon nach kurzer Belichtungszeit ein deutliches, Lap2 α spezifisches Signal auf dem Zelllysat. Die deutlichsten Signale zeigten die Überstände der Mischklonen 3B1, 5C3, 9C1 und 10C6 was in diesem Fall auch mit den hohen ELISA -Werten korrelierte.

Die Verdünnung zur Einzelklonisierung wurde mit dem Mischklon 9C1 gemacht, da der Überstand dieses Klons Lap2 α im Westernblot sehr gut erkannte und das Signal auch wenige Hindergrundbanden zeigte. Bereits der erste durchgeführte ELISA dieser Verdünnung zeigte eine Reihe von hoch positiven Klonen, die daraufhin wieder im Westernblot getestet wurden.

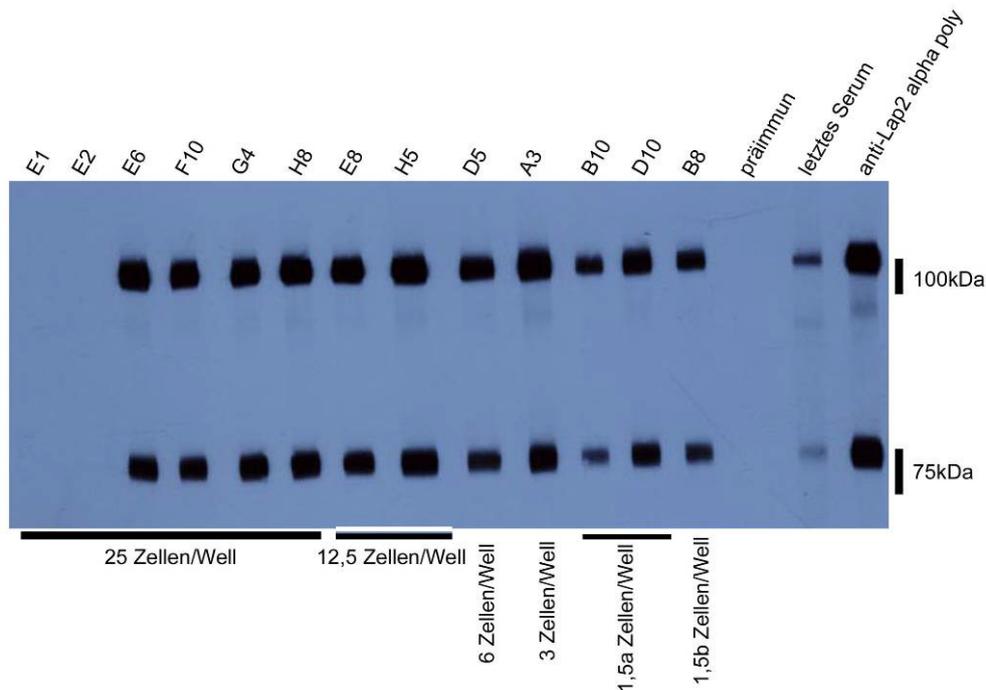


Abbildung 50: Westerndetektion, der ELISA-positiv getesteten Überstände der Verdünnung des Mischklons 9C1. E1 und E2 sind Negativkontrollen. Überstände 1:10 verdünnt; Mauseren 1:1000 und der polyklonaler Ak 1:300 000. 7,5% SDS-PAA-Gel

Positive Signale kamen von allen getesteten Überständen und auch von bereits potentiellen Einzelklonen: Klon 3A von der Platte mit errechneten 3 Zellen pro Well und die Klone B10 und D10 einer der Verdünnungsplatten mit errechneten 1,5 Zellen pro Well. Klon 3A3 wurde nun wiederum auf einer Platte mit 2 Zellen/Well ausgesät, da er unter dem Lichtmikroskop am wahrscheinlichsten ein Einzelklon war und unter den potenziellen Einzelklonen das stärkste Signal gab. Alle anderen Klone (Misch- als auch potenzielle Einzelklone) wurden eingefroren. Aufgrund dessen, dass alle Überstände der Verdünnungsplatte des Klons 3A3, in denen sich auch mindestens eine Kolonie befand, positive ELISA –Werte gaben, war es statistisch sehr wahrscheinlich, dass der Klon 3A3 bereits ein Einzelklon war.

Dann wurde der Klon schrittweise vom HAT -Selektionsmedium über HT-Medium auf Medium mit 10% FCS und ohne Selektion überführt.

5.2.2 3A3 – entwickelter monoklonaler Ak: Eigenschaften

Nachdem der Klon vom Selektionsmedium auf normales DMEM mit 10% FCS gesetzt wurde musste die bestehende Ak -Produktion bestätigt werden:

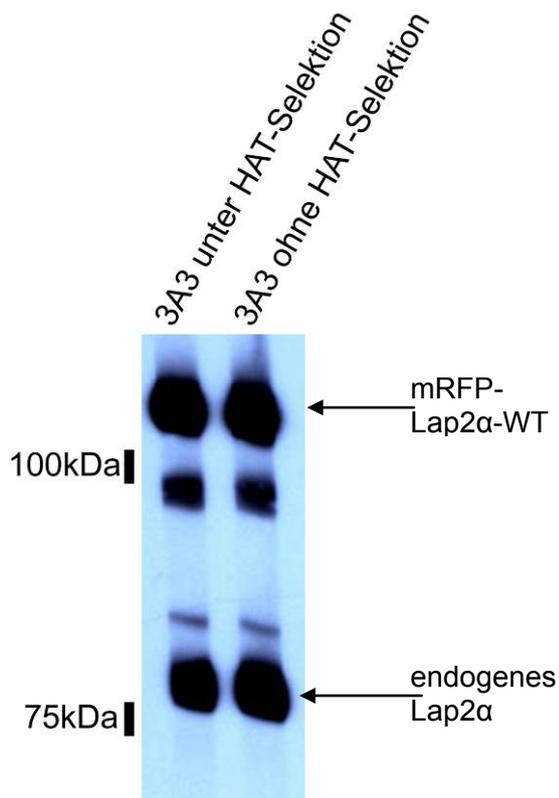


Abbildung 51: Westerndetektion des Ak 3A3 auf dem HeLa mRFP-Lap2 α -WT Lysat. Unter Selektion von HAT -Medium wurde der Ak 1:200 verdünnt, unter den Kulturbedingungen mit DMEM -Medium mit 10% FCS wurde der Ak 1:100 verdünnt. 7,5% SDS-PAA-Gel

Die Ak -Produktion wurde auch für die Kolonie auf normalem DMEM mit 10% FCS bestätigt. Die Verdünnung des Überstandes wurde jedoch geringer gewählt (1:100 im Gegensatz zu 1:200 bei HAT -Medium), da die Produktivität eines Klons auf dem neuen Medium eventuell nachlässt. Nach wie vor war das Lap2 α - spezifische Signal auf dem HeLa mRFP-Lap2 α – WT Lysat sehr stark, sowohl für das endogene als auch das getaggte Lap2 α .

Im folgenden Schritt wurde der Ak nicht nur auf Lysaten verschiedener menschlicher Zelllinien sondern auch auf Lysaten einer Mauszelllinie (von NIH-Fibroblasten) und einer Rattenzelllinie getestet (Rat1). Wie schon erwähnt unterscheidet sich der C-Terminus des Maus-Lap2 α von dem des humanen Lap2 α nur in der allerletzten AS (H => Q). Die Sequenz der Ratte ist in den letzten 11AS ident mit der der Maus:

- homo sapiens: -CKVIKKRGNK**H**-COOH
- mus musculus: - -KVIKKRGNK**Q**-COOH
- rattus norvegicus: - -KVIKKRGNK**Q**-COOH

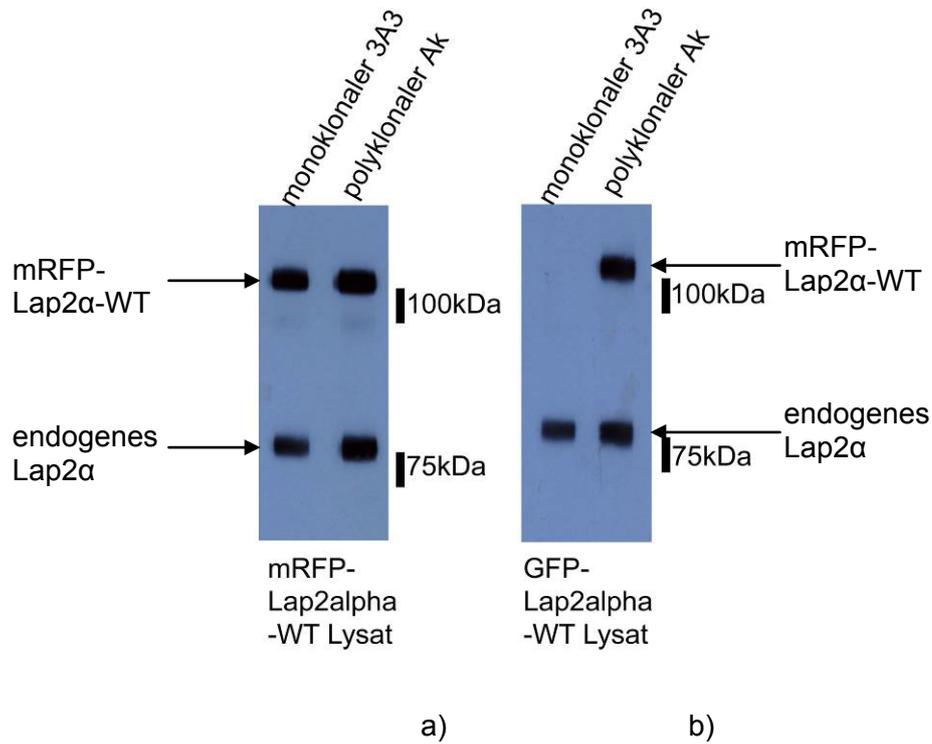


Abbildung 52: monoklonaler Ak 3A3 (1:100) und polyklonales Serum (1:300 000) auf verschiedenen HeLa-Zelllysate a) mit exogenem GFP-Lap2α -WT mit modifiziertem C-Term. b) mit exogenem mRFP-Lap2α -WT. 7,5% SDS-PAA-Gel

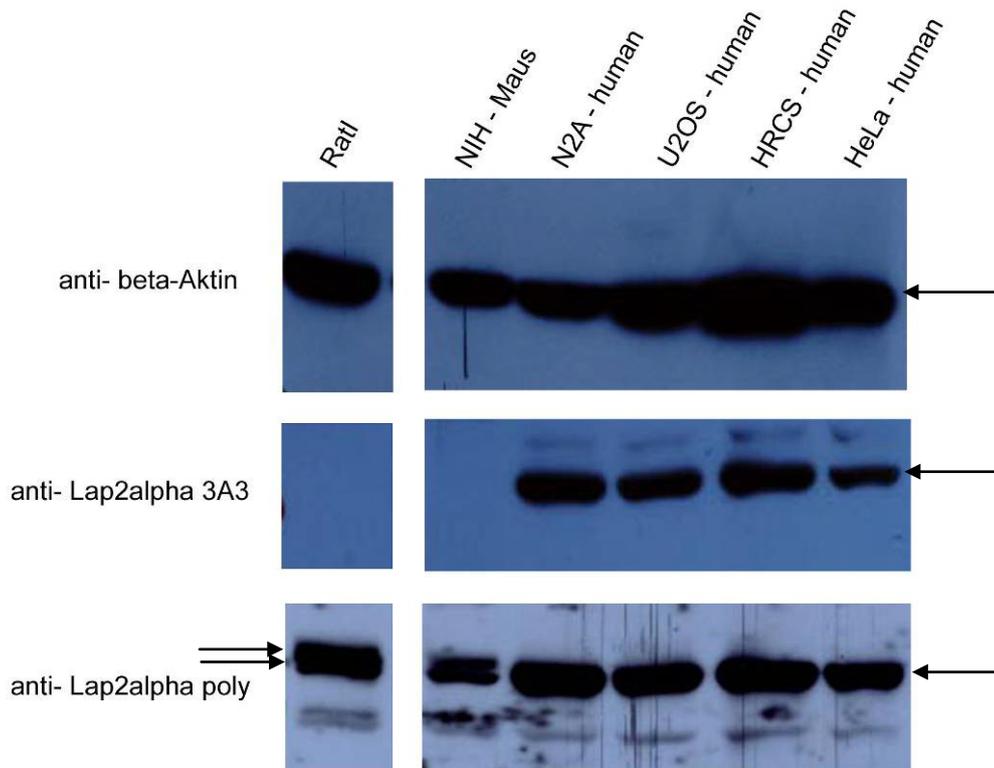


Abbildung 53: Westernblot mit den Lysaten der Zelllinien RatI, NIH, N2A, U2OS, HRCS und HeLa. Anti-beta-Aktin Ak als Ladekontrolle, monoklonaler 3A3 (1:500), der polyklonale anti-Lap2α Ak (1:300 000).

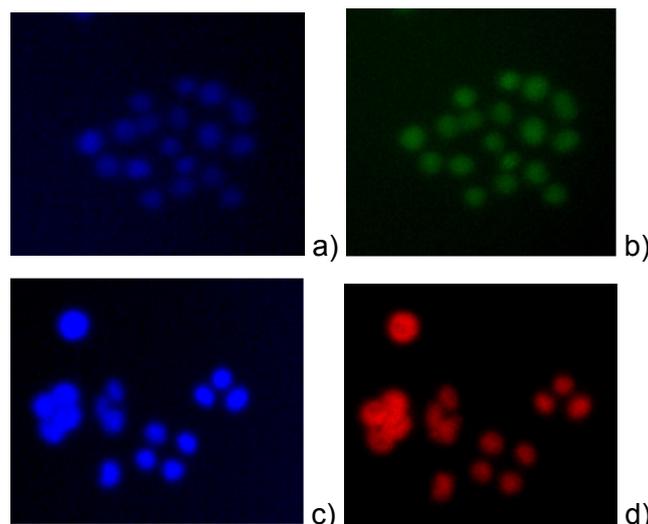
Die Inkubation mit anti-beta-Aktin diente als Ladekontrolle, dabei wurde ersichtlich, dass vom Lysat HRCS- deutlich mehr geladen wurde. Das polyklonale α-Lap2α Serum erkannte

Lap2 α in allen Zelllysaten der verschiedenen Spezies (Ak vom Labor Roland Foisner). Bei den Lysaten von Maus und Ratte wurde bei der Inkubation mit polyklonalem Lap2 α -Ak eine Doppelbande sichtbar, diese ist für diese Spezies unter diesen Bedingungen typisch, denn einerseits erkennt der eingesetzte polyklonale Ak knapp über Lap2 α eine unspezifische Bande, die auch bei knock-out Stämmen sichtbar ist (Prof. Roland Foisner). Andererseits liegt Lap2 α in stark proliferierenden Zellen vermehrt in phosphorylierter Form vor und diese Form läuft knapp über dem unphosphorylierten Lap2 α .

Der monoklonale Ak 3A3 erkannte humanes Lap2 α in den Lysaten der 3 humanen Zelllinien. Die Lap2 alpha's der anderen Spezies, die sich in einer einzigen AS im C-Terminus von der humanen Sequenz unterscheiden wurden nicht erkannt. Weder das murine Lap2 α der Rattenzelllinie oder der Mauszelllinie (Abb. 53), noch das GFP-Lap2 α indem der C-Terminus um 4AS verlängert wurde (Abb. 52 b)), wurden vom monoklonalen 3A3 erkannt. Es wurde also ein Ak generiert, der bezüglich der Änderung einer einzigen AS spezifisch ist, leider war es jedoch nicht die gewünschte AS R690 sondern die AS H694. Das Epitop des Ak konnte durch diese Versuche auf den äußersten C-Terminus von humanem Lap2 α festgelegt werden. Der nächste Schritt war die Identifikation der Ig-Isoform des generierten Ak. Durch den ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit II (AP/PNPP) von Pierce wurde für diesen Ak der Isotyp IgG1 festgelegt (Daten nicht gezeigt).

Weiter wichtige Anwendungsbereiche von Ak sind Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation. Daher wurden die Eigenschaften dieses Ak hinsichtlich dieser Anwendungsmöglichkeiten untersucht:

Im ersten Teil wurde die Anwendung für die Immunfluoreszenz getestet. Unter den folgenden Bedingungen wurden Färbungen einer HeLa-Zelllinie durchgeführt.



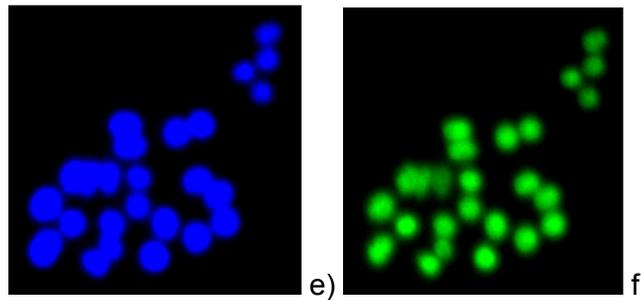


Abbildung 54: Immunfluoreszenz in HeLa a) DAPI –Färbung b) Färbung durch 3A3 in Verdünnung 1:50 (sek. Ak α -mouse 488) c) DAPI –Färbung d) korrelierende Färbung durch 3A3 in Verdünnung 1:50 (sek. Ak α -mouse 594) e) DAPI -Färbung f) korrelierende Kontrollfärbung mit dem polyklonalen α -Lap2 α -Ak 1:2000 (sek Ak α -mouse 488)

Jeweils blau, in Abbildungen 54 a) c) und e), sieht man die nukleären Färbungen durch DAPI. Parallel dazu in Abb. 54 b) d) und f) die Färbungen mittels Ak (unterscheiden sich im verwendeten sekundären Ak). Ganz offensichtlich war der Ak 3A3 im Stande das nukleäre Lap2 α zu detektieren, wie in der Abb. 54 b) und d) deutlich wird. Die Signale des 3A3 Ak deckten sich mit der nukleären DAPI –Färbung und waren auch, was die Lokalisierung betraf, vergleichbar mit den Signalen aus der Kontrollfärbung mit dem polyklonalen α -Lap2 α Ak (Abb. 54 f)).

Um die Anwendung in der Immunpräzipitation zu testen wurden parallel drei IPs durchgeführt. Als Positivkontrolle diente in diesem Versuch der monoklonale α -Lap2 α Ak15/2 (vom Labor von Roland Foisner) und als Negativkontrolle wurde ein α -HA Ak eingesetzt. Für die IP wurde ein Lysat aus HeLa –Zellen verwendet. Die Immunpräzipitate wurden im Auftragpuffer 5min. auf 100°C erhitzt und auf einem SDS-PAA –Gel mit 30 μ l des Ursprungslysats verglichen.

Zur Detektion der resultierenden Proteinbanden wurde der Ak 3A3 (1:500) genutzt.

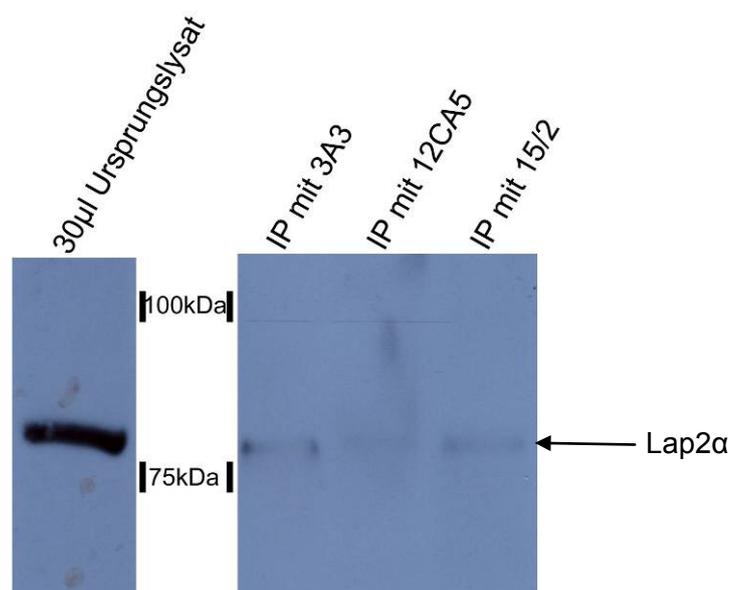


Abbildung 55: Westerndetektion der IPs durch 3A3, die IPs wurden mit 3A3 (1:10), 12CA5 (α -HA; 1:50) und 15/2 (1:2) durchgeführt. Die IP-Bande von 3A3 ist mit der der Positivkontrolle mit 15/2 vergleichbar. Die schwache Bande der Negativkontrolle 12CA5 liegt höher. 7,5% SDS-PAA-Gel

Das Signal des Ursprungslysats der HeLa-Zelllinie war nicht sehr stark; 30µl wurden aufgetragen, was einer Proteinmenge von 60µg entsprach. Für jede IP wurden 1,5mg Protein eingesetzt.

Doch auch das Signal der Positivkontrolle mit dem Ak 15/2 war sehr schwach. Die Banden der Positivkontrolle (15/2) und jene der IP mit 3A3 waren vergleichbar. Der Ak konnte also aus dem Zelllysate Lap2α spezifisch anreichern. Auch bei der IP mit dem 12CA5 Ak (Negativkontrolle) war ein sehr schwaches Signal erkennbar, doch dieses lag höher und konnte daher als unspezifisch gewertet werden.

Ich konnte einen monoklonalen Ak gegen Lap2α generieren, der Lap2α sowohl in der Immunfluoreszenz als auch in der Immunpräzipitation erkennt. Darüber hinaus ist dieser Ak spezifisch für den C-Terminus des humanen Lap2α.

5.2.3 Expression des DnaJ-Lap2α Fusionsproteins

Für die Expression wurden zunächst die Vektoren pB'His- DnaJ Lap2α –WT und –R690C in die Expressionsstämme Rosetta- und Rosetta+ transformiert.

Die Induktion erfolgte für 3 ½ h bei 37°C und einer IPTG –Konzentration von 1mM.

Die Kulturen wuchsen vergleichbar an, zwischen den Expressionsstämmen zeichneten sich Unterschiede ab.

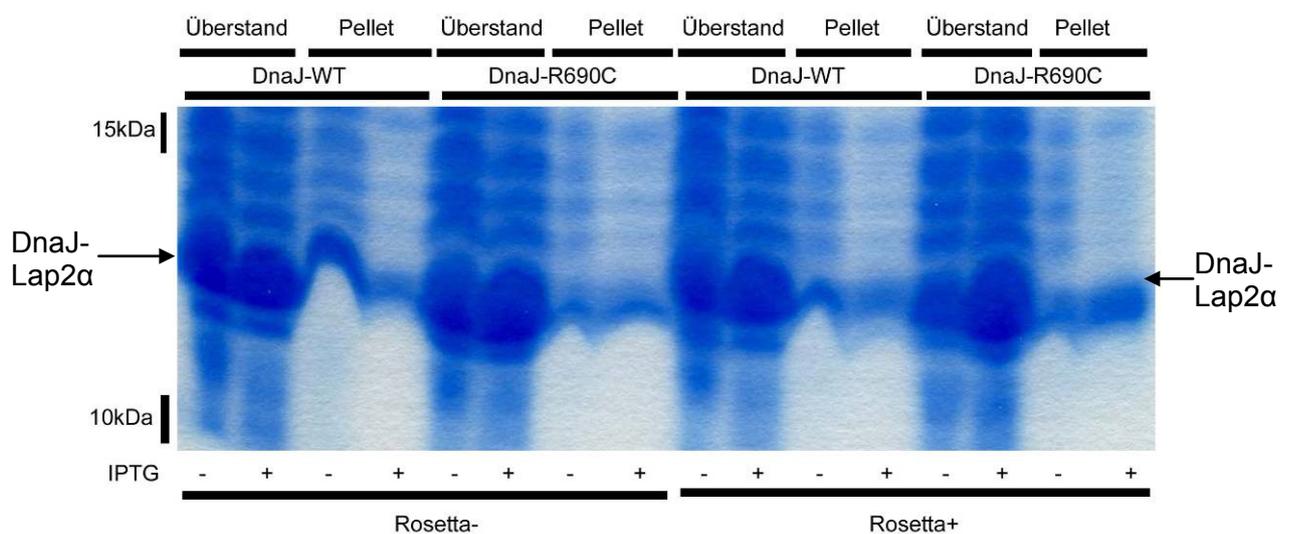


Abbildung 56: Coomassie-Färbung; Expressions von DnaJ-Lap2α –WT und –R690C in den Stämmen Rosetta- und +. Berechnete Proteingröße 10,3 kDa. 1/50 einer jeden Fraktion wurde aufgetragen was einem Kulturvolumen von 1ml entsprach. 15% SDS-PAA-Gel

Die geladene Menge an bakteriellem Lysat (1/50) entsprach einem Volumen an Ursprungskultur von 1ml.

Die Expressionsproteine DnaJ-Lap2α –WT und -R690C hatten eine errechnete Größe von 10,3 kDa, liefen am SDS-PAA -Gel allerdings etwas langsamer und nicht diesem Molekulargewicht entsprechend. Der Hauptteil des Proteins war in der löslichen Fraktion des bakteriellen Lysats zu finden. Die Expression des Fusionsproteins DnaJ -Lap2α (-WT als

auch –R690C) konnte durch Zugabe von IPTG weder im Stamm Rosetta – noch Rosetta + gesteigert werden und dies, obwohl der Promoter IPTG induzierbar war. Einzig bei der Expression von DnaJ –R690C im Stamm Rosetta+ schien in der löslichen Proteinfraction der IPTG induzierten Kultur mehr Protein produziert worden zu sein.

Zur weiteren Reinigung des Proteins wurde die lösliche Fraktion der induzierten Rosetta - Kultur gewählt und mit Ni –NTA -beads inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das gebundene Protein mittels Erhitzen in Auftragepuffer von den beads gelöst. Die native Struktur war in diesem Fall nicht essentiell, da das kurze fusionierte Lap2 α - Peptid von der Immunogenität der DnaJ -Domäne profitieren sollte und keine Ak gesucht wurden, die gegen die native Struktur gerichtet sind. Daher war die denaturierende Eluierungsmethode anwendbar. Die folgenden Konzentrationen des Fusionsproteins konnten nach der Elution von den Ni-NTA beads und einem Reinigungsschritt über ein SDS-PAA-Gel mit angeschlossener Anreicherung in der Eluierungsfalle erreicht werden.

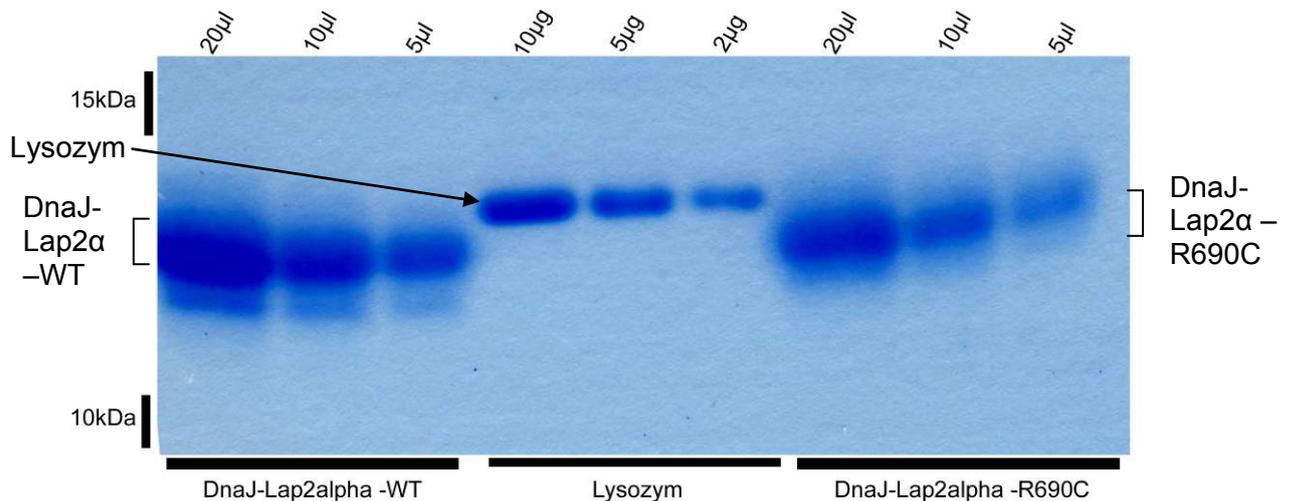


Abbildung 57: Coomassiefärbung, zeigt den Vergleich der Proteinmengen aus den bekannten Voluminen der eluierten Proteine DnaJ-Lap2 α –WT und –R690C mit bekannten Mengen an Lysozym zur Bestimmung der Konzentrationen.

DnaJ-Lap2 α WT	1000 μ g/ml
DnaJ-Lap2 α R690C	500 μ g/ml

Tab. 4: ermittelte Proteinkonzentrationen der Fusionsproteine DnaJ-Lap2 α -T und –R690C

Basierend auf diesen Konzentrationsabschätzungen wurde mit der Immunisierung der Labortiere begonnen.

Auch das Protein DnaJ-Lap2 α –R690S wurde nach dem angeführten Schema aus dem Überstand einer induzierten Kultur von Rosetta- isoliert. Die folgende Immunisierung wurde aber erst gegen Ende meiner Arbeit im Labor gestartet und die entsprechenden Immunreaktionen wurden nicht mehr von mir ausgewertet.

5.2.3.1 Immunisierung mit DnaJ-Lap2 α und Tests der generierten Seren

Pro Antigen wurden 5 Tiere immunisiert, nämlich 2 Mäuse des Genotyp balb-c, 2 RBF-Mäuse sowie ein Kaninchen.

Nachdem von allen Tieren 3 Antisera verfügbar waren (präimmun, 1. und 2.), wurden diese im Westernblot auf das Vorhandensein spezifischer Lap2 α Ak getestet:

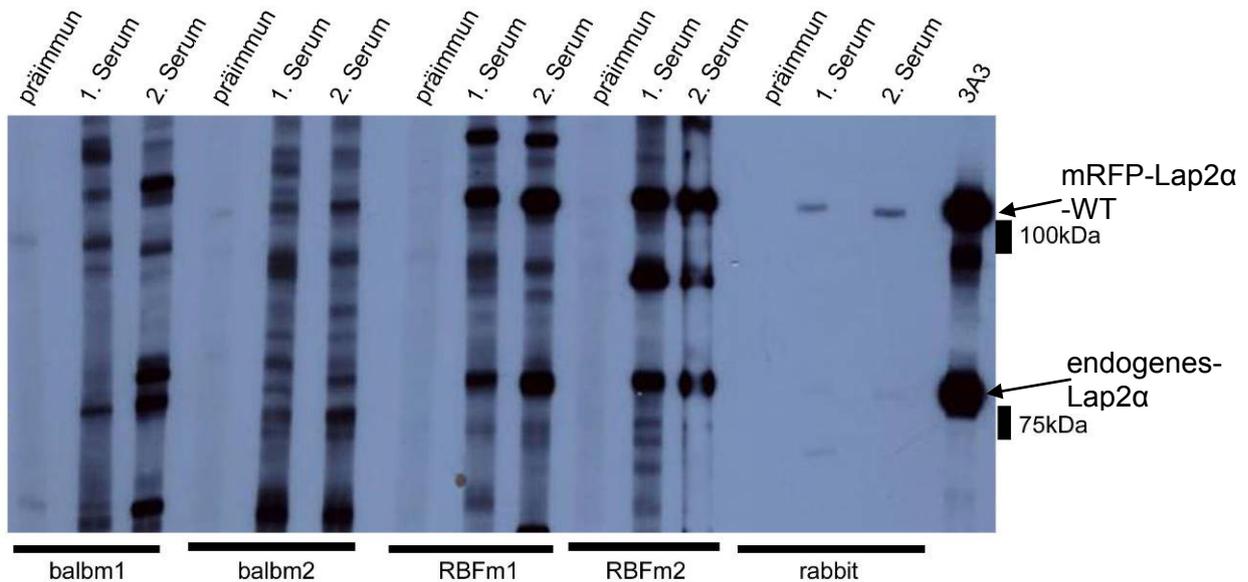


Abbildung 58: Westerndetektion durch die Antiseren (1:1000) nach der Immunisierung mit DnaJ-Lap2 α -WT. Bei der Inkubation mit den Kaninchenseren wurde fälschlich anti-Maus-HRP verwendet. Verdünnung des monoklonalen 3A3 1:200, 7,5% SDS-PAA-Gel

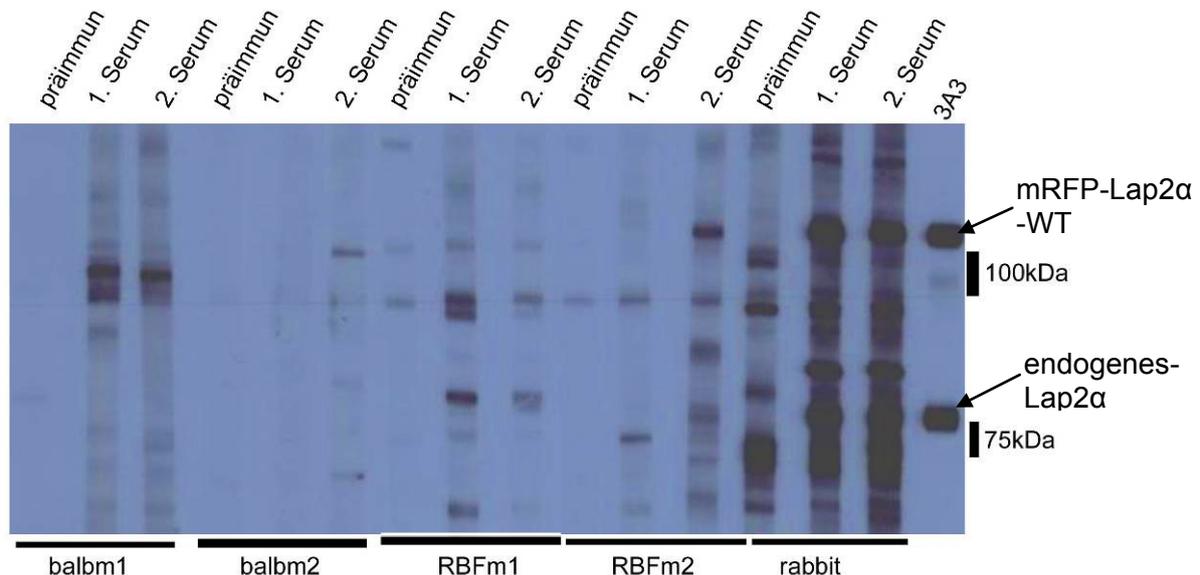


Abbildung 59: Westerndetektion durch die Antiseren nach der Immunisierung mit DnaJ-Lap2 α -R690C. Verdünnung der Mausseren 1:1000, monoklonaler 3A3 1:200, 7,5% SDS-PAA-Gel

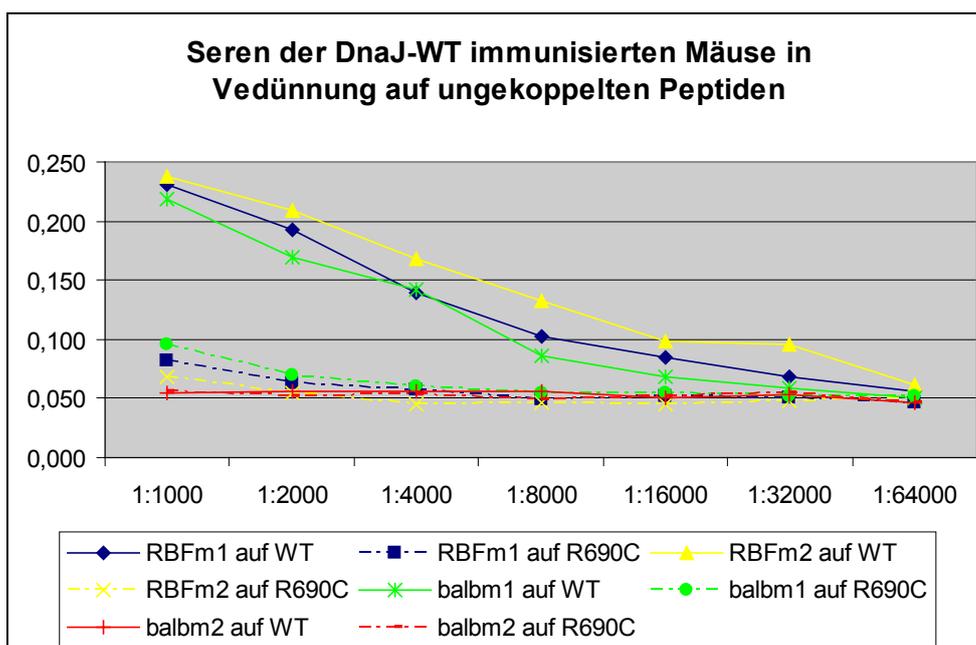
Die Immunisierung verlief mit unterschiedlichen Ergebnissen, aber im Allgemeinen nicht so erfolgreich wie die HBc-Ag -Immunisierung. Hier war primär das hohe Maß an

unspezifischen Banden, die sich bei dem Westernblot mit den Antiseren dieser Immunisierung zeigten, auffällig.

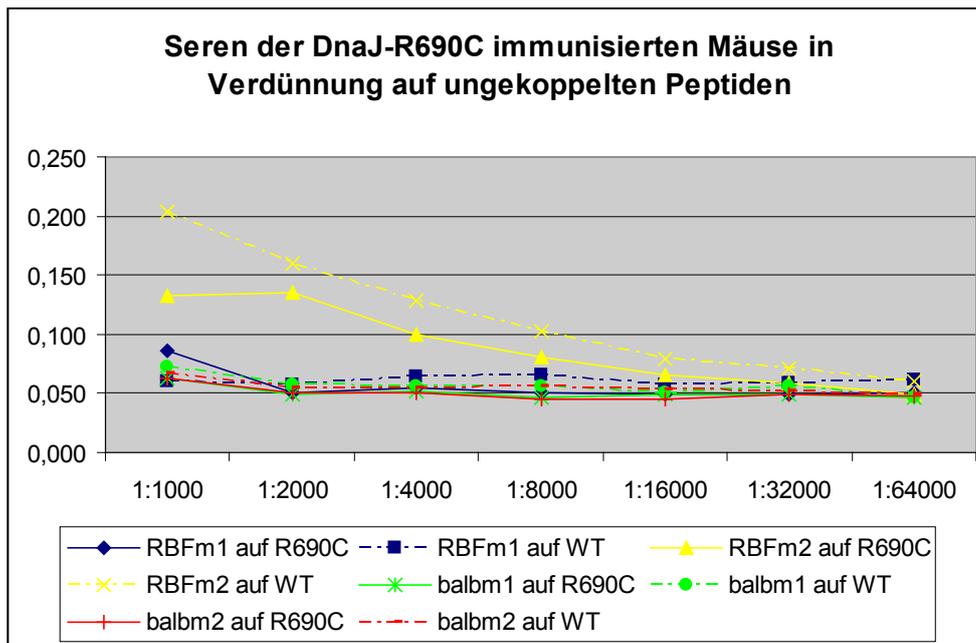
Bei der Immunisierung mit dem –WT Protein (Abb. 58) zeigten alle Tiere unterschiedlich starke, aber Lap2 α -spezifische Reaktionen, trotz der zahlreichen Hintergrundbanden. Bei der Analyse des Kaninchenserums wurde der falsche sek. Ak eingesetzt (anti-Maus-HRP), trotzdem war ein Lap2 α -spezifisches Signal erkennbar, was auf die Kreuzreaktion zwischen sekundärem anti-Maus und anti-Kaninchen IgG zurückzuführen war. Bei den Mäusen war vor allem bei den RBF -Mäusen im ersten Antiserum ein starkes Signal sichtbar. Die balb-c Mäuse lagen deutlich darunter. Die balb Maus 2 hatte in beiden Antiseren ein schwaches Signal und konnte diesen auch im Zeitraum zwischen erstem und zweitem Antiserum nicht steigern. Die balb Maus 1 zeigte bei beiden Antiseren ein vergleichbares Signal, das aber im Vergleich zur balb Maus 2 stärker war.

Bei den Tieren die mit DnaJ-Lap2 α -R690C immunisiert wurden (Abb. 59) zeigte in erster Linie das Kaninchen eine gute Immunreaktion auf das injizierte Antigen. Bei den Mäusen waren nur im 2. Antiserum der RBF Maus 2 Lap2 α -spezifische Signale erkennbar. Allerdings konnten die Antiseren der Tiere, die mit der mutierten Form des Antigens immunisiert wurden, nur auf einem WT -Lysat getestet werden, da für die mutierte Form nach wie vor keine Zelllinie zur Verfügung stand die getaggetes Lap2 α R690C exprimierten.

In einer weiteren Testreihe wurden nun die Maus -Antiseren in mehreren Verdünnungen (1:1000-1:64000) auf beiden Formen des ungekoppelten Lap2 α -Peptids (die letzten 11AS aus dem Fusionsprotein) im ELISA -Test getestet um deren Titer zu bestimmen und einen Hinweis auf mögliche vorhandene WT- oder R690C- spezifische Antikörper zu bekommen.



a)



b)

Abbildung 60: Resultate des ELISA's der mittels Excelgrafik ausgewertet wurde; Verdünnung des zweiten Antiserums aller DnaJ-Lap2 α immunisierten Tiere auf jeweils beiden ungekoppelten Lap2 α - Peptiden. Durchgezogene Linie ist jeweils das Signal auf dem Immunisierungspeptid, die strichlierte Linie steht für den Signalverlauf auf dem inversen Peptid.

Die Ergebnisse des Immunoblots konnten überwiegend bestätigt werden. Von den DnaJ – Lap2 α –WT immunisierten Mäusen (Abb.60 a)) gaben mit einer Ausnahme alle Tiere schon hier ein Lap2 α –WT spezifisches Signal. Die Maus die auch auf Westernstreifen nur ein undeutliches Signal gab (balb Maus 2) zeigte hier kein spezifisches Signal. Die Antiseren der weiteren Mäuse zeigten ähnlich WT- spezifische Signale.

Im Gegensatz dazu gab nur eine einzige DnaJ-Lap2 α –R690C immunisierte Maus ein Signal (wie im Immunoblot RBF Maus 2), jedoch auf der –WT beschichteten Platte. Die Signale auf der mit Lap2 α –R690C beschichteten Platte zeigten ein deutlich unterschiedliches Muster. Weiterhin konnte nur eine der DnaJ-Lap2 α –R690C immunisierten Mäuse (RBF Maus 2) ein deutliches Signal entwickeln, doch ist diese überraschender Weise niedriger als auf der –WT beschichteten Platte. Dieses Ergebnis wurde auf eine unterschiedliche Beschichtungskonzentration (geringer für Lap2 α -R690C Peptid) zurückgeführt. Dies war wahrscheinlich mit Grund, warum die Werte der Antiseren der DnaJ-Lap2 α –WT immunisierten Tiere auf R690C -Peptid generell niedriger waren.

Vergleichend wurde auch ein ELISA auf den Immunisierungsantigenen DnaJ-Lap2 α –WT und –R690C durchgeführt. Hier zeigten alle Mäuse vergleichbare und sehr hohe Titer was aber hauptsächlich durch die Immunogenität der DnaJ -Domäne bedingt war (Daten nicht gezeigt).

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde für die erste Fusion dieser Immunisierungsreihe die DnaJ-Lap2 α –WT immunisierte RBF Maus 2 ausgewählt, da deren

Antiserum auf dem WT -Peptid den höchsten Titer, auf R690C –Peptid aber das niedrigste Signal zeigte. Mit Hinsicht auf die Ergebnisse des ELISA (Abb. 60 a)) zeigte sie die spezifischste Immunantwort und gab auch auf den Westenstreifen gute Signale.

Bei Westerntests späterer Antiseren bestätigten sich die ersten Ergebnisse und keine der Mäuse die bis zum 2. Serum keine Lap2 α -spezifische Immunantwort entwickelt hatte konnte dieses Defizit ausgleichen.

Die verbleibenden Mäuse mit spezifischem Titer waren also:

- DnaJ-Lap2 α –WT RBFMaus 1 (Lap2 α –WT -spezifischer Titer)
- DnaJ-Lap2 α –WT BalbMaus 1 (Lap2 α –WT -spezifischer Titer)
- DnaJ-Lap2 α –R690C RBFMaus 2 (Lap2 α spezifischer Titer, wahrscheinlich nicht für C690)

Mit den Antiseren dieser drei Mäuse wurde noch ein Depletions -ELISA gemacht um genauere Aussagen über die Spezifität des Titters geben zu können. Der Test wurde mit einer 1:1000 Verdünnung des 4ten Serums durchgeführt.

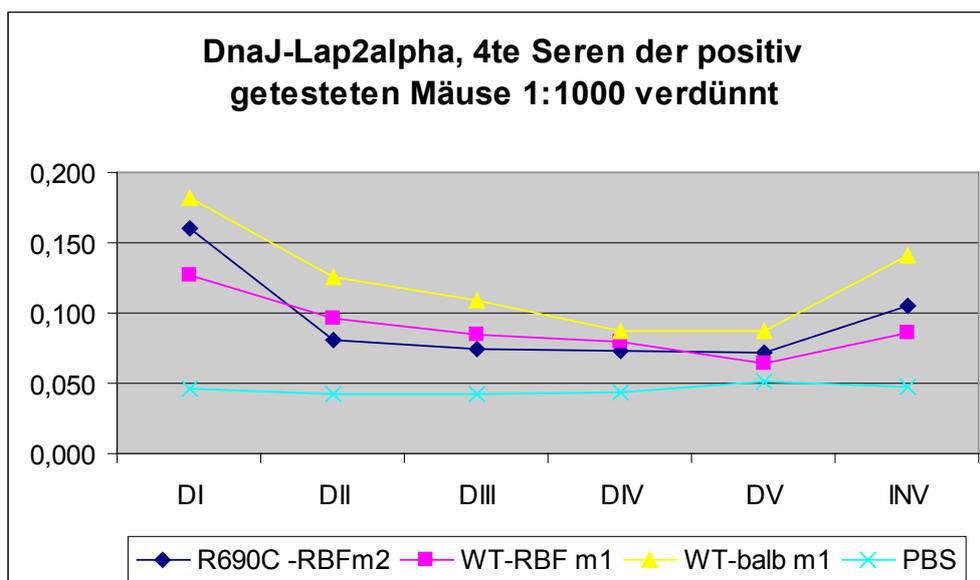


Abbildung 61: Depletions -ELISA der 4ten Seren der Mäuse (in Verdünnung 1:1000) dieser Immunisierungsreihe, die einen Lap2 α spezifischen Titer entwickeln konnten. R690C immunisierte Maus (R690C RBFm2) wurde über Lap2 α -WT depletiert (DI-V) und die inverse Kontrolle (INV) auf Lap2 α R690C durchgeführt. Die Lap2 α -WT immunisierten Mäuse (WT-RBF m1 und –balb m1) wurden über Lap2 α R690C depletiert und die inverse Kontrolle auf Lap2 α -WT Peptid ausgeführt.

In fünf Depletions-Schritten (für die Lap2 α –WT immunisierten Mäuse auf Lap2 α -R690C Peptid und für die Lap2 α -R690C immunisierte Maus auf Lap2 α -WT Peptid durchgeführt) erreichten die Signale aller Antiseren einen sehr niedrigen Level nahe dem Hintergrundsignal von PBS. Den höchsten Titer auf ungekoppeltem R690C-Peptid zeigte von Anfang an die – WT balb Maus 1. Auch im inversen Schritt (für Lap2 α –WT immunisierte Mäuse auf WT-Peptid und für Lap2 α –R690C immunisierte Maus auf R690C Peptid) stiegen die Signale bei allen Antiseren deutlich an. Für alle Mäuse kann also auf punktspezifische Ak geschlossen

werden. Das Signal für die –R690C RBF Maus 2 fiel schon im ersten Depletions -Schritt stark ab und wurde auch in den Folgenden Schritten nicht wesentlich weiter abgeschwächt. Dies wies darauf hin, dass die Konzentration des Lap2 α –spezifischen Ak in diesem Serum auf Grund der Verdünnung bereits niedrig war.

Den höchsten Wiederanstieg des Signals beim inversen Schritt zeigte jedoch die –WT balb Maus 1, daher wurde diese als nächste für eine Fusion verwendet.

Wie einführend erwähnt, wurden auch zwei Kaninchen mit den DnaJ-Lap2 α

Fusionsantigenen immunisiert. An den Lap2 α spezifischen Titer der Antiseren der Kaninchen aus Abb.58 und 59 änderte sich bei fortschreitender Immunisierung nichts.

5.2.3.2 Fusionen mit DnaJ-Lap2 α immunisierten Mäusen

Wie beschrieben wurde die erste Fusion mit der DnaJ -Lap2 α –WT immunisierten RBF Maus 2 gemacht. Deren Antiserum zeigte die höchste und spezifischste Immunantwort.

In einem Verhältnis von 1:1 wurden die Milzzellen mit den X63-Myelomzellen fusioniert. Ausgetropft wurde die Fusion auf 10x 24-Well-Platten.

Der anschließende ELISA wurde parallel auf ungekoppeltem –WT als auch –R690C Peptid durchgeführt, um Hinweise auf Klone mit Lap2 α WT –spezifischen Ak zu erhalten (Werte nicht gezeigt). Auffällig war, dass die meisten Klone auf WT -Peptid im Durchschnitt höhere Signale gaben als auf R690C –Peptid. Auch das letzte Antiserum dieser Maus gab auf dem Lap2 α -WT Peptid ein höheres Signal, was ja Voraussetzung für die Auswahl der Maus für die Fusion war. Jedoch könnte dies auch auf eine unterschiedliche Beschichtungskonzentration zurückgeführt werden, doch das polyklonale Kontrollserum (generiert gegen die vollständige Lap2 α –WT Sequenz und zur Verfügung gestellt vom Labor von Roland Foisner) schloss einen solchen Unterschied in der Beschichtungskonzentration aus, da die Werte dieses Serum auf beiden Peptiden vergleichbar waren (ELISA -Daten nicht gezeigt).

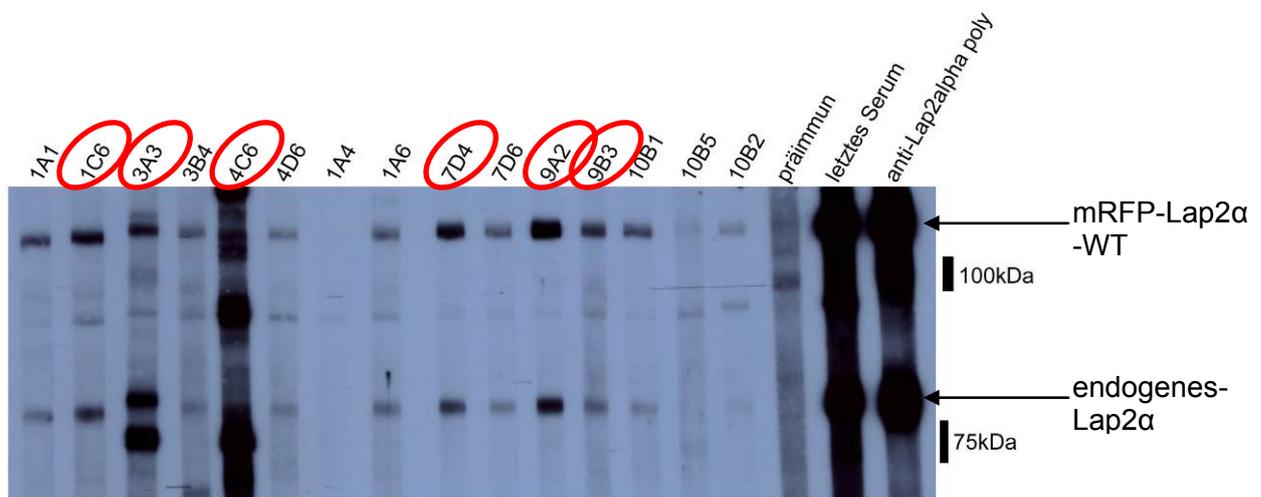


Abbildung 62: Westernblotanalyse der ELISA –positiven Mischklone der Fusion DnaJ-WT RBFMaus 2.

Klone 1:10 verdünnt, Seren 1:1000, polyklonales Serum (Lab. Roland Foisner) 1:300 000 auf einem HeLa Zellysat mit exogenem mRFP-Lap2 α –WT (7,5% SDS-PAA-Gel)

Die Überstände der Klone 1A4 und 1A6 zeigten im ELISA Signale auf beiden Peptiden (WT als auch R690C) auf Hintergrundniveau und wurden als Negativkontrolle verwendet.

Interessanterweise enthielt aber der Klon 1A6 trotzdem Lap2 α -spezifische Ak und zeigte Banden auf dem HeLa mRFP-Lap2 α –WT Lysat. Die Klone mit den stärksten Signalen 1C6, 3A3 (prädominante Erkennungsbande knapp unterhalb des endogenen Lap2 α), 4C6 (zeigt mehrere Hintergrundbanden), 7D4 und 9B3 wurden eingefroren. Der Mischklon 9A2 wurde zur Einzelklonisierung weiter verdünnt, da er das stärkste und das Signal mit den wenigsten Hintergrundbanden zeigte (Abb. 62). Im Allgemeinen korrelierten die gemessenen ELISA –Werte (Werte nicht gezeigt) mit den Westernsignalen wieder nur bedingt (gewählte Negativkontrolle 1A6 enthielt Lap2 α spezifische Ak, die in der Westernblotanalyse Signale zeigten).

Beim ELISA der Verdünnung von 9A2 konnten keine positiven Signale mehr gemessen werden (Werte nicht gezeigt). Auch der Test von ELISA negativen Pools auf Westernstreifen führte zu keinen positiven Ergebnissen.

Für die zweite Fusion wurde die Maus DnaJ- Lap2 α –WT Balb Maus 1 ausgewählt. Auch hier wurden in Vorversuchen (Depletions –ELISA) WT -spezifische Ak im Antiserum nachgewiesen. Diese Fusion wurde in einem Verhältnis von 5:1 (Milzzellen: X63) mit der X63-Zelllinie gemacht. Ausgetropft wurde die Fusion auf 6x 24-Well-Platten und 4x 96-Well – Platten. Der ELISA wurde sowohl auf WT –Peptid als auch auf R690C –Peptid ausgeführt. Bis auf einen Überstand (des Klones 7A3), der aber auch nur ein schwaches Signal (1,5 faches Hintergrundsignal) auf der mit –WT beschichteten Platte zeigte, waren keine positive Signale zu verzeichnen. Daher wurden für 2 der 96-Well Platten jeweils Pools der Überstände von 8 Mischklonen in der Westernblotanalyse getestet (Mischklon 7A3 zusätzlich einzeln getestet).

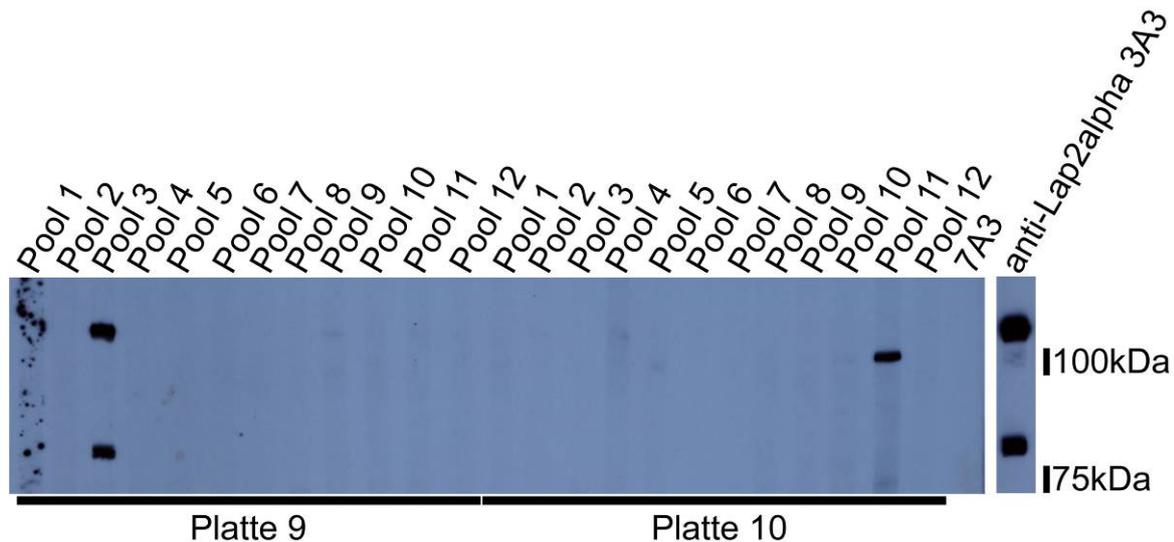


Abbildung 63: Westerndetektion von Pools aus Überständen von Mischklonen der Fusion DnaJ-Lap2 α -WT balb Maus 1 auf HeLa –Lysat mit mRFP-Lap2 α -WT. Verdünnung jedes Überstandes im Pool 1:10, monoklonaler Kontroll-Ak 3A3 1:500 (Zelllysate auf 7,5% SDS-PAA-Gel)

Ein deutlich Lap2 α spezifisches Signal gab der Pool 3 der Platte 9 (3/9), die Überstände der betroffenen Mischklone wurden daher getrennt im Westernblot getestet. Der Pool 10/11 gab zwar auch ein deutliches Westernsignal, doch das Molekulargewicht des erkannten Proteins entsprach nicht dem von Lap2 α , darüber hinaus müssten sowohl endogenes als auch GFP-getagtes Lap2 α erkannt werden, was auch nicht der Fall war. Die Überstände aller anderen Pools, als auch jener des einzelnen Mischklon 7A3 gaben kein Westernsignal.

Die Aufspaltung des Pools 9/3 lieferte zwei positive Mischklone, die in der Westernblotanalyse das humane Lap2 α erkennen konnten, allerdings nicht in der Lage waren Mausequenz von Lap2 α zu erkennen. Sie waren somit spezifisch für die humane Lap2 α –Sequenz. Diese unterscheidet sich aber nur in der letzten AS von der murinen Sequenz. Somit zeigten die Ak dieser Mischklone ähnliche Eigenschaften bezüglich der Spezifität, wie der bereits generierte Einzelklon 3A3, da die letzte AS offensichtlich Teil ihres Epitops war. Die Klone wurden eingefroren.

5.2.4 Transfektion von HeLa –Zellen mit pVH1

Der Vektor basiert auf pEYFP-C1 und die Expression der EYFP-Sequenz steht unter der Kontrolle des CMV-Promoter. Zusätzlich enthält dieser Vektor als Marker das Gen für eine Kanamycin/ Neomycinresistenz und einen SV40 polyA -Anhang hinter der MCS. Die exprimierte Sequenz kodiert für ein Fusionsprotein aus YFP und Lap2 α -R690C. Weitere Details siehe Kap. 4.1.14.

Die Transfektion erfolgte durch Kalzium-Phosphat, die Selektion auf 500 μ g/ml G418. Sofort nach der Transfektion war die Fluoreszenz gut sichtbar und ließ den Schluss auf eine hohe Transfektionsrate zu. Nach der Spaltung und einem erforderlichen Medienwechsel war die Fluoreszenz allerdings nicht mehr so stark und nur vereinzelt erkennbar. Natürlich wurde

parallel auch eine nicht transfektierte HeLa –Linie unter Selektion gesetzt, wovon alle Zellen starben.

Von den selektionierten Transfektanten wurden 13 Einzelklone isoliert. Diese wurden zu verschiedenen Zeitpunkten unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und zeigten im Kern Fluoreszenz wie folgt:

Klon#	frühe Fluoreszenz (24h nach der Isolierung)	späte Fluoreszenz, eine Woche nach der Isolierung)
1	-	nachweisbar, aber schwach
2	gering	nur bei toten oder deformierten Zellen
3	-	nur bei toten oder deformierten Zellen
4	-	-
5	-	nur bei toten oder deformierten Zellen
6	-	hoher Level an Fluoreszenz
7	-	nachweisbar, aber schwach
8	-	nur bei toten oder deformierten Zellen
9	-	-
10	-	-
11	gering	hoher Level an Fluoreszenz
12	gering	hoher Level an Fluoreszenz
13	-	-

Tab. 5: Fluoreszenz der isolierten Einzelkolonien nach der Transfektion mit pVH1 unter dem Fluoreszenzmikroskop 24h und eine Woche nach der Einzelklonisierung.
- steht für keine Fluoreszenz

Im Allgemeinen war die Fluoreszenz bei sterbenden oder deformierten („angeschwollenen“) Zellen am Stärksten was den Schluss zuließ, dass die Expression von YFP-Lap2 α R690C den Zellen in hohem Grad schadete.

Die Westernblotanalyse von Lysaten dieser Klone mit den Ak 3A3, α -Lap2 α poly und 15/2 ergab:

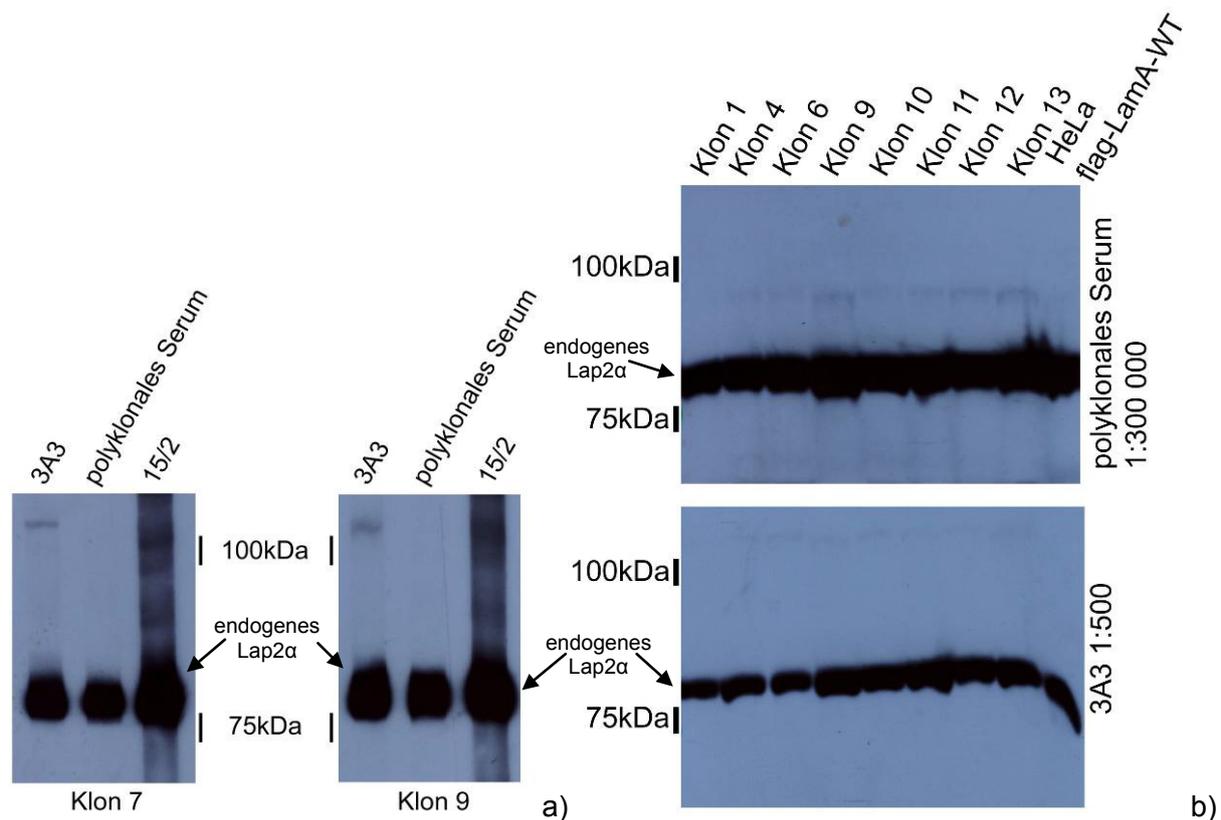


Abbildung 64: Westernblotanalyse von Einzelklonlysaten nach der Transfektion mit pVH1. a) Klone 7 und 9 wurden mit dem monoklonalen Ak 3A3 (1:500), dem polyklonalen Serum (1:300 000) und dem ebenfalls monoklonalen 15/2 (1:10) inkubiert. b) Lysate der Klone 1, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13 und ein Zelllysate mit flag- LaminA –WT wurden mit dem polyklonalem Serum und dem monoklonalen 3A3 inkubiert.

Keiner der Ak konnte bei einem der Zelllysate eine spezifische Bande mit dem errechneten Molekulargewicht des Fusionsproteins YFP-Lap2α R690C von 102kDa detektieren, alle detektierten hingegen die endogenen Form von Lap2α auf 75kDa. Einzig der monoklonale Ak 3A3 konnte bei manchen Lysaten (Klone 7 +9) knapp über der erwarteten Höhe (bei 110-120kDa) eine sehr schwache Bande detektieren, aber selbst wenn diese das gewünschte Signal wäre. Trotz der deutlich sichtbaren Fluoreszenz bei manchen Klonen, erschien in der Westernblotanalyse mit keinem der verwendeten Ak ein korrespondierendes Signal für das Fusionsprotein YFP-Lap2α-R690C. Eine mögliche Erklärung dazu wäre eine posttranslationale Prozessierung, die zur Trennung von Lap2α-R690C und YFP führte. Um die Lokalisation der Fluoreszenz genauer bestimmen zu können, wurde mit dem gut fluoreszierenden Klon 12 eine Kontroll –IF gemacht. Wäre Lap2α von dem Fusionspartner YFP getrennt, wäre die Fluoreszenz gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, da YFP nicht mehr über Lap2α im Kern verankert wäre.

Der Klon wurde fixiert und einerseits mit 3A3 andererseits mit dem polyklonalen α-Lap2α Ak gegengefärbt:

Ansatz#	primärer Ak	Verdünnung	sekundärer Ak	DAPI
1	Klon wurde nur fixiert, keine Ak-Färbung			+
2	3A3	1:50	α -mouse 594	+
3	α -Lap2 α poly	1:2000	α -rabbit 594	+

Tab. 6: Auflistung der durchgeführten IF-Färbungen des, mit pVH1 transfektierten, Einzelklons 12.

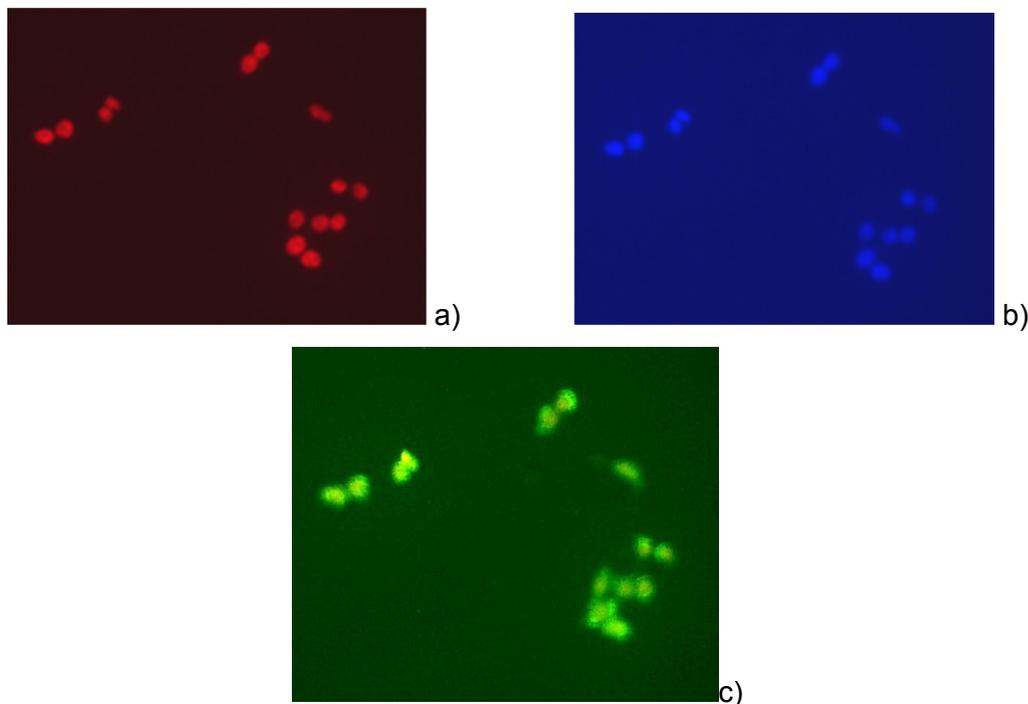


Abbildung 65: Fluoreszenzphotographien des Einzelklons 12 (transfektiert mit pVH1) a) Färbung mit 3A3 und sekundärem α -Maus 594 (Emmissionsspektrum rot) b) Kernfärbung mit DAPI c) Eigenfluoreszenz des Klons durch YFP-Expression

Die Färbungen vom monoklonalen Ak 3A3 (Abb.65 a)), polyklonalen Serum (nicht gezeigt) als auch von DAPI (Abb.65 b)) überlappten und legten die Kerne deutlich fest. Die Eigenfluoreszenz durch das Fusionsprotein des Klons 12 hingegen, deckte sich mit diesen Signalen nicht vollkommen (Abb.65 c)). Zwar war die Fluoreszenz im Kernbereich am Stärksten, doch nicht zu 100% auf diesen beschränkt.

Das Fusionsprotein, oder zumindest der YFP-Teil, wurde nicht vollständig im Kern verankert. Wäre dies alleine durch die Überexpression begründet, müsste ein deutliches Westernsignal nachweisbar sein, was allerdings nicht so war (Abb.64 b)). In der gegebenen Zeit war es mir nicht möglich eine Zelllinie zu etablieren, die den Vektor pVH1 und somit YFP-Lap2 α R690C nachweislich exprimierte. Die Ursache dafür konnte ich in der verbleibenden Zeit nicht mehr aufklären.

6 Diskussion

Unser Ziel war es ein Paar von monoklonalen Ak zu isolieren, von denen einer die WT- Form und der andere eine punktmutierte Form eines Proteins erkennen sollte. Somit wäre die

Unterscheidung dieser zwei Proteinformen in verschiedenen Applikationen auch direkt in der Zelle (Westernblotanalyse, IF und IP) möglich.

Laborintern konnte bereits ein monoklonaler Ak produziert werden, der spezifisch für die regulative (B) alpha und delta Untereinheit von PP2A ist, obwohl auch zu den anderen Isoformen dieses Proteins (beta und gamma) eine hohe Sequenzhomologie besteht. Die Immunisierungen wurden mit dem angeführten Proteinabschnitt der B alpha Untereinheit durchgeführt

alpha:	398 C A S G K R K K D E I S V D 411
beta:	394 C V G G K R R K D E I S V D 407
gamma:	394 C V G G K R R R C C I S V D 407
delta:	404 C S G G K R K K D E I S V D 417

Basierend auf diesen Ergebnissen hielten wir es für möglich einen Ak zu generieren, der spezifisch für die Änderung in nur einer AS wäre.

In Hinblick auf dieses Ziel konnten sehr vielversprechende Ergebnisse erzielt werden: die Isolierung des monoklonalen Ak 3A3, der zwischen der humanen und der murinen Sequenz von Lap2 α unterscheiden kann. Diese unterscheiden sich im Bereich des Immunisierungspeptides nur um eine AS. Das Epitop dieses Ak konnte somit auf den Bereich dieser Substitution (human His => murin Gln), dem äußersten C-Terminus von Lap2 α zugeordnet werden. Außerdem lieferte der Immunisierungsansatz mit dem HBc- Ig - fold Fusionsprotein auch direkt nach der Fusion bereits Testergebnisse, die auf die Existenz von mutationsspezifischen Ak schließen ließen.

Hinweise auf Ak, die zwischen dem WT- und dem mutierten Protein unterscheiden können, erhielten wir in folgenden Ansätzen und Tests:

- Immunisierung mit HBc-Ag LaminA R482W => Depletions –ELISA (Abb. 34a)) und Westernblotanalyse (Abb. 38)
- Immunisierung mit KLH-Lap2 α WT => Depletions –ELISA (Abb. 41)
- Immunisierung mit DnaJ –Lap2 α –WT => Depletions –ELISA (Abb. 61)

Durch die folgend angeführten Immunisierungsansätze konnten die aufgelisteten Ergebnisse erreicht werden:

1. Immunisierung mit dem HBc –LaminA Fusionsprotein (nativ exprimiertes Protein)
2. Immunisierung mit KLH gekoppelten Peptiden (wurde bei beiden Proteinen, LaminA und Lap2 α , angewandt)
3. Immunisierung mit dem DnaJ –Lap2 α Fusionsprotein

Es wurden bereits Studien über die Immunogenität eines Fusionsproteins aus HBc-Ag und einer integrierten globulären Einheit, in diesem Fall GFP, publiziert (Kratz et al.). Dabei

wurde allerdings die Formierung von CLPs (Capsid like particles) nachgewiesen. Die globuläre Domäne (GFP) wurde dabei in das immunodominante c/e1 Epitop integriert. Über die Fluoreszenz von GFP konnten die korrekte Faltung von GFP und die Formierung von CLPs leicht nachgewiesen werden und zur Immunisierung wurden nur vollständige CLPs genutzt. Parallel zur Immunisierung mit den CLPs wurden auch Kaninchen mit denaturiertem Antigen immunisiert. Zwar führten beide Ansätze zu polyklonalen Antisera, die im Westernblot GFP detektierten, doch nur das Antiserum aus dem Immunisierungsansatz mit nativem Fusionsprotein konnte in der IP GFP in großem Maße im Eluat anreichern. In unserem Fall wurde die Kontrolle der Faltung des Fusionsproteins, im Speziellen der inserierten globulären Ig-Domäne, und die Formierung von CLPs nicht durchgeführt. Die inserierte Ig -Domäne hatte keine vergleichbaren Eigenschaften, die zur Identifizierung der korrekten Faltung oder Isolierung von CLPs genutzt werden konnte. Jedoch konnte auch ohne diese Nachweisverfahren eine hohe und Ig-fold spezifische Immunantwort hervorgerufen werden.

Es war wichtig, das HBcAg -Ig -fold Fusionsprotein unter nativen Bedingungen zu exprimieren, da die Struktur des Ig -folds von LaminA erhalten werden sollte. Dies war nötig, da konformationsspezifische Ak isoliert werden sollten. Die bekannte Struktur des Ig -folds legte die Vermutung nahe, dass vor allem die Mutation R453W (aber auch R482W) zu einer Änderung der Sekundärstruktur führen würde. Bis zur Eluierung der Proteine von den Ni-NTA beads verhielten sich die drei Proteine (HBc-Ag LaminA -WT, -R453W, und -R482W) ähnlich, doch dann zeigten sich deutliche Unterschiede. Das Fusionsprotein HBc-Ag LaminA R453W konnte nativ in nur sehr geringer Konzentration von den Beads gelöst werden (Abb. 32), zu gering für eine Immunisierung. Für die R453W Mutation wurde, wie bereits erwähnt, eine Änderung der Sekundärstruktur vorhergesagt die scheinbar zu einer veränderten/ stärkeren Bindung zu den Ni-NTA beads führte. Nur unter denaturierenden Bedingungen war es möglich adäquate Mengen an Protein von den beads zu lösen (Abb. 30). Wegen der geringeren erreichten Konzentration des löslichen HBc-Ag -R453W Proteins wurde die Immunisierung nur für die verbleibenden zwei Proteinformen gestartet (HBcAg -WT und R482W).

Obwohl bei der Immunisierung mit dem Fusionsprotein HBcAg -Ig -fold der gesamte Ig -fold von LaminA zur Immunisierung benutzt wurde, entwickelte die Immunreaktion eine hohe Zahl an LaminA spezifischen Ak, die sich auch gegen die gewünschte Region um die AS R/W482 richteten. Allerdings konnten im Depletions-ELISA (Abb. 34) nur punktmutations-spezifische (W482) nachgewiesen werden, scheinbar war die Substitution von R auf W482 immunogener oder besser zugänglich.

Die unterschiedlichen Immunisierungserfolge zwischen HBc-Ag LaminA -WT und -R482W und die Unterschiede in der Aufreinigung der Fusionsproteine (HBc-Ag LaminA -WT, -

R453W und –R482W), unterstützte die Hypothese der vorhergesagten geänderten Sekundärstruktur.

Die Immunisierungen mit den Fusionsproteinen HbC-Ag LaminA –WT und –R482W war äußerst erfolgreich, da die Antiseren ausnahmslos aller Tiere sehr hohe Titer mit LaminA/C Ig-fold –spezifischen Signalen in der Westernblotanalyse zeigten.

Bei allen HbC-Ag LaminA R482W immunisierten Tieren konnten im Depletions –ELISA mutationsspezifische Ak nachgewiesen werden. Da in diesem Fall das Protein unter nativen Bedingungen aufgereinigt wurde, könnte der LaminA –Teil des HbC-Ag LaminA –WT Proteins so gefaltet sein, dass er für eine Immunreaktion erschwert zugänglich oder schwächer immunogen ist. Dies würde erklären wieso für das Epitop R482 der WT –Form keine spezifischen Ak nachgewiesen werden konnten. Generell war die Reaktion auf den HbC –Teil des Fusionsproteins bei allen Tiere sehr hoch (im ELISA getestet, Daten nicht gezeigt).

Einige Klone aus der Fusion von der Maus HbC-Ag LaminA R482W bald 2 erkannten auf der Höhe von LaminC eine nicht weiter definierte Doppelbande, es handelte sich dabei um die Klone 7G12, 8A8, 8C3, 8D9, 8E7, 9C5 und 9D10. Vielleicht liegt LaminC in einer modifizierten, prozessierten oder auch mutierten Form vor, die allerdings noch nicht genauer beschrieben ist.

Die geänderte Sekundärstruktur der mutierten LaminA-Proteine, oder die Formierung von CLPs (Capsid like particles), die in vergleichbaren Studien (Kratz P.A. et al.; Nassal M. et al.) erfolgte und nachgewiesen wurde, könnte Auswirkung auf das Bindungsverhalten des Proteins an die Ni -Beads nach sich ziehen. Ersichtlich wurde dies bei der Aufreinigung der drei HbC-Fusionsproteine (-WT; -R453W, und –R482W, Abb. 30 und 32). Im Falle von formierten CLPs wird eine Bindung an Ni -NTA –Beads wahrscheinlich erschwert, da der His-Tag im Inneren der CLPs unzugänglich wird. Jedenfalls war bis zum Schritt der Eluierung das Expressionsverhalten der R453W Mutante vergleichbar zu den anderen zwei Formen.

Der Immunisierungsansatz mit dem HbC -Fusionsprotein lieferte mit Abstand den schnellsten Immunisierungserfolg für LaminA im Vergleich mit dem KLH- Immunisierungsansatz. Auch waren bei der HbC- Immunisierung kaum Hintergrundsignale in der Westernblotanalyse ersichtlich. Ein sehr hoher und spezifischer Titer war bereits im ersten Serum nachweisbar. Im ELISA –Depletionstest konnten dann auch mutationsspezifische Ak nachgewiesen werden. Für die WT –Form allerdings war dieses nicht möglich.

Allerdings setzte dieser Immunisierungsansatz voraus, dass das inserierte Protein (globuläre Domäne mit N- und C- Terminus in räumlicher Nähe und autonome Faltung), weswegen dieser Ansatz auch für den C-Terminus von Lap2 α nicht genutzt werden konnte. Eine weitere Alternative wäre allerdings ein Immunisierungsversuch bei dem ebenfalls nur ein kurzes

Peptid mit entsprechend langen Linkern in das immunodominante c/e1 Epitop des HBcAg inseriert wird. Dieser Ansatz würde die hohe Immunogenität des HBc –Fusionsproteins mit einer möglicherweise gesteigerten Spezifität eines kurzen Peptides vereinen. Es würde wahrscheinlich nicht zur nativen Faltung des inserierten Antigens kommen.

Der Immunisierungsansatz mit KLH wurde sowohl für Lap2 α WT und R690C als auch LaminA R482 und W482 angewandt. Für beide Proteine (LaminA als auch Lap2 α) konnte eine spezifische Immunreaktion hervorgerufen werden, jedoch mit unterschiedlichem Erfolg. Bei den KLH-LaminA immunisierten Tieren (für R482 (WT) und W482 durchgeführt) konnte in der Westernblotanalyse nur bei 3 von 8 Tieren ein, teils schwaches, LaminA spezifisches Signal nachgewiesen werden. Im Depletions –ELISA konnten jedoch keine WT- oder mutations- spezifischen Ak nachgewiesen werden. Aus diesem Immunisierungsansatz wurde daher keine Maus für eine Fusion ausgewählt.

Bei den KLH-Lap2 α immunisierten Tieren hingegen ließen sich bei allen 5 Mäusen im ELISA –Test Lap2 α spezifische Ak nachweisen und die Antiseren der KLH –Lap2 α WT immunisierten Tiere zeigten im Depletions –ELISA auch Lap2 α –WT spezifische Signale. Dafür, dass die KLH- Lap2 α -R690C immunisierten Tiere keine nachweisbaren mutationsspezifischen Ak entwickelten, gibt es folgende Erklärungen: Einerseits erfolgt die Kopplung des Peptides über ein endständiges Cystein (Teil der regulären Primärsequenz), was aber auch über die gewählte Mutation (Arginin zu Cystein) erfolgen kann. Sollte dies vermehrt der Fall gewesen sein, wäre ein Epitop, das diese Aminosäure enthält anders (erschwert) für die sich entwickelnde Immunreaktion zugänglich, verglichen mit dem WT-Epitop. Außerdem war es möglich, dass das Cystein der Mutation intra- sowie intermolekular in Schwefelbrücken komplexiert wurde. Auch dies würde zu einer anderen Zugänglichkeit des C690-Epitops im mutierten Protein führen.

Der zweite Ansatz für die Entwicklung Lap2 α -spezifischer Ak war jener, der Fusion der letzten 11 AS der humanen LAP2 α –Sequenz an die DnaJ -Domäne des Polyomavirus SV40. Die nachgewiesene Immunogenität der DnaJ -Domäne (Schirmbeck et al.) wurde hierbei genutzt. Die Expression und Aufreinigung des DnaJ- Fusionsproteins stellte keine Probleme, da das kleine Protein bereits unter Standardbedingung in hohem Maße exprimiert wurde und in der löslichen Fraktion zu finden war. Auch die Proteinanreicherung war dadurch, und durch die Tatsache, dass die Eluierung unter denaturierenden Bedingungen möglich war, über Ni-NTA beads effektiv und in hoher Konzentration von allen drei Proteinformen (-WT, –R690C und -R690S) möglich.

Der DnaJ -Ansatz wurde nur für das Lap2 α Protein durchgeführt. Abgesehen von der WT – Form und der R690C mutierten Form wurde zusätzlich eine R690S Form kloniert und

exprimiert. Wie bereits beschrieben, bestand auch hier die Möglichkeit, dass das Cystein des mutierten Proteins in Schwefelbrücken komplexiert wurde, und daher keine Ak gegen dieses Epitop gebildet werden können. Um diese mögliche Komplikation auszuschließen, wurde statt dem Cystein ein Serin eingefügt. Die Substitution von Cystein zu Serin kommt auch in der Natur öfters vor und kann dabei auch ohne pathogene Auswirkungen bleiben. Außerdem unterscheiden sich diese zwei AS (C und S) in ihrer Seitenkette nur durch ein einziges Atom (Serin trägt ein Sauerstoff- statt einem Schwefelatom). Ein monoklonaler Ak, der gegen die Serin –mutierte Form entwickelt wurde, könnte vielleicht auch die Cysteinmutation erkennen. Die Immunisierung mit dem DnaJ –Lap2 α R690S Protein wurde von mir gestartet, doch die generierten Antiseren nicht mehr von mir getestet. Die Antiseren der anderen Mäuse (mit DnaJ -Lap2 α –WT und –R690C immunisiert) wurden sowohl im ELISA (Abb. 59), Depletions –ELISA (Abb. 60) als auch in der Westernblotanalyse (Abb. 58) getestet. Dabei lieferten 3 der 4 mit DnaJ –Lap2 α –WT immunisierten Tiere Lap2 α –WT spezifische Ergebnisse, jedoch nur eine DnaJ –Lap2 α -R690C immunisierte Maus generierte Lap2 α spezifische Ak, deren Antiserum war auch mutationsspezifisch.

Im Immunisierungsansatz mit dem DnaJ- Fusionsprotein wurden die Erwartungen nicht ganz erfüllt. Gerechnet wurde, basierend auf der hohen Immunogenität der DnaJ –Domäne, mit einer sehr hohen und schnellen Immunantwort auch gegen das fusionierte Peptid. Die Zahl an Mäusen, die folgend auf die DnaJ- Immunisierung einen spezifischen Titer entwickelten, lag jedoch sogar unter der Zahl an Mäusen die nach der Immunisierung mit KLH gekoppelten Peptiden einen Lap2 α spezifischen Titer entwickelten. Mit dem KLH gekoppelten Peptid waren es 5 aus 5 Mäusen, die zumindest einen Lap2 α spezifischen Titer entwickelten, im Gegensatz zum DnaJ –Immunisierungsansatz, bei dem nur 4 aus 8 Mäusen Lap2 α spezifische Signale lieferten. Ein Vorteil dieser beiden Immunisierungsansätze war die Länge des eingesetzten Fusionspeptides. Schließlich bestand die Lap2 α –Domäne nur aus 11 AS was die Wahrscheinlichkeit für die Erkennung der zentral gelegenen Mutation verbessern sollte. Für die Mäuse die mit der WT –Form immunisiert wurden konnten in beiden Ansätzen WT- spezifische Ak nachgewiesen werden, doch für Mäuse die mit der R690C mutierten Form immunisiert wurden, war dies nur bei einer Maus im DnaJ- Ansatz möglich. Wie bereits mehrmals erwähnt könnte dies auch daran liegen dass die Seitengruppe des Cysteins in einer Disulfidbrücke ‚versteckt‘ und somit erschwert zugänglich ist.

Die hohe Immunogenität der DnaJ -Domäne wirkte sich nicht so positiv auf den fusionierten Teil von Lap2 α aus wie erwartet, der Schwerpunkt der Immunreaktion konzentrierte sich natürlich auf die wesentlich längere DnaJ -Domäne. Denn wie in einem ELISA -Test sichtbar war zeigten alle Mäuse dieses Immunisierungsansatzes gegen die DnaJ –Domäne einen sehr hohen Titer. Das Lap2 α - Fusionspeptid konnte also von der an sich starken

Immunreaktion nicht ausreichend profitieren. Allerdings war auch im HBc –Ansatz die Immunreaktion der Tiere gegen den HBc- Teil groß, was sich aber auf den Ig –fold von LaminA übertrug. Vielleicht lag es daran, dass das HBc –Protein den Ig-fold beidseitig umschloß und nicht nur N -terminal fusioniert war, außerdem bot der Ig-fold im Vergleich zum kurzen Lap2 α –Peptid wesentlich mehr potenzielle Epitope.

Eine Alternative zum Immunisierungsansatz mit dem Fusionsprotein mit der DnaJ-Domäne wäre zum Beispiel die Kopplung der gleichen, oder noch kürzeren Peptiden an die zellulären Bindungspartner der DnaJ –Domäne, Proteine der hsp70 Familie. Denn die Immunogenität der DnaJ –Domäne beruht auf der Bindung an eben diese zellulären Proteine (Schirmbeck et al.).

Rückblickend auf die drei unterschiedlichen Immunisierungsreihen (HBc-Ag für den LaminA Ig-fold, DnaJ für das Lap2 α - Peptid, und KLH für Lap2 α als auch LaminA R482 und W482) waren alle drei Ansätze durchaus zielführend, aber mit unterschiedlicher Effizienz.

Der KLH- Fusionsansatz scheint hoch effizient zur Generierung eines Ak der spezifisch für einen speziellen Proteinabschnitt sein soll, doch zur Generierung punktspezifischer Ak schien vor allem der HBc- Ag Immunisierungsansatz sehr gut geeignet. Jedoch schließt dieser Ansatz durch die experimentellen Grundlagen Antigene aus, denn nur globuläre Domänen mit bekannter Sekundärstruktur und räumlich eng zusammenliegenden N- und C-Termini können bislang in das HBc –Ag eingesetzt werden. Allerdings existieren auch Studien bei denen Proteine über längere Linker in das c/e1 Epitop von HBc inserierten wurden (OspA, Nassal et al.), was eine gute Alternative für Proteine wäre, die nicht den geforderten Ansprüchen genügen (Pumpens P. und Grens E.).

Nur eine der durchgeführten Fusionen führte zur Produktion eines monoklonalen Ak, der den C-Terminus von humanem Lap2 α erkennt. Der isolierte Einzelklon 3A3 bietet alle der ausgetesteten Anwendungsmöglichkeiten: ELISA, Westerndetektion, IF und IP. Die Analyse der Ak-Eigenschaften zeigte, dass dieser Ak bereits spezifisch zwischen zwei Proteinformen unterscheiden kann, die sich nur in einer AS unterscheiden und zwar der humanen und der murinen Form von Lap2 α (Unterschied in der letzten AS). Somit konnte bereits ein punktspezifischer Ak isoliert werden. Im Laufe der Charakterisierung konnte das Epitop auf den äußersten C-Terminus eingeschränkt werden und auch die terminale COOH-Gruppe konnte als Teil des Epitops festgelegt werden (erkennt Lap2 α in einer C -terminal GFP getagten Form nicht).

Im Zuge des Protokolls zur Generierung von monoklonalen Ak ist so, dass oft vielversprechende Klone im Laufe der Verdünnungsschritte, die zur Einzelklonisierung

essentiell sind, verloren gehen oder zumindest ihre Ak -Produktivität verlieren. Nach wie vor entsteht durch die Fusion eine polyploide Zelle, die dazu tendiert ihren Chromosomensatz gerade in den ersten Teilungen nach der Fusion zu reduzieren. Da aber nicht direkt auf die Produktion von Ak selektiert werden kann, ist es möglich, dass die Zelle das Chromosom zur Produktion von Immunglobulinen verliert und somit nicht länger zur Ak -Produktion im Stande ist. Zwar existiert ein spezieller Mausstamm bei dem durch eine natürliche Translokation das Chromosom mit dem Locus der Ig -Produktion und das Chromosom mit dem Selektionslocus (APRT) zu einem Chromosom vereinigt sind (Robertsonian Translokation; CByJ.RBF-Rb(8.12)5Bnr/J – Mausstamm), doch konnte dieser die erwartete Hybridomstabilität nicht erhöhen.

Ein weiterer Faktor weswegen manche Klone vielleicht verloren gingen, oder gar nicht erst gefunden wurden, ist der des Detektionsverfahrens, zuerst durch ELISA und erst danach durch die Westernblotanalyse. Allerdings ergab sich diese Einschränkung aus dem Versuchsaufbau. Wie beschrieben erkennen nicht alle Ak ihr Epitop in ELISA als auch Westernblotanalyse. Der ELISA hat den Vorteil, viele Kulturüberstände in einem Test zu untersuchen, was für den Westerntest unter den gegebenen Bedingungen nicht praktikierbar war. Allerdings war es das Ziel einen Ak zu isolieren der in erster Linie in der Westerdetektion zur Anwendung kommen sollte, daher schränkte sich die Suche auf die Schnittgruppe ein, die in beiden Anwendungen positive Signale gibt. Diese Einschränkung konnte jedoch durch Westernblotapparaturen, die es ermöglichen eine große Zahl von Überständen in der Westernbloanalyse parallel zu testen, bereits ausgemerzt werden. Bei den von mir ausgeführten Fusionen war es einmal der Fall, dass ein Klon, der ohne ELISA -Signal als Negativkontrolle in der Westernblotanalyse eingesetzt wurde, dann doch ein Signal lieferte (Fusion DnaJ -Lap2 α WT immunisierte Maus RBF2, Abb 62 Klon 1A6). Ansonsten lieferten ca. 60% der ELISA positiven Überstände auch in der Westernblotanalyse ein Signal.

Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz liegt in der Art der Protein/ Peptid-Präsentation, denn im ELISA, im Gegensatz zur Westernblotanalyse, unterliegt das Protein oder Peptid nicht denaturierenden Bedingungen. Hier könnten also nativ erkennende Ak auch ihr Epitop finden.

Im Laufe meiner Arbeit konnte ich Hinweise liefern, dass es möglich ist punktmutationsspezifische Ak zu generieren, diesbezüglich lieferte vor allem der Immunisierungsansatz mit dem Hbc-LaminA-Ig-fold Fusionsprotein vielversprechende Ergebnisse. Ich konnte einen monoklonalen Ak gegen den C-Terminus von humanem Lap2 α produzieren, der sowohl in der Immunfluoreszenz als auch in der Immunopräzipitation einsetzbar ist.

7 Danksagung

Vielen Dank an alle Mitglieder des Labors von Prof. Egon Ogris für die liebe Unterstützung (physisch wie psychisch), allen voran natürlich Prof. Egon Ogris selbst und Dr. Stefan Schüchner. Außerdem gilt mein Dank auch den Mitarbeitern aus dem Labor von Prof. Roland Foisner, die nicht nur Materialien zur Verfügung stellten, sondern mir auch immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie und engen Freunden danken, die mich auch in so mancher dunklen Stunde unterstützt haben. Ohne auch nur einer der genannten Personen wäre all das nicht möglich gewesen.

8 Referenzen

1. Abbas A.K., Lichtman A.H. Cellular and molecular Immunology; fifth Edition; Saunders, 2003
2. Brodsky J.L., Pipas J.M. Polyomavirus T Antigens: Molecular Chaperones for multiprotein complexes. *J of Virology* 72/7: 5329-5334; 1998
3. Broers J.L.V. et al. Decreased mechanical stiffness in LMNA^{-/-} cells is caused by nucleo-cytoskeletal integrity. Implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet* 13(21): 2567-80; 2004
4. Broers J.L.V. et al. Review Article; Laminopathies. *J Pathol* 204: 478-488; 2004
5. Capell B.C. et al. Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *PNAS* 102; 36, 12879-12884; 2005
6. Cohen M. et al. Transcriptional repression, apoptosis. human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *TIBS* 26: 41-48; 2001
7. Dhe-Paganon S. et al; Structure of the Globular Tail of nuclear Lamins; *JBC* Vol 277, No 20, 17381-17384; 2002
8. Goldman R. et al; Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture; *genesdev* 16:533-547; 2002
9. Gotzmann J. and Foisner R.; *Molecular Mechanisms of Muscular Dystrophies*, edited by Steve J. Winder; 2004
10. Hutchison C.J. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nature Rev Mol Cell Biol* 3: 848-858; 2002
11. Johnson B.R. et al. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *PNAS* 101; 26, 9677-9682; 2004
12. Kratz P.A. et al. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *PNAS* 96; 1915-1920; 1999

13. Krimm I. et al. The Ig-like structure of the C-terminal domain of LaminA/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure* 10, 811-823; 2002
14. Kryder K. et al. Improved Immunogenicity of HIV-1 epitopes in HBsAg chimeric DNA vaccine plasmids by structural mutations of HBsAg. *DNA and Cell biology* 18/3: 219-225; 1999
15. Lammerding J. et al. LaminA/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest* 113: 370-378; 2004
16. Maidment Stephen L. and Ellis Juliet A. Muscular dystrophies, dilated cardiomyopathy, lipodystrophy and neuropathy: the nuclear connection. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4:17:1-21 Cambridge University Press 2002
17. Moir R.D. and Spann T.P. The structure and function of nuclear lamins: implications for disease. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 1748-1757; 2001
18. Nassal M. et al. A fusion product of the complete *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) and the hepatitis B virus capsid protein is highly immunogenic and induces protective immunity similar to that seen with an effective lipidated Osp A vaccine formula. *Eur. J. Immunol.* 35: 655-665; 2005
19. Parnaik VK and Manju K. Laminopathies: multiple disorders arising from defects in nuclear architecture. *J Biosci.* 31(3):405-21; 2006
20. Peter M. and Nigg; Ectopic expression of an A-type lamin does not interfere with differentiation of lamin A-negative embryonal carcinoma cells. *J. Cell Dxi.* 100:589-598; 1991
21. Pumpens P. und Grens E. HBV core particles as carrier for B cell/ T cell epitopes. *Intervirology*, 44(2-3):98-114; 2001
22. Rusiñol A.E. and Sinensky M.S. Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *J Cell Sci* 119: 3265-3272; 2006
23. Schirmbeck R. et al. Priming polyvalent immunity by DNA vaccines expressing chimeric antigens with a stress protein-capturing, viral J-domain. *FASEB Journal* 16(9):1108-10; 2002
24. Shumaker D. K. et al. Functions and dysfunctions of the nuclear lamin Ig-fold domain in nuclear assembly, growth, and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *PNAS* 102(43): 15494-15499; 2005
25. Sinensky M. et al. The processing pathway of prelamin A. *Journal of Cell science* 107, 61-67; 1994
26. Snyder et al. Lamina-associated Polypeptide 2- α Forms Homo-trimers via Its C Terminus, and Oligomerization Is Unaffected by a Disease-causing Mutation. *J. Biol. Chem.*, 282 (9) 6308-6315; 2007

27. Stewart CL et al. Mouse models of the laminopathies. *Experimental cell research* 313(10): 2144-56; 2007
28. Sullivan C.S., Pipas J.M. T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(2):179-202; 2002
29. Taylor M.R.G. et al Thymopoietin (lamina associated polypeptide 2) gene mutation associated with dilated Cardiomyopathy. *Human Mutation* 26(6), 566-574; 2005
30. Venables R.S. et al. Expression of individual lamins in basal cell carcinomas of the skin. *Ann. Neurol.* 39, 636-642; 2001
31. Vogel M et al. Quarternary structure is critical for Protein display on capsid-like particles (CLPs): Efficient generation of Hepatitis B Virus CLPs presenting monomeric but not dimeric and tetrameric fluorescent proteins. *Proteins: Structure, function and Bioinformatics* 58: 478-488; 2005
32. Wilson K.L. et al. Lamins and disease: insights into nuclear infrastructure. *Cell* 104: 647-650; 2001

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

9 Lebenslauf

Name: Veronika Huber (geb. Kiszka am 18.06. 1981)

Adresse: Hochstrass 531/1/8, 3033 Altllengbach

Eltern: Friederike Kiszka (zahnärztliche Assistentin, geb. Groschel am 10.2. 1956) und Werner Kiszka (Beamter des BMI, geb. 26.1. 1954)

Geschwister: Andreas Kiszka (geb. 4.10. 1982)

schulische Laufbahn: September 1987 bis Juli 1991 VS Mondweg

September 1991 bis Juni 1999 AHS Lützowgasse (BRG XIV)
Abschluß mit Matura

Oktober 1999 bis Mai 2001 HLF Krems (Kollege für Tourismus und Marketing) Abschluß als diplomierte Touristikkauffrau mit gutem Erfolg

ab Oktober 2001: Studium der Biologie an der Universität Wien mit Spezialisierung auf Mikrobiologie und Genetik

November 2006 bis August 2007 Arbeit zur Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. Egon Ogris

WS2008 Karenzierung zur Kinderbetreuung

persönliche Daten: September 2005: Heirat mit Helge Huber
Juli 2008: Geburt der Tochter Sarah Marie Huber