

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Pharmazie und Chemie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Institut für Pharmazeutische Biologie

und

**Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik – Innenstadt**

**Klonierung, rekombinante Expression
und erste Charakterisierung
des humanen hodenspezifischen
Serinprotease-ähnlichen Proteins T-GPI-SP1**

Dipl.-Biol. (Univ.) Birgit Profanter

aus

München

2007

*Für meine Eltern
und für Peter*

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Frau **Prof. Dr. rer. nat. Marianne Jochum** von der Medizinischen Fakultät betreut und wird von Frau **Prof. Dr. rer. nat. Angelika Vollmar** von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 17. Dezember 2007

.....
(Birgit Profanter)

Dissertation eingereicht am 18. Dezember 2007

1. Gutachter Prof. Dr. Marianne Jochum

2. Gutachter Prof. Dr. Angelika Vollmar

Mündliche Prüfung am 20. Februar 2008

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abkürzungsverzeichnis	VI
A	Zusammenfassung	1
B	Einleitung	3
B.1	Bedeutung von Proteasen	3
B.1.1	Patho/physiologische Aspekte	3
B.1.2.	Vorkommen, Katalysemehanismus und Membranbindung von Serinproteasen	4
B.1.3	Proteolytische Enzyme im männlichen Genitaltrakt	6
B.2	Der menschliche Hoden	7
B.2.1	Aufbau und Funktion	7
B.2.1.1	Der Hoden mit interstitiellen Zellen	7
B.2.1.2	<i>Ductuli efferentes</i> , Nebenhoden und Spermienreifung	8
B.2.2	Proteolytische Faktoren im Ejakulat	10
B.3	Molekulare und bioinformatische Charakterisierung der humanen T-GPI-SP1	11
B.3.1	mRNA-Vorkommen der T-GPI-SP1 in humanen Geweben	12
B.3.2	Spleißvarianten der T-GPI-SP1 und genomische Struktur	12
B.3.3	Proteinstruktur der humanen T-GPI-SP1	14
B.4	Aufgabenstellung	17
B.4.1	Zielsetzung 1: Erstellung des mRNA-Expressionsprofils der T-GPI-SP1 aus verschiedenen humanen Geweben	17
B.4.2	Zielsetzung 2: Rekombinante Expression der humanen T-GPI-SP1 in verschiedenen Expressionssystemen	18
B.4.3	Zielsetzung 3: Immunologische sowie biochemische Lokalisation und funktionelle Charakterisierung der humanen T-GPI-SP1	18
C	Material und Methoden	19
C.1	Material	19
C.1.1	Geräte für mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten	19
C.1.2	Geräte für proteinbiochemische Arbeiten	19
C.1.3	Geräte für Fermentation	19
C.1.4	Sonstige Geräte	20

C.1.5	Material für mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten	21
C.1.5.1	Nährmedien und Zusätze	21
C.1.5.2	Chemikalien	21
C.1.5.3	Kits	21
C.1.5.4	Enzyme	22
C.1.5.5	Vektoren und Plasmide	22
C.1.5.6	Oligonukleotide	27
C.1.6	Material für die Proteinanalytik	29
C.1.6.1	Allgemeine Chemikalien und Materialien	29
C.1.6.2	Antikörper	29
C.1.6.3	Proteasesubstrate und Inhibitoren	30
C.1.7	Material für Zellkulturtechnik	30
C.1.8	Sonstige Materialien, Lösungen und Kits	31
C.1.9	Prokaryontische und eukaryontische Zellen	32
C.1.10	Gewebeschnitte; Gewebe-assoziierte Arrays, RNAs und cDNAs	33
C.2	Methoden	34
C.2.1	Mikro- und zellbiologische Methoden	34
C.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen (Kulturmedien, Stammhaltung, Anzucht und Vermehrung)	34
C.2.1.2	Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i> (Kulturmedien, Stammhaltung, Anzucht und Vermehrung)	35
C.2.1.3	Kultivierung von Säugerzellen (HEK293) (Kulturmedien, Zellsplitten, Zellzahlbestimmung, Einfrieren/Auftauen)	36
C.2.1.4	Isolierung von Spermien aus humanem Ejakulat	37
C.2.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	38
C.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
C.2.2.2	Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	38
C.2.2.3	Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese	39
C.2.2.4	Reinigung und Sequenzierung von DNA	39
C.2.2.5	Isolierung von RNA aus Spermien	40
C.2.2.6	Quantifizierung von DNA und RNA	40
C.2.2.7	cDNA-Synthese und quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	41
C.2.3	Expression von T-GPI-SP1 in <i>E. coli</i>	42
C.2.3.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation	42
C.2.3.2	Zellkultur, Zellernte und Isolierung der Einschlusskörperchen	42

C.2.4	Expression von T-GPI-SP1 in <i>Pichia pastoris</i>	43
C.2.4.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>Pichia pastoris</i> -Zellen Transformation und Selektion von positiven Zellen	43
C.2.4.2	Anzucht im Fernbachkolben und im Fermenter	43
C.2.4.3	Zellernte und Ankonzentrierung des Mediums	44
C.2.5	Expression von T-GPI-SP1 in Säugerzellen	45
C.2.5.1	Transfektion von HEK293- und HEK293 Flp-In-Zellen	45
C.2.5.2	Konstitutive Expression in HEK293-Zellen	45
C.2.5.3	Induzierbare Expression in HEK293 Flp-In-Zellen	45
C.2.6	Reinigung der T-GPI-SP1-Konstrukte	46
C.2.6.1	Dialyse	46
C.2.6.2	Kationenaustauscherchromatographie	46
C.2.6.3	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Sepharose	47
C.2.7	Proteinchemische Charakterisierung von T-GPI-SP1	48
C.2.7.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
C.2.7.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
C.2.7.3	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blau	48
C.2.7.4	Western Blot-Analyse	49
C.2.7.5	N-terminale Aminosäuresequenzierung	49
C.2.7.6	Glykosylierungsanalysen	50
C.2.7.7	Prozessierung von rekombinanten Pro-T-GPI-SP1-Varianten	50
C.2.7.8	Aktivitätsbestimmung	50
C.2.8	Transkriptanalyse von T-GPI-SP1 in diversen Geweben	51
C.2.8.1	DNA-Sonde	51
C.2.8.2	mRNA-Array	51
C.2.8.3	Quantitative RT-PCR	52
C.2.9	Herstellung polyklonaler T-GPI-SP1-Antikörper	52
C.2.9.1	Grundimmunisierung, Boostern und Serumgewinnung	52
C.2.9.2	Titerbestimmung und -überwachung mittels ELISA	53
C.2.9.3	Reinigung mittels Ionenaustauscherchromatographie	53
C.2.10	Isolierung von T-GPI-SP1 aus humanem Seminalplasma	54
C.2.10.1	Magnetische Immunpräzipitation	54
C.2.10.2	Immunpräzipitation mittels Protein G-Agarose	54
C.2.10.3	Immunpräzipitation mittels eines Säulen-gekoppelten Liganden	54
C.2.11	Immunhistochemische Analyse von T-GPI-SP1 in humanen Spermien und fixierten Gewebeschnitten	55
C.2.12	Fluoreszenzmikroskopie	55

D	Ergebnisse	56
D.1	Gewebespezifische mRNA-Expression von humaner T-GPI-SP1	56
D.1.1	Untersuchung der cDNA verschiedener humaner Gewebe	56
D.1.2	Quantitative Ausprägung der Spleißvarianten von T-GPI-SP1 in humanem Hoden und in Spermien	59
D.2	Expression von T-GPI-SP1-Varianten in <i>E. coli</i>	60
D.2.1	Konstrukte und Vektoren	60
D.2.2	Expression und Reinigung	61
D.2.3	Rückfaltung	63
D.2.4	Prozessierung des N-Terminus mittels Furin und Trypsin	64
D.3	Herstellung und Charakterisierung des polyklonalen T-GPI-SP1-Antikörpers	66
D.3.1	Herstellung des Antikörpers	66
D.3.2	Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung	67
D.4	Expression von T-GPI-SP1-1 in <i>Pichia pastoris</i>	69
D.4.1	Konstrukte und Vektoren	69
D.4.2	Transformation von <i>Pichia pastoris</i> und Selektion von Klonen	71
D.4.3	Expression im Fernbachkolben und im Fermenter	72
D.4.4	Reinigung	73
D.4.4.1	Kationenaustauscher-Chromatographie	73
D.4.4.2	Affinitätschromatographie	74
D.5	Expression von T-GPI-SP1-1 in Säugerzellen	75
D.5.1	HEK293-Systeme, Konstrukte und Vektoren	75
D.5.1.1	Plasmidkonstruktion für das konstitutive HEK293-System	76
D.5.1.2	Plasmidkonstruktion für das induzierbare HEK293 Flp-In-Zellen-System	76
D.5.2	Transfektion, Selektion und Expression	78
D.5.3	Lokalisationsanalysen der rekombinanten Expression	78
D.5.4	Reinigung einer rekombinanten Form von T -GPI-SP1-1	80
D.6	Biochemische Charakterisierung	81
D.6.1	N-terminale Aminosäuresequenzierung	81
D.6.2	Glykosylierungsanalysen	81
D.6.3	Prozessierung des N-Terminus der rekombinanten Pro-T-GPI-SP1-1	82
D.6.4	Untersuchungen zur Stabilität der rekombinanten T-GPI-SP1	82

D.7	Funktionelle Charakterisierung	84
D.7.1	Analyse der proteolytischen Aktivität von rekombinanter T-GPI-SP1 aus <i>E. coli</i> und <i>Pichia pastoris</i>	84
D.7.2.	Aktivitätsmessungen in HEK293-Zellen und Zellkulturüberständen	85
D.8	Gewebespezifische Expression des T-GPI-SP1-Proteins	86
D.8.1	T-GPI-SP1 in humanen Testis- und Epididymispräparaten	86
D.8.2	T-GPI-SP1 in humanem Ejakulat	88
D.8.3	T-GPI-SP1 in humanen Ovarial- und Prostatakarzinompräparaten	90
E	Diskussion	93
E.1	mRNA-Expressionsprofil von T-GPI-SP1 in verschiedenen humanen Geweben	93
E.2	Rekombinante Expression von humaner T-GPI-SP1	96
E.2.1	Expression in <i>E. coli</i> zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern	96
E.2.2	Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers	97
E.2.3	Expression in <i>Pichia pastoris</i>	99
E.2.4	Expression in HEK293-Zellen	100
E.3	Biochemische und funktionelle Charakterisierung von rekombinanter T-GPI-SP1	101
E.3.1	Membranverankerung und Glykosylierung	101
E.3.2	Studien zur proteolytischen Aktivität und Stabilität	102
E.4	Gewebelokalisation und mögliche Funktionen des T-GPI-SP1-Proteins	108
E.5	Schlussfolgerung und Ausblick	110
F	Literaturverzeichnis	111
G	Anhang	120
H	Lebenslauf	122
I	Danksagung	124

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin I Converting Enzyme</i>
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	Di-tert-butylidicarbonat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bz	Benzoyl
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
D	Dexter, rechtsdrehend
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosobent Assay</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
EtOH	Ethanol
EYFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
FRT	<i>Flp Recombinase Target</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
hK	humanes Kallikrein-Protein
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>

IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KLK	humanes Kallikrein-Gen
LB	Luria Bertoni
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
Meo	Methoxy-
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NaAc	Natriumacetat
NAc	N-Acetyl
OD _x	optische Dichte bei x Nanometern
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
STPK	<i>Similar to Plasma Kallikrein Precursor</i>
Suc	Succinyl-
TBS(-T)	<i>Tris Buffered Saline</i> (mit Tween-20 und Triton-X 100)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydromethyl)-aminomethan
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteil in Prozent
w/v	Gewichtsanteil in Prozent
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
Z	Benzyloxycarbonyl-

A Zusammenfassung

Serinproteasen spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung eines Organismus. Dazu gehören bedeutende Prozesse wie die Befruchtung, die Immunantwort, die Wundheilung, die Blutgerinnung und die Verdauung. Des Weiteren sind Serinproteasen an einer Vielzahl von Krankheiten beteiligt, wo sie beispielsweise in die Entzündung und in die Tumorprogression involviert sind.

Kürzlich wurde eine neue Gruppe von membranverankerten Chymotrypsin (S1)-ähnlichen Serinproteasen identifiziert, die möglicherweise eine Rolle in malignen Erkrankungen spielen. Ein Mitglied dieser Gruppe ist die von Netzel-Arnett et al. (2003) erwähnte GPI-SP1 (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-verankerte Serinprotease 1), die in der Datenbank NCBI auch als Tryptophan/Serinprotease (Accession Number NM_198464) gelistet ist. In der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München hat Herr Dr. P. Neth dieses Protein schließlich aufgrund seines primären Vorkommens in Testisgewebe als T-GPI-SP1 (Testis-Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-verankerte Serinprotease 1) benannt und herausgefunden, dass drei Spleißvarianten von T-GPI-SP1 existieren. T-GPI-SP1-1 besteht aus einem 18 Aminosäuren langen Signalpeptid, einem 49 Aminosäuren umfassenden Propeptid und einer 228 Aminosäuren umfassenden katalytischen Domäne. Letztere zeigt eine Aminosäuresequenzidentität von 91 % und 82 % mit derjenigen von T-GPI-SP1-2 bzw. T-GPI-SP1-3. Nur T-GPI-SP1-1 besitzt einen hydrophoben Teil aus 17 Aminosäuren am C-Terminus, der eine mögliche Verankerung des Proteins in der Zellmembran darstellen könnte.

Ein Hauptziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es nun, mittels geeigneter molekularbiologischer, biochemischer und immunhistochemischer Methoden Beiträge zur näheren Charakterisierung dieser bisher weitgehend unaufgeklärten Serinprotease zu leisten, und zwar zunächst durch die Evaluierung des mRNA-Expressionsprofils von T-GPI-SP1 in diversen Geweben und danach insbesondere durch die rekombinante Herstellung des Proteins in verschiedenen Expressionssystemen, die weiterführende Untersuchungen ermöglichen sollte.

Zur Überprüfung des Transkriptprofils von T-GPI-SP1 wurden verschiedene humane Gewebe getestet, wobei die mRNA-Expression vornehmlich in Hodengewebe, in geringerem Ausmaße aber auch in Schilddrüsengewebe von Männern detektiert wurde. Bezüglich der quantitativen Ausprägung der drei Spleißvarianten in humanem Hodengewebe und in Spermien konnte gezeigt werden, dass die höchsten Transkriptmengen die Spleißvariante T-GPI-SP1-1 aufweist, während T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 in wesentlich niedrigeren Mengen exprimiert werden.

Da wir auch an der Expression des T-GPI-SP1-Proteins und somit an dessen Lokalisation in humanen Geweben interessiert waren, war für immunhistochemische Untersuchungen die Herstellung von polyklonalen Antikörpern notwendig. Hierfür wurden die drei Spleißvarianten von T-GPI-SP1 in *E. coli* exprimiert und T-GPI-SP1-3 wegen ihrer besten Ausbeute für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Der generierte polyklonale Antikörper erkennt aufgrund der hohen Aminosäuresequenzidentität des Antigens und der beiden weiteren Varianten alle drei Spleißformen aus *E. coli* ebenso wie rekombinant hergestellte T-GPI-SP1-1-Konstrukte aus anderen Expressionssystemen.

Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte nun nachgewiesen werden, dass in Übereinstimmung mit dem mRNA-Profil die Expression von T-GPI-SP1 vornehmlich in humanem Hodengewebe, genauer gesagt in den Leydigischen Zellen, in den Sertoli-Zellen und in den Epithelzellen der *Ductuli efferentes* erfolgt. Zudem konnte T-GPI-SP1 auch in einigen humanen Ovarialtumoren und im Prostatakarzinom detektiert werden.

Für funktionelle Studien wurde die *in vivo* am häufigsten vorkommende T-GPI-SP1-1 rekombinant in den Expressionssystemen *Pichia pastoris* und in der HEK293-Zelllinie hergestellt. Durch geeignete Genkonstruktwahl war es außerdem möglich, eine Membranverankerung von T-GPI-SP1-1 nachzuweisen, die einem hydrophoben Bereich am C-Terminus des Proteins zugeordnet werden konnte.

Die Aufreinigung dieses hoch instabilen Proteins stellte allerdings eine große Herausforderung dar. Möglicherweise liegt es gerade an dieser Instabilität, die durch computergestützte Analysen bestätigt wurde, dass keine enzymatische Aktivität von T-GPI-SP1 nachzuweisen war. Weder der Einsatz einer Vielzahl von synthetischen Substraten noch Aktivierungsstudien mittels der Proteasen Furin und Trypsin erlaubten die Detektion einer proteolytischen Aktivität, weshalb die biologische Funktion dieses strukturell Protease-ähnlichen Proteins einer weiteren Aufklärung bedarf.

B Einleitung

B.1 Bedeutung von Proteasen

Proteasen repräsentieren etwa 2 % der Gesamtproteine im Organismus, wobei etwa 500 menschliche Gene existieren, die für Proteasen und deren Homologen kodieren (Rawlings und Barrett 1999). Im menschlichen Genom sind derzeit knapp 1000 untersuchte oder putative Proteasen bzw. deren Homologe bekannt (www.merops.sanger.ac.uk). Zu ihnen gehören intra- und extrazellulär vorkommende hydrolytische Enzyme, die Peptidbindungen selektiv und irreversibel spalten können und daher auch Peptidasen genannt werden. Grundsätzlich werden Proteasen nach dem katalytischen Reaktionsmuster, d.h. der Beteiligung von bestimmten Aminosäuren im katalytischen Zentrum, in 8 Hauptklassen (Aspartic A, Cysteine C, Glutamic G, Metallo M, Mixed P, Serine S, Threonine T, Unknown U) und nach der Ähnlichkeit ihrer Tertiärstruktur in Clans und entsprechend der Isoformen einer Protease in Familien eingeteilt (Rawlings et al. 2004, <http://www.merops.ac.uk>). Die Serinproteasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase werden demzufolge der Familie der S1-Proteasen zugeordnet, die dem Chymotrypsin-ähnlichen Clan PA (früher SA) angehört (www.merops.ac.uk).

B.1.1.1 Patho/physiologische Aspekte

Ein Ungleichgewicht in der Homöostase von Proteasen und ihren endogenen Inhibitoren im Organismus kann zu pathologischen Erscheinungen führen. So können zum Beispiel Proteine der extrazellulären Matrix (d.h. des Binde- und Stützgewebes) von aus Zellen freigesetzten Mitgliedern nahezu aller Proteasenklassen unkontrolliert abgebaut werden. Dies spielt nicht nur bei der Entzündung, sondern vor allem bei der Metastasierung von Tumorzellen eine zentrale Rolle (Johnsen et al. 1998). Bei der Metastasierung von Zellen des Brustkarzinomgewebes wird u.a. die Serinprotease Elastase vermehrt exprimiert (Foekens et al. 2003), die ansonsten nur in neutrophilen Granulozyten zu finden ist und als ursächlich für das multiple Organversagen bei Sepsis und nach schwerem Polytrauma angesehen wird (Jochum et al. 1994, Waydhas et al. 1996). Auch die Serinproteasen „Urokinase-ähnlicher Plasminogenaktivator“ (uPA) und das Gewebekallikrein hK1 (Reuning et al. 2003, Yousef and Diamandis 2003b, Clements 1997) sind an der fortschreitenden Entwicklung von Tumoren und Entzündungsprozessen beteiligt, um aus der Vielzahl der bekannten Reaktionen nur einige wenige Beispiele zu nennen.

Des Weiteren können genetische Defekte die Ursache für eine deregulierte Proteasenexpression in bestimmten Geweben sein. Erkrankungen wie die Ausbildung des Typ 2 Diabetes haben oftmals einen genetischen Hintergrund, aber nur wenige Gene wie jenes, das für die Cysteinprotease Calpain 10 kodiert, wurden bis jetzt mit diesem Krankheitsbild assoziiert (Stumvoll et al. 2005).

Ohne an dieser Stelle die immense physiologische und pathologische Bedeutung der Proteasen vertiefen zu wollen, steht außer Frage, dass aufgrund ihrer zentralen Stellung Proteasen sowie deren Inhibitoren wichtige Zielmoleküle in der Forschung darstellen, um nach der Aufklärung ihrer Funktionsweise konsequente Therapieansätze entwickeln zu können.

B.1.2 Vorkommen, Katalysemechanismus und Membranbindung von Serinproteasen

Serinproteasen sind eine der umfangreichsten und hoch konserviertesten Peptidasen innerhalb der diversen Proteasenklassen. Sie werden durch zahlreiche Gene kodiert (Rawlings and Barrett 1994, Lander et al. 2001), wobei die Trypsin-ähnlichen Peptidasen der S1-Familie des Clans PA der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen anzahlmäßig den größten Teil der Serinproteasen ausmachen und in Eukaryoten, Prokaryoten, Archäen und Viren auftreten (Polgar 2005). Serinproteasen werden demzufolge in vielen Geweben und biologischen Flüssigkeiten gefunden. Sie spielen eine wichtige Rolle in entwicklungsbiologischen Prozessen sowie bei der Aufrechterhaltung der Homöostase inklusive der Immunantwort, der Fibrinolyse, der Blutgerinnung und der Verdauung.

Serinproteasen sind durch ein aktives Serin gekennzeichnet, das mit den Aminosäuren Histidin und Aspartat die sog. katalytische Triade im aktiven Zentrum der katalytischen Domäne bildet (Yousef et al. 2004). Obwohl alle Serinproteasen diese typische katalytische Triade besitzen, sind sie in ihrer Substratspezifität doch sehr unterschiedlich. Einige zeichnen sich durch eine hohe Substratspezifität aus wie etwa der Faktor XI, der nur Faktor IX spaltet, während beispielsweise Trypsin viele Proteine unspezifisch an Arginin- oder Lysin-Resten degradieren kann (Green 2006, Whitcomb & Lowe 2007).

Der katalytische Mechanismus der Serinproteasen (Abbildung B.1) beginnt mit einem nukleophilen Angriff durch die Hydroxylgruppe des Serins auf das Carbonylkohlenstoffatom des Substrates und wird durch die Imidazolgruppe des Histidins als Base katalysiert (1). Dies führt zur Formation eines tetrahedralen Zwischenproduktes und eines Imidazoliumions (2) (Additionsreaktion). Das tetrahedrale Zwischenprodukt zerfällt, und es entstehen ein Acyl-Enzym, eine Imidazolbase und ein Amin-Produkt (3,4) (Eliminierungsreaktion). Während des Acylierungsschrittes transferiert die Imidazolgruppe das Proton der Hydroxylgruppe des Serins auf die austretende Aminogruppe. Das Acyl-Enzym wird deacyliert durch eine Umkehrung der Acylierungsreaktion (Deacylierung), jedoch wird in dieser zweiten Additions-Eliminierungs-Reaktion ein Wassermolekül statt dem Serinrest zum angreifenden Nukleophil (5-8) (Polgar 2005).

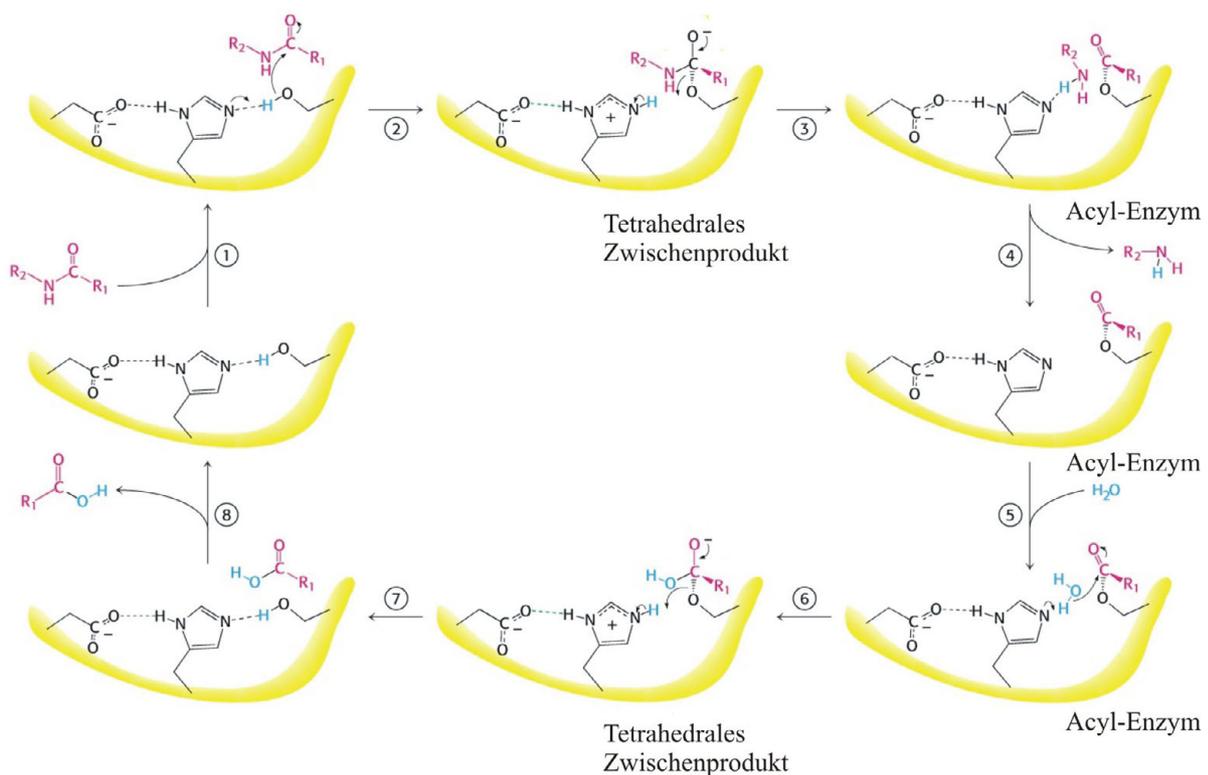


Abbildung B.1 Katalytischer Mechanismus der Peptidhydrolyse durch Serinproteasen.
(modifiziert nach Stryer et al. 2002)

Die Mehrheit der Serinproteasen liegt präformiert in zytoplasmatischen Vesikeln der Zelle vor und wird erst nach einem (meist entzündlichen) Stimulus freigesetzt (Netzel-Arnett et al. 2003). Doch kürzlich wurde eine neue Gruppe der Chymotrypsin (S1)-ähnlichen Proteasen entdeckt, die über verschiedene Bereiche ihrer Domänen mit der Plasmamembran verankert sind. Die Membrananbindungen betreffen dabei entweder die Verankerung des C-Terminus oder die Verbindung zur Membran mittels eines Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Ankers bzw. die Verankerung des N-Terminus. Entsprechend werden die jeweiligen Mitglieder in sog. Typ I-Serinproteasen, GPI-verankerte Serinproteasen oder Typ II-Serinproteasen unterteilt (Netzel-Arnett et al. 2003). Aufgrund der Membranbindung wird ihnen vor allem eine wesentliche Rolle bei der Migration von Tumorzellen und somit bei der Tumorphoresis zugesprochen. Zudem gibt es Hinweise, dass diese Serinproteasen sowohl an zellulären Signalling-Ereignissen als auch bei der Umgestaltung der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Netzel-Arnett et al. 2003).

B.1.3 Proteolytische Enzyme im männlichen Genitaltrakt

Eine Untergruppe der membrangebundenen Serinproteasen stellen die bereits erwähnten GPI-verankerten Proteasen dar. Zu diesen gehören Prostasin (Yu et al. 1995, Chen et al. 2001) und Testisin (Hooper et al. 1999, Hooper et al. 2000), die bezüglich ihres Expressionsprofils hauptsächlich auf den humanen männlichen Genitaltrakt begrenzt sind. Prostasin kann vornehmlich in der Prostata nachgewiesen werden, während Testisin von Keimzellen des Hodens während des prämeiotischem Stadiums der Spermatogenese exprimiert wird (Hopper et al. 1999), was darauf hindeutet, dass Testisin in die Keimzellentwicklung involviert ist. So dürfte eine Überexpression von Testisin möglicherweise zu Abnormalitäten in der Entwicklung der Keimzellen führen, was Sterilität zur Folge haben kann. Des Weiteren mehren sich die Hinweise, dass eine erhöhte Testisinexpression mit einer Tumorfomation einhergehen kann (Hooper et al. 1999, Hooper et al. 2000, Tang et al. 2005).

Andere Chymotrypsin-ähnliche Proteasen, die eine (patho)physiologische Rolle vor allem im männlichen Genitaltrakt oder in der Krebsprogression spielen, sind die humanen Kallikrein-ähnlichen Proteasen, wobei das „Prostate Specific Antigen“ (PSA, hK3) der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist und einen wichtigen Marker für das Prostatakarzinom darstellt (Yousef und Diamandis 2003b, Steuber et al. 2007, Stephan et al. 2007).

Neben Serinproteasen werden etliche weitere Proteasen im Hoden gefunden, der einem kontinuierlichen Remodeling aufgrund der Spermatogenese ausgesetzt ist. Zu diesen Proteasen zählen Cathepsin L, PC4 oder Neprylisine, die an der Prozessierung von Proteinen beteiligt sind (Erickson-Lawrence et al. 1991, Mbikay et al. 1997 und Ghaddar et al. 2000). Zudem sind einige Matrix-Metalloproteasen (MMPs) in den Umbau von Testisgewebe, in die Migration von Zellen oder in Zell-Zell-Kontakten involviert (Longin et al. 2001, Robinson et al. 2001).

Außer Proteasen wurden auch zahlreiche Inhibitoren im Hoden detektiert, wie zum Beispiel alpha2-Makroglobulin, Cystatin C oder Protein C Inhibitor, deren Vorkommen wesentlich das proteolytische Gleichgewicht im männlichen Genitaltrakt bestimmt (Cheng et al. 1990, Peloille et al. 1997, Uhrin et al. 2000).

Aufgrund unseres Interesses an einem primär in diesem Organsystem auftretenden, bisher relativ unbekanntem Serinprotease-ähnlichem Protein sollen nun im Folgenden zum besseren Verständnis seiner möglichen Bedeutung wesentliche Erkenntnisse über Aufbau und Funktion des menschlichen Hodens sowie über proteolytische Faktoren im Ejakulat angeführt werden.

B.2 Der menschliche Hoden

Der Hoden oder Testikel ist ein inneres männliches Geschlechtsorgan, das paarig angelegt ist. Er hat die Aufgabe, Spermien und Geschlechtshormone (z.B. Androgene) zu bilden.

B.2.1 Aufbau und Funktion

[Alle anatomischen Daten wurden den Lehrbüchern Junqueira und Carneiro 1996 und Löffler und Petrides 1997 entnommen.]

B.2.1.1 Der Hoden mit interstitiellen Zellen

Abbildung B.2 gibt einen schematischen Überblick über den männlichen Genitaltrakt.

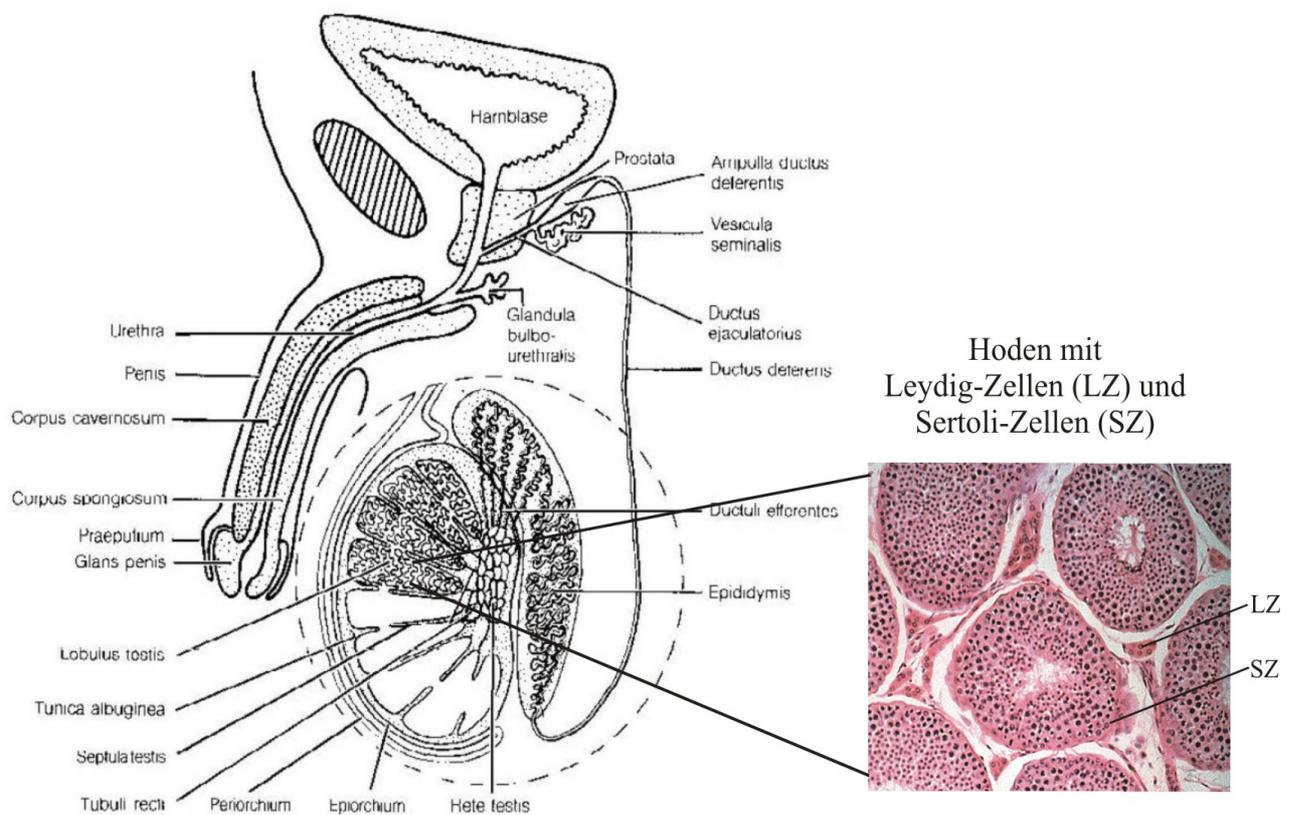


Abbildung B. 2 Schema der männlichen Geschlechtsorgane.

Hoden (Testis) und Nebenhoden (Epididymis) sind leicht vergrößert dargestellt (aus Junqueira und Carneiro 1996).

Hoden (Testis) und Nebenhoden (Epididymis) sind über die *Ductuli efferentes* verbunden. Die Spermien (Samenzellen) werden im Hoden gebildet, gelangen über die *Ductuli efferentes* zum Nebenhoden, reifen dort heran und verlassen diesen über den *Ductus deferens*.

Das Keimepithel im Hoden besteht aus Keimzellen und Sertoli-Zellen. Sertoli-Zellen dienen der Ernährung und dem Schutz der Spermatozyten (Vorläufer der Samenzellen) und ermöglichen über Plasmabewegungen den Transport dieser Zellen zum Lumen. Zudem können sie degenerierte Samenzellen und Zellreste phagozytieren, die bei der Spermienbildung entstehen. Im Keimepithel findet die Bildung der Spermien statt. Diese sog. Spermatogenese ist im reifen Hoden ein kontinuierlicher Vorgang, bei dem verschiedene Stadien durchlaufen werden. Dabei werden die aufeinander folgenden Entwicklungsstadien der Keimzellen ausgehend von der Urgeschlechtszelle (Spermatogonien → Spermatozyten → Spermatiden → Spermien) in Richtung Lumen transportiert. Die Spermienbildung dauert etwa 64 Tage, anschließend ist jedoch eine Reifung der Spermatozyten im Nebenhoden (etwa 10 Tage) notwendig.

Zwischen den Hodenkanälchen befindet sich ein lockeres Bindegewebe, das Nerven sowie Blut- und Lymphgefäße enthält. Außerdem kommen spezielle interstitielle Zellen, die sog. Leydig-Zellen, vor, deren Aufgabe die Bildung von männlichen Geschlechtshormonen (Androgene wie Testosteron und Androstanolon) und Oxytozin ist. Oxytozin fördert u. a. die Motilität der Spermien. Testosteron bewirkt die Reifung der Spermatiden. Die Leydig-Zellen nehmen etwa 12 % des Hodengewebes ein.

B.2.1.2 *Ductuli efferentes*, Nebenhoden und Spermienreifung

Die *Ductuli efferentes* stellen die Verbindung zwischen Hoden und Nebenhoden her (Abbildung B.2). Der Mensch besitzt etwa 8 - 12 solcher Verbindungsgänge. Die *Ductuli efferentes* werden von einem mehrschichtigen Epithel aus hohen und niedrigen Zellen ausgekleidet. Die hohen Zellen tragen Kinozilien und Mikrovilli, die in Richtung auf den Nebenhoden schlagen und so für den Transport der Spermatozyten in den Nebenhoden sorgen.

Die Hauptaufgaben der *Ductuli efferentes* sind der Transport der Spermatozyten in den Nebenhoden, die Absorption testikulärer Flüssigkeit, die Sekretion zahlreicher Moleküle und die Phagozytose defekter Spermien, die als Spermiphagie bezeichnet wird (Jones 2004, Cooper 1996, Ilio und Hess 1994). Die noch unbeweglichen Spermatozyten werden durch Bewegungen der ciliären Zellen und der glatten Muskulatur in den Nebenhoden transportiert. Dabei scheinen auch andere Faktoren eine Rolle zu spielen, die den Spermientransport entlang der *Ductuli efferentes* bewerkstelligen, wie z. B. die kontinuierliche Flüssigkeits-Sekretion durch die Hodenkanälchen und das Vakuum, das durch die Absorption und die Ejakulation im weiter unten liegenden Bereich entsteht (Mason & Shaver 1952).

Der Nebenhoden (*Epididymis*) besteht aus einem 5 - 6 m langen Gang, der auf etwa 7 cm aufgeknäuel ist. Er gliedert sich anatomisch in Kopf, Körper und Schwanz, wo die Spermien einen physiologischen und funktionellen Reifungsprozess durchlaufen.

Auf dem Weg durch den Nebenhoden werden die biochemischen Charakteristika der Spermien verändert. Dazu zählen die Chromatin-Kondensation des Nukleus, die Änderung der Membranzusammensetzung bezüglich der Phospholipide und des Cholesterols sowie die veränderte Zusammensetzung der Oberflächenproteine in der Spermienmembran (Robaire & Hinton 2002). Die Sekretion sowie die Absorption, die hauptsächlich im Nebenhoden aber auch in den *Ductuli efferentes* durch Epithelzellen geschieht, führt zu einer sich ändernden flüssigen Umgebung für die Spermien (Hinton & Palladino 1995). Diese Modifikationen sind für die Reifung von funktionstüchtigen und somit befruchtungsfähigen Spermien essentiell. Hierzu gehören vermutlich die Veränderung der Ratio von Cholesterol zu Phospholipiden, die Zunahme an negativen Ladungen bezogen auf die Gesamtoberfläche, die Zunahme an Disulfidbrücken und die Addition, die Eliminierung und die Veränderungen von Oberflächenproteinen (Sullivan et al. 2005). Beispielsweise können die Glykosyltransferasen, die Zuckerketten an bestehende Glykokonjugate hängen und Glykohydrolasen, die Zuckerketten abspalten, für einige dieser Modifikationen verantwortlich sein (Jones 1998, Tulsiani 2006).

Auch Proteasen scheinen hierbei eine wesentliche Rolle zu spielen. So dürften die Cysteinprotease Cathepsin L (Okamura et al. 1995) und die Aspartatprotease Cathepsin D (Raczek et al. 1995) bei der Modifikation der Spermienmembran einen wichtigen Beitrag leisten. Außerdem ist es möglich, dass Matrix-Metalloproteinasen wie MMP-2, MMP-3 und MMP-9 an diesem Prozess zumindest bei Schafen, Pferden und Schweinen beteiligt sind (Métayer et al. 2002).

Interessanterweise sind einige der Spermien-Oberflächenproteine Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-verankerte Proteine, wie z. B. die Hyaluronidase und Spam-1 in Mäusen (Thaler & Cardullo 1995, Zhang & Martin-Deleon 2003), HE5 im Menschen (Kirchhoff & Hale 1996), P26h im Hamster bzw. P25b im Rind und P34H im Menschen, wobei einige der Faktoren Marker für Fertilität zu sein scheinen (Légaré et al. 1999, Frenette und Sullivan 2001, Boué et al. 1994, Parent et al. 1999, Guillemette et al. 1999). So wird beispielsweise HE5 überwiegend im humanen Nebenhoden exprimiert. Beschrieben wurde HE5 allerdings erstmals als CD52 in Lymphozyten (Kirchhoff 1996). Dieses Protein hat einen GPI-Anker und wird während des Transits durch die Epididymis an der Membranoberfläche der Spermien verankert. Höchstwahrscheinlich wird HE5, das von den Epithelzellen der Nebenhoden exprimiert wird, an besondere Vesikel assoziiert. Diese als Exosomen bezeichneten Vesikel dienen als Träger für den Transport von HE5 an die Plasmamembran der Spermien (Kirchhoff & Hale 1996, Yeung et al. 1997). In ähnlicher Weise werden die bereits erwähnten GPI-verankerten Proteine Hyaluronidase, Spam-1, P26h, P25b und P34H über den apokrinen Weg von Epithelzellen der Nebenhoden sezerniert und an die Exosomen, die auch als Epididymosomen bezeichnet werden (Sullivan et al. 2005), assoziiert.

B.2.2 Proteolytische Faktoren im Ejakulat

Ejakulat (Sperma) enthält Spermien, die weniger als 5 % des Ejakulatvolumens ausmachen, und Samenflüssigkeit (Seminalplasma), die sich zusammensetzt aus den Sekreten der Nebenhoden, der Samenblase (*Vesicula seminalis*), der Prostata sowie den *Glandulae bulbourethrales* (Cowper Drüsen) und Anhangsdrüsen der Urethra. Pro Ejakulation werden etwa 300 Millionen Spermien abgegeben.

Der Hauptanteil des Seminalplasmas wird von der *Vesicula seminalis* (50-80 %) und der Prostata (15-30 %) gebildet. Nur 2-5 % des Gesamtvolumens entstammen aus dem Hoden und weniger als 1 % entfallen auf die *Glandulea bulbourethrales*.

Die Prostata ist die Hauptquelle für die proteolytischen Proteine wie z.B. das "Prostate Specific Antigen" (PSA, hK3; Wang et al. 1979, Yousef and Diamandis 2001). Des Weiteren findet man die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen hK5 und hK11 im Seminalplasma (Yousef and Diamandis 2001, Yousef and Diamandis 2003, Luo et al. 2006).

Die durchschnittliche Proteinkonzentration von Seminalplasma liegt bei etwa 50,4 mg/ml (Owen & Katz 2005). Der Hauptbestandteil an Proteinen stammt überwiegend aus der Samenblase, während Albumin seinen Ursprung in der Prostata hat. Albumin macht etwa 1/3 der Proteinmenge aus. Zudem finden sich im Seminalplasma vor allem die Proteine Semenogelin I und Semenogelin II sowie Fibronectin (Lilja et al. 1987, Lilja & Laurel 1984).

Seminalplasma ist wie Blut den Schwankungen von Gerinnung und Verflüssigung unterworfen. Der Gerinnungsprozess im Ejakulat ereignet sich sehr schnell nach der Ejakulation, die Verflüssigung dauert etwa 5 Minuten *in vivo* und 20-30 Minuten *in vitro* (Polak & Daunter 1989). Die genauen Gründe für dieses Phänomen sind noch nicht verstanden. Es wurden bereits einige Proteine in Seminalplasma detektiert, die auch in der Blutgerinnung bzw. der Fibrinolyse eine Rolle spielen, weshalb durchaus denkbar ist, dass die Gerinnung und die Verflüssigung durch den Prozess der Fibrinolyse des Ejakulates einige Analogien zu den gut verstandenen Hämostasewegen im Blut aufweisen (Lwaleed et al. 2007). Die tatsächliche Quelle der betreffenden Komponenten, die im Ejakulat detektiert werden konnten, bleibt unklar, da eventuell auch ein Austritt (Extravasation) der Faktoren aus den Blutgefäßen in das Seminalplasma möglich ist (Lwaleed et al. 2004, Lwaleed et al. 2007).

Die Gerinnungsfaktoren haben wahrscheinlich ihren Ursprung in der Samenblase, während die Faktoren für die Verflüssigung aus der Prostata stammen (Gonzales et al. 1993). Die Verflüssigung ermöglicht die Freisetzung der Spermien und wird unter anderem durch die proteolytische Aktivität des PSA und durch Fibrinolysefaktoren bewerkstelligt (Lee et al. 1989, Lwaleed et al. 2007). Unter anderem werden dabei die Proteine Semenogelin I und Semenogelin II proteolytisch gespalten (Lilja et al. 1989), die direkt nach der Ejakulation ein Gerinnsel ausbilden und somit maßgeblich am Gerinnungsprozess beteiligt sind.

Proteasen findet man auch in Spermien, wobei sie bei der Befruchtung der Eizelle eine wichtige Rolle spielen. Sie sind, wie z. B. die Serinprotease Acrosin, in der akrosomalen Matrix lokalisiert und tragen durch limitierte Proteolyse zur Prozessierung anderer Proteine bei, die sich ebenfalls im Akrosom oder auf der Membran befinden (Klemm et al. 1991a, Honda et al. 2002). Bei der Akrosomenreaktion bindet das Spermium an die *Zona pellucida* der Eizelle, einer extrazellulären Matrix, die die Eizelle umgibt (Primakoff & Myles 2002). Hierbei werden durch Exozytose Proteine des Akrosoms freigesetzt, wodurch diese mit der *Zona pellucida* interagieren können. Das Eindringen der Spermien erfolgt zum einen durch mechanische Kräfte, aber auch durch hydrolytische Prozesse (Bedford 1998). So spielt beispielsweise SAMP14, ein Mitglied der Ly-6/Urokinase-ähnlichen Plasminogenaktivator Rezeptor (uPAR) Superfamilie eine Rolle bei der Interaktion von Spermium und Ei (Shetty et al. 2003). SAMP14 ist an die Spermienmembran assoziiert und besitzt einen GPI-Anker. Die Inkubation mit einem Antikörper, der gegen SAMP14 gerichtet war, zeigte, dass eine Fusion mit der Eizelle nicht mehr möglich war (Shetty et al. 2003).

B.3 Molekulare und bioinformatische Charakterisierung der humanen T-GPI-SP1

Wegen des historischen Hintergrundes der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, deren primäre Forschung ursprünglich dem Kallikrein-Kinin-System galt (Frey et al. 1968), bestand und besteht weiterhin ein besonderes Interesse an Kallikreinen und im Besonderen an Plasmakallikrein. Auf der Suche nach Transkripten und Genen im humanem Genom (Lander et al. 2001, Clark et al. 2003), die für ähnliche Enzyme kodieren, fand Dr. P. Neth in der NCBI-Datenbank ein neues Mitglied der Familie der Serinproteasen, das im ersten Datenbankeintrag als „Similar to Plasma Kallikrein Precursor“ (STPK) oder Tryptophan/Serinprotease und im Rahmen einer Sequenzvergleichstudie auch als Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-verankerte Serinprotease 1 (GPI-SP1) benannt wurde (Netzel-Arnett et al. 2003). Aufgrund des überwiegenden Vorkommens in Testisgewebe bezeichnete er das Protein schließlich als T-GPI-SP1.

Im Folgenden werden die von Dr. Neth hinsichtlich der molekularen Charakterisierung erzielten und bis zum Beginn der vorliegenden Dissertationsarbeit noch nicht publizierten Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

B.3.1 mRNA-Vorkommen der T-GPI-SP1 in humanen Geweben

Erste Untersuchungen zum mRNA-Transkriptionsprofil von T-GPI-SP1 mittels PCR wurden durch das Design von Primern möglich, die anhand der in der Genbank vorhergesagten kodierenden Sequenz (NM_198464, *Homo sapiens* Tryptophan/Serine Protease) gewählt wurden.

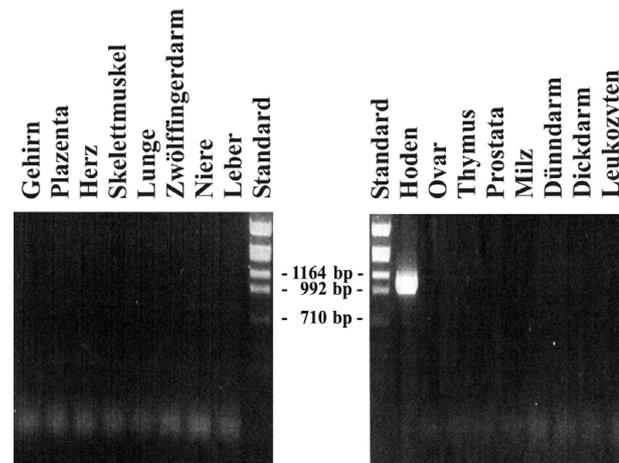


Abbildung B.3 Nachweis von T-GPI-SP1-Transkripten mittels PCR.

Mit T-GPI-SP1-spezifischen Primern erfolgte eine Amplifikation von T-GPI-SP1-cDNA mittels der PCR-Methode. Es wurden cDNAs von 16 verschiedenen humanen Geweben getestet. Ein Signal konnte nur in der cDNA von Hodengewebe nachwiesen werden.

Mittels qualitativer PCR wurde das Expressionsmuster von T-GPI-SP1 mit cDNAs aus 16 verschiedenen humanen Geweben getestet (Abbildung B.3). T-GPI-SP1 konnte auf diese Weise nur im Hodengewebe detektiert werden.

B.3.2 Spleißvarianten der T-GPI-SP1 und genomische Struktur

RLM-RACE-Transkriptanalysen zeigten, dass neben der in der Datenbank eingetragenen Variante von T-GPI-SP1 zwei weitere Varianten in Hodengewebe auftreten, die die Bezeichnung T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 erhielten. Diese Transkripte belegten eine Heterogenität am 3'-Ende der jeweiligen mRNAs (Abbildung B.4). Ein Vergleich mit den NCBI-Einträgen ergab, dass die identifizierte T-GPI-SP1-1 identisch mit der in der Datenbank eingetragenen Sequenz (NM_198464) ist. T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 stellen hingegen neue Formen im Hoden dar, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf alternatives Spleißen zurückzuführen sind. Die drei mRNAs besitzen offene Leseraster von 912 bp, 831 bp und 1059 bp Länge, die für Preproteine mit einem Molekulargewicht von 33,6 kDa, 30,7 kDa und 38,9 kDa kodieren.

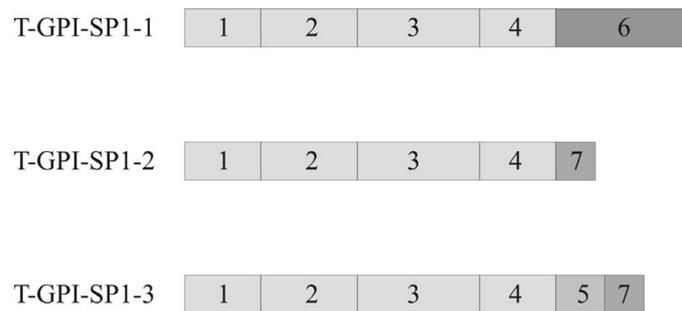


Abbildung B.4 Schematische Darstellung der Exonverteilung der drei in Hodengewebe detektierten Spleißvarianten.

T-GPI-SP1-1 umfasst die Exons 1,2,3,4 und 6, T-GPI-SP1-2 die Exons 1,2,3,4 und 7 und T-GPI-SP1-3 die Exons 1,2,3,4,5 und 7.

Die Nukleotidsequenzen der drei Spleißvarianten sind im Kapitel G (Anhang) wiedergegeben.

Die genomische Struktur der Serinprotease wurde durch den Vergleich der drei Transkripte mit der genomischen Sequenz von T-GPI-SP1 auf Chromosom 8 und durch den Abgleich mit den RLM-RACE-Ergebnissen dechiffriert.

Entsprechend der erhaltenen Resultate besteht T-GPI-SP1-1 aus den Exons 1,2,3,4 und 6, während T-GPI-SP1-2 aus den Exons 1,2,3,4 und 7 aufgebaut ist und T-GPI-SP1-3 die Exons 1,2,3,4,5 und 7 umspannt (Abbildung B.4). Somit umfasst das T-GPI-SP1-Gen 7 Exons mit einer Länge von ca. 28,7 kbp, wobei es auf Chromosom 8p23.1 (Chromosom 8p23.1, 2858342 – 2887039, Abbildung B.5) lokalisiert ist. Alle Exon/Intron-Übergänge wurden mit Hilfe der GT-AG-Regel (Breathnach und Chambon 1981) ermittelt und stehen mit dieser im Einklang.

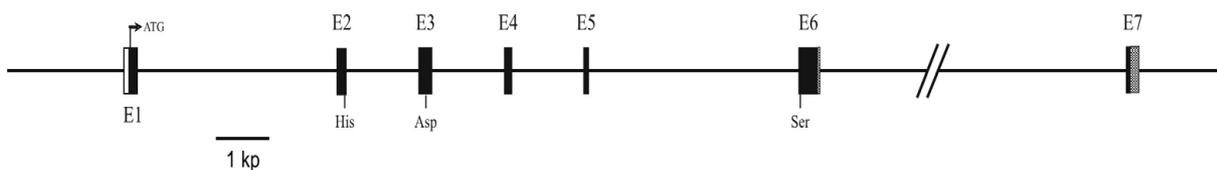


Abbildung B.5 Schematische Darstellung der genomischen Struktur von T-GPI-SP1.

Die genomische Struktur von humaner T-GPI-SP1 auf Chromosom 8 umspannt ca. 28,7 kbp und besteht aus 7 Exons und 6 Introns.

His, Asp und Ser beziehen sich auf die katalytische Triade des T-GPI-SP1-1-Proteins (siehe dazu B.3.3).

B.3.3 Proteinstruktur der humanen T-GPI-SP1

Entsprechend einer bioinformatischen Analyse kann die katalytische Triade, die für eine mögliche enzymatische Aktivität notwendig ist, für die Spleißvariante T-GPI-SP1-1 postuliert werden. Sie beinhaltet die Aminosäuren His¹⁰⁸, Asp¹⁵⁶ und Ser²⁵⁰, während hingegen keine homologen Bereiche um das aktive Serin in den Varianten T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 zu detektieren sind (Abbildung B.6). Die Aminosäuresequenz von Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen um das katalytische Serin trägt das hochkonservierte Motiv GDSGGP. Dieses findet man nur in T-GPI-SP1-1. Somit kann angenommen werden, dass nur T-GPI-SP1-1 alle Merkmale einer funktionellen Serinprotease besitzt.

T-GPI-SP1-1	1	M	L	L	F	S	V	L	L	L	L	S	L	V	T	G	T	Q	L	G	P	R	T	P	L	P	E	A	G	V	A	I	L	G					
T-GPI-SP1-2	1	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>G</u>					
T-GPI-SP1-3	1	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>G</u>					
T-GPI-SP1-1	34	R	A	R	G	A	H	R	P	Q	P	R	H	P	P	S	P	V	S	E	C	G	D	R	S	I	F	E	G	R	T	R	Y	S					
T-GPI-SP1-2	34	R	A	R	G	A	H	R	P	Q	P	R	H	P	P	S	P	V	S	E	C	G	D	R	S	I	F	E	G	R	T	R	Y	S					
T-GPI-SP1-3	34	R	A	R	G	A	H	R	P	Q	P	R	H	P	P	S	P	V	S	E	C	G	D	R	S	I	F	E	G	R	T	R	Y	S					
T-GPI-SP1-1	67	R	<u>I</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	M	E	A	E	V	G	E	F	P	W	Q	V	S	I	Q	A	R	S	E	P	F	C	G	G	S	I	L	N					
T-GPI-SP1-2	67	R	<u>I</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	M	E	A	E	V	G	E	F	P	W	Q	V	S	I	Q	A	R	S	E	P	F	C	G	G	S	I	L	N					
T-GPI-SP1-3	67	R	<u>I</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	M	E	A	E	V	G	E	F	P	W	Q	V	S	I	Q	A	R	S	E	P	F	C	G	G	S	I	L	N					
T-GPI-SP1-1	100	K	W	W	I	L	T	A	A	<u>H</u>	C	L	Y	S	E	E	L	F	P	E	E	L	S	V	V	L	G	T	N	D	L	T	S	P					
T-GPI-SP1-2	100	K	W	W	I	L	T	A	A	<u>H</u>	C	L	Y	S	E	E	L	F	P	E	E	L	S	V	V	L	G	T	N	D	L	T	S	P					
T-GPI-SP1-3	100	K	W	W	I	L	T	A	A	<u>H</u>	C	L	Y	S	E	E	L	F	P	E	E	L	S	V	V	L	G	T	N	D	L	T	S	P					
T-GPI-SP1-1	133	S	M	E	I	K	E	V	A	S	I	I	L	H	K	D	F	K	R	A	N	M	D	N	<u>D</u>	I	A	L	L	L	L	A	S	P					
T-GPI-SP1-2	133	S	M	E	I	K	E	V	A	S	I	I	L	H	K	D	F	K	R	A	N	M	D	N	<u>D</u>	I	A	L	L	L	L	A	S	P					
T-GPI-SP1-3	133	S	M	E	I	K	E	V	A	S	I	I	L	H	K	D	F	K	R	A	N	M	D	N	<u>D</u>	I	A	L	L	L	L	A	S	P					
T-GPI-SP1-1	166	I	K	L	D	D	L	K	V	P	I	C	L	P	T	Q	P	G	P	A	T	W	R	E	C	W	V	A	G	W	G	Q	T	N					
T-GPI-SP1-2	166	I	K	L	D	D	L	K	V	P	I	C	L	P	T	Q	P	G	P	A	T	W	R	E	C	W	V	A	G	W	G	Q	T	N					
T-GPI-SP1-3	166	I	K	L	D	D	L	K	V	P	I	C	L	P	T	Q	P	G	P	A	T	W	R	E	C	W	V	A	G	W	G	Q	T	N					
T-GPI-SP1-1	200	A	A	D	K	N	S	V	K	T	D	L	M	K	V	P	M	V	I	M	D	W	E	E	C	S	K	M	F	P	K	L	T	K					
T-GPI-SP1-2	200	A	A	D	K	N	S	V	K	T	D	L	M	K	V	P	M	V	I	M	D	W	E	E	C	S	K	M	F	P	K	L	T	K					
T-GPI-SP1-3	200	A	A	D	K	N	S	V	K	T	D	L	M	K	V	P	M	V	I	M	D	W	E	E	C	S	K	M	F	P	K	L	T	K					
T-GPI-SP1-1	232	N	M	L	C	A	G	Y	K	N	E	S	Y	D	A	C	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
T-GPI-SP1-2	232	N	M	L	C	A	G	Y	K	N	E	S	Y	D	A	C	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
T-GPI-SP1-3	232	N	M	L	C	A	G	Y	K	N	E	S	Y	D	A	C	K	S	P	L	K	D	H	G	M	R	H	H	L	S	T	E	D	C					
T-GPI-SP1-1	248	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>C</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>I</u>					
T-GPI-SP1-2	248	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
T-GPI-SP1-3	265	L	Q	G	C	S	C	S	A	P	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
T-GPI-SP1-1	271	S	W	G	K	S	C	G	E	K	N	T	P	G	I	Y	T	S	L	V	N	Y	N	L	W	I	E	K	V	T	Q	L	E	G					
T-GPI-SP1-2	271	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
T-GPI-SP1-3	271	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
T-GPI-SP1-1	304	R	P	F	N	A	E	K	R	R	<u>I</u>	S	V	K	Q	K	P	M	G	S	P	V	S	G	V	P	E	P	G	S	P	R	S	W					
T-GPI-SP1-2	304	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
T-GPI-SP1-3	304	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
T-GPI-SP1-1	337	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
T-GPI-SP1-2	248	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	S	Y	F	P	T	L	Q	R	M	N	T	G	S	S	Q	T
T-GPI-SP1-3	275	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	S	Y	F	P	T	L	Q	R	M	N	<u>I</u>	G	S	S	Q	T
T-GPI-SP1-1	266	K	P	P	G	S	H	T	F	H	L	Q	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
T-GPI-SP1-3	291	K	P	P	G	S	H	<u>I</u>	F	H	L	Q	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Abbildung B.6 Aminosäuresequenz-Alignment der drei Spleißvarianten von T-GPI-SP1.

Die Aminosäuren der katalytischen Triade (H, D und S) von T-GPI-SP1-1 sind grau unterlegt, die mögliche Aktivierungsstelle (ab ITGG) ist ebenfalls grau unterlegt. Die N-terminale Signalsequenz und die hydrophobe C-terminale Region sind unterstrichen dargestellt. Mögliche O-Glykosylierungsstellen (T²⁵⁷ und T³¹³ in T-GPI-SP1-1 sowie T²⁸⁶ und T²⁹⁸ in T-GPI-SP1-3) sind ebenfalls unterstrichen dargestellt und grau unterlegt.

Der Kyte/Doolittle Hydropathieplot (Abbildung B.7), der die Hydrophobizität und die Hydrophilizität der Aminosäuresequenz bewertet, zeigt ein hydrophobes Profil am N-Terminus von PreproT-GPI-SP1-1, -2 und -3. Es handelt sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Signalpeptid mit einer Länge von 18 Aminosäuren, das für ein Protein im sekretorischen Weg spricht. Das Propeptid beginnt entsprechend der Spezialsoftware-Analyse SignalP (www.genomics.unibe.ch) mit Gly¹⁹, umfasst 49 Aminosäuren und endet mit Arg⁶⁷. Die Protease-ähnliche Domäne startet mit dem ITGG-Motiv, das auch in humanem Prostatin gefunden wurde (Yu et al. 1994). Dieser Sequenzbereich ist ein wenig verändert im Vergleich zu dem hoch konservierten Motiv (IVGG), welches die Mehrheit der Serinproteasen der Trypsinfamilie aufweist.

Im Gegensatz zu den identischen N-terminalen Bereichen ist der C-Terminus bei den drei Spleißvarianten unterschiedlich. Hydropathieplot-Analysen zeigen, dass in T-GPI-SP1-1 ein hydrophober C-Terminus aus 17 Aminosäuren (WLLLCPLSHVLFRAILY) existiert, der möglicherweise als direkter Anker in der Plasmamembran oder als Signalsequenz für die Verankerung des Proteins als GPI-Anker dient. Dieser hydrophobe C-Terminus fehlt bei den Varianten T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3.

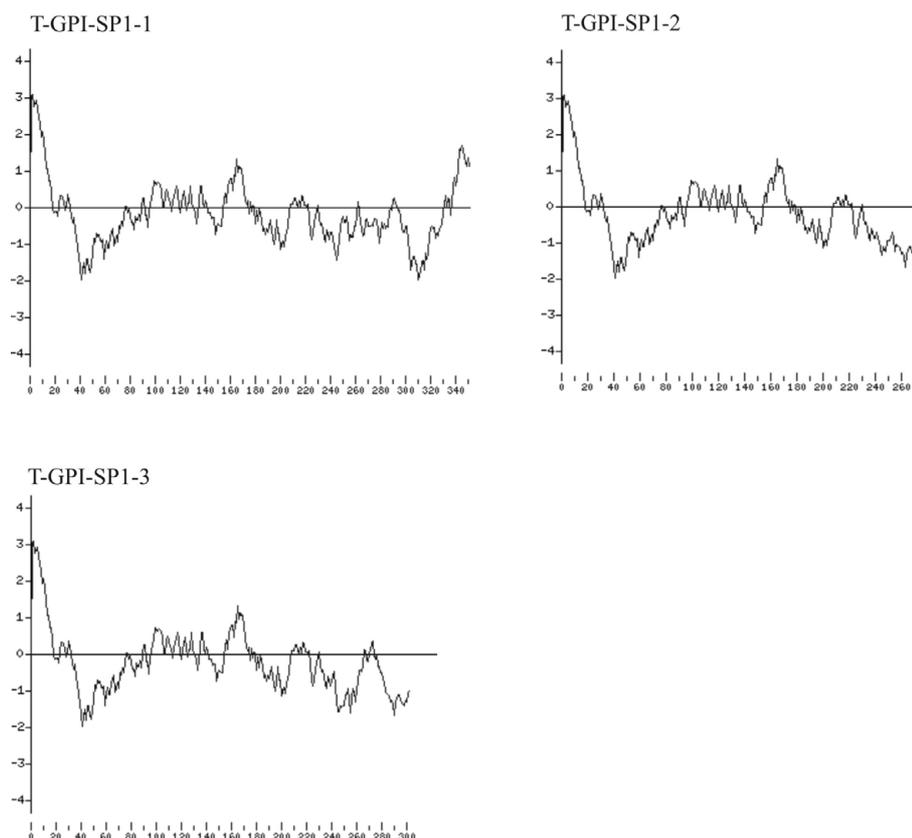


Abbildung B.7 Kyte-Doolittle-Hydropathieplot der drei Spleißvarianten von T-GPI-SP1.

Beginnend mit dem N-Terminus ist die Aminosäureanzahl der drei Spleißvarianten auf der X-Achse dargestellt, der Grad der Hydrophobizität (0 bis +4) und der Grad der Hydrophilie (0 bis -4) sind auf der Y-Achse angegeben. Alle drei Spleißvarianten besitzen einen hydrophoben N-Terminus, der höchstwahrscheinlich einem Signalpeptid zuzuschreiben ist.

Nur T-GPI-SP1-1 weist einen hydrophoben C-Terminus auf, der eine Zellmembran-Bindung erlaubt.

Aufgrund von Alignments mit Strukturdaten anderer Serinproteasen wie Faktor XI und Plasmaprothrombin (McMuellen et al. 1991a, 1991b) ist es möglich, Disulfidbrücken in T-GPI-SP1 vorherzusagen. Diese Brücken können in T-GPI-SP1-1 an folgenden Stellen ausgebildet werden: Cys⁵³/Cys¹⁷⁶, Cys⁹³/Cys¹⁰⁹, Cys¹⁸⁹/Cys²⁵⁶, Cys²²²/Cys²³⁵ und Cys²⁴⁶/Cys²⁷⁶ (Abbildung B.8). Das erste Cysteinpaar verbindet die Proregion mit der Region der katalytischen Domäne, während die übrigen Brücken innerhalb der katalytischen Domäne lokalisiert sind. Ein unpaares Cystein findet sich an Position Cys³⁴⁰ nahe des C-Terminus.

Wegen des alternativen Spleißens unterscheiden sich insbesondere die Disulfidbrücken von T-GPI-SP1-1, die nahe am C-Terminus liegen, von denen der beiden anderen Varianten. Für T-GPI-SP1-2 ergeben sich Cysteinbrücken an den Positionen Cys⁵³/Cys¹⁷⁶, Cys⁹³/Cys¹⁰⁹, Cys¹⁸⁹/Cys²⁴⁶ und Cys²²²/Cys²³⁵. Mögliche Disulfidbrücken dürften in T-GPI-SP1-3 an folgenden Stellen lokalisiert sein: Cys⁵³/Cys¹⁷⁶, Cys⁹³/Cys¹⁰⁹, Cys¹⁸⁹/Cys²⁶⁴, Cys²²²/Cys²³⁵ und Cys²⁴⁶/Cys²⁶⁸. Auch hier verbleibt ein einzelnes Cystein an Position Cys²⁷⁰ (Abbildung B.8).

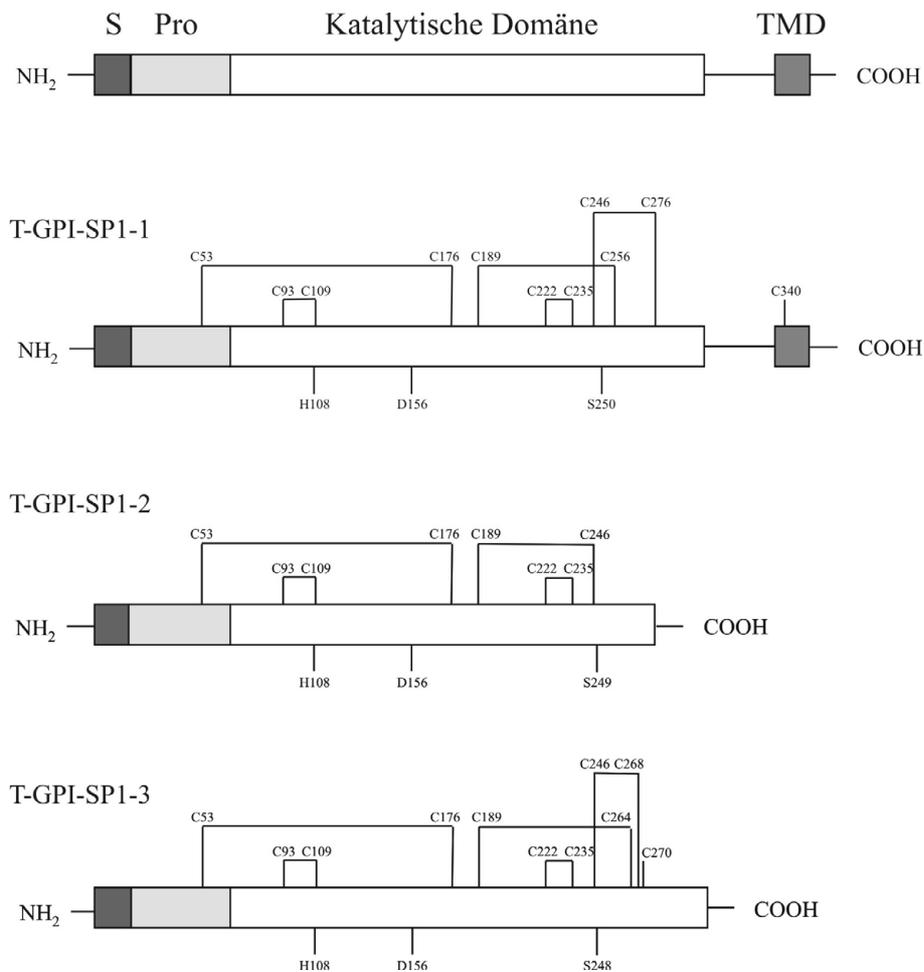


Abbildung B.8 Mögliche Disulfidbrücken in den T-GPI-SP1-Spleißvarianten.

Die Position der möglichen Disulfidbrücken in T-GPI-SP1 wurde in Analogie zu den Cysteinpaaren von Plasmaprothrombin und Faktor XI ermittelt.

B.4 Aufgabenstellung

Da außer dem Datenbankeintrag keine weiteren Veröffentlichungen zu T-GPI-SP1 vorlagen, waren in Ergänzung zu den unter B.3 beschriebenen Daten, welche hauptsächlich die qualitative Transkriptexpression in diversen Geweben und die Aufklärung der Gen- bzw. Proteinstruktur zum Inhalt hatten, zu Beginn der Promotionsarbeit folgende Fragen von vorrangiger Bedeutung:

- (i) Wie stellt sich das quantitative Expressionsprofil von T-GPI-SP1-Transkripten in verschiedenen humanen Geweben dar?
- (ii) Ist die rekombinante Expression von T-GPI-SP1 und ihren Spleißvarianten in pro- und eukaryontischen Expressionssystemen möglich?
- (iii) Kann ein spezifischer Antikörper generiert und mit dessen Hilfe ein T-GPI-SP1-Protein immunologisch in humanen Geweben nachgewiesen werden?
- (iv) Lässt sich eine erste biochemische und funktionelle Charakterisierung der rekombinant hergestellten T-GPI-SP1-Proteine durchführen?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte durch die drei nachfolgenden wesentlichen Zielsetzungen erreicht werden.

B.4.1 Zielsetzung 1: Erstellung des mRNA-Expressionsprofils der T-GPI-SP1 aus verschiedenen humanen Geweben

Ausgehend von der qualitativen PCR, mittels derer die cDNA von 16 verschiedenen Geweben überprüft wurde (Abbildung B.3), sollte nun über die quantitative RT-PCR (LightCycler-Technologie) die mengenmäßige Bildung der Transkripte von T-GPI-SP1 in diesen humanen Geweben nachgewiesen werden. Ergänzend hierzu sollte mit Hilfe der mRNA-Array-Technologie die Evaluierung des Expressionsprofils auf weitere Gewebe ausgedehnt werden.

Darüber hinaus sollte durch das spezielle Design von Oligonukleotiden die Expression der drei Spleißvarianten in den Syntheseorten aufgeklärt werden. Dies sollte eine Aussage darüber ermöglichen, welche der Spleißvarianten die hauptsächliche Isoform von T-GPI-SP1 darstellt.

B.4.2 Zielsetzung 2: Rekombinante Herstellung der humanen T-GPI-SP1 in verschiedenen Expressionssystemen

Die rekombinante Expression der Spleißvarianten von T-GPI-SP1 in verschiedenen Expressionssystemen sollte einen Schwerpunkt in dieser Arbeit bilden:

- Für die Produktion von polyklonalen Antikörpern zur immunologischen Lokalisation von T-GPI-SP1-Protein sollten zunächst die drei Spleißvarianten als dafür notwendige Antigene im prokaryontischen System *E. coli* exprimiert werden.
- Für die biochemische und funktionelle Charakterisierung der bis dato nicht näher charakterisierten Serinprotease war auch die rekombinante Herstellung der Spleißvarianten von T-GPI-SP1 in der Hefe *Pichia pastoris* und in HEK293 Flp-In-Zellen vorgesehen.

Hierfür sollten unterschiedliche Genkonstrukte generiert werden, die u.a. die Expression als Proenzym bzw. als putative aktive Form erlauben.

Zudem war geplant, Proteinvarianten mit und ohne hydrophoben C-Terminus im Hinblick auf Untersuchungen zur postulierten Membranverankerung zu exprimieren.

B.4.3 Zielsetzung 3: Immunologische Lokalisation sowie biochemische und funktionelle Charakterisierung der humanen T-GPI-SP1

Für immunologische Lokalisationsstudien ist die Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen rekombinante T-GPI-SP1 eine wesentliche Voraussetzung. Hierfür sollten Kaninchen immunisiert, die gebildeten Antikörper isoliert sowie deren Sensitivität und Spezifität evaluiert werden. Anschließend sollte mit Hilfe dieser Antikörper der Nachweis der Proteinbildung in T-GPI-SP1-exprimierenden Zelltypen bzw. Geweben durch immunhistochemische Studien erbracht werden.

Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der rekombinant hergestellten T-GPI-SP1-Varianten sollten Untersuchungen zur Aminosäuresequenz, zur Glykosylierung und zur Membranverankerung sowie zur Stabilität durchgeführt werden.

Zudem sollten neben direkten Aktivitätsmessungen auch Versuche zur Aktivierung der Proformen der drei Spleißvarianten erfolgen, um Aussagen über deren Proteasecharakter treffen zu können.

C Material und Methoden

C.1 Material

C.1.1 Geräte für mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

Autoklav VST 500-C 12D	Zirbus, Bad Grund
BioPhotometer 6131	BioRad, München
CO ₂ -Inkubator Typ B5060 E	Heräus, Osterode
Elektrophoresekammer	Peqlab, Erlangen
Inkubationsschüttler Typ ITE	Ifors, Bottmingen
Inkubationsschüttler SM30	Bühler, Hechingen
Sterilbank Laminar Flow	Beer, Germering
Thermocycler Gen Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Langen

C.1.2 Geräte für proteinbiochemische Arbeiten

ÄKTAexplorer	GE Healthcare, USA
Biopilot	GE Healthcare, USA
Dot Blot Apparatur	Biorad, München
Fraktionssammler Proben Tisch 5122	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler SM30	Bühler, Hechingen
Inkubationsschüttler Typ ITE	Ifors, Bottmingen
Microassay Reader Biolumin 960	Pharmacia, Freiburg
Mini Protean Electrophoresis Cell	BioRad, München
Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, München
Tangentialflusskonzentrator, Miniset	Pall, Dreieich
Schlauchpumpe Masterflex	Cole Parmer, Kehl
Spektralphotometer	Kontron, Eching
Vakuumfiltrationseinheit	Millipore, Eschborn

C.1.3 Geräte für Fermentation

Fermenter Typ Biostat E bestehend aus Regelungseinheit mit Regeleinschüben für Säure, Lauge und Antischaummittel sowie Sechs-Kanalschreiber Kulturgefäß ES 10	Braun Biotech, Melsungen
Druckluftkompressor Whisper 0,56-20	Blitz, Bräunlingen
Dampferzeuger Typ 603	Strobel, München
Peristaltikpumpe P-1	Pharmacia, Freiburg

C.1.4 Sonstige Geräte

Analysenwaage, A 120 S	Sartorius, Göttingen
Digitales pH-Meter 646	Bachofer, Reutlingen
Electrophoresis Power Supply E424	Wagner & Munz, München
Eismaschine AF-10	Scotsman, Italien
Gefrierschrank (-20 °C) Premium Frost	Liebherr, Berlin
Gefrierschrank (-80 °C) Colora UF 85-300S	Colora, Lorch
Hybridisierungsöfen Mini Hybi	H. Saur, Reutlingen
LightCycler	Roche, Mannheim
Magnetrührer Ika-Combimag RCO	Janke & Kunkel, Staufen
Magnetrührer Ikamag RET	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowellenofen R-6270	Sharp, Japan
Magnetrührer Ikamag RET	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop IX50 mit CCD Kamera Typ 3CCD UV-Lampe U-RFL-T	Olympus, Feldkirchen-Westerham Sony, Köln Olympus, Feldkirchen-Westerham
Präzisionswaage 2842	Sartorius, Göttingen
Spektralfluorimeter Safire 2	Tecan, Crailsheim
Stickstofftank Cryo 4000	MVE Cryosystems, USA
Technische Waage, MA AF200	Sartorius, Göttingen
UV Transilluminator DarkReader™	Clare Chemical Research, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Jüchen
Wärmeblock Typ 2111 CHM-12-80	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad WB-14	Memmert, Schwabach
Wasserdeionisierungssystem Membrapure	MembraPURE, Bodenheim
Zellzählsystem Casy1	Schärfe Systems, Reutlingen
Zentrifugen:	
Zentrifuge 3200	Eppendorf, Hamburg
Sigma 2K15	Braun Biotech, Melsungen
Biofuge pico	Heraeus, Osterode
Minifuge RF	Heraeus, Osterode
Centrikon H-401	Kontron, Eching

C.1.5 Material für mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

Alle nachstehend nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) in der Qualitätsstufe z. A. bezogen. Für die molekularbiologischen Arbeiten wurde 'Aqua ad injectabilia' (ddH₂O) der Firma Pharmacia (Erlangen) verwendet.

C.1.5.1 Nährmedien und Zusätze

Bacto-Tryptone	Difco, Augsburg
Bacto-Tryptone-Peptide	Difco, Augsburg
Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
<i>Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids</i>	Difco, Augsburg
Ampicillin, Natriumsalz USP	Biomol, Hamburg
Glycerin	Serva, Heidelberg
Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
Zeocin	Invitrogen, Groningen

C.1.5.2 Chemikalien

Agarose, SeaKem	Biozym, Hameln
Agarose, NuSieve	Biozym, Hameln
<i>10 x Blue Juice Gel Loading Buffer</i>	Invitrogen, Groningen
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
DNA-Längenstandard 1kbp Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Molekulargewichtsmarker VII	Roche, Mannheim
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
<i>Phase Lock Tubes</i>	Eppendorf, Hamburg
Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe

C.1.5.3 Kits

<i>High Speed Maxi Kit</i>	Qiagen, Hilden
NucleoSpin PCR-Produkte-Reinigungskit	Machery & Nagel, Düren
<i>Plasmid Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden und Roche, Mannheim
<i>QIAshredder</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy MiniElute-Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>1st Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Roche, Mannheim

C.1.5.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
<i>Calf Intestine</i> Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, USA
DNase	Sigma, Deisenhofen
DNA Polymerase I	New England Biolabs, USA
<i>Platinum-High-fidelity</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin	R & D Systems, USA
<i>Taq</i> -Polymerase	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	Promega, Heidelberg
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim und New England Biolabs, USA
Trypsin	New England Biolabs, USA

C.1.5.5 Vektoren und Plasmide

Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO und pCR4.0-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

Aufgrund der terminalen Transferase-Aktivität von *Taq*-Polymerasen kann ein Desoxyadenosin an das 3'-Ende eines PCR-Produktes anfügt werden. Über einzelne, überhängende Desoxythymidin-Reste an den 3'-Enden der linearisierten Vektoren pCR2.1-TOPO und pCR4.0-TOPO können daher PCR-Fragmente und Klonierungs-Vektor miteinander verbunden werden. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Topoisomerase I des Vaccinia Virus.

Selektives Wachstum der *E. coli*-Klone wird durch die Antibiotika-Resistenzen Ampicillin bzw. Kanamycin vermittelt. Die Vektoren besitzen einen pUC19 Replikationsstartpunkt (pUC-Origin) sowie eine f1 Startsequenz (f1-Origin) für die Synthese von DNA-Einzelsträngen.

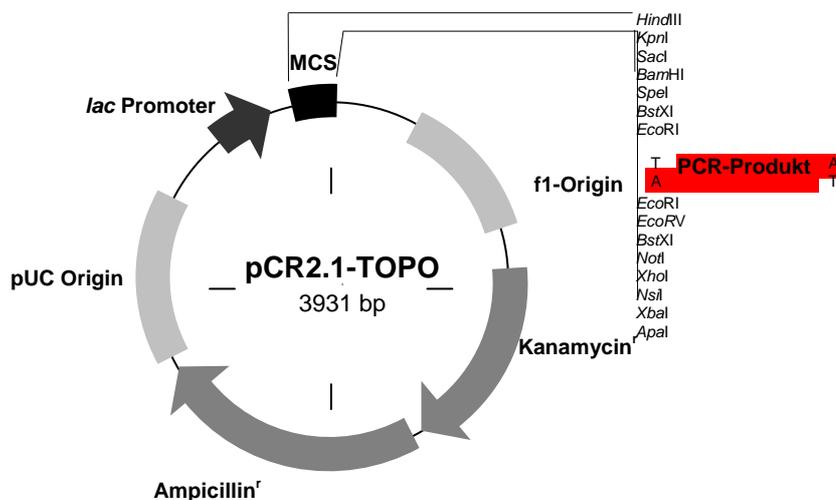


Abbildung C.1 Schematische Darstellung des Klonierungs-Vektors pCR2.1-TOPO.

Klonierungsvektor pENTR11 (Invitrogen, Karlsruhe)

Der pENTR11-Vektor dient als Ausgangsvektor für die Rekombination eines Zielgens in verschiedene Expressionsvektoren und -systeme. Er besitzt die sog. Kozak-Sequenzen für eine effiziente Initiation der Translation in Eukaryonten und zwei Bindestellen für Ribosomen für die Translation in Prokaryonten. Die Rekombinationsreaktion wird über die attL1- und die attL2-Sequenz vermittelt. Das ccdB-Gen zwischen diesen Seiten dient der negativen Selektion. Der Vektor besitzt zudem eine kodierende Sequenz für eine Kanamycin-Resistenz.

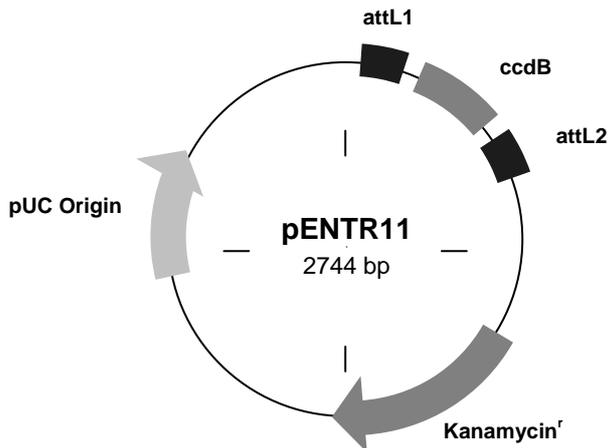


Abbildung C.2 Schematische Darstellung des Entry-Vektors pENTR11.

Expressionsvektor pET-DEST-42 (Invitrogen, Karlsruhe)

Der Expressionsvektor pET-DEST-42 ist ein Teil der Gateway-Expressionssysteme der Firma Invitrogen. Das Zielgen wird in einen Ausgangsvektor (sog. Entry-Vektor, pENTR) kloniert und kann durch ortsspezifische Rekombination in verschiedene Expressionsvektoren für verschiedene Expressionssysteme integriert werden. Dieser Vorgang wird durch eine LR-Klonase vermittelt und geschieht an definierten Rekombinationsstellen, den attR1- und den attR2-Sequenzen.

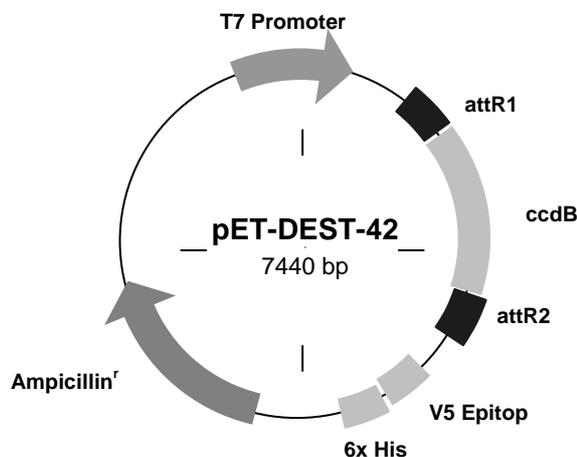


Abbildung C.3 Schematische Darstellung des *E. coli* Expressionsvektors pET-DEST-42.

Für die rekombinante Expression von T-GPI-SP1-1, T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 in *E. coli* wurden folgende Konstrukte kloniert:

Spleißvariante	Propeptid	Transmembrandomäne	V5-Epitop	His ₆ -Tag am C-Terminus
T-GPI-SP1-1	√	√	√	√
T-GPI-SP1-2	√	nicht vorhanden	√	√
T-GPI-SP1-3	√	nicht vorhanden	√	√

Alle Konstrukte besitzen ein V5-Epitop und einen His₆-Tag am C-Terminus. Letzterer dient zur Reinigung des exprimierten Proteins mittels Ni-NTA-Sepharose-Affinitätschromatographie.

Fluoreszenzprotein-Vektor pEGFP-N3 (Clontech, USA)

Der Vektor pEGFP-N3 kann unter anderem für die Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen genutzt werden. Das Zielprotein ist hierbei am C-Terminus mit dem Fluoreszenzprotein EGFP fusioniert. Ein weiteres Element des Vektors ist ein CMV-Promoter, der eine starke mRNA-Expression ermöglicht. pEGFP-N3 trägt für die Replikation eine SV40 Startpunktsequenz (SV40-Origin) sowie ein Neomycin-Resistenzgen für die Selektion in Säugetierzellen. Ein bakterieller Promoter erlaubt die Expression des Kanamycin-Resistenzgens zur Selektion von *E. coli*-Klonen. Der Vektor besitzt einen pUC19 Replikationsstartpunkt (pUC-Origin) für die Vermehrung in *E. coli* und eine f1 Startsequenz (f1-Origin) für die Einzelstrang-DNA-Synthese.

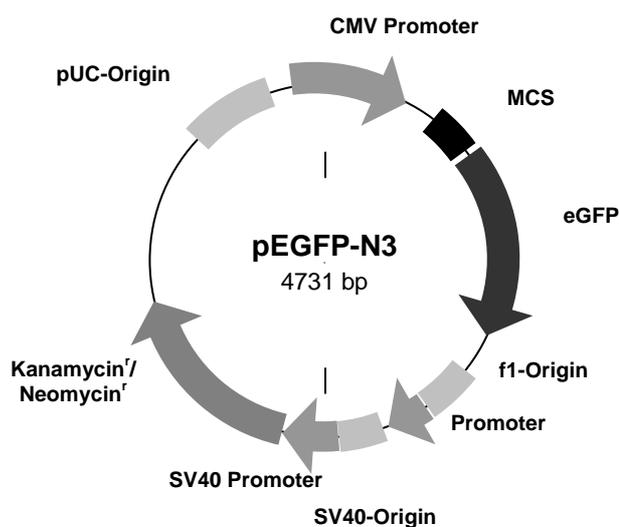


Abbildung C.4 Schematische Darstellung des Fluoreszenzproteinvektors pEGFP-N3

Flp-In-Vektor pcDNA5/FRT (Invitrogen, Karlsruhe)

Der Expressionsvektor pcDNA5/FRT ermöglicht eine gerichtete und somit spezifische Integration eines Vektors in einen transkriptionell aktiven Genomlocus der Wirtszelle von Säugern. Die HEK293 Flp-In-Zellen besitzen eine singuläre Flp-Rekombinase-Erkennungssequenz (FRT: Flp *recombinase target*).

Bei der Cotransfektion des Expressionsvektors mit einem Flp-Rekombinase-Expressionsvektor erfolgt eine stabile Integration des gewünschten Transgens in das Genom der Zellen. Durch diese Integration in die FRT-Erkennungsstelle wird ein ATG-Startcodon für die Hygromycin-Resistenz generiert. Der Vektor besitzt zudem einen ColE1-Replikationsstartpunkt (ColE1-Origin) und eine Sequenz, die für die Resistenz gegen Ampicillin codiert.

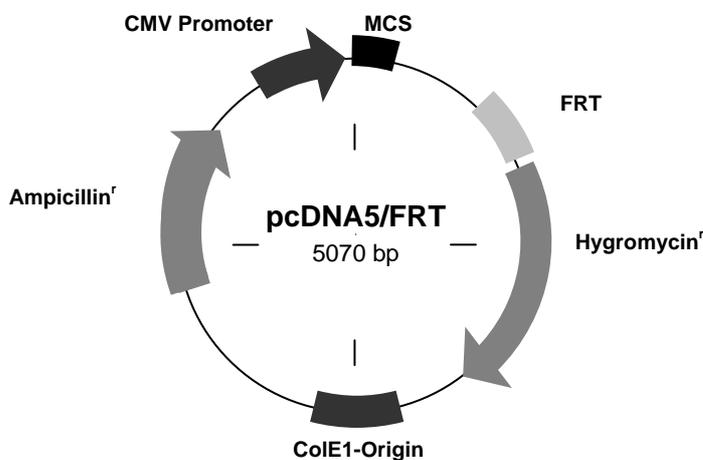


Abbildung C.5 Schematische Darstellung des Flp-In-Vektors pcDNA5/FRT.

Für die rekombinante Expression von T-GPI-SP1-Varianten in HEK-Zellen wurden folgende Konstrukte kloniert:

Vektor	Spleißvariante	Signal-und Propeptid	Transmembrandomäne	EGFP/YFP
pEGFP-N3	T-GPI-SP1-1	√	√	EGFP
	T-GPI-SP1-2	√	nicht vorhanden	EGFP
	T-GPI-SP1-3	√	nicht vorhanden	EGFP
pcDNA5/FRT	T-GPI-SP1-1	√	√	YFP
	T-GPI-SP1-1	√	-	YFP
	T-GPI-SP1-1	√	√	-
	T-GPI-SP1-1	√	-	-

Expressionsvektor pPICZ α A (Invitrogen, Karlsruhe)

Der pPICZ α A-Vektor ist ein Expressionsvektor für *Pichia pastoris*. Er verfügt über ein Zeocin-Resistenzgen zur Selektion. Die AOX1-Region (Alkohol Oxidase 1-Region) mit dem starken AOX1-Promotor erlaubt die Methanol-induzierbare Expression von Fremdproteinen in *Pichia pastoris*. Die α -Faktor-Signalsequenz dient der Ausschleusung des Fremdproteins in das Kulturmedium.

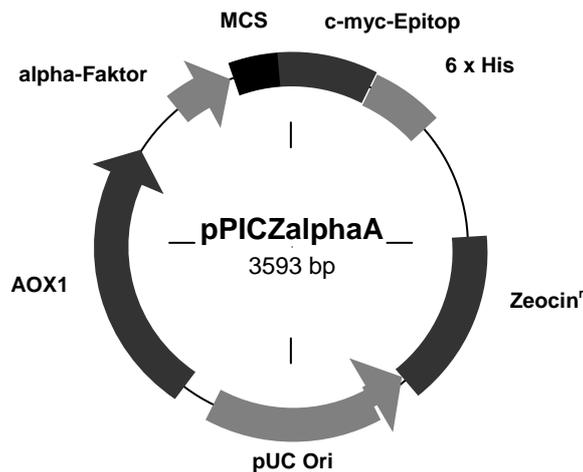


Abbildung C.6 Schematische Darstellung des *Pichia pastoris* Expressionsvektors pPICZ α A.

Für die rekombinante Expression in *Pichia pastoris* wurden folgende Konstrukte der Spleißvariante T-GPI-SP1-1 kloniert:

Spleißvariante	Propeptid	Katalytische Domäne	Transmembrandomäne	c-myc	His ₆ -Tag
T-GPI-SP1-1	√	√	√	√	√
	-	√	√	√	√
	√	√	√	-	-
	√	√	√	-	√
	-	√	√	-	-
	-	√	√	-	√
	-	√	-	-	-
	-	√	-	-	√
	√	√	-	-	√

C.1.5.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Martinsried), MWG Biotech (Ebersberg), Operon (Köln) oder Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert und mittels HPLC gereinigt.

Primer für die Herstellung von T-GPI-SP1-Konstrukten in HEK293 Flp-In-Zellen

HindIII T-GPI-SP1 SE (Metabion) (Forward-Primer für alle drei Varianten mit Propeptid)
5'-AATTT-AAGCTT-ATGCTCCTGTTCTCAGTGTTGC-3'

T-GPI-SP1 His6 *BamHI* AS (Invitrogen) (Reverse-Primer für Pro-T-GPI-SP1-1 mit His₆-Tag)
5'-TTAAA-GGATCC-CTAATGATGATGATGATGATGGTACAAAATAGCT
CTGAACAACACATGG-3'

T-GPI-SP1 ØTM His6 *BamHI* AS (Invitrogen) (Reverse-Primer für Pro-T-GPI-SP1-1 ohne Transmembrandomäne, mit His₆-Tag)
5'-TTAAA-GGATCC-CTAATGATGATGATGATGATGGGATCTGGGGCTGC
CTGGCTCTGG-3'

T-GPI-SP1 ØTM *XhoI* AS YFP (Metabion) (Reverse-Primer für Pro-T-GPI-SP1-1 ohne Transmembrandomäne, mit YFP)
5'-ATTATT-CTCGAG-GGATCTGGGGCTGCCTGGCTCTGG-3'

T-GPI-SP1 *XhoI* AS YFP (Invitrogen) (Reverse-Primer für Pro-T-GPI-SP1-1, mit YFP)
5'-ATTATT-CTCGAG-GTACAAAATAGCTCTGAACAACACATGG-3'

Primer für die Herstellung von T-GPI-SP1-Konstrukten in HEK293-Zellen

Für pEGFP-N3:

T-GPI-SP1-*EcoRI*-f-1 (MWG) (Forward-Primer für alle drei Varianten mit Propeptid)
5'-G-GAATTC-ATGCTCCTGTTCTCAGTGTTGCT-3'

T-GPI-SP1-*BamHI*-r-828 (MWG) (Reverse-Primer für Pro-T-GPI-SP1-1 mit EGFP)
5'-CG-GGATCC-GTTTTGCAGATGAAAGGTGTGAGAC-3'

T-GPI-SP1-*BamHI*-r-1056 (MWG) (Reverse-Primer für Pro-T-GPI-SP1-2 und -3 mit EGFP)
5'-CG-GGATCC-GTACAAAATAGCTCTGAACAACACA-3'

Für pEGFP-N3 ohne eGFP:

T-GPI-SP1-*EcoRI*-f-1 (MWG) (Forward-Primer für alle drei Varianten mit Propeptid)
5'-G-GAATTC-ATGCTCCTGTTCTCAGTGTTGCT-3'

NotI-T-GPI-SP1-ØTMD-HIS-Stop (Operon) (Reverse-Primer für Pro-T-GPI-SP1-1 ohne Transmembrandomäne, mit His₆-Tag)
5'-ATTTT-GCGGCCGC-CTAATGATGATGATGATGATGGGATCCTGGG
GCTGCCTGGCTCTGG-3'

Primer für die Herstellung von T-GPI-SP1-Konstrukten in *Pichia pastoris*

*Xho*I-T-GPI-SP1-mPro (Operon) (Forward-Primer für T-GPI-SP1-1 mit Propeptid)
5'-CGG-CTCGAG-AAAAGAGGCCACGGACTCCTCTCCCA-3'

*Xho*I-T-GPI-SP1-oPro (MWG) (Forward-Primer für T-GPI-SP1-1 ohne Propeptid)
5'-CGG-CTCGAG-AAAAAGAATCACAGGGGGGATGGAGGCGGAG-3'

*Not*I-T-GPI-SP1Ex6-rev (MWG) (Reverse-Primer für T-GPI-SP1-1, Fusion mit c-myc- und His₆-Tag)
5'-ATTT-GCGGCCGC-GTACAAAATAGCTCTGAACAA-3'

*Not*I-T-GPI-SP1Ex6-Stop (Operon) (Reverse-Primer für T-GPI-SP1-1 ohne Tag)
5'-ATTT-GCGGCCGC-CTAGTACAAAATAGCTCTGAACAA-3'

*Not*I-T-GPI-SP1Ex6-HIS-Stop (Operon) (Reverse-Primer für T-GPI-SP1-1 mit His₆-Tag)
5'-ATTT-GCGGCCGC-CCTAATGATGATGATGATGATGGTACAAAATAGC
TCTGAACAA-3'

*Not*I-T-GPI-SP1-oTMD-Stop (MWG) (Reverse-Primer für T-GPI-SP1-1 ohne Transmembrandomäne ohne Tag)
5'-ATTT-GCGGCCGC-CTAGGATCTGGGGCTGCCTGGCTCTGG-3'

*Not*I-T-GPI-SP1-oTMD-HIS-Stop (Operon) (Reverse-Primer für T-GPI-SP1-1 ohne Transmembrandomäne mit His₆-Tag)
5'-ATTTT-GCGGCCGC-CTAATGATGATGATGATGATGGGATCCTGGG
GCTGCCTGGCTCTGG-3'

Primer für die Herstellung von T-GPI-SP1-Konstrukten in *E. coli*

*Nae*I-T-GPI-SP1-f-55 (MWG) (Forward-Primer für alle drei Varianten mit Propeptid)
5'-AA-GCCGGC-CCACGGACTCCTCTCCCAG-3'

*Xho*I-T-GPI-SP1-r-altEx6 (MWG) (Reverse-Primer für Pro-T-GPI-SP1-2 und -3 mit V5-Epitop und His₆-Tag)
5'-CCG-CTCGAG-TTTTGCAGATGAAAGGTGTG-3'

*Xho*I-T-GPI-SP1-r-Ex6 (MWG) (Reverse-Primer für Pro-T-GPI-SP1-1 mit V5-Epitop und His₆-Tag)
5'-CGGC-CTCGAG-TACAAAATAGCTCTGAACAAC-3'

Primer für die Herstellung von Sonden und zur Detektion von T-GPI-SP1

T-GPI-SP1-f-342 (MWG) (Forward-Primer)
5'-GGATTCTCACTGCGGCTCAC-3'

T-GPI-SP1-r-694 (MWG) (Reverse-Primer)
5'-CCAGTCCATGATGACCATTG-3'

Primer für die quantitative RT-PCR

Primersets zur Detektion von T-GPI-SP1, T-GPI-SP1-Spleißvarianten und GAPDH wurden von der Firma Search LC (Heidelberg) bezogen.

C.1.6 Material für die Proteinanalytik

C.1.6.1 Allgemeine Chemikalien und Materialien

Acrylamid (40 %)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
DEAE-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, USA
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
ECL Plus-Western Blot-System	GE Healthcare, USA
His-trap HP-Säulen	GE Healthcare, USA
<i>Horseradish Peroxidase</i>	R & D Systems, Wiesbaden
Hypercassette	GE Healthcare, USA
Lumi-Film Entwicklungsfilm	GE Healthcare, USA
MonoS Säulen	GE Healthcare, USA
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	Serva, Heidelberg
Nitrocellulosemembran BA 85 (0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
PeqGOLD Molekularstandard	PAA, Österreich
Pierce Protein Assay	Pierce, Bonn
Polyethylenglycol 3350	Merck, Darmstadt
PVDF Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
SeeBlue Plus2 Protein-Molekularstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Rinderserum-Albumin	Sigma Aldrich, USA
<i>Slide a Lyzer</i> Dialysekassetten	Pierce, Bonn
<i>SpectraPor</i> Dialysis Tubing	Serva, Heidelberg
<i>Western Blot Reagent</i>	Roche, Mannheim

C.1.6.2 Antikörper

Anti-His-Conjugate	Qiagen, Hilden
Anti-Kaninchen IgG-HRP-konjugiert aus Ziege	Dako, Dänemark
Anti-Kaninchen IgG-Rhodamin aus Esel	Santa Cruz Biotechnologies, USA
T-GPI-SP1-Antikörper	Arbeitsgruppe Dr. Neth

C.1.6.3 Proteasesubstrate und Inhibitoren

Boc-Gly-Arg-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Boc-Leu-Lys-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Boc-Val-Leu-Lys-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Boc-Val-Pro-Lys-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
<i>Fluorogenic Peptide Substrate II</i> (Mca-Arg- Pro-Lys-Val-Pro-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp)-NH ₂)	R & D Systems, Wiesbaden
H-Pro-Phe-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
HD-Val-Pro-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
MeoSuc-Ala-Phe-Lys-AMC	Bachem, Weil am Rhein
MeoSuc-Gly-Leu-Phe-Lys-AMC	Bachem, Weil am Rhein
NAc-Phe-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Suc-Ala-Phe-Lys-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Tos-Gly-Pro-Lys-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Z-Ala-Arg-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Z-Gly-Gly-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Z-Gly-Pro-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Z-Phe-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
E 64	Bachem, Weil am Rhein
EDTA	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Pefabloc SC	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen

C.1.7 Material für Zellkulturtechniken

Blasticidin	Sigma, Deisenhofen
DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose	PAA, Österreich
DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose ohne Phenolrot	PAA, Österreich
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	PAA, Österreich
G418 (Geneticin)	PAA, Österreich
Hygromycin	PAA, Österreich
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin	PAA, Österreich
RPMI 1640 mit Hepes, ohne Phenolrot	PAA, Österreich
Trypsin-EDTA, 10 x Lösung	PAA, Österreich
Zellkulturgefäße (T25, T75, T185)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96well)	Nunc, Wiesbaden

C.1.8 Sonstige Materialien, Lösungen und Kits

β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Brij-35	Sigma, Deisenhofen
<i>BugBuster Protein Extraction Kit</i>	Merck, Darmstadt
<i>plus Benzonase</i>	
<i>Catch and Release Immunoprecipitation Kit</i>	Upstate, USA
Coomassie Brilliant Blau R250 und G250	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
Endoglycosidase H	New England Biolabs, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
FastHyb-Hybridisierungslösung	Biocat, Heidelberg
FCA (Freund'sches komplettes Adjuvans)	Sigma, Deisenhofen
FIA (Freund'sches inkomplettes Adjuvans)	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Furin	New England Biolabs, USA
D-Glukose	Sigma, Deisenhofen
Glutardialdehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
<i>μMACS Protein G MicroBeads</i>	Miltenyi Biotec, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonident P-40	Sigma, Deisenhofen
<i>Pichia EasyComp Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Prolong Antifate</i>	MolecularProbes, USA
SDS	Serva, Heidelberg
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tunicamycin	PAA, Linz, Österreich
Tween-20	Serva, Heidelberg

C.1.9 Prokaryontische und eukaryontische Zellen

E. coli-Stämme

TOP 10 (Invitrogen, Karlsruhe):

F – *mcrA*_(*mrr-hsdRMS-mcrBC*)_80*lacZ*_M15_ *lacX74deoR recA1araD139*_(*ara-leu*)7697*galU galK rpsL* (Str R) *endA1 nupG*

XL-GOLD (Stratagene, USA):

Tet Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcr CB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 sup E44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte[F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10(Tet^R) Amy Cam^R]

BL21(DE3) (Novagen):

F' *ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3)

Pichia pastoris

X33 (Invitrogen, Karlsruhe):

Genotyp: Wildtyp, Phänotyp: Mut⁺

Säugerzellen

HEK293 (Invitrogen, Karlsruhe)

HEK293-Zellen sind eine seit 1977 bestehende humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (Human Embryonic Kidney) mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen wurde (Graham et al. 1977). Als immortalisierte Epithelzellen wachsen HEK293-Zellen adhärent.

HEK293 Flp-In (Invitrogen, Karlsruhe)

Diese HEK293-Zelllinie ist stabil mit einer singulären Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase (FRT) (Andrews et al. 1985) und mit der Tetracyclin (Tet)-Repressor kodierenden Sequenz transfiziert. Werden HEK293 Flp-In-Zellen mit einem Vektor transfiziert, der ebenfalls eine Erkennungssequenz für FRT trägt und einen Promoter mit dem Tet-Operator (TetO) besitzt, so kann der transfizierte Vektor in Gegenwart der Rekombinase Flp stabil in das Genom integriert werden. Der Tet-Repressor bindet an die beiden Tet-Operator-Stellen und blockiert somit die Transkription des Transgens. Nach der Zugabe des Induktors Tetracyclin (Tet) fällt der Tet-Repressor ab und die Transkription wird unbehindert durchgeführt. Mit Hilfe dieses Systems, das auch als Flp-In T-REx-System bezeichnet wird, ist es somit möglich, induzierbare isogene Zelllinien zu generieren.

Humane Spermien

Humane Spermien wurden aus Patientenejakulat isoliert, das freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. M. Wolf aus der Abteilung Andrologie der Dermatologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt wurde.

C.1.10 Gewebeschnitte; Gewebe-assoziierte Arrays, RNAs und cDNAs

Humane Testisschnitte	Biocat, Heidelberg
Humane Epididymischnitte	Biocat, Heidelberg
Humane Prostata-, Ovarialkarzinom- und Prostatakarzinomschnitte	Prof. Dr. Andreas Nerlich, Krankenhauses München-Bogenhausen
Human Multiple Tissue Panel I und II	Clontech, USA
Human Tumor/Normal Tissue 2-Array	Biocat, Heidelberg
Total RNA (Testis Tumor, Seminoma)	Biocat, Heidelberg
cDNA Bindegewebe, männlich	Biocat, Heidelberg
cDNA Bindegewebe, weiblich	Biocat, Heidelberg
cDNA Schilddrüse, männlich	Biocat, Heidelberg
cDNA Schilddrüse, weiblich	Biocat, Heidelberg
Tumor cDNA Panel I [Nebenniere, Ösophagus, Thymus, Ovar und Blase]	Biocat, Heidelberg

C.2 Methoden

C.2.1 Mikro-und zellbiologische Methoden

C.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Kulturmedien

Für die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen wurde DYT- und LB-Medium verwendet, das durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C und 1×10^5 Pa Überdruck sterilisiert wurde. Hitzelabile Lösungen, wie z.B. Antibiotika, wurden durch Sterilfiltration durch einen 0,22 µm Filter keimfrei filtriert und dem Medium zugegeben, nachdem dieses auf 50 °C abgekühlt war. Für die Herstellung solider Kultivierungsplatten wurde dem Kulturmedium 15 g/l Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

DYT (pro Liter)	16 g	Bacto Trypton
	10 g	Hefeextrakt
	6 g	NaCl

LB (pro Liter)	10 g	Bacto Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl

Für die Selektion von *E. coli*-Klonen wurden die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin in einer Konzentration von 200 µg/ml verwendet. Zeocin wurde in einer Endkonzentration von 25 µg/ml dem Medium zugesetzt.

Stammhaltung von *E. coli*-Stämmen

Für die Kurzzeitlagerung im Kühlschrank (bis zu 4 Wochen) wurden *E. coli*-Klone auf Kultivierungsplatten mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Für eine längerfristige Stammhaltung wurden 2 ml einer Über-Nacht-Kultur mit 350 µl sterilem Glycerin gemischt und in kleinen Einfrierröhrchen bei -80 °C eingefroren.

Anzucht und Vermehrung von *E. coli*-Stämmen

Alle Stämme, die eine Antibiotikaresistenz trugen, wurden unter Antibiotikazusatz kultiviert. Über-Nacht-Kulturen wurden am Vorabend mit einer Einzelkolonie oder einem geringen Volumen der Glycerin-Stocklösung aus der Stammsammlung in Kulturflaschen mit DYT-Medium angeimpft und bei 37 °C über Nacht geschüttelt.

C.2.1.2 Kultivierung von *Pichia pastoris*

Kulturmedien

Für die Kultivierung der Hefe *P. pastoris* im Fernbachkolben (FK) und auf Nährplatten (NP) wurden folgende Medien (Konzentrationsangaben beziehen sich auf 1 Liter) verwendet:

YPD (FK)	1 % Hefeextrakt 2 % Peptone 2 % Dextrose
YPD (NP)	1 % Hefeextrakt 2 % Peptone 2 % Dextrose 2 % Agar
YPDS (NP)	1 % Hefeextrakt 2 % Peptone 2 % Dextrose 1 M Sorbitol 2 % Agar 200 mg Zeocin
BMGH (FK)	100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 1,34 % YNB (Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat und ohne Aminosäuren, Fa. Invitrogen) 4 x 10 ⁻⁵ % Biotin 1 % Glycerin
BMMH (FK)	100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 1,34 % YNB (Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat und ohne Aminosäuren, Fa. Invitrogen) 4 x 10 ⁻⁵ % Biotin 0,5 % Methanol
Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0	868 ml 1 M KH ₂ PO ₄ 132 ml 1 M K ₂ HPO ₄

Für die Anzucht im Fermenter wurden folgende Lösungen verwendet:

Spurenelemente-Lösung	0,6 % CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 0,008 % NaI, 0,3 % MnSO ₄ x H ₂ O, 0,02 % NaMoO ₄ x 2 H ₂ O, 0,002 % Borsäure, 0,05 % CoCl ₂ , 2 % ZnCl ₂ , 6,5 % FeSO ₄ x 7 H ₂ O, 0,02 % Biotin, 0,5 % (v/v) H ₂ SO ₄
Glycerollösung	50 % Glycerol mit 12 ml/l Spurenelemente-Lösung versetzt.
Methanollösung	100 % Methanol mit 12 ml/l Spurenelemente-Lösung versetzt.

Stammhaltung von *Pichia pastoris*

P. pastoris wurde als Verdünnungsausstrich angezogen und nach der Bebrütung für 4 - 5 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. Für eine längerfristige Stammhaltung wurden 1,5 - 2 ml einer Über-Nacht-Kultur zentrifugiert und das Sediment in sterilem Glycerin (50 % (v/v) in YPD) resuspendiert und in kleinen Einfrierröhrchen bei -80 °C eingefroren.

Anzucht und Vermehrung von *Pichia pastoris*

Über-Nacht-Kulturen bis zu einem Volumen von 50 ml wurden am Vorabend mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 30 °C über Nacht geschüttelt. Bei größeren Kulturvolumina wurde das Medium mit 1/10 Volumen einer Vorkultur beimpft und bei 30 °C in einem Kolben mit Schikane oder einem Fernbachkolben geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 5 – 15 erreicht war.

C.2.1.3 Kultivierung von Säugerzellen (HEK293)

Kulturmedien

Wachstumsmedium

Routinemäßig wurde für die Kultivierung von HEK293- und HEK293 Flp-In-Zellen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Konzentration und 90 % Luftfeuchtigkeit als Wachstumsmedium DMEM mit 10 % (v/v) FCS unter Zugabe einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (40 U/ml) verwendet.

Selektionsmedien

Zur Selektion von konstitutiv das Transgen exprimierenden HEK293-Zellen wurden dem Medium 1 mg/ml G418 (Geneticin) zugesetzt. Die Selektion von Klonen, die den pcDNA5/FRT-Vektor integriert hatten, erfolgte mittels 100 µg/ml Hygromycin. Zudem war die Gabe von 5 µg/ml Blasticidin zur Selektion von Tet-Repressor-positiven Zellen notwendig.

Einfriermedium

Zur Stammhaltung von stabil transfizierten Klonen wurden die Zellen mit DMSO-haltigem Medium (83 % (v/v) DMEM, 10 % (v/v) FCS und 7 % (v/v) DMSO) eingefroren.

Weitere Lösungen

Zum Waschen von Zellen wurde PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Fa. PAA) verwendet. Zum Trypsinieren von Zellen wurde eine 10 x Trypsin-EDTA-Lösung (PAA) mit PBS auf eine 1 x-Lösung verdünnt.

Für Aktivitätsmessungen der Zellkulturüberstände wurde farbloses RPMI 1640-Medium (PAA) und DMEM ohne Phenolrot benutzt.

Splitten konfluenter Zelllinien

Das Medium von konfluenten Zellen wurde entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine 1 x Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben, so dass diese gerade von der Lösung benetzt wurden. Nach einigen Minuten konnten die Zellen von der Kulturflaschenoberfläche gelöst werden. Zum Entfernen der Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen in DMEM-Medium aufgenommen und zentrifugiert. Die Zellen wurden danach in frischem Medium resuspendiert und in neue Zellkulturgefäße ausgesät.

Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde ein Aliquot resuspendierter Zellen mit 0,2 % (w/v) Trypan-Blau versetzt und so mit PBS verdünnt, dass etwa 10 bis 50 Zellen/Quadrat in einem Neubauer-Hemocytometer unter dem Mikroskop zu erkennen waren. Die Anzahl nicht gefärbter und damit lebender Zellen (n_{Zellen_total}) pro Quadrat ($n_{Quadrat}$) wurde ermittelt und die Konzentration in der Zellsuspension wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{n_{Zellen_total}}{n_{Quadrat}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nach der Zählung wurden die Zellen zentrifugiert und das Zellsediment in kaltem Einfriermedium aufgenommen. In Einfrierröhrchen wurden 1×10^6 Zellen/ml zunächst über Nacht im Isopropanol-Bad bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen von Zellen wurden die Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und zügig bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad erwärmt. Die Zellen wurden in frisches Kulturmedium gegeben, zum Entfernen von DMSO zentrifugiert, erneut resuspendiert und anschließend in eine T25-Zellkulturflasche überführt.

C.2.1.4 Isolierung von Spermien aus humanem Ejakulat

Die Isolierung von Spermien aus humanem Ejakulat erfolgte mittels eines diskontinuierlichen Percoll-Gradienten (40 – 80 %). Hierfür wurde das Ejakulat auf die Gradientensäule gegeben und bei $800 \times g$ für 20 Minuten zentrifugiert. Mittels eines Mikroskopes wurde die Mehrheit der Spermien im unteren Drittel (80 %-Phase) der Percoll-Säule detektiert. Dieser Bereich wurde eluiert und erneut zentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde mit PBS gewaschen und für weitere Analysen (quantitative RT-PCR und Western Blot) verwendet.

C.2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

C.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für analytische und präparative Zwecke wurde Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen mittels der Plasmidisolierungskits der Firmen Qiagen bzw. Roche gewonnen. Die Durchführung beruht auf der am häufigsten angewendeten DNA-Plasmidisolierungsmethode, der alkalischen Lyse. Dafür wurden Über-Nacht-Kulturen sedimentiert und anschließend in einem RNase-haltigen Puffer resuspendiert. Durch Zugabe des NaOH- und SDS-haltigen Puffers wurden die Zellen lysiert. Nach Neutralisation mit einem Kaliumacetat-haltigen Puffer wurde die chromosomale DNA durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt und die Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschersäule oder an eine silikathaltige Matrix gebunden. Durch zwei Waschschrte wurden Protein-, RNA- und niedermolekulare Verunreinigungen beseitigt. Die Elution der Plasmid-DNA von der Säule erfolgte im Falle des Anionenaustauschers durch hohe Salzkonzentrationen oder mit ddH₂O bei der Benutzung einer hydrophoben Matrix.

C.2.2.2 Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen und mit den mitgelieferten Puffersystemen durchgeführt. Die Restriktion mit spezifischen Endonukleasen diente der Linearisierung von Plasmiden oder zum Ausschneiden gewünschter DNA-Fragmente. Die Analyse von Plasmiden kann mit einer analytischen Restriktion erfolgen, der präparative Verdau strebt hingegen weitere Klonierungsschritte an.

Zur Auftrennung von geschnittenen DNA-Fragmenten wurde die Agarosegel-Elektrophorese verwendet. Für die Restriktion wurde für 1 µg eluierte DNA mit 10 Einheiten (Units) Endonuklease im entsprechenden Puffer versetzt und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

DNA-Fragmente, die durch präparativen Restriktionsverdau geschnitten worden waren, wurden danach durch Ligation für die Herstellung rekombinanter DNA-Konstrukte miteinander verknüpft. Dabei wurde für die Ligation von überhängenden und stumpfen Enden ein 3-10 facher molarer Überschuß des kleineren DNA-Fragmentes mit 50 ng Plasmid-DNA sowie einer Einheit T4-DNA-Ligase versetzt und eine Stunde bei 16 °C inkubiert.

Für die Rekombinasereaktion wurden 100 – 300 ng pENTR11-Vektor mit Insert zusammen mit 300 ng pET-DEST-42-Vektor und einem LR-Clonase-Mix vermischt und eine Stunde bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein unspezifischer Abbau von Proteinen durch 10-minütige Inkubation mit Proteinase K bei 37 °C. Der Reaktionsansatz wurde daraufhin in *E. coli*-Zellen transformiert.

Um eine Religation von linearisierten Vektoren zu reduzieren, wurden die 5'-Enden mittels *Calf Intestine* Phosphatase (CIP, New England Biolabs) dephosphoryliert. Hierfür wurde eine Einheit CIP mit 100 pmol linearisiertem Vektor im entsprechenden Puffer verdünnt und für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die CIP durch Ethanol-fällung entfernt.

C.2.2.3 Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese

Für analytische Gele wurde Agarose der Firma Biozym in einer Konzentration von 0,8 bis 2,0 % (w/v) verwendet. Für die Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris Base, 20 mM Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,3) mittels eines Mikrowellenofens geschmolzen und anschließend 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA-Fragmente wurden mit 1/10 Vol 10 x *Blue Juice Gel Loading Buffer* (Invitrogen) gemischt, in die Taschen des Gels eingebracht und in TAE-Puffer bei ca. 100 V für 1-2 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden anschließend auf einem Transilluminator bei 302 nm sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert (Image Master, Pharmacia). Bei präparativen Gelen wurde(n) die gewünschte(n) Bande(n) ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert.

Für die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der Gel-Extraktionskit entsprechend den Vorschriften der Firma Machery & Nagel verwendet. Das ausgeschnittene Gelstück wurde bei 50 °C in der 3-fachen Menge Solubilisierungspuffer geschmolzen und die DNA an eine Silikatsäule gebunden. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurde die DNA in ddH₂O eluiert.

C.2.2.4 Reinigung und Sequenzierung von DNA

Zur Entfernung von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen wurden Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktionen durchgeführt. Das Mischungsverhältnis der organischen Phase bestehend aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol betrug 25/24/1. Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde zusammen mit der organischen Phase in *Phase Lock Tubes* (Eppendorf) gegeben, vermischt und anschließend zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Es wurde die obere DNA-haltige wässrige Phase abgenommen.

Diese DNA-Lösung wurde mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Vol. Ethanol (100 %) versetzt, mindestens 30 Minuten bei -20 °C gekühlt und anschließend in einer Kühlzentrifuge sedimentiert. Das Präzipitat wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in ddH₂O aufgenommen.

Die Sequenzierung der gereinigten DNA mittels Fluorescein-markierten Didesoxynukleotiden wurde von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt (nach Sanger et al. 1977). Hierfür wurden der Firma 200 ng Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt und 100 pmol des entsprechenden Primers zugeschickt. Die Analyse der Daten erfolgte mittels der Software SECentral und NCBI BLAST.

C.2.2.5 Isolierung von RNA aus Spermien

Die Isolierung der RNA aus Spermien für die Quantifizierung der T-GPI-SP1- bzw. GAPDH-Transkriptexpression mittels RT-PCR wurde mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen durchgeführt. 1×10^7 über einen Percoll-Gradienten gereinigte Spermien wurden mit einem β -Mercaptoethanol-haltigen und Guanidinisothiocyanat-haltigen Puffer lysiert. Für eine effektive Zerstörung der Zellmembran wurde das Zelllysate in einem QIAshredder-Filtergefäß zentrifugiert, mit 70 % (v/v) Ethanol vermischt und auf eine silikahaltige Säule gegeben. Chaotrope Salze und Ethanol bewirken dabei die spezifische Bindung von RNA-Molekülen, die länger als 200 Nukleotide sind, an die Säulenmatrix. Durch die Behandlung mit DNase wurde vorhandene genomische DNA entfernt und durch zweimaliges Waschen konnten weitere Verunreinigungen beseitigt werden. Die RNA wurde abschließend mit RNase-freiem ddH₂O eluiert.

C.2.2.6 Quantifizierung von DNA und RNA

Quantifizierung durch Agarosegel-Elektrophorese

Die zu quantifizierende DNA-Lösung wurde zusammen mit einer Standard- oder Vergleichs-DNA bekannter Konzentration in einer Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Konzentration der zu bestimmenden DNA konnte dabei durch den Vergleich mit der UV-induzierten Bandenintensität der DNA mit bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

Quantifizierung durch UV-Spektroskopie

Nukleinsäuren können ultraviolettes Licht mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 260$ nm absorbieren. Die Bestimmung von DNA- und RNA-Lösungen erfolgte über die Messung der Extinktion bei 260 nm (E_{260}) gegen den entsprechenden Referenzpuffer. Ein Absorptionswert von 1 entspricht näherungsweise einer Konzentration von

DNA:	1 $E_{260} = 50$ $\mu\text{g/ml}$
RNA:	1 $E_{260} = 40$ $\mu\text{g/ml}$
Oligonukleotide:	1 $E_{260} = 20$ $\mu\text{g/ml}$

Mittels des Quotienten von $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ kann eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäurepräparation getroffen werden. Der Quotient sollte bei DNA-Lösungen zwischen 1,8 und 1,95 sowie bei RNA zwischen 1,9 und 2,0 betragen. Ergeben sich niedrigere Werte, so liegen meist Verunreinigungen durch Phenol oder Proteine vor.

C.2.2.7 cDNA-Synthese und quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

1 µg RNA aus verschiedenen humanen Geweben der Firma Biocat (Heidelberg) bzw. 455 ng RNA aus humanen Spermien wurden in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Dies wurde mittels des *1st Strand cDNA Synthesis*-Kit von Roche ausgeführt, wobei zur gereinigten RNA die Reverse Transkriptase zugegeben wurde. Danach wurde für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Die umgeschriebene cDNA wurde nach einer anschließenden Ethanol-fällung für die quantitative RT-PCR eingesetzt.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein geeignetes Verfahren um *in vitro* eine Vervielfältigung eines DNA-Bereiches mit einer definierten Länge und einer definierten Sequenz zu erreichen. Die PCR arbeitet nach folgendem zyklischen Prinzip: Die doppelsträngige (ds) DNA wird thermisch denaturiert (94 °C). Beim Abkühlen hybridisieren die beiden Oligonukleotid-Primer an den zu vervielfältigenden Bereich der DNA. Dieser Vorgang wird als *Annealing* bezeichnet. In Anwesenheit von dNTPs kann die DNA-Polymerase die Oligonukleotide verlängern. Das Temperaturoptimum liegt für die *Taq*-Polymerase bei 72 °C.

Nach der PCR wurden die Produkte mittels präparativer Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Amplifikate, die mit einem Vektor mit überhängenden Enden ligiert werden sollten, wurden zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Die dem gewünschten Produkt entsprechende Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem NucleoSpin-Kit der Firma Machery & Nagel von der Agarose befreit und mit dem entsprechend geschnittenen Vektor ligiert.

Die Quantifizierung von mRNA-Transkripten mittels RT-PCR wurde mit dem LightCycler-System der Firma Roche durchgeführt. Dieses System ermöglicht die Quantifizierung von Transkripten durch die Analyse der log-Phase einer PCR, in der eine Vermehrung des PCR-Produktes mit einer logarithmischen Zunahme des Fluoreszenzsignals einhergeht. Als Signal wird die Zunahme des fluoreszierenden Komplexes aus dsDNA mit interkaliertem SYBR Green gemessen.

C.2.3 Expression von T-GPI-SP1 in *E. coli*

C.2.3.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation

XL-10 Gold *E. coli*-Zellen wurden auf antibiotikafreien Kultivierungsplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 50 ml DYT-Medium mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über eine weitere Nacht kultiviert. Durch Zugabe von frischem DYT-Medium wurde die Kultur bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 1,0 erreicht worden war. Die Zellen wurden sedimentiert und in $\frac{1}{4}$ Originalvolumen eiskalter 100 mM MgCl₂-Lösung aufgenommen. Es folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation. Die Zellen wurden in $\frac{1}{20}$ Originalvolumen eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellsediment in $\frac{1}{100}$ Originalvolumen Einfriermedium (85 % (v/v) 100 mM CaCl₂ und 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert und in 50 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Stämme (XL-10 und Top10) wurde ein Aliquot von 50 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis aufgetaut und mit 2 µl 10 %igen (v/v) β-Mercaptoethanol für 10 Minuten bei 0 °C inkubiert. Nach Zugabe von 50 bis 200 ng des zu transformierenden Plasmides (Konstrukte siehe unter C.1.5.5) erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 30 Minuten auf Eis. Die Aufnahme des Plasmids wurde durch einen kurzen Hitzeschock bei 42 °C induziert. Nach nochmaliger Inkubation auf Eis für 2 Minuten wurde den Zellen SOC-Medium (5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM D(+)-Glukose) zugesetzt. Anschließend wurden sie für eine Stunde bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt. Die Zellsuspension wurde danach auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

C.2.3.2 Zellkultur, Zellernte und Isolierung der Einschlusskörperchen

Zur Expression der Spleißvarianten Pro-T-GPI-SP1-1, -2 und -3 mit V5-Epitop und His₆-Tag wurde der Vektor pET-DEST-42 in *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Die Eigenschaften des Vektors sind unter C.1.5.5 beschrieben. Für die Expression wurde eine 10 ml *E. coli*-Vorkultur über Nacht bei 37 °C in DYT-Amp-Medium angezogen und am nächsten Tag in einen Fernbachkolben mit 500 ml DYT-Amp-Medium überimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,0 wurden die Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und die Zellen bei 37 °C für weitere drei Stunden geschüttelt.

Nach der Expression wurde die *E. coli*-Kultur für 10 Minuten bei 4500 x g und 4 °C zentrifugiert. Zum Entfernen der Membranbestandteile wurde das Zellsediment in 5 ml BugBuster-Lösung (Merck) pro Gramm Sediment resuspendiert. Das *E. coli*-Lysat wurde mit Benzonase (10 µg/ml) und Lysozym (1000 U/ml) bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch ein Abbau der Nukleinsäuren und der bakteriellen Zellwände erreicht wurde. Anschließend wurden die Einschlusskörperchen durch Zentrifugation (16000 x g, 20 Minuten und 4 °C) geerntet und mehrmals durch Resuspendieren in einer 1/10 verdünnten BugBuster-Lösung gewaschen (5000 x g, 15 Minuten und 4 °C). Die isolierten Einschlusskörperchen wurden sodann in 8 M Harnstoff gelöst.

C.2.4. Expression von T-GPI-SP1 in *Pichia pastoris*

C.2.4.1 Herstellung chemisch kompetenter *Pichia pastoris*-Zellen, Transformation und Selektion von positiven Zellen

Als Alternative zur Elektroporation wurden *Pichia pastoris*-Zellen des Stammes X33 mit Hilfe des Pichia EasyComp Kits von der Firma Invitrogen chemisch kompetent gemacht. Hierfür wurde eine in YPD gehaltene Über-Nacht-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,2 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 1,0 bei 30 °C für 1 bis 2 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden bei 3000 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in der im Kit enthaltenen Pufferlösung I aufgenommen, erneut sedimentiert und abermals in Lösung I resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden 3 µg linearisierter Vektor (pPICZαA mit den unter C.1.5.5 beschriebenen Konstrukten) verwendet. Zunächst erfolgte unter Zugabe der Pufferlösung II des Pichia EasyComp Kits eine Inkubation bei 30 °C für eine Stunde. Die Aufnahme der DNA wurde mittels eines Hitzschocks bei 42 °C erreicht. Anschließend fand eine 1-stündige Inkubation mit dem Vollmedium YPD statt. Die Zellen wurden zweimal bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert, in Pufferlösung III aufgenommen und in einem letzten Schritt auf Zeocin-haltigen YPDS-Platten ausgestrichen und für 5 bis 10 Tage bei 30 °C inkubiert.

Screening der Klone – Expressionsanalyse der transformierten Zellen mittels Dot-Blot

Um die Expressionsleistung verschiedener His-Tag-markierter *Pichia*-Klone quantitativ vergleichen zu können, wurde der Kulturüberstand mit Hilfe der Dot-Blot-Analyse untersucht. Aufgrund von Gravitationskräften wurde der Überstand dabei auf einer Nitrozellulosemembran auf eine kleine kreisförmige Fläche fokussiert und anschließend mit TBS-Puffer gewaschen. Geblockt wurde mit einer 3 %igen BSA-TBS-Lösung. Daraufhin wurde mit TBS-Tween-Triton gewaschen und mit einem Anti-His-Conjugate (1/3000 Verdünnung in TBS) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Entwicklung mit dem ECL Plus-Western Blot-System (GE Healthcare) in der Dunkelkammer.

C.2.4.2 Anzucht im Fernbachkolben und im Fermenter

Für die Expression von T-GPI-SP1 wurde der Vektor pPICZαA im Hefestamm X33 eingesetzt. Die Eigenschaften dieses Vektors und die verwendeten T-GPI-SP1-Konstrukte sind unter C.1.5.5 beschrieben.

Zur Anzucht im Fernbachkolben wurden Hefezellen in 10 ml BMGH-Medium aus einer Glycerinkultur oder von einem Verdünnungsausstrich angeimpft und 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 4 bis 6 erreicht war. Diese Vorkultur wurde in 500 ml BMGH-Medium überimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert, bis wiederum eine OD₆₀₀ von 2 bis 6

erreicht war. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1500 x g geerntet, der Überstand verworfen und das Sediment in BMMH-Medium soweit resuspendiert, dass eine OD₆₀₀ von 1 erreicht wurde. Zur Expression wurden 500 ml dieser Kultur in einem 1 Liter Fernbachkolben bei 30 °C für 3 bis 5 Tage inkubiert und alle 24 Stunden mit 1 % Methanol versorgt.

Zur Anzucht der Zellen im Fermenter wurde ebenfalls der Hefestamm X33 verwendet. Die Zellen wurden in 10 ml BMGH-Medium aus einer eingefrorenen Glycerinkultur oder von einem Verdünnungsausstrich angeimpft und 2 - 3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 4 bis 6 erreicht war. Dann wurden 500 ml BMGH Medium in einem Schüttelkolben mit dieser Kultur beimpft und bei 30 °C für 2 - 4 Tage bis zu einer OD₆₀₀ von 2 bis 6 inkubiert. Danach wurde der Ansatz in den Fermenter gepumpt.

Der verwendete Fermenter Biostat E (B. Braun Biotech) besitzt ein Kulturgefäß (10 Liter) und eine Regeleinheit. Die Regeleinheit erlaubt die Überwachung und Steuerung wichtiger Parameter wie Sauerstoffgehalt, Temperatur, pH-Wert und Schaumbildung. Die Handhabung des Gerätes erfolgte nach den Angaben des Herstellers der Fa. B. Braun Biotech, Melsungen.

Die Fermentation unterteilte sich in die Abschnitte Glycerolphase, ‚Batch‘-Phase, Glycerolfütterungs- und Methanolfütterungsphase. Es galten folgende Sollwerte:

pH-Wert:	5,5
Temperatur:	30 °C
Sauerstoffsättigung:	35 %
Sauerstoffkontrolle:	Rührer und Ventil
minimale/maximale Rührgeschwindigkeit:	300 rpm / 1500 rpm
Ventilstellung:	ganz geöffnet (max. 10 l/Minute)

Das für die Expression verwendete Basalsalzmedium (5 l) wurde im Fermenter bei 121°C für 30 Minuten sterilisiert. Bereits vor der Sterilisation war das folgende Zubehör am Fermenter angebracht worden: Temperaturfühler PT 100, Sauerstoffelektrode, pH-Elektrode und Antischaumsonde. Nach dem Abkühlen des Mediums wurden am nächsten Tag zusätzlich Zuluftnadel, Zuleitungen für Säure, Lauge und Antischaum sowie eine zusätzliche Anstechnadel mit Sterilkupplung (zur späteren Zugabe der Vorkultur, des Glycerols und des Methanols) am Gerät montiert. Der pH des Mediums wurde auf 5,5 eingestellt und 21,75 ml Spurenelemente-Lösung wurden steril zugegeben.

C.2.4.3 Zellernte und Ankonzentrieren des Mediums

Um die bei der Expression ins Medium sezernierten rekombinanten Proteine aus dem Fermenterlauf von den Hefezellen zu trennen, wurde die Kultur eine Stunde bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert. Überstände aus dem Fermenter wurden über das Tangentialflusssystem Minisette (Pall) mit einer Membrankassette von 10 kD Ausschlussgröße konzentriert. Das konzentrierte Medium wurde bis zur Reinigung bei 4 °C gelagert.

C.2.5 Expression von T-GPI-SP1 in Säugerzellen

C.2.5.1 Transfektion von HEK293- und HEK293 Flp-In-Zellen

Mit Hilfe des Lipidreagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) kann Fremd-DNA in eukaryontische Zellen eingebracht werden. Dies wird als lipidvermittelte Transfektion bezeichnet. Die verwendeten Vektoren und Konstrukte werden unter C.1.5.5 beschrieben.

Am Tag vor der Transfektion wurden $1 - 5 \times 10^5$ Zellen pro Kavität in 6well-Platten so ausgesät, dass die Zellen am Tag der Transfektion etwa 80 % Konfluenz erreicht hatten. 0,2 µg Plasmid-DNA (Konstrukte siehe C.1.5.5) wurden in Serum-freies DMEM gegeben und kurz inkubiert. Anschließend wurde Lipofectamine 2000 der DNA im Verhältnis 3/2 zugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde der DNA/Lipid-Komplex tropfenweise auf die Zellen aufgebracht und durch leichtes Schütteln gleichmäßig verteilt. Am folgenden Tag wurde das Medium erneuert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 2-3 Wochen mit 1 mg/ml G418 selektioniert.

Im Falle der induzierbaren HEK293 Flp-In-Zellen erfolgte eine Cotransfektion von 0,1 µg pcDNA5 mit einem zweiten Plasmid (pOG44; 1 µg), welches die kodierende Sequenz für die Flp-Rekombinase trug. Somit konnte eine Integration der gewünschten Gensequenz gezielt an einer definierten Stelle im HEK-Genom erreicht werden. Die transfizierten Zellen wurden für 1-2 Wochen mit 100 µg/ml Hygromycin B und anschließend für eine weitere Woche mit 100 µg/ml Blastocidin selektioniert. Die Induktion der Klone erfolgte mit 1 µg/ml Tetracyclin.

C.2.5.2 Konstitutive Expression in HEK293-Zellen

Die Expression von T-GPI-SP1 in nicht induzierbaren HEK293-Zellen verlief kontinuierlich. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % in Serum-haltigen DMEM-Medium kultiviert. Nach Austausch des Mediums gegen Serum-freies DMEM wurden die Zellen für fünf Tage im Brutschrank gehalten. Der Überstand wurde abgenommen und für die affinitätschromatographische Aufreinigung gegen den entsprechenden Bindepuffer (siehe C.2.6) dialysiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Serum-freiem DMEM, um somit eine möglichst geringe Menge an Fremdproteinen im Kulturüberstand zu gewährleisten. Dies erleichterte die Aufreinigung erheblich.

C.2.5.3 Induzierbare Expression in HEK293 Flp-In-Zellen

Die Expression verschiedener T-GPI-SP1-Konstrukte wurde mit Hilfe von Tetracyclin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml induziert. Hierfür wurden die Zellen am Vortag in DMEM mit FCS so ausgesät, dass sie eine Konfluenz von ca. 80 % erreichten. Anschließend wurde das Kulturmedium abgesaugt und gegen ein Serum-freies, Tetracyclin-haltiges Medium ausgetauscht. Die Ernte des Zellkulturüberstandes erfolgte nach fünf Tagen.

C.2.6 Reinigung der T-GPI-SP1-Konstrukte

C.2.6.1 Dialyse

Zum Puffer-Austausch von Proteinlösungen mittels Dialyse wurden die Dialyseschläuche *SpectraPor Dialysis Tubing* (Serva) und *Slide a Lyzer* Dialysekassetten (Pierce) verwendet. Abhängig vom Volumen wurden für größere Volumina (ab 0,5 ml) Dialyseschläuche, für kleinere Volumina Dialysekassetten benutzt. Das Ausschlußmolekulargewicht betrug jeweils 10 kDa. Die Dialyse wurde bei 4 °C für vier Stunden unter leichtem Rühren durchgeführt.

C.2.6.2 Kationenaustauscherchromatographie

Die Reinigung mittels Kationenaustauscherchromatographie wurde an einer FPLC-Anlage bei Raumtemperatur durchgeführt. Der gesamte Aufreinigungsprozess wurde über die Absorption bei 280 nm überwacht und das Eluat wurde fraktioniert gesammelt. Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

Das Kulturmedium wurde vor dem Auftragen auf die Chromatographiesäule bei 4 °C für 20 Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert und der Überstand mit einer Spritze durch einen 0,45 µm Filter gepresst. Das klare Filtrat wurde mit einer Flußrate von 2 ml/Minute auf eine mit Auftragspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 5,5) äquilibrierte MonoS-Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit Auftragspuffer (ca. 10 Säulenvolumen) gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linear ansteigenden Elutionspuffergradienten (Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl, 2 M NaCl, pH 5,5) bei einer Flußrate von 2 ml/Minute. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

C.2.6.3 Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Sepharose

T-GPI-SP1 Proteine mit einem His₆-Tag am C-Terminus wurden mittels Ni-NTA-Sepharose (Qiagen) oder mit bereits gepackten His-trap HP-Chromatographie-Säulen (GE Healthcare) gereinigt. Es wurde sowohl unter denaturierenden als auch unter nativen Bedingungen gearbeitet.

Zuerst wurden die Säulen mit Bindepuffer (siehe unten) äquilibriert, dann erfolgte das Beladen der Säulen mit gelösten Einschlusskörperchen aus *E. coli* bzw. mit Kulturüberständen von *Pichia pastoris* oder von HEK293-Zellen. Anschließend wurden die Säulen mit dem 10-fachen Säulenvolumen mit Bindepuffer gewaschen. Unter nativen Bedingungen wurde die Elution der gebundenen Proteine mit einem Imidazol-haltigen Puffer durchgeführt. Die eluierten Proteine wurden in 1 ml-Fractionen gesammelt. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur unter Normaldruck mit einer Flußrate von 1 ml/Minute durchgeführt.

Puffer für die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen:

Bindepuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris/HCl 8 M Harnstoff, pH 8
Waschpuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris/HCl 8 M Harnstoff, pH 6,3
Elutionspuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris/HCl 8 M Harnstoff, pH 5,9

Puffer für die Reinigung unter nativen Bedingungen:

Bindepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol, pH 8
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 50 mM Imidazol, pH 8
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 - 500 mM Imidazol, pH 8

C.2.7 Proteinchemische Charakterisierung von T-GPI-SP1

C.2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die colorimetrische BCA-Methode verwendet. Dabei wird die Entstehung eines blauen Cu^{2+} -Komplexes gemessen, der zwischen Peptidbindungen und Bicinchoninsäure (BCA) in Gegenwart von Cu^{2+} gebildet wird. Dafür wurden 100 μl Proteinlösung in geeigneter Verdünnung mit 100 μl BCA/ Cu^{2+} (24/1)-Lösung (Pierce Protein Assay, Fa. Pierce) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde die Absorption bei 560 nm gemessen. Zur Quantifizierung der Proben wurde eine Standardkurve mit BSA-Standard-Lösungen bekannter Konzentrationen verwendet. Die Bestimmung der Proben erfolgte in Duplikaten.

C.2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen (Laemmli, 1970) wurden homogene 12 %-ige oder 15 %-ige Trenngele mit 5 %-igen Sammelgelen verwendet. Der Aufbau der Gelapparatur und das Gießen der Gele erfolgten entsprechend der Anleitung des Geräteherstellers (BioRad). Die Proben wurden vor dem Auftragen zur Denaturierung und Reduktion mit Laemmli-Puffer für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Während der Elektrophorese betrug die Stromstärke bei der Konzentrierung der Proben im Sammelgel 80 V und beim Lauf im Trenngel 120 V. Die SDS-PAGE wurde in einem SDS-Laufpuffer (25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) durchgeführt. Zur Charakterisierung der Banden wurden die Farbstoff-markierten Molekulargewichtsmarker SeeBlue Plus2 (Fa. Invitrogen) und PeqGOLD Marker (Fa. PAA) und ggf. gereinigte Zielproteine ebenfalls der Elektrophorese zugeführt.

C.2.7.3 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Brilliant Blau

Zur Visualisierung der Proteinbanden nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau (Serva) angefärbt. Hierfür wurden sie nach der Elektrophorese in der Färbelösung (30 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,08 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau) inkubiert. Anschließend wurden sie in der Entfärbelösung (30 % Methanol, 10 % Essigsäure) geschüttelt, bis der Hintergrund klar und nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren. Dabei wurde die Entfärbelösung mehrmals gewechselt.

C.2.7.4 Western Blot-Analyse

Für die immunologische Detektion von Proteinen mittels Western Blot wurden diese nach der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran mit Hilfe des Elektrotransfer-Verfahrens transferiert. Für den Transfer wurden Filterpapiere und eine auf die Größe des Gels zugeschnittene Nitrocellulosemembran im Transferpuffer (50 mM Tris Base, 139 mM Glycin, 0,1 % SDS, 20 % (v/v) Methanol) inkubiert. Anschließend wurde das „Transfersandwich“ wie folgt aufgebaut: ANODE – Schwämmchen - Filterpapier - Nitrocellulosemembran - Gel - Filterpapier - Schwämmchen – KATHODE. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 70 mA pro Gel für 1,5 Stunden.

Nach Transfer der Proteinbanden auf die Nitrocellulosemembran wurde die Detektion der T-GPI-SP1-Proteine mittels eines spezifischen Antikörpers (siehe C.2.9) bewerkstelligt. Hierfür wurde zunächst die Membran in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) mit 3 % BSA bei niedriger Rotationsgeschwindigkeit geschüttelt, um die freien Bindungsstellen abzusättigen. Nach Waschschritten mit TBS-Tween-Triton (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,2 % Triton X-100) und TBS wurde sie mit dem T-GPI-SP1-Antikörper (Verdünnung 1/500 in TBS mit 3 % BSA) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgten erneut Waschschrritte und die Inkubation der Membran mit einem sekundären Antikörper, der mit *Horseradish Peroxidase* (HRP) markiert war (Verdünnung 1/20 000 in TBS mit 3 % BSA). Die Detektion der Banden wurde mit Hilfe des ECL Plus-Western Blot-Detection Systems unter Verwendung einer Luminol/H₂O₂-Lösung (Firma GE Healthcare) durchgeführt und der Röntgenfilm (Lumi Film Entwicklungsfilm, GE Healthcare) in einer Entwicklungskassette (Hypercassette, GE Healthcare) belichtet.

Zur Detektion von His₆-Tag-markierten-Proteinen wurde das Anti-His-Conjugate (Qiagen) in einer Verdünnung von 1/3000 in TBS-Tween mit 3 % BSA verwendet. Der Antikörper war bereits mit *Horseradish Peroxidase* markiert, somit war eine Inkubation mit einem Sekundärantikörper nicht nötig.

Für die Western Blot-Analysen der in *P. pastoris* generierten rekombinanten Proteine wurde 1 ml konzentrierter Kulturüberstand auf ein Volumen von 50 µl reduziert. Hierfür wurden die in der Lösung befindlichen Proteine mittels 10 %iger TCA gefällt, mit Aceton gewaschen und zur Trennung über die SDS-PAGE in Laemmli-Puffer (2 x Laemmli-Puffer: 100 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 200 mM DTT) aufgenommen.

C.2.7.5 N-terminale Aminosäuresequenzierung

Die gereinigten T-GPI-SP1-Proteine wurden für die Sequenzierung auf eine PVDF-Membran der Firma Schleicher & Schuell transferiert, kurz mit 0,5 % Coomassie Brilliant Blau angefärbt und getrocknet. Die Sequenzierung wurde von Herrn Reinhard Mentele vom Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) durchgeführt.

C.2.7.6 Glykosylierungsanalysen

Deglykosylierungsversuche erfolgten mit Tunicamycin und mit Endoglykosidase H. Im Falle von Tunicamycin wurden in einer Kavität einer 6well-Platte ausgesäte, T-GPI-SP1-exprimierende HEK293 Flp-In-Zellen mit Tunicamycin-Konzentrationen von 0,1 µg bis 0,5 µg /ml (Fa. PAA) in DMEM ohne FCS über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Analyse der Glykosylierung mittels Western Blot durchgeführt.

Zur Endo H-Analyse wurde rekombinantes T-GPI-SP1 mit Endo H-Denaturierungspuffer (0,5 % SDS, 1 % β-Mercaptoethanol) für 10 Minuten bei 100 °C denaturiert und anschließend mit 1 x G5 Reaktionspuffer (50 mM Natriumacetat, pH 5,5) mit 1 bis 2 Einheiten Endo H (Fa. New England Biolabs) bei 37 °C für 1 bis 3 Stunden inkubiert. Die Glykosylierung der T-GPI-SP1-Proteine wurde ebenfalls mittels Western Blot-Analyse untersucht.

C.2.7.7 Prozessierung von rekombinanten Pro-T-GPI-SP1-Varianten

Zur Abspaltung der T-GPI-SP1-fremden N-terminalen Aminosäuresequenz inklusive des Propeptides der T-GPI-SP1-Varianten aus *E. coli* bzw. des Propeptids von T-GPI-SP1 aus den anderen Expressionssystemen wurden die Proteasen Furin und Trypsin eingesetzt.

Bei Verwendung der Proprotein-Konvertase Furin (New England Biolabs, USA) wurden 1 bis 3 Einheiten Furin mit den rekombinanten T-GPI-SP1-Proteinen in Furinpuffer (100 mM Hepes, 0,5 % Triton X-100, 1 mM CaCl₂, 1 mM β-Mercaptoethanol) zwischen 1 Minute bis über Nacht bei 30 °C inkubiert. Für die Proteolyse mittels Trypsin wurde 1 nM Enzym (New England Biolabs) verwendet. Der Ansatz wurde für 1 bis 180 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die proteolytische Spaltung über SDS-PAGE oder Western Blot analysiert.

C.2.7.8 Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Aktivität von T-GPI-SP1 wurden die T-GPI-SP1-Lösungen in einer 96well-Platte vorgelegt. Danach wurden diverse Serinprotease-Substrate (siehe C.1.6.3) in Lösung zugegeben und die Spaltung der Substrate in einem Spektralphotometer (Microassay Reader Biolumin 960, Pharmacia) gemessen. Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

Messungen von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* und *Pichia pastoris*:

Rekombinante T-GPI-SP1-1, -2 und -3 wurden nach der Affinitätschromatographischen Aufreinigung in Elutionspuffer (siehe C.2.6) vorgelegt. Alternativ wurde mit Inhibitoren aufgereinigte T-GPI-SP1 gegen PBS dialysiert und danach in eine 96well-Platte pipettiert. Die verschiedenen Substrate wurden in einer Endkonzentration von 20 µM (in Elutionspuffer oder PBS) eingesetzt, wobei das Reaktionsvolumen in der Regel 150 µl betrug.

Die Spaltung der AMC-Substrate wurde bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 430 nm über einen Zeitraum von 3 Stunden alle 30 Sekunden bei 37 °C gemessen.

Die Proteolyse des Substrates *Fluorogenic Peptide Substrate II* wurde hingegen bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 320 nm verfolgt.

Messung von rekombinanter T-GPI-SP1-1 aus HEK293-Zellen:

Für die Untersuchung von Zellkulturüberständen wurden 100.000 Zellen pro Kavität in einer 48well-Platte ausgesät und am nächsten Tag die Bildung des T-GPI-SP1-1-Proteins mit Tetracyclin in DMEM ohne Phenolrot und ohne FCS induziert. Die Messung erfolgte 48 Stunden nach Induktion im Spektralphotometer. Hierfür wurden 100 µl Überstand in eine 96well-Platte pipettiert und die verschiedenen Substrate in einer Endkonzentration von 20 µM zugegeben. Die Reaktion wurde bei einer Temperatur von 37 °C über 3 Stunden alle 30 Sekunden dokumentiert. Als Leerwert wurde DMEM ohne Phenolrot mit und ohne Substrat verwendet. Als Positivkontrolle dienten die Serinprotease Trypsin und die Cysteinprotease Cathepsin B jeweils in einer Endkonzentration von 1 nM.

C.2.8 Transkriptanalyse von T-GPI-SP1 in diversen Geweben

C.2.8.1 DNA-Sonde

Für die Herstellung der DNA-Sonde wurde eine PCR mit den Primern f342 und r694 (siehe C.1.5.6) durchgeführt, als Matrize diente pEGFP-N3 mit T-GPI-SP1-1 als Insert. Dabei wurden verschiedene molare Verhältnisse von Biotin-markiertem dUTP zu dTTP eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein PCR-Produkt ohne Biotin-markiertem dUTP mit der Länge von 350 bp verwendet. Die Sonden enthielten ein molares Verhältnis von Biotin-markiertem dUTP/dTTP von 1/1 und 3/1. Die beiden Sonden wurden mit dem oben genannten Plasmid auf ihre Sensitivität getestet. Es wurden definierte Plasmidmengen (10 ng bis 0,1 fg DNA) für 1 Minute bei 95 °C denaturiert, auf eine Nylonmembran gespottet und mit UV-Licht auf dieser fixiert (1,5 J/cm²). Es folgte nun die Prähybridisierung und Hybridisierung wie oben beschrieben. Dabei zeigte die Sonde mit dem höheren Biotin-dUTP-Anteil eine geringfügig höhere Sensitivität. Die Detektionsgrenze lag bei 0,1 pg Plasmid. Die Sonde mit dem Verhältnis 3/1 wurde für die Detektion von T-GPI-SP1-Transkripten eingesetzt.

C.2.8.2 mRNA-Array

Für den Nachweis von spezifischer mRNA in Gewebeproben wurde der *Human Tumor/ Normal Tissue 2-Array* (Fa. Biocat) zur Prähybridisierung mit FastHybridisierungslösung (Fa. Biocat) bei 65 °C inkubiert und mit 100 ng einer denaturierten T-GPI-SP1-spezifischen Biotin-markierten Sonde über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Am folgenden Tag wurde mit 1 x SSC (150 mM NaCl, 0,5 mM NaOH, 0,005 % SDS) und mit 0,5 x SSC gewaschen. Der Array wurde mit 30 ml Prekonjugatblock [1/5 Vol. Western Blot Reagent (Fa. Roche), 4/5 Vol. Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,1 M NaCl, pH 7,5)] für 20 Minuten und danach für 2 Stunden mit 40 ml Konjugatblock [1/10 Vol. Western Blot Reagent, 9/10 Vol. Maleinsäurepuffer, 1/300 Verdünnung Streptavidin-HRP] inkubiert. Das Streptavidin ist dabei an die *Horseradish Peroxidase* gebunden. Es folgten vier Waschschriffe mit Maleinsäurewaschpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,1 M NaCl, 0,3 % Tween, pH 7,5) und ein Waschschriff mit Maleinsäurepuffer (ohne Tween). Detektiert wurde mit dem ECl Plus-Western Blot-Detection System.

C.2.8.3 Quantitative RT-PCR

Die Quantifizierung von mRNA-Transkripten mittels RT-PCR wurde mit dem LightCycler-System der Firma Roche durchgeführt. Für einen Reaktionsansatz wurde 1 µl umgeschriebene cDNA bzw. 1 µl Standard mit spezifischen Primern und den *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* Mix in einer Glaskapillare gemischt, zentrifugiert und in das LightCycler Kapillar-Rondell eingesetzt. Die Proben durchliefen folgendes Programm:

95 °C/10 Min; [95 °C/10 Sek → 68 °C/10 Sek → 72 °C/16 Sek] x 35 Zyklen. Abschließend wurde durch eine graduelle Erhöhung der Temperatur eine Schmelzkurvenanalyse mit den Parametern 95 °C → 58 °C/10 Sek → dT/dt 0,1 °C/Sek vorgenommen, die es ermöglicht, Primerdimere und unspezifische Produkte zu identifizieren. Die Daten wurden anhand der entsprechenden Standardkurven analysiert und auf das *House keeping*-Gen GAPDH normiert.

C.2.9 Herstellung polyklonaler T-GPI-SP1-Antikörper

Die Immunisierungen, die Blutentnahme aus der Ohrvene zur Antikörper-Titerbestimmung und die kardiale Entblutung von zwei weiblichen New-Zealand-Kaninchen (Herkunft: Fa. Harlan-Winkelmann, Borcheln) erfolgte unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten Dr. med. vet. Peter Scheuber.

C.2.9.1 Grundimmunisierung, Boostern und Serumgewinnung

Die Grundimmunisierung wurde intramuskulär mit 500 µg in PBS-gelöster T-GPI-SP1-3 und FCA (Freund'sches komplettes Adjuvans) durchgeführt. FCA besteht aus einer Emulsion von Mineralöl und Hitze-inaktivierten Mykobakterien, wodurch eine verstärkte Immunantwort ausgelöst wird.

Vor der ersten Boosterung wurde den beiden Tieren nach 21 Tagen aus der Ohrvene Blut entnommen. Daraus wurde das Serum gewonnen (siehe unten) und eine Antikörper-Titerbestimmung mit Hilfe der ELISA-Technik (siehe C.2.9.2) durchgeführt. Danach wurde den Kaninchen subkutan 500 µg in PBS gelöste T-GPI-SP1-3 mit FIA (Freund'sches inkomplettes Adjuvans) gespritzt. FIA enthält keine Mykobakterien und belastet somit die Tiere in einem geringeren Maße als FCA. Nach weiteren 21 Tagen erfolgte die zweite Boosterung und nach 31 Tagen die dritte Boosterung nach dem oben genannten Schema. In der 12. Woche wurden die Tiere unter intramuskulärer Ketamin-Betäubung durch Herzpunktion kardial entblutet.

Das entnommene Blut wurde für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert, um eine vollständige Blutgerinnung zu erreichen, und anschließend bei Raumtemperatur und 2000 x g zentrifugiert. Das gewonnene Serum mit den T-GPI-SP1-Antikörpern wurde zur Titerbestimmung bzw. Aufreinigung der spezifischen Antikörper eingesetzt.

C.2.9.2 Titerbestimmung und -überwachung mittels ELISA

Eine Mikrotiterplatte wurde mit 0,5 µg/ml rekombinanter T-GPI-SP1-3 beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 5 x mit PBS-Puffer gewaschen und mit 2 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden Verdünnungsreihen des zu testenden Serums in 2 % BSA enthaltendem PBS-Puffer in den Verdünnungsstufen 1/50, 1/100, 1/200 bis 1/400 zugegeben und eine Stunde geschüttelt. Es folgten fünf Waschschriffe mit PBS und eine einstündige Inkubation mit Kaninchen-IgG-Antikörpern auf dem Schüttler. Nach weiteren fünf Waschschriffen wurde das Substrat TMB zugegeben und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 1 M Schwefelsäure zum Abstoppen der Reaktion konnte die Mikrotiterplatte im ELISA-Lesegerät bei 450 nm vermessen werden.

C.2.9.3 Reinigung mittels Ionenaustauscherchromatographie

T-GPI-SP1-Antikörper wurden zusammen mit anderen Proteinen aus dem gewonnenen Serum mittels gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung unspezifisch gefällt, resuspendiert und über Nacht bei 4 °C gegen den Säulenauftragspuffer A (20 mM Tris/HCl, pH 8,5) dialysiert. Eine mit DEAE-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, USA) beladene Säule wurde an der Biopilot (GE Healthcare, USA) mit 1/10 Säulenvolumen Auftragspuffer A äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung aufgetragen und mittels eines NaCl-Gradienten (0 - 500 mM NaCl) eluiert, der durch verschiedene Mischverhältnisse aus Auftragspuffer A und Elutionspuffer B (20 mM Tris/HCl, pH 8,5, 1 M NaCl) erzeugt wurde. Bei einer Molarität von ca. 280 mM NaCl wurden die Antikörper von der Säule gelöst.

Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die isolierten IgG-Fraktionen nach Coomassie-Färbung anhand ihrer Molekülgröße identifiziert. Danach wurde in den einzelnen Fraktionen der T-GPI-SP1-Antikörper-Titer mittels ELISA bestimmt. Die Fraktion mit dem höchsten Wert wurde für immunologische Analysen verwendet.

C.2.10. Isolierung von T-GPI-SP1 aus humanem Seminalplasma

Zur Gewinnung von T-GPI-SP1 aus humanem Seminalplasma wurden verschiedene Immunpräzipitations-Methoden verwendet.

C.2.10.1 Magnetische Immunpräzipitation

(μ MACS Protein G MicroBeads der Fa. Miltenyi Biotec)

Seminalplasma wurde mit 1 μ g T-GPI-SP1-Antikörper und 50 μ l Protein G-gekoppelten magnetischen MicroBeads gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Eine Trennsäule mit einer speziellen Matrix (Fa. Miltenyi Biotec) wurde mit Waschpuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 6,0, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100) äquilibriert. Das mit Protein G und T-GPI-SP1-Antikörper inkubierte Seminalplasma wurde auf diese Säule aufgetragen und in ein Magnetfeld gebracht. Während der nächsten Waschschrte verblieb der Protein G-Antikörper-Antigen-Komplex auf der Säule. Anschließend wurde das Magnetfeld entfernt und das gewünschte Antigen mit 95 °C heißem 1 x Laemmli-Puffer eluiert und mittels Western Blot analysiert.

C.2.10.2 Immunpräzipitation mittels Protein G Agarose

(Fa. Roche)

30 μ l Protein G Agarose wurde über Nacht bei 4 °C mit 1 μ g T-GPI-SP1-Antikörper inkubiert und anschließend dem Seminalplasma (0,5 ml bis 1 ml) mit 1 % BSA zugegeben. Nach einer Inkubationzeit von zwei Stunden bei 4 °C wurde das Gemisch zur Reinigung bei maximaler Geschwindigkeit für 5 Sekunden und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Sediment dreimal in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 1 x Laemmli-Puffer aufgenommen und mittels Western Blot-Analyse überprüft.

C.2.10.3 Immunpräzipitation mittels eines Säulen-gekoppelten Liganden

(*Catch and Release*-Kit der Fa. Upstate)

Auf die mitgelieferte und zuvor mit Waschpuffer äquilibrierte Säule wurden Waschpuffer, Seminalplasma, 1 μ g T-GPI-SP1-Antikörper und 10 μ l des *Antibody Capture Affinity Ligand* gegeben, das den Antikörper an die Säulenmatrix bindet. Das Gesamtvolumen betrug 500 μ l. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rotor inkubiert. Anschließend wurde die Säule bei 5000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte unter Verwendung des im Kit enthaltenen Elutionspuffers in einem Volumen von 70 μ l. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels Western Blot-Analyse untersucht.

C.2.11 Immunohistochemische Analyse von T-GPI-SP1 in humanen Spermien und fixierten Gewebeschnitten

Zur immunhistochemischen Analyse von T-GPI-SP-1 in humanen Spermien wurden die über Percoll gereinigten Zellen mit Poly-D-Lysin immobilisiert, mit 1 % Paraformaldehyd auf *Chamberslides* fixiert und mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde für eine Stunde mit 1 % BSA geblockt, erneut gewaschen und mit T-GPI-SP1-Antikörper in einer Verdünnung von 1/60 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit PBS und die Zugabe des sekundären Antikörpers (Anti-Kaninchen IgG-Rhodamin) in einer Verdünnung von 1/100. Nachdem nochmals mit PBS gewaschen worden war, wurden die Spermien unter einem Deckglas mittels des Fertigsystems Prolong Antifate fixiert. Das Vorliegen von T-GPI-SP-1 wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Für den immunhistochemischen Nachweis von T-GPI-SP-1 in diversen Geweben wurden in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von der Firma Biocat und von Herrn Prof. Dr. Andreas Nerlich vom Institut für Pathologie des Krankenhauses München-Bogenhausen bezogen. Die Schnitte wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit einer 0,3 %igen H₂O₂-Lösung für 30 Minuten inkubiert und erneut mit ddH₂O und PBS gespült. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 10 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Lösung vorsichtig abgetupft und der T-GPI-SP1-Antikörper in einer Verdünnung von 1/60 in PBS zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurde der Sekundärantikörper Anti-Kaninchen IgG-Rhodamin in einer Verdünnung von 1/100 in PBS und 1 % BSA aufgetragen. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Einbettung der Gewebeschnitte in Prolong Antifate und die Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop.

C.2.12 Fluoreszenzmikroskopie

Die Analysen der Fluoreszenz von Zellen, die mit Fluoreszenzprotein (EGFP und EYFP)-kodierenden Plasmiden transfiziert waren, sowie immunhistochemische Lokalisationsstudien wurden mit einem IX70 Phasenkontrastmikroskop (Olympus) ausgeführt, das mit einer UV-Fluoreszenzlampe und den entsprechenden Fluoreszenzfiltern ausgestattet war.

D Ergebnisse

D.1 Gewebespezifische mRNA-Expression von humaner T-GPI-SP1

EST-Datenbankeinträge, die durch das Programm ESTProfileViewer möglich waren, geben das humane Hodengewebe als das Hauptexpressionsorgan von T-GPI-SP1 an. Einige EST-Einträge finden sich auch in humanem Gehirn. Deswegen sollten zunächst verschiedene humane Gewebe auf das Vorhandensein von T-GPI-SP1-mRNA geprüft werden. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob in Tumorgeweben eine Änderung im T-GPI-SP1-Transkriptionsprofil nachgewiesen werden kann.

D.1.1 Untersuchung der cDNA verschiedener humaner Gewebe

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde an 16 verschiedenen Geweben des *Human Tissue Panels I* und *II* der Firma Clontech eine Transkriptanalyse durchgeführt. Hierfür wurde cDNA der jeweils umgeschriebenen mRNA in die quantitative RT-PCR eingesetzt. T-GPI-SP1-Transkripte konnten nur in Hodengewebe detektiert werden. Pro μg RNA befanden sich durchschnittlich 791 mRNA-Moleküle von T-GPI-SP1 in diesem Gewebe, woraus sich im Bezug auf die Transkriptanzahl des *House keeping*-Gens GAPDH eine Ratio von $18,9 \times 10^{-4}$ (Abbildung D.1) ergab.

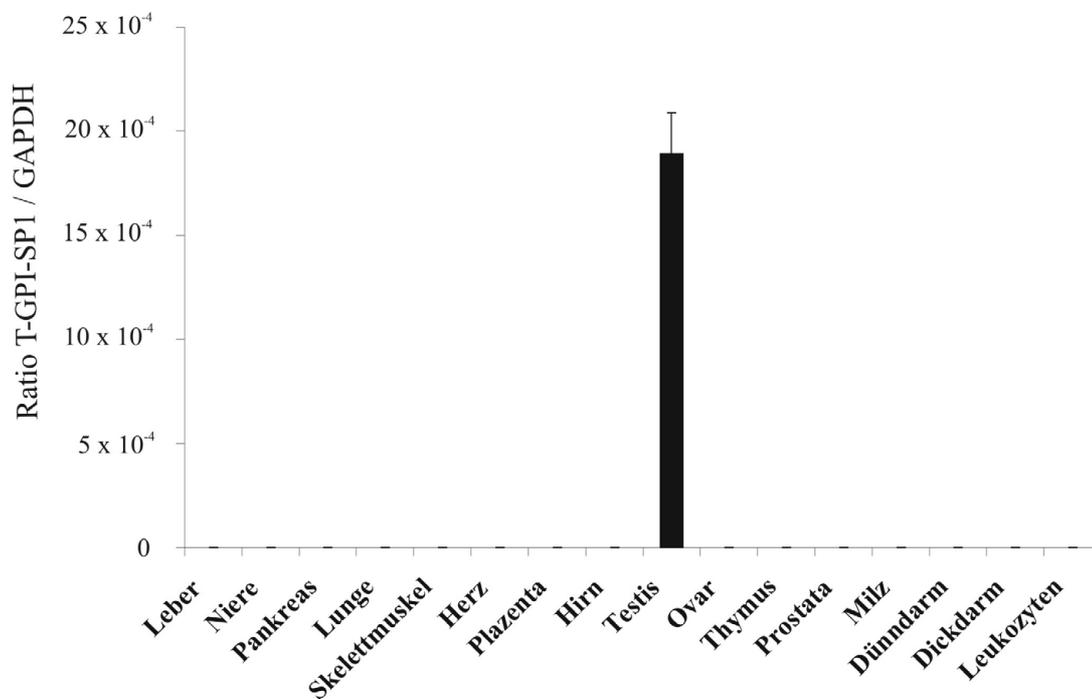


Abbildung D.1 Transkriptanalyse mittels *LightCycler-Technologie* (RT-PCR).

Getestet wurde die cDNA von 16 verschiedenen Geweben. Normiert wurde auf die Anzahl der gemessenen GAPDH-Transkripte.

Um die Frage zu beantworten, ob man T-GPI-SP1-mRNA in weiteren Geweben und insbesondere auch in Tumoren detektieren kann, wurde ein mRNA-Array der Firma Biocat (*Human Tumor/Normal Tissue 2-Array*) auf die Expression von T-GPI-SP1 untersucht. Auf dem Array waren 50 ng mRNA von normalen Geweben und den jeweils korrespondierenden Tumorgeweben gespottet.

Der *Human Tumor/Normal Tissue 2-Array* wurde mit einer T-GPI-SP1-spezifischen Biotin-markierten Sonde (Primer T-GPI-SP1-f-342 und T-GPI-SP1-r-694: siehe C.1.5.6) hybridisiert. Hierfür wurde eine Sonde mittels PCR hergestellt, die in den Bereichen von Exon 2 und Exon 3 bindet und in der der dTTP-Anteil durch 75 % dUTP-Biotin ersetzt war. Wie in Abbildung D.2a in Spur 3 zu sehen ist, hat diese Sonde ein höheres Molekulargewicht als das in Spur 1 aufgetrennte unmarkierte PCR-Produkt (352 bp). Die Sonde, die mit einem 50/50-Verhältnis von dTTP zu dUTP-Biotin generiert wurde (Spur 2), besitzt ein etwas niedrigeres Molekulargewicht als das PCR-Produkt in Spur 3.

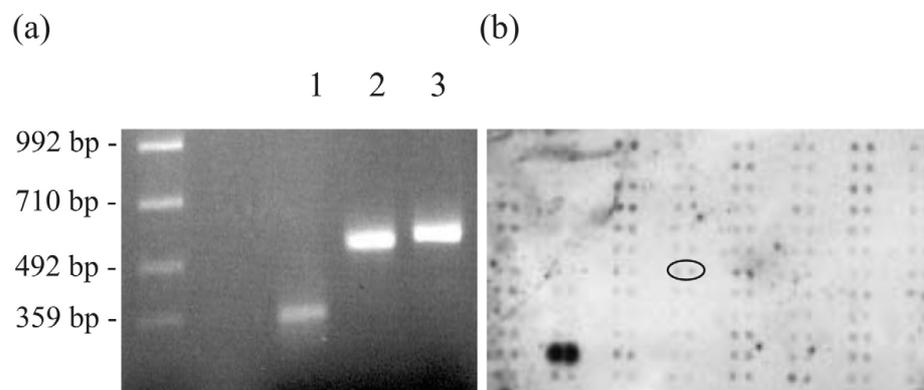


Abbildung D.2 (a) Herstellung der Biotin-markierten T-GPI-SP1-spezifischen Sonde und (b) mRNA-Array

- (a) Spur 1 zeigt die ohne Biotin generierte Sonde, die Länge des PCR-Produkts liegt bei ca. 360 bp. Spur 2 zeigt die Sonde bei einem dTTP/dUTP-Biotin-Verhältnis von 50/50, in Spur 3 ist das PCR-Produkt mit dem Nukleotidverhältnis dTTP/dUTP-Biotin von 25/75 zu sehen.
- (b) mRNA-Array: Die mRNAs aus gesunden Geweben und den korrespondierenden Tumorgeweben wurden nebeneinander auf die Membran aufgetragen. Der Nachweis von T-GPI-SP1-Transkripten erfolgte mit der Sonde, die das Nukleotidverhältnis dTTP/dUTP-Biotin von 25/75 aufwies. Das starke Doppelsignal repräsentiert die mRNA aus männlichem Bindegewebe, die eingekreisten Signale zeigen die mRNA, die aus humanem Hodengewebe gewonnen wurde.

Mit Hilfe des Quantifizierungsprogramms Array Vision 8.0 konnte im Bezug auf die mRNA-Transkripte im Hoden (entsprechend 100 %) eine Aussage der T-GPI-SP1 mRNA-Expression in anderen Geweben getroffen werden. Auf diese Weise konnten vermehrt T-GPI-SP1-Transkripte in verschiedenen Tumorgeweben (Nebennierentumor 196 %, Ösophagustumor 182 %, Bindegewebetumor 163 %, Thymustumor 162 %, Ovarialtumor 160 %, Blasen-tumor 157 % und Brusttumor 142 %) nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde T-GPI-SP1-mRNA in normalen männlichen Geweben wie im Bindegewebe (306 %) und in Schilddrüsengewebe (172 %) detektiert.

Um die Array-Ergebnisse zu verifizieren, wurden einige der T-GPI-SP1-Transkripte mittels der LightCycler-Technologie quantifiziert. Hierfür wurde cDNA der relevanten Gewebe, d.h. von Bindegewebe und Schilddrüsengewebe von einem männlichen und einem weiblichen Spender sowie von Nebennieren-, Ösophagus-, Thymus-, Ovarial- (mäßig differenziertes Papillar-Adenokarzinom) und Brusttumorgewebe von der Firma Biocat erworben und einer quantitativen PCR unterzogen. Die Auswertung ergab, dass lediglich im Schilddrüsengewebe von männlichen Spendern mehr T-GPI-SP1-Transkripte zu finden waren als in den weiblichen Geweben, jedoch war die Menge im Bezug auf die im Hoden detektierte T-GPI-SP1-mRNA etwa um den Faktor 1190 niedriger (Abbildung D.3). Die Anzahl der T-GPI-SP1-Transkripte in männlichem Bindegewebe war um den Faktor 1720 niedriger als im Hodengewebe.

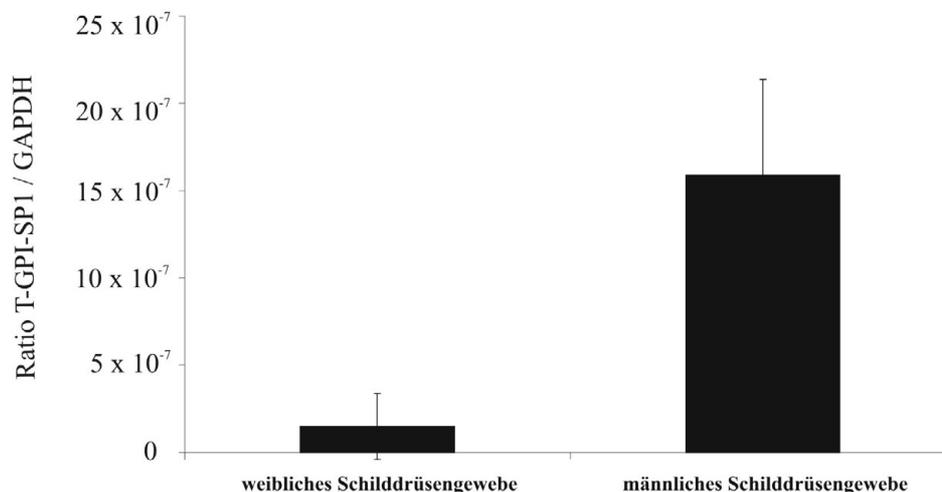


Abbildung D.3 *Quantifizierung der T-GPI-SP1-Expression in weiblichem und männlichem Schilddrüsengewebe.*

Auf der Y-Achse sind die Ratios von T-GPI-SP1 / GAPDH aufgetragen. Die Transkriptmenge, die im humanen männlichen Schilddrüsengewebe gefunden wurden, liegt etwa um den Faktor 1190 niedriger als die Transkriptanzahl im humanen Hoden.

In den Tumorgeweben von Ösophagus, Thymus, Ovar und Blase konnten hingegen keine T-GPI-SP1-Transkripte nachgewiesen werden. Somit war es nicht möglich, die Ergebnisse des mRNA-Arrays mit Hilfe der quantitativen RT-PCR für Tumorgewebe zu bestätigen.

Des Weiteren wurden die Gesamt-RNA von Hodentumorgewebe (mäßig differenziertes Seminoma) und die RNAs verschiedener Tumorzelllinien (Prostatatumorzelllinie PC3, Zervix-Karzinomzelllinie HeLa, Fibrosarkomazelllinie HT 1080, Lungenkarzinomzelllinie LCLC, immortalisierte Keratinozyten HaCat und Magenkarzinomzelllinie HS 746T) in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer RT-PCR auf T-GPI-SP1-Transkripte untersucht. Es konnte weder in dem Seminomagewebe noch in den Tumorzelllinien mRNA von T-GPI-SP1 nachgewiesen werden.

D.1.2 Quantitative Ausprägung der Spleißvarianten von T-GPI-SP1 in humanem Hoden und in Spermien

Um die quantitative Ausprägung der drei Spleißvarianten von T-GPI-SP1 untersuchen zu können, wurden Oligonukleotide so konstruiert, dass eine Unterscheidung aufgrund der verschiedenen 3'-Transkriptenden möglich war. Dazu wurden 400 ng Gesamt-RNA aus gesundem Hodengewebe in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR die Transkriptzahl von T-GPI-SP1 im Triplet quantifiziert. Die Gesamt-T-GPI-SP1-mRNA-Expression wurde dabei als 100 % gesetzt. Wie sich zeigte, betraf mit 99,87 % die überwiegende Mehrheit der T-GPI-SP1-Transkripte die Spleißvariante T-GPI-SP1-1. Nur knapp 0,13 % aller Transkripte konnten der Variante T-GPI-SP1-2 und weniger als 0,0004 % der Variante T-GPI-SP1-3 zugeordnet werden.

Darüber hinaus wurde auch die RNA von humanen Spermien auf das Vorhandensein von T-GPI-SP1-Transkripten untersucht. Hierfür wurden die Spermien mittels eines Percoll-Gradienten aus Seminalplasma gereinigt und aus ihnen RNA isoliert. 455 ng RNA wurden in cDNA umgeschrieben und diese anschließend mit Hilfe der LightCycler-Technologie quantifiziert. Die Gesamtmenge an T-GPI-SP1-Transkripten, die in Spermien detektiert wurde, betrug etwa nur 1/6 der Gesamtmenge in Hodengewebe. Interessanterweise war die Häufigkeit der Transkripte der Spleißvarianten in humanen Spermien der Transkriptverteilung im Hoden sehr ähnlich. So wurden mit 99,22 % wieder überwiegend T-GPI-SP1-1-Transkripte detektiert. Der Anteil der T-GPI-SP1-2 lag bei 0,7 % und der von T-GPI-SP1-3 nur bei 0,08 % aller T-GPI-SP1-Transkripte.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass sich die Expression von T-GPI-SP1-Transkripten nahezu ausschließlich auf gesundes humanes Hodengewebe beschränkt, wobei hauptsächlich die Spleißvariante T-GPI-SP1-1 exprimiert wird. T-GPI-SP1-mRNA kann auch in humanen Spermien detektiert werden. Sehr geringe Transkriptmengen finden sich zudem noch im Schilddrüsengewebe von Männern.

D.2 Expression von T-GPI-SP1-Varianten in *E. coli*

Vorrangiges Ziel der Expression der T-GPI-SP1-Varianten in *E. coli* war die Gewinnung von rekombinantem Protein zur Generierung von T-GPI-SP1-Antikörpern. Da die korrekte Faltung von in *E. coli* rekombinant hergestellten Proteinen oft durch Propeptide erleichtert wird, wurden auch in dieser Arbeit nur die Zymogene der drei T-GPI-SP1-Varianten in *E. coli* exprimiert.

D.2.1 Konstrukte und Vektoren

Für die Klonierung der verschiedenen Spleißvarianten von T-GPI-SP1, deren Transkripte eine Heterogenität am 3'-Ende der jeweiligen mRNAs aufweisen (siehe B.3.2), wurde humane Hoden-cDNA aus dem *Human Multiple Tissue cDNA Panel* der Firma Clontech verwendet. Diese cDNA wurde als Template für die anschließende PCR-Amplifikation der T-GPI-SP1-cDNAs genutzt. Als Oligonukleotide für die unterschiedlichen 3'-Nukleotidenden der drei Spleißvarianten wurden der Forward-Primer *Nae* I T-GPI-SP1 f-55 und die Reverse-Primer *Xho* I T-GPI-SP1-r-altEx6 (für die Varianten T-GPI-SP1-2 und -3) bzw. *Xho* I T-GPI-SP1-r-Ex6 (für die Variante T-GPI-SP1-1) eingesetzt (siehe C.1.5.6). Die über Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigten PCR-Produkte wurden in den pCR2.1-TOPO-Vektor (siehe C.1.5.5) zwischenkloniert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *Nae* I und *Xho* I ausgeschnitten und in den Vektor pENTR11 kloniert.

Der Vektor pENTR11 (siehe C.1.5.5) war zuvor mit dem Restriktionsenzym *Nco* I geschnitten worden, wobei die überhängenden Nukleotide mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt und die gewünschte *Nae* I-Schnittstelle generiert wurden. Im letzten Schritt wurde der Vektor mit *Xho* I verdaut und dephosphoryliert. Nach der Ligation wurden die Konstrukte in den *E. coli*-Stamm Top 10 transformiert. Anschließend erfolgte der Ausstrich der transformierten Bakterien auf Kanamycin-haltigen DYT-Platten. Die Plasmid-DNAs der erhaltenen Klone wurden mittels einer Restriktionsanalyse analysiert und die positiven Klone durch Sequenzierungsanalysen verifiziert. Nun folgte die Rekombination der T-GPI-SP1-Inserts in den Expressionsvektor pET-DEST42 über eine Rekombinasereaktion. Der Expressionsvektor wurde in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert und die Selektion auf Ampicillin-haltigen Platten durchgeführt. Die Charakterisierung der isolierten Plasmid-DNAs geschah durch Restriktionsanalysen. Die korrekte Konstruktion aller für die Expression verwendeten Plasmide wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Die Tabelle D.1 gibt einen Überblick über alle in *E. coli* exprimierten Konstrukte mit deren Modifikationen am C-Terminus mittels eines V5-Epitops und eines His₆-Tags. Das V5-Epitop dient dem Nachweis auf immunhistochemischer Ebene (wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt), der His₆-Tag ist für eine affinitätschromatographische Aufreinigung über die Ni-NTA-Sepharose nötig.

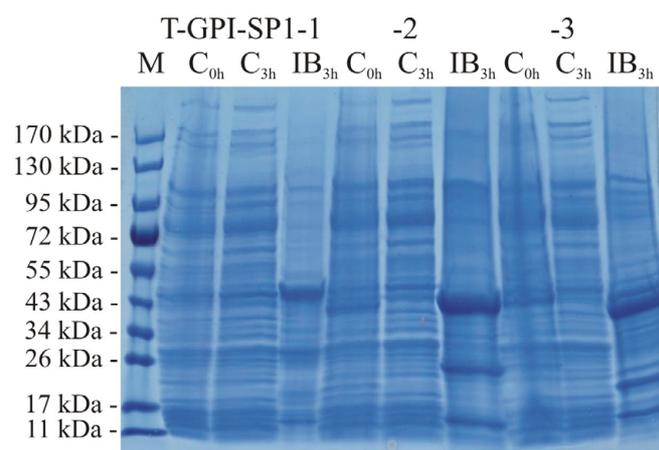
Tabelle D.1 *In E. coli exprimierte T-GPI-SP1-Konstrukte*

Es wurden die drei Spleißvarianten T-GPI-SP1-1, -2 und -3 jeweils mit Propeptid und katalytischer Domäne kloniert. Zusätzlich befindet sich bei allen Isoformen ein V5-Epitop und ein His₆-Tag am C-Terminus der jeweiligen Proteine. Das natürlich vorkommende Signalpeptid wurde deletiert.

Spleißvariante	Propeptid	Transmembrandomäne	V5-Epitop	His ₆ -Tag am C-Terminus
T-GPI-SP1-1	√	√	√	√
T-GPI-SP1-2	√	nicht vorhanden	√	√
T-GPI-SP1-3	√	nicht vorhanden	√	√

D.2.2 Expression und Reinigung

Die Kulturen wurden in Schüttelkolben herangezogen und die Expression mit 1 mM IPTG für 3 Stunden bei 37 °C induziert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mit Hilfe des BugBuster Kits der Firma Novagen aufgeschlossen. Der Versuch, die T-GPI-SP1-Zymogene mittels des pET-DEST42-Expressionssystems im Zytoplasma gelöst zu exprimieren, gelang jedoch nicht, sondern führte zur Bildung der rekombinanten Proteine in sog. Einschlusskörperchen (*Inclusion Bodies*). Diese Einschlusskörperchen wurden in mehreren Waschschriften gereinigt, anschließend in verschiedenen Solubilisierungspuffern unter denaturierenden Bedingungen aufgelöst und über SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung D.4).

**Abbildung D.4** *Expression der rekombinanten T-GPI-SP1-Spleißvarianten in E. coli B21(DE3).*

Die Zellsedimente wurden nach dem Aufschluss der Zellen mittels SDS-PAGE / Coomassie-Färbung analysiert. Aufgetragen wurden die cytoplasmatischen Fraktionen vor und nach der 3-stündigen Induktion (C_{0h} und C_{3h}) der rekombinanten Proteinexpression sowie die nach der Induktion isolierten und gelösten Einschlusskörperchen („Inclusion Bodies“ IB_{3h}).

Die Aufreinigung von T-GPI-SP1-1, T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 erfolgte über den His₆-Tag am C-Terminus mittels Ni-NTA-Sepharose. Nach Lösen der Einschlusskörperchen in 8 M Harnstoff wurden die dadurch freigesetzten rekombinanten Proteine auf die Ni-NTA-Sepharose-Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Bindepuffer gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mittels der Verschiebung von pH 8 in den sauren Bereich von pH 5,9. Die eluierten Proteine wurden in 1 ml-Fractionen gesammelt und mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung sowie Western Blot-Analyse untersucht. In Abbildung D.5 ist exemplarisch die SDS-PAGE von T-GPI-SP1-3 gezeigt.

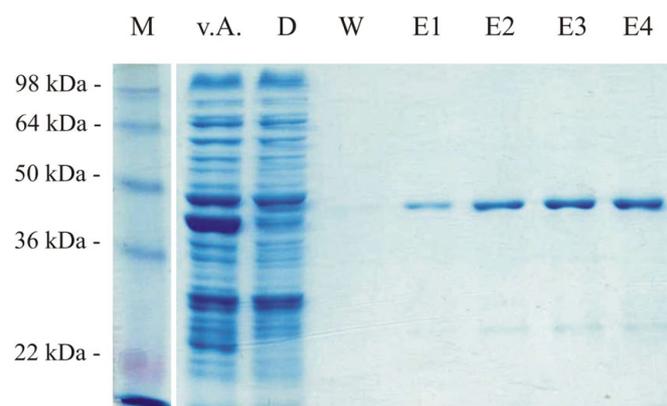


Abbildung D.5 Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanter T-GPI-SP1-3.

Die aufgereinigten Fraktionen wurden nach der Isolierung der Einschlusskörperchen mittels SDS-PAGE / Coomassie-Färbung analysiert. Aufgetragen wurden neben dem Molekularstandard (M) die gelösten Einschlusskörperchen vor der Aufreinigung (v.A.), der Durchlauf (D), eine Waschfraktion (W) und die Elutionsfraktionen (E1-E4).

Das Molekulargewicht von T-GPI-SP1-1 betrug etwa 50 kDa und das von T-GPI-SP1-2 ca. 42 kDa. T-GPI-SP1-3 wies eine molekulare Masse von ca. 45 kDa auf. Des Weiteren konnte eine zweite Bande mit einem Molekulargewicht von 27 kDa bei T-GPI-SP1-1, von 19 kDa bei T-GPI-SP1-2 und von 22 kDa im Falle von T-GPI-SP1-3 detektiert werden. Bei allen Varianten beginnt dieses Fragment mit einem Methionin an Position Met¹⁵³.

Die N-terminale Sequenzierung der drei exprimierten Proteine erbrachte allerdings nicht den korrekten N-Terminus der Spleißvarianten. Vielmehr wurde mit der Aminosäureabfolge MYKKAGFE eine Sequenz detektiert, die nicht dem des Propeptids (MGRPRTL...) von T-GPI-SP1 zugeordnet werden kann, sondern noch eine zusätzliche Verlängerung darstellt.

D.2.3 Rückfaltung

Die Versuche zur Renaturierung in ein lösliches, korrekt gefaltetes Protein wurden mit der Spleißvariante T-GPI-SP1-1 durchgeführt. Hierfür wurden aufgereinigte Einschlusskörperchen gegen 16 verschiedene Puffer dialysiert, und die jeweiligen Rückfaltungsausbeuten über eine Proteinbestimmung ermittelt. Dabei zeigte der Puffer Nr. 3 (mit der Zusammensetzung 55 mM MES, pH 6,5, 10 mM NaCl, 0,5 mM KCl, 0,06 % Polyethylenglycol 3350, 550 mM Guanidinium-Hydrochlorid, 1,1 mM EDTA, 440 mM Saccharose und 550 mM L-Arginin) mit einer Rückfaltungsausbeute von 13,5 % das beste Ergebnis (Tabelle D.2).

Tabelle D.2 Pufferzusammensetzung für die Rückfaltung und Rückfaltungsausbeuten.

Zahlenschlüssel: (1) 55 mM Tris, pH 8,2, (2) 55 mM MES pH 6,5, (3) 260 mM NaCl, 10 mM KCl, (4) 10 mM NaCl, 0,5 mM KCl, (5) 1,1 mM EDTA, (6) 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, (7) 440 mM Saccharose und (8) 550 mM L-Arginin. Puffer Nr. 3 ergab die höchste Rückfaltungsausbeute.

Puffer Nr.	Puffer-grundsubstanz	Salz	PEG 3350	GuHCl	Kation oder Chelator	Polare und nicht-polare Zusätze	Rückfaltungsausbeute in %
1	(1)	(3)	5,5 µM		(5)		4,3
2	(2)	(4)		550 mM	(6)		5,7
3	(2)	(4)	5,5 µM	550 mM	(5)	(7) + (8)	13,5
4	(1)	(3)			(6)	(7) + (8)	11,8
5	(2)	(4)			(6)	(7)	4,5
6	(1)	(4)	5,5 µM	550 mM	(5)	(7)	5,7
7	(1)	(3)		550 mM	(6)	(8)	9,8
8	(2)	(3)	5,5 µM		(5)	(8)	11,8
9	(2)	(3)	5,5 µM	550 mM	(6)	(7)	4,6
10	(1)	(4)			(5)	(7)	5,8
11	(1)	(4)	5,5 µM		(6)	(8)	11,1
12	(2)	(3)		550 mM	(5)	(8)	12
13	(1)	(3)		550 mM	(5)		5,2
14	(2)	(4)	5,5 µM		(6)		4,6
15	(2)	(4)			(5)	(7) + (8)	12,1
16	(1)	(3)	5,5 µM	550 mM	(6)	(7) + (8)	12,3

Eine weitere Rückfaltungsmethode wurde mit allen drei Spleißvarianten in zwei Schritten durchgeführt: Dafür wurden die solubilisierten Einschlusskörperchen zunächst bei 4 °C mit einem 50-fachen Überschuß des Renaturierungspuffer verdünnt. Dieser Puffer enthielt ein Glutathion-Redoxsystem (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5 mM DTT, 0,5 mM Triton X 100, 10 mM Imidazol, 10 mM Glutathion reduziert, 0,5 mM Glutathion oxidiert), das die Bildung der Disulfidbrücken erleichtert. Anschließend wurde die Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Hierbei wurde eine Rückfaltungsausbeute von etwa 14,6 % erzielt.

Hochgerechnet lag die Ausbeute von T-GPI-SP1-1 bei etwa 20 µg, von T-GPI-SP1-2 bei etwa 25 µg und von T-GPI-SP1-3 bei etwa 50 µg pro Liter Kulturvolumen. Im Gegensatz zu der *in vivo*-Situation im Hoden wurde somit die Variante T-GPI-SP1-3 in *E. coli* am höchsten exprimiert.

D.2.4 Prozessierung des N-Terminus mittels Furin und Trypsin

Zur Abspaltung der T-GPI-SP1-fremden N-terminalen Aminosäuresequenz inklusive des Propeptides wurden die gereinigten T-GPI-SP1-Varianten mit den Proteasen Furin und Trypsin inkubiert. Danach sollten die rekombinanten Proteine in einer aktivierten Form vorliegen.

Prozessierung mittels Furin

Furin ist eine Proprotein-prozessierende Serinprotease, die eine Vielzahl an Proproteinen und Prohormonen aktivieren kann (Nakayama 1997). Sie ist im menschlichen Körper ubiquitär vorhanden. Die Erkennungssequenz im zu spaltenden Protein lautet RXXRR und ist entscheidend abhängig von der Präsenz eines Arginins an Position P₁ des Substrates. Für eine effiziente Spaltung sind allerdings noch zwei weitere Arginine notwendig, wobei diese an den Positionen P₂, P₄ und P₆ lokalisiert sein können (Rockwell et al. 2002).

T-GPI-SP1 besitzt vor dem Isoleucin der katalytischen Domäne in der Proregion ein Arginin, was der Position P₁ entspräche. An Position P₄ und P₆ befindet sich ebenfalls die Aminosäure Arginin (Abbildung D.6a). Somit würde diese Sequenz am Übergang des Propeptids zur katalytischen Domäne die Kriterien für eine Spaltung durch Furin exakt erfüllen. Bei der Inkubation mit Furin konnte jedoch keine Prozessierung der T-GPI-SP1-Varianten festgestellt werden. Dies ist in Abbildung D.6b exemplarisch für T-GPI-SP1-1 wiedergegeben.

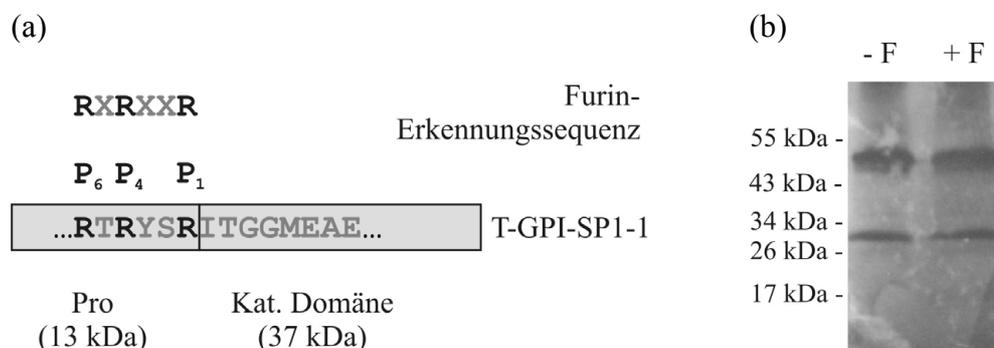


Abbildung D.6 (a) Erkennungssequenz von Furin und schematische Darstellung von T-GPI-SP1.

(b) Western Blot-Analyse der rekombinanten T-GPI-SP1-1 ohne und mit Furin.

- (a) Dargestellt ist in der oberen Reihe die Erkennungssequenz von Furin, die für die Spaltung eines Substrates nötig ist. Die untere Sequenz zeigt die letzten 6 AS des Propeptids (Pro), anschließend beginnt mit dem Isoleucin die katalytische Domäne von T-GPI-SP1. Die Spaltprodukte würden ein Molekulargewicht von ca. 13 kDa und 37 kDa ergeben.
- (b) Rekombinante T-GPI-SP1-1 wurde mit 1U Furin versetzt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Es konnte jedoch keine proteolytische Spaltung von T-GPI-SP1-1 nachgewiesen werden. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Anti-His-Conjugate. - F: ohne Furin, + F: mit Furin.

Prozessierung mittels Trypsin

Trypsin gehört zu den Mitgliedern der S1-Familie der Serinproteasen und spaltet C-terminal Peptide an den Aminosäuren Lysin und Arginin. Somit schien auch Trypsin zur Entfernung des Propeptides mit der N-terminalen Verlängerung der rekombinanten T-GPI-SP1-Varianten geeignet, da die katalytische Domäne von T-GPI-SP1, wie bereits erwähnt, mit dem Motiv ITGG beginnt, wobei vor dem Isoleucin ein Arginin lokalisiert ist (Abbildung D.6a), das von Trypsin erkannt werden könnte.

Um diese Annahme zu bestätigen, wurden das rückgefaltete T-GPI-SP1-1-Protein mit 1 nM Trypsin bei 37 °C für 10 – 180 Minuten inkubiert und die Reaktionsprodukte mittels SDS-PAGE und Western Blot (Abbildung D.7) analysiert. Als Kontrolle diente rekombinantes T-GPI-SP1-1 ohne Trypsin-Zusatz. Wie in Abbildung D.7 mit einem Stern markiert, entspricht eines der Spaltprodukte hinsichtlich seines Laufverhaltens der reifen Form von T-GPI-SP1-1 mit einem Molekulargewicht von 34,9 kDa (31,7 kDa + 3,2 kDa V5-Epitop + His₆-Tag). Ein weiteres Spaltprodukt repräsentiert wahrscheinlich das Propeptid mit der N-terminalen Verlängerung entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 13 kDa (Abbildung D.7, ebenfalls mit einem Stern markiert). Zudem sind noch verschiedene andere Spaltprodukte zu erkennen, da insgesamt 35 putative Trypsin-Schnittstellen in T-GPI-SP1-1 enthalten sind.

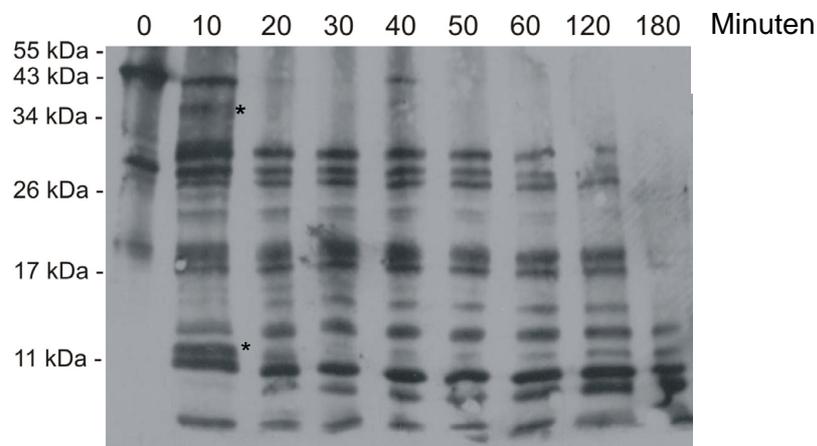


Abbildung D.7 Western Blot-Analyse der Prozessierung des rückgefalteten T-GPI-SP1-1 durch Trypsin.

Die Inkubation wurde für 10 – 180 Minuten mit 1 nM Trypsin durchgeführt [0: Kontrolle ohne Trypsin]. Die Detektion erfolgte mittels des T-GPI-SP1-Antikörpers (siehe D.3). Die mit einem Stern markierten Banden stellen möglicherweise das aktivierte T-GPI-SP1-1 (34,9 kDa) und das Propeptid (ca. 13 kDa) dar.

D.3 Herstellung und Charakterisierung des polyklonalen T-GPI-SP1-Antikörpers

Aufgrund der Tatsache, dass T-GPI-SP1-3 in den größten Mengen rekombinant hergestellt werden konnte, wurde diese Spleißvariante für die Generierung von polyklonalen Antikörpern verwendet. Da die Sequenzidentität der katalytischen Domäne von T-GPI-SP1-3 mit der von T-GPI-SP1-1 ca. 82 % und mit der von T-GPI-SP1-2 ca. 91 % beträgt, konnte davon ausgegangen werden, dass auch diese beiden Varianten von dem zu generierenden Antikörper detektiert würden.

D.3.1 Herstellung des T-GPI-SP1-Antikörpers

Die Herstellung des polyklonalen T-GPI-SP1-Antikörpers gliederte sich in Immunisierung/Boostern zweier Kaninchen, Titerbestimmung und Aufreinigung der IgGs aus Kaninchen-serum. Diese Schritte wurden wie unter C.2.9 beschrieben durchgeführt.

Tabelle D.3 zeigt die ermittelten T-GPI-SP1-Antikörpertiter der beiden Kaninchen vom Zeitpunkt des ersten Boosterns bis hin zur kardialen Entblutung.

Tabelle D.3 *Übersicht über den im ELISA gemessenen Antikörpertiterverlauf nach Immunisierung zweier Kaninchen.*

	1. Boosterung	2. Boosterung	3. Boosterung	Entblutung
Kaninchen 1	1 : 12.800	1 : 12.800	1 : 25.600	1 : 12.800
Kaninchen 2	1 : 102.400	1 : 102.400	1 : 204.800	1 : 204.800

Der Antikörpertiter von Kaninchen 1 blieb bis zur 2. Boosterung konstant, stieg bis zur 3. Boosterung auf 1/25.600 an und war bei der Entblutung wieder auf 1/12.800 abgefallen. Die Werte von Kaninchen 2 blieben ebenfalls bis zur 2. Boosterung konstant bei 1/102.400 und zeigten dann ab der 3. Boosterung bis zur Entblutung einen Anstieg auf 1/204.800.

Auch für die IgG-Fractionen der aus beiden Kaninchen gewonnenen Seren wurden Titerbestimmungen durchgeführt, wobei eine der IgG-Fractionen von Kaninchen 1 den höchsten Titer bei 1/3.200 aufwies, während der Höchstwert in den IgG-Fractionen von Kaninchen 2 bei 1/6.400 lag.

D.3.2 Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung

In einem weiteren Versuchsansatz musste nun evaluiert werden, ob bzw. mit welcher Sensitivität der isolierte Antikörper neben T-GPI-SP1-3 auch die anderen beiden rekombinant in *E. coli* hergestellten Spleißvarianten erkennen kann.

Die ELISA-Analyse zeigte, dass der generierte Antikörper wie erwartet T-GPI-SP1-2 mit einer höheren Sensitivität erkennt als T-GPI-SP1-1 (Tabelle D.4), da wie oben angeführt die Ähnlichkeiten zwischen T-GPI-SP1-3 und T-GPI-SP1-2 größer als zwischen T-GPI-SP1-3 und T-GPI-SP1-1 sind.

Tabelle D.4 *Titerbestimmung zur Charakterisierung des T-GPI-SP1-Antikörpers.*

Der Antikörper erkennt im ELISA T-GPI-SP1-3 und T-GPI-SP1-2 gleich aber T-GPI-SP1-1 weniger gut. Für den Nachweis von T-GPI-SP1-1 wird somit eine höhere Antikörperkonzentration benötigt als für den der beiden anderen Varianten.

Spleißvariante	IgG-Titer	AS-Sequenzidentität
T-GPI-SP1-1	1/3.200	81,9 %
T-GPI-SP1-2	1/6.400	91,4 %
T-GPI-SP1-3	1/6.400	100 %

Zur Untersuchung der Sensitivität des Antikörpers wurde eine Titrationsreihe bezüglich der Menge an eingesetztem rekombinanten Protein und der Menge an Primärantikörper bzw. der an Sekundärantikörper durchgeführt. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass 50 ng rekombinantes T-GPI-SP1-3 noch zu detektieren waren. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Antikörperverdünnung von 1/1.000 erreicht, wobei die Verdünnung des *Horseradish-Peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers bei 1/20.000 lag.

Im Western Blot detektierte der Antikörper ebenfalls alle drei rekombinant in *E. coli* hergestellten Spleißvarianten (Abbildung D.8).

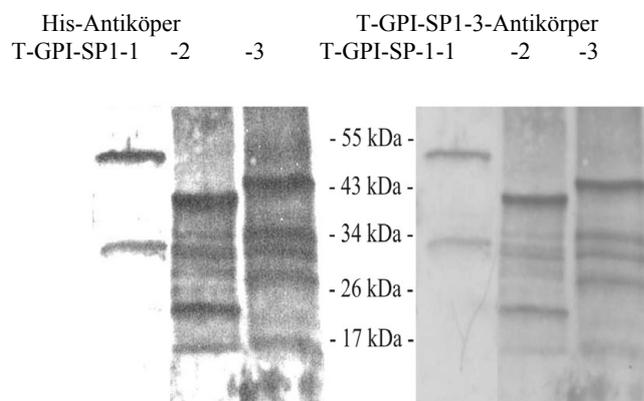


Abbildung D.8 *Western Blot-Analyse zur Charakterisierung des T-GPI-SP1-Antikörpers mit rekombinanter T-GPI-SP1-1, T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3.*

Die Spleißvarianten wurden mit dem Anti-His-Conjugate (His-Antikörper) bzw. mit dem generierten T-GPI-SP1-Antikörper detektiert. Es wurden jeweils etwa 150 ng des rekombinanten T-GPI-SP1-Proteins aufgetragen.

Zur Untersuchung der Spezifität des Antikörpers wurden im ELISA als Kontrollen jeweils humanes männliches und weibliches Serum in einer Verdünnung von 1/100 eingesetzt. Überraschenderweise konnte eine Wechselwirkung des generierten Antikörpers mit den verdünnten Seren nachgewiesen werden. Im Western Blot erkannte er ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa (Abbildung D.9a). Zudem wurden sehr schwache Banden bei ca. 150 kDa und bei ca. 200 kDa nachgewiesen.

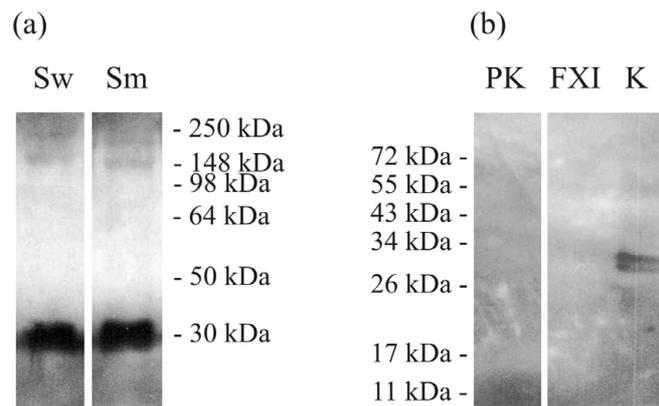


Abbildung D.9 Western Blot-Analysen zur Spezifität des T-GPI-SP1-Antikörpers.

- (a) In Spur Sw wurde eine 1/100-Verdünnung von humanem weiblichen Serum und in Spur Sm eine 1/100-Verdünnung von humanem männlichen Serum aufgetragen. Die Detektion mittels des T-GPI-SP1-Antikörpers zeigte insbesondere eine Kreuzreaktion mit einem unbekanntem Protein von ca. 30 kDa.
- (b) Aufgetragen wurden jeweils 1 μ g Plasmakallikrein (PK) und Faktor XI (FXI). Als Kontrolle (K) diente rekombinante T-GPI-SP1-1 Δ TMD (Konstrukt 8), welche in *Pichia pastoris* hergestellt wurde (siehe Kapitel D.4.1).

Um die Identität des auch in weiblichem Serum detektierten 30 kDa-Proteins zu klären, wurden die Serinproteasen Plasmakallikrein und Faktor XI mittels Western Blot-Analysen getestet. Plasmakallikrein und Faktor XI besitzen mit 42 % und 40 % die höchste Sequenzidentität bezogen auf die katalytische Domäne von T-GPI-SP1-1 (siehe dazu Abbildung E.1). Dennoch konnte im Western Blot keine Bande detektiert werden, die diesen beiden Plasmaproteinen zuzuordnen wäre (Abbildung D.9b). Zudem weisen beide Proteasen ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa auf. Somit bleibt die Identität des 30 kDa-Proteins weiterhin unklar.

D.4 Expression von T-GPI-SP1-1 in *Pichia pastoris*

Da aufgrund der bioinformatischen Analyse (siehe B.3.3) nur T-GPI-SP1-1 alle Merkmale einer funktionellen Protease enthalten sollte, wählten wir diese Variante für weitere biochemische und funktionelle Charakterisierungen. Hierfür mußte allerdings das Expressionssystem gewechselt werden, da die N-terminale Verlängerung der in *E. coli* hergestellten Variante nicht abgespalten werden konnte.

Zunächst wurde das Expressionssystem *Pichia pastoris* gewählt, da mittels dieses Systems bereits andere Chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen wie z.B. PSA oder Plasmakallikrein in löslicher Form exprimiert werden konnten (Habeck et al., 2001 und Tang et al., 2005). Außerdem können Hefen im Gegensatz zu anderen eukaryontischen Expressionssystemen zu hohen Zelldichten fermentiert werden, so dass entsprechend hohe Ausbeuten möglich sind.

Im hier verwendeten System pPICZ α A wird die Expression des Transgens durch Methanol induziert und die Klone, die das Transgen tragen, können durch das Antibiotikum Zeocin selektioniert werden. Das Fremdprotein wird ins Medium ausgeschleust und ermöglicht so eine einfache Reinigung. Des Weiteren sollte das von uns verwendete spezielle Vektorsystem eine Expression von reifen Proteasen und dadurch eine mögliche funktionelle Charakterisierung von T-GPI-SP1-1 erlauben.

D.4.1 Konstrukte und Vektoren

Für die Expression von T-GPI-SP1-1 in *Pichia pastoris* wurden neun verschiedene Konstrukte dieser Spleißvariante designed und kloniert (Abbildung D.10). Dafür wurden die entsprechenden cDNAs in den Expressionsvektor pPICZ α A ligiert. Mittels dieses Vektorsystems wird ein Fusionsprotein mit dem α -Faktor-Signalpeptid generiert und das Fremdprotein in das Medium sezerniert. Dabei wird das Signalpeptid durch die Protease KEX2 abgespalten.

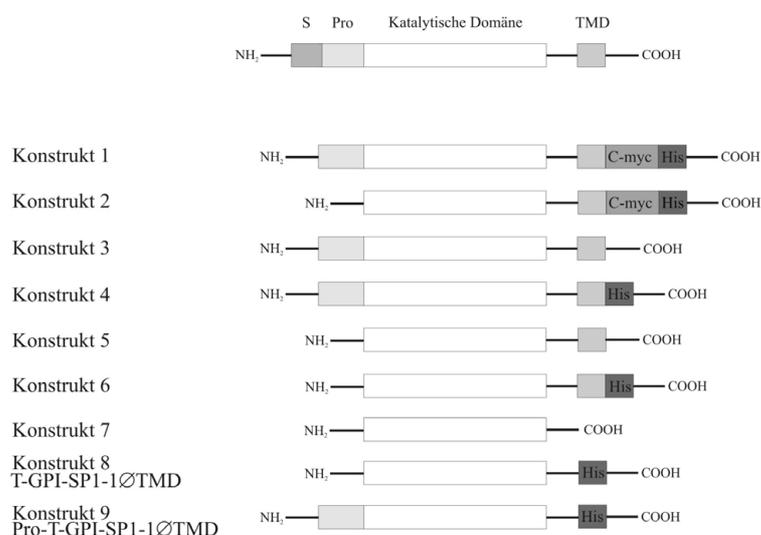


Abbildung D.10 Schematische Darstellung aller für das Expressionssystem *Pichia pastoris* klonierten Konstrukte von T-GPI-SP1-1.

(S) Signalpeptid, (Pro) Propeptid, (TMD) Transmembrandomäne, (c-myc) C-myc-Epitop, (His) His₆-Tag am C-Terminus der Konstrukte. Die Konstrukte 8 und 9 enthalten keine Transmembrandomäne (Δ TMD).

Für die Ligation wurde der Vektor pPICZ α A mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Not* I linearisiert, wobei ein Teil der α -Faktor-Signalsequenz zerstört wurde. Die cDNAs wurden mittels PCR amplifiziert. Über die dabei eingesetzten modifizierten Primer wurden zum einen die für die Klonierung benötigten Schnittstellen eingeführt und zum anderen die α -Faktor Signalsequenz vervollständigt.

Nach Transformation von *E. coli* Top 10 mit den so konstruierten Expressionsplasmiden erfolgte die Selektion und Identifikation von positiven *E. coli*-Klonen mittels Ampicillin-haltiger Medien. Anschließend wurden eine Restriktionsanalyse sowie die DNA-Sequenzierung der ausgewählten Klone durchgeführt.

Abbildung D.11 zeigt exemplarisch die Restriktionsanalyse der Konstrukte 8 und 9 ohne Transmembrandomänen (\emptyset TMD). Der Vektor pPICZ α A weist eine Größe von 3520 bp auf. Das Insert für die kodierende Sequenz von T-GPI-SP1-1 \emptyset TMD (Konstrukt 8) besitzt eine Länge von 821 bp und das von Pro-T-GPI-SP1-1 \emptyset TMD (Konstrukt 9) eine Länge von 1078 bp.

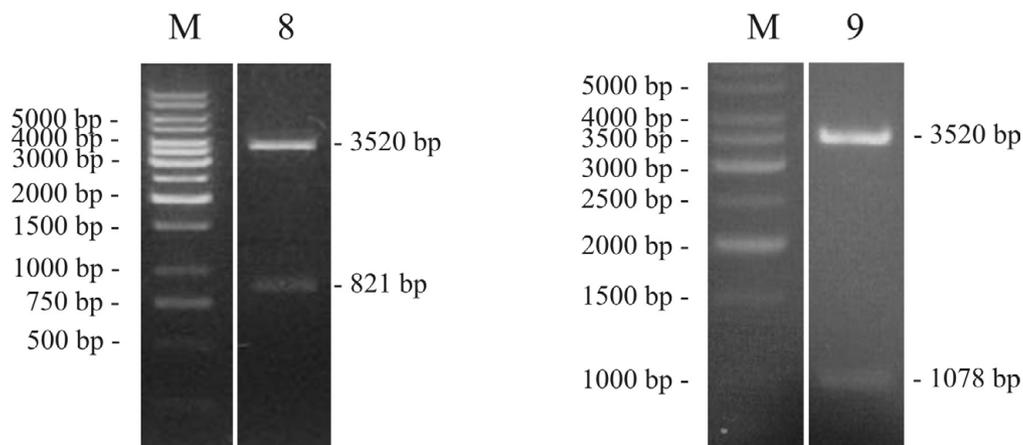


Abbildung D.11 Restriktionsanalyse des Vektors pPICZ α A mit dem Insert für die kodierenden Sequenzen von T-GPI-SP1-1 \emptyset TMD (Konstrukt 8) und Pro-T-GPI-SP1-1 \emptyset TMD (Konstrukt 9).

Die Plasmide wurden mit *Not* I und *Xho* I geschnitten und auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. (M) Standard, (8) T-GPI-SP1-1 \emptyset TMD und (9) Pro-T-GPI-SP1-1 \emptyset TMD.

D.4.2 Transformation von *Pichia pastoris* und Selektion von Klonen

Um stabile Hefeklone zu erzeugen, muß das in *E. coli* hergestellte Fremdgen durch homologe Rekombination in das Hefegenom integriert werden. Dabei ist die Integration mehrerer Kopien des Plasmids möglich, was zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Zeocin sowie einer höheren Expressionsausbeute führen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Hefestamm X33 mit den oben genannten Plasmidkonstrukten transformiert, die zuvor mit *Pme* I linearisiert worden waren. Die Hefezellen wurden auf Zeocin-haltigen (200 µg/ml) YPDS-Platten ausgestrichen und 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Zur Identifikation von Klonen, die das Konstrukt mehrfach integriert hatten, wurden die selektierten Klone weiter untersucht. Hierfür wurden Testexpressionen in BMMH-Medium im 3 ml Maßstab durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Dot Blot-Analyse von 500 µl Medium der verschiedenen Klone. Der Klon, der im Dot Blot die größte Menge an rekombinantem Protein exprimierte, wurde mittels Western Blot-Analyse verifiziert. Hierfür wurde 1 ml Kulturüberstand mit 10 % Trichloressigsäure versetzt. Die ausgefällten Proteine wurden mit Aceton gewaschen, in 20 µl Laemmli-Puffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Mit Ausnahme der Konstrukte 8 und 9 (ohne Transmembrandomänen) konnte keines der anderen rekombinanten Proteine im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Und selbst bei den Konstrukten 8 und 9 verblieb die Mehrheit der gebildeten Proteine innerhalb der Hefezellen.

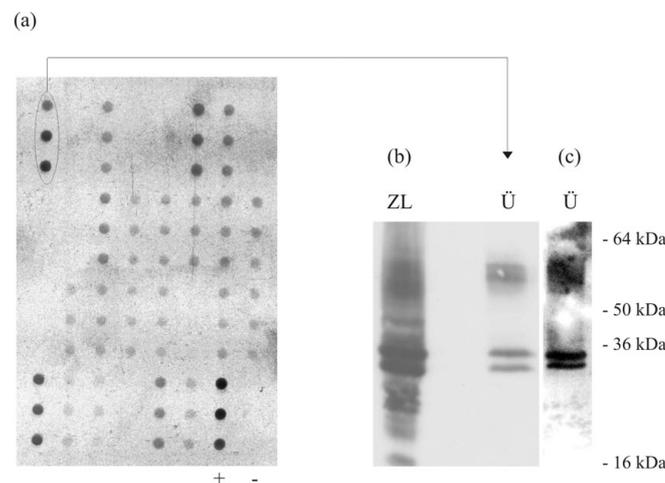


Abbildung D.12 Identifizierung von *T-GPI-SP1-10TMD*-exprimierenden *Pichia pastoris*-Klonen mittels (a) Dot Blot-Analyse sowie (b) und (c) Western Blot-Analyse.

- (a) Dot Blot-Analyse: Der Kulturüberstand wurde im Triplett aufgetragen. Rechts unten befinden sich die Positivkontrollen (+) aus dem Überstand eines Klones, von dem bereits bekannt war, dass er mit His-Tag-markiertes rekombinantes Protein exprimiert sowie die Negativkontrollen (-) aus dem Überstand eines Hefeklons, der mit dem Vektor aber ohne Insert transformiert worden war. Der Klon mit der höchsten Expressionsleistung im Dot Blot wurde im Western Blot weiter analysiert.
- (b) Western Blot-Analyse: In Spur 1 wurde Hefezelllysate (ZL) aufgetragen, Spur 2 zeigt den TCA-gefällten Überstand (Ü). Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Anti-His-Conjugate.
- (c) Western Blot-Analyse des TCA-gefällten Überstandes (Ü) von Konstrukt 8 mit Hilfe des polyklonalen *T-GPI-SP1*-Antikörpers.

Abbildung D.12a zeigt eine Dot Blot-Analyse von Konstrukt 8. Der Klon, der die höchste Expression in diesem Test aufwies, wurde auch im Western Blot (Abbildung D.12b) analysiert. Das vorhergesagte Molekulargewicht beträgt für dieses Konstrukt 30,4 kDa. Die Ergebnisse aus der N-terminalen Aminosäuresequenzierung bestätigten, dass die höhermolekulare Bande exakt dem reifen T-GPI-SP1-1-Protein entspricht, das mit ITGG beginnt. Die untere Bande von Konstrukt 8 stellt ein Spaltprodukt dar, dem laut der Aminosäuresequenzierung N-terminal 21 Aminosäuren fehlen. Der höhermolekulare "Schmier" dürfte einer hyperglykosylierten T-GPI-SP1-1 entsprechen. Abbildung D.12c gibt das Ergebnis einer Western Blot-Analyse wieder, die mittels des von uns generierten T-GPI-SP1-Antikörpers durchgeführt wurde.

D.4.3 Expression im Fernbachkolben und im Fermenter

Für die präparative Expression der sezernierbaren Konstrukte 8 (T-GPI-SP1-1ØTMD) und 9 (Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD) wurden je 500 ml Kulturansatz im 1 Liter-Fernbachkolben verwendet. Zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes wurde die Expression in gepuffertem Minimalmedium (BMMH-Medium) durchgeführt. Dieses Medium erleichtert die Aufreinigung der sezernierten T-GPI-SP1-1-Proteine, da es nur die zum Wachstum der Hefen notwendigen Komponenten ohne zusätzliche Proteine enthält. Ein Aliquot des Kulturmediums wurde täglich abgenommen und der Zeitpunkt ermittelt, der die höchste Expressionsleistung erbrachte. Die Dauer der Expression betrug je nach Konstrukt fünf bis sieben Tage. Die Ausbeuten beliefen sich auf 10 - 30 µg pro Liter.

Die Expression von T-GPI-SP1-1ØTMD (Konstrukt 8) wurde über einen Zeitraum von vier Tagen auch im Fermenter durchgeführt. Die erzielten Ausbeuten waren allerdings geringer als die im Fernbachkolben, wobei jedoch ein direkter Vergleich schwierig war, da nach der Aufreinigung des im Fermenter exprimierten Proteins vornehmlich Degradationsprodukte detektiert wurden. Abbildung D.13 zeigt eine Western Blot-Analyse der TCA-gefällten Zellkulturüberstände an den Tagen 0 bis 4.

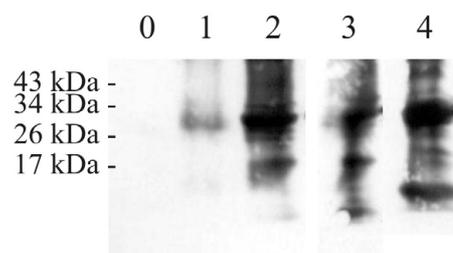


Abbildung D.13 *Rekombinante Expression von T-GPI-SP1-1ØTMD im Fermenter.*

Western Blot-Analyse der Expression von T-GPI-SP1-1ØTMD im Fermenter über den Zeitverlauf von Tag 0 (0) bis Tag 4 (4). Aufgetragen wurden jeweils die TCA-gefällten Fermentationsüberstände. Die Detektion erfolgte mittels des Anti-His-Conjugate.

D.4.4 Reinigung

D.4.4.1 Kationenaustauscher-Chromatographie

Zur Entfernung der Hefezellen wurde der Hefekulturüberstand vor der Kationenaustauscher-Chromatographie zentrifugiert und filtriert. Die erhaltene klare Lösung wurde auf eine MonoS-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit Auftragspuffer wurde das gebundene Protein durch Erhöhung der Salzkonzentration mit einem linearen Gradient von 0 - 1 M NaCl eluiert. Der Durchlauf und die eluierten Fraktionen wurden mittels Western Blot analysiert, da aufgrund der sehr niedrigen Expressionsmengen keine Coomassie-Färbung durchgeführt werden konnte.

Abbildung D.14 zeigt die Aufreinigung von Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD (Konstrukt 8). Obwohl das vorhergesagte Molekulargewicht 33 kDa beträgt, wurde im Western Blot allerdings eine Molekülmasse von etwa 42 kDa detektiert. Die niedermolekularen Signale in den Fraktionen E4 - E6 stellen Degradationsprodukte von Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD dar.

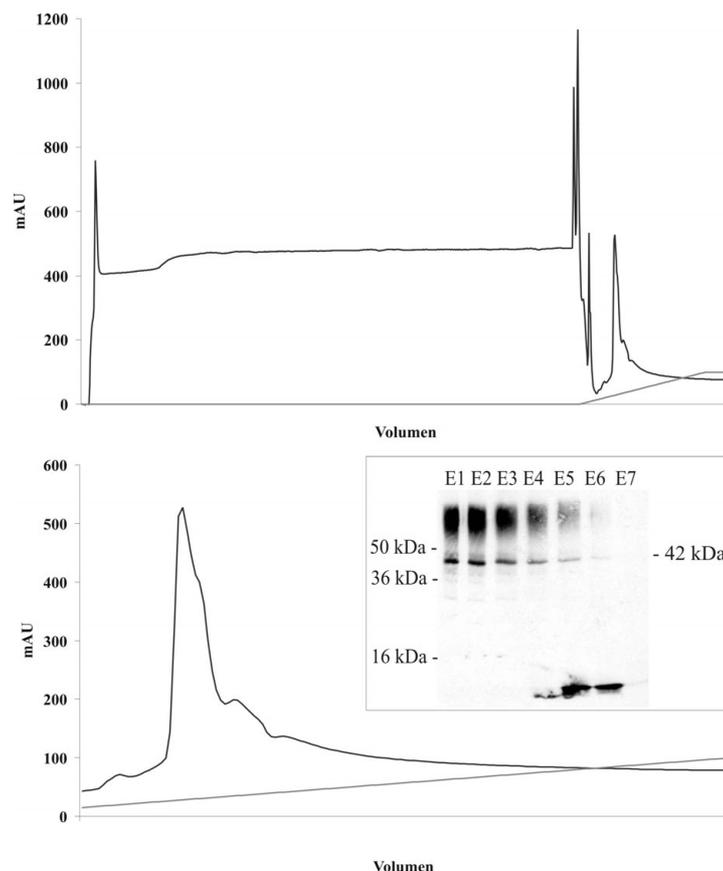


Abbildung D.14 Kationenaustauscher-Chromatogramm und Western Blot-Analyse von Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD (Konstrukt 9) aus *Pichia pastoris*.

Der Verlauf der gesamten Chromatographie ist in dem oberen Diagramm dargestellt. Die Höhe des Elutionspeaks ist im unteren Diagramm vergrößert wiedergegeben und korrespondiert mit der Menge an rekombinantem Protein, das in den entsprechenden Elutionsfraktionen (E1 – E7) gefunden wurde. Die Detektion erfolgte mittels des Anti-His-Conjugate.

D.4.4.1 Affinitätschromatographie

T-GPI-SP1-Proteine mit einem His₆-Tag am C-Terminus wurden mittels Ni-NTA-Sepharose gereinigt. Die Säule wurde mit Bindepuffer äquilibriert und mit dem gegen den Bindepuffer dialysierten Kulturüberstand von *Pichia pastoris* beladen. Anschließend wurde mit Bindepuffer gewaschen und die Elution des an das Säulenmaterial gebundenen Proteins mittels eines hochmolaren Imidazol-haltigen Puffers durchgeführt.

Abbildung D.15 zeigt die Aufreinigung von T-GPI-SP1-1ØTMD (Konstrukt 8), wobei die Elutionsfraktionen E1 - E6 im Western Blot analysiert wurden. Das vorhergesagte Molekulargewicht betrug 30,4 kDa und entsprach auch der detektierten Form.

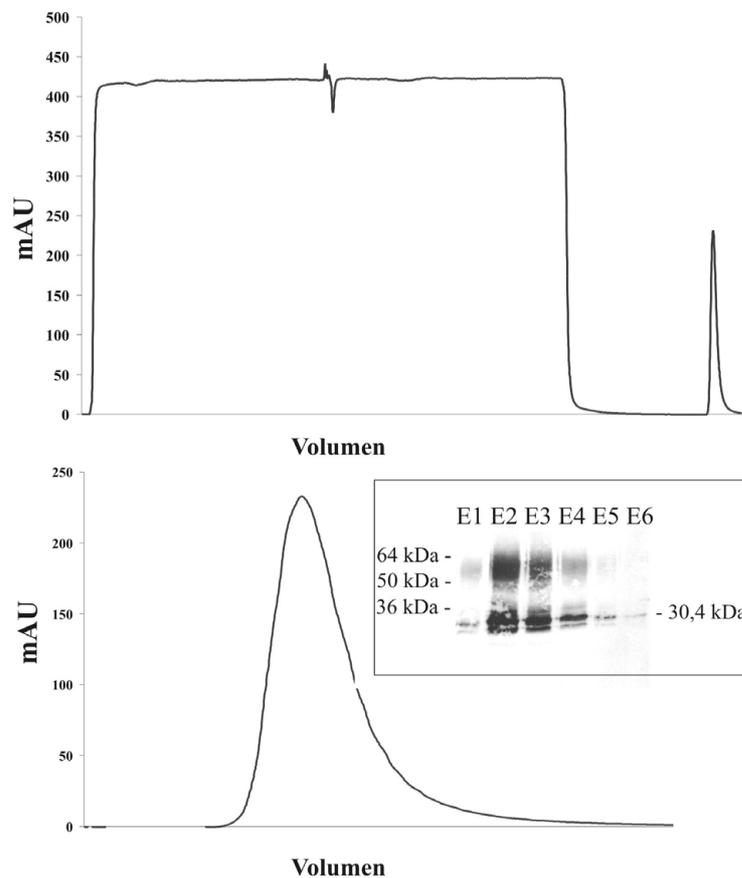


Abbildung D.15 Ni-NTA-Sepharose-Affinitätschromatogramm und Western Blot-Analyse von T-GPI-SP1-1ØTMD (Konstrukt 8) aus *Pichia pastoris*.

Der Verlauf der Chromatographie ist im oberen Diagramm dargestellt. Die Höhe des Elutionspeaks ist vergrößert im unteren Diagramm wiedergegeben und korrespondiert mit der Menge an rekombinamtem Protein, dass in den entsprechenden Elutionsfraktionen (E1-E6) gefunden wurde. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Anti-His-Conjugate.

Die eluierten Proteine wurden in 1 ml-Fractionen gesammelt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sowie Western Blot-Analyse untersucht. In der Regel war die Proteinausbeute so niedrig, dass die Detektion nur im immunologischen Western Blot gelang.

D.5 Expression von T-GPI-SP1-1 in Säugerzellen

Neben der Expression von T-GPI-SP1-1 in der Hefe wurde auch die Expression der Spleißvarianten in der humanen Zelllinie HEK293 durchgeführt. Da es sich hierbei um eines zu den höheren Eukaryonten zählenden Expressionssystem handelt, kann davon ausgegangen werden, dass die rekombinant hergestellten Proteine richtig glykosyliert und korrekt gefaltet werden. Zudem sollte die Menge insbesondere an rekombinanter T-GPI-SP1-1 erhöht werden.

Um zu überprüfen, ob die Sequenz des hydrophoben C-Terminus, der charakteristisch für die Variante T-GPI-SP1-1 ist, möglicherweise für eine Verankerung in der Zellmembran verantwortlich zeichnet, wurden ebenfalls wieder T-GPI-SP1-1-Konstrukte mit und ohne Transmembrandomäne (TMD) generiert. Zudem sollte geklärt werden, inwiefern die subzelluläre Lokalisation der T-GPI-SP1-1-Konstrukte abhängig von der Transmembrandomäne ist. Dies sollte mit Hilfe der fluoreszierenden Proteine EGFP und YFP erfolgen.

D.5.1 HEK293-Systeme, Konstrukte und Vektoren

Die Expression der diversen Konstrukte wurde konstitutiv (HEK293-Zellen) und induzierbar (HEK293 Flp-In-Zellen) durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Vektorsysteme eingesetzt, wobei nur im induzierbaren System eine Integration des Zielgens an einer definierten Stelle im Genom der Wirtszelle erfolgt. Die Integration in herkömmlichen HEK293-Zellen geschieht dagegen zufällig, d.h. randomisiert. Abbildung D.16 zeigt einen Überblick über alle hergestellten Konstrukte für die rekombinante Generierung diverser T-GPI-SP1-Varianten.

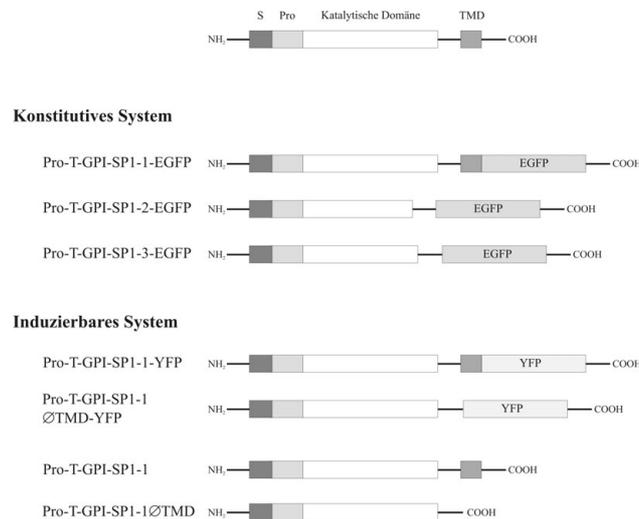


Abbildung D.16 Schematische Darstellung aller für das Expressionssystem HEK293 klonierten Konstrukte von T-GPI-SP1.

Für das konstitutive System wurden die drei Spleißvarianten von T-GPI-SP1 als EGFP-Fusionskonstrukte hergestellt. Im induzierbaren System wurden Konstrukte von T-GPI-SP1-1 transfiziert, die die kodierende Sequenz der Fusionskonstrukte Pro-T-GPI-SP1-1-YFP und Pro-T-GPI-SP1-1∅TMD-YFP sowie die der Konstrukte Pro-T-GPI-SP1-1 und Pro-T-GPI-SP1-1∅TMD beinhalteten. (S) Signalpeptid, (Pro) Propeptid, (TMD) Transmembrandomäne.

D.5.1.1 Plasmidkonstruktion für das konstitutive HEK293-System

Die cDNA der drei Spleißvarianten T-GPI-SP1-1, -2 und -3 wurde in den Expressionsvektor pEGFP-N3 ligiert. Bei der Expression entsteht ein Fusionsprotein mit dem Fluoreszenzprotein EGFP am C-Terminus. Für die Ligation wurde der Vektor pEGFP-N3 mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Not* I linearisiert. Die cDNAs wurden mittels PCR amplifiziert und über die dabei eingesetzten Primer wurden die oben genannten Schnittstellen generiert. Um überhängende Enden zu erzeugen, folgte eine Inkubation mit den beiden Enzymen und anschließend wurde das präparierte PCR-Produkt in den linearisierten Vektor ligiert.

Danach wurde der *E. coli* Stamm Top 10 mit den so konstruierten Expressionsplasmiden transformiert. Die Selektion und Identifikation von positiven Klonen wurde durch die Verwendung von Kanamycin-haltigen Medien bewerkstelligt. Danach schlossen sich Restriktionsanalyse sowie DNA-Sequenzierung an.

D.5.1.2 Plasmidkonstruktion für das induzierbare HEK293 Flp-In-Zellen-System

Der Expressionsvektor pcDNA5/FRT ermöglicht eine gerichtete und somit spezifische Integration eines Vektors in einen transkriptionell aktiven Genomlocus der Säuger-Wirtszelle. Hierfür besitzen die HEK293 Flp-In-Zellen eine singuläre Flp-Rekombinase-Erkennungssequenz (FRT). Bei der Cotransfektion des Expressionsvektors mit einem Flp-Rekombinase-Expressionsvektor erfolgt eine stabile Integration des gewünschten Transgens in das Genom der Zellen. Durch diese Integration in die FRT-Erkennungsstelle wird das ATG-Startcodon für die Hygromycinresistenz generiert.

Der Vektor wurde mit *Hind* III und *Bam*H I geschnitten. Die cDNAs von Pro-T-GPI-SP1-1 mit einem C-terminalen His₆-Tag wurden mit und ohne den kodierenden Bereich für die Transmembrandomäne mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit *Hind* III und *Bam*H I geschnitten und in den linearisierten Vektor ligiert. Danach wurden die Plasmide in XL Gold *E. coli*-Zellen transformiert und auf Ampicillin-haltigen Nährböden selektioniert. Über Restriktionsanalyse und Sequenzierung wurde die korrekte DNA-Sequenz der Klone verifiziert.

Wie in Abbildung D.17a dargestellt, ergab die Restriktionsanalyse der Plasmide ein DNA-Fragment von 5118 bp, das dem linearisierten Vektor entspricht. Zudem wurde in Spur 1 ein Fragment mit 1076 bp detektiert. Dies entspricht der für Pro-T-GPI-SP1-1 kodierenden Sequenz. Die untere Bande in Spur 2 stellt den für Pro-T-GPI-SP1-1ΔTMD kodierenden Bereich dar. Aufgrund der Deletion der TMD handelt es sich hier um eine um 51 bp verkürzte Sequenz mit 1025 bp.

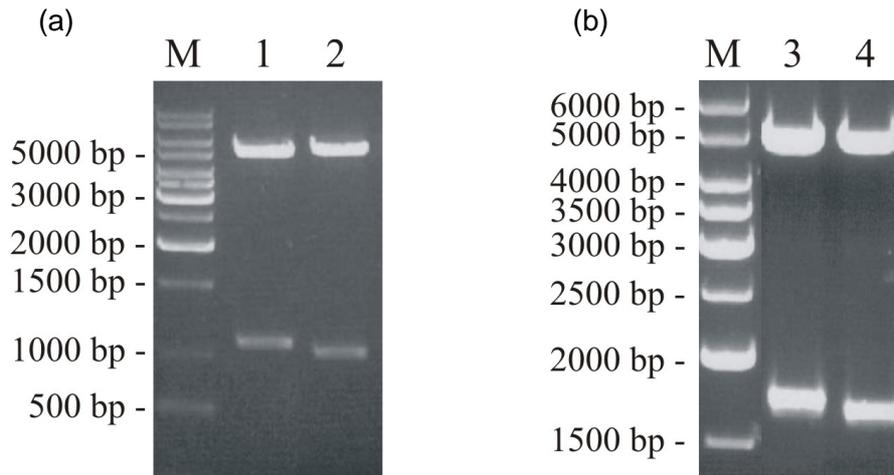


Abbildung D.17 (a) Restriktionsanalyse des Vektors *pcDNA5/FRT* mit dem Insert für die kodierenden Sequenzen von *Pro-T-GPI-SP1-1* und *Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD*

(b) Restriktionsanalyse der Plasmid-Konstrukte für die Fusionsproteine

***Pro-T-GPI-SP1-1-YFP* und *Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD-YFP* im Vektor *pcDNA5/FRT*.**

- (a) Die Plasmide wurden mit *Hind* III und *Bam*H I geschnitten und auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen. (M) Standard, (1) *pcDNA5/FRT* + *Pro-T-GPI-SP1-1*, (2) *pcDNA5/FRT* + *Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD*.
- (b) Die Plasmide wurden mit *Hind* III und *Xho* I geschnitten und die resultierenden DNA-Fragmente mittels eines 1 %igen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt. (M) Marker, (3) *pcDNA5/FRT* + *Pro-T-GPI-SP1-1-YFP*, (4) *pcDNA5/FRT* + *Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD-YFP*.

Für die Herstellung von YFP-Fusionskonstrukten wurde zunächst der kodierende Bereich von *Pro-T-GPI-SP1-1* über die Schnittstellen *Hind* III und *Bam*H I in den Vektor *pcDNA5/FRT* kloniert. Es wurden ebenfalls zwei Konstrukte generiert, nämlich *Pro-T-GPI-SP1-1-YFP* mit TMD und *Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD-YFP* ohne TMD. Die Plasmide wurden im Anschluss daran mit den Restriktionsenzymen *Bam*H I und *Xho* I geschnitten. Die mit den genannten Enzymen präparierte YFP-Sequenz, die uns Herr PD Dr. Alexander Faussner freundlicherweise zur Verfügung stellte, wurde nun in die Plasmide ligiert. Die entstandenen Plasmide wurden in XL Gold *E. coli*-Zellen transformiert und die Selektion erfolgte auf Ampicillin-haltigen Nährböden. Über Restriktionsanalyse und Sequenzierung wurden die positiven Klone verifiziert.

Abbildung D.17b zeigt die Restriktionsanalyse der mit den Enzymen *Hind* III und *Xho* I generierten Plasmide. Die obere Bande in Spur 1 und 2 repräsentiert den Vektor *pcDNA5/FRT* mit 5062 bp. Die untere Bande in Spur 1 entspricht mit 1795 bp der kodierenden Sequenz von *Pro-T-GPI-SP1-1* und YFP, während die untere Bande in Spur 2 mit 1744 bp die kodierende Sequenz von *T-GPI-SP1-1ØTMD* und YFP darstellt.

D.5.2 Transfektion, Selektion und Expression

Für die Herstellung von konstitutiv T-GPI-SP1-exprimierenden HEK293-Zellen wurde der Komplex aus Plasmid-DNA und Lipofectamine 2000 auf die Zellen aufgebracht. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 2-3 Wochen mit 1 mg/ml Geneticin selektioniert. Um möglichst reines rekombinantes Protein zu erhalten, wurden danach die selektionierten Zellen in Serum-freiem DMEM in Kulturflaschen für vier bis fünf Tage im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und weiter analysiert.

Die Generierung von induzierbaren HEK293 Flp-In-Zellen erfolgte durch Cotransfektion der Vektoren pcDNA5/FRT und pOG44. Letzterer beinhaltet die kodierende Sequenz für die Flp-Rekombinase. Somit konnte eine Integration der gewünschten Gensequenz gezielt an einer definierten Stelle im HEK293-Genom erfolgen. Die transfizierten Zellen wurden nach Cotransfektion für 1-2 Wochen mit 100 µg/ml Hygromycin B selektioniert und anschließend für eine weitere Woche mit 100 µg/ml Blasticidin inkubiert. Die Expression der verschiedenen T-GPI-SP1-1-Konstrukte wurde mit Hilfe von 1 µg/ml Tetracyclin induziert und der Zellkulturüberstand nach vier bis fünf Tagen geerntet. Anschließend wurde der Kulturüberstand in Western Blot-Analysen und im Falle der EGFP-Fusionskonstrukte unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

D.5.3 Lokalisationsanalysen der rekombinanten Expression

Im konstitutiven System wurden die EGFP-Fusionskonstrukte (siehe Abbildung D.16) der Spleißvarianten T-GPI-SP1-1, T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 in den Zellen zunächst unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die mikroskopische Analyse ließ jedoch keinen eindeutigen Schluss auf die subzelluläre Lokalisation der drei Varianten zu (Abbildung D.18a).

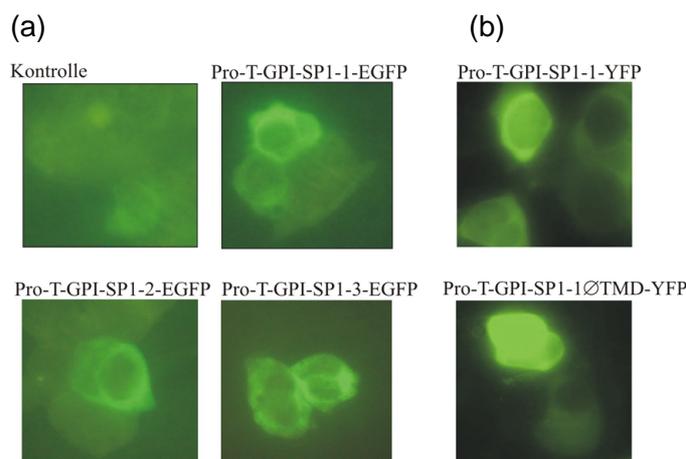


Abbildung D.18 *Subzelluläre Lokalisationsstudie mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops.*
 (a) Analyse der Fusionskonstrukte der drei Spleißvarianten Pro-T-GPI-SP1-1-EGFP, Pro-T-GPI-SP1-2-EGFP und Pro-T-GPI-SP1-3-EGFP.
 (b) Analyse der Fusionskonstrukte Pro-T-GPI-SP1-1-YFP und Pro-T-GPI-SP1-1ΔTMD-YFP.
 Die Vergrößerungen betragen in allen Fällen 100 x.

Im induzierbaren System wurden zwei YFP-Fusionskonstrukte von T-GPI-SP1-1 exprimiert. Hierfür wurde je ein Konstrukt mit (Pro-T-GPI-SP1-1-YFP) bzw. ohne (T-GPI-SP1-1ØTMD-YFP) Transmembrandomäne für die Expression in HEK293 Flp-In-Zellen kloniert. Nach der Induktion wurden nach zwei Tagen fluoreszenzmikroskopische Analysen durchgeführt. Wie bei den Fusionsproteinen mit EGFP konnte auch hier keine genauere Lokalisation in den Zellen festgestellt werden (Abbildung D.18b).

Um die Lokalisation der Varianten immunologisch nachzuweisen, erfolgte eine Isolierung von Membranproteinen und cytosolischen Proteinen. Mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Antikörpers gegen EGFP wurde T-GPI-SP1-1 im Western Blot in der Fraktion der membran- gebundenen Proteine detektiert (Abbildung D.19a), was auf eine Membranverankerung von T-GPI-SP1-1 hindeutet. Das vorhergesagte und tatsächlich detektierte Molekulargewicht des Fusionskonstruktes T-GPI-SP1-1-EGFP beträgt 64 kDa. Ein schwaches Signal konnte auch in der cytosolischen Zellfraktion detektiert werden.

T-GPI-SP1-2-EGFP und T-GPI-SP1-3-EGFP waren hingegen überwiegend in der cytosolischen Fraktion und nur in vergleichbar geringen Mengen in der Membranfraktion zu finden (Abbildung D.19a). Die Molekulargewichte für diese Varianten wurden mit 55,7 kDa und 58,6 kDa berechnet und entsprechend nachgewiesen.

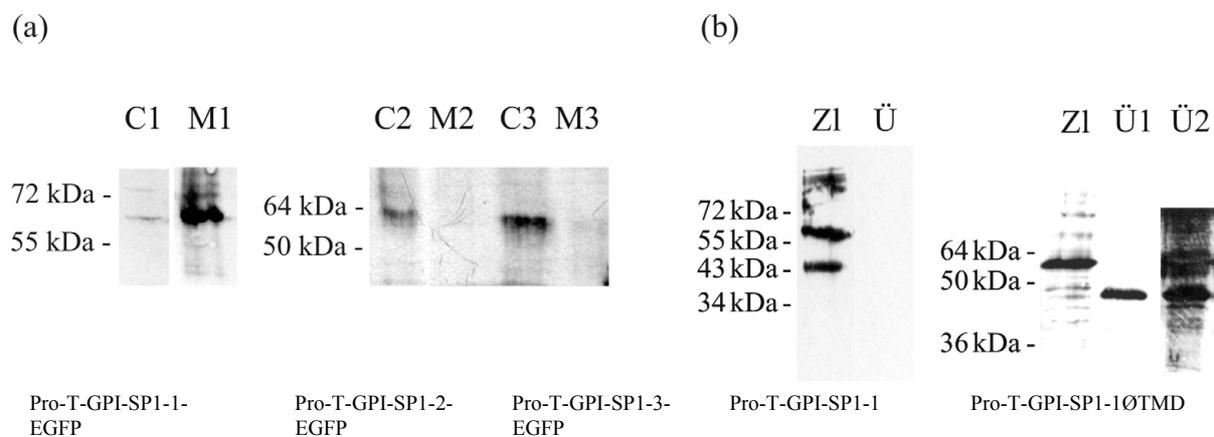


Abbildung D.19 *Rekombinante Expression von T-GPI-SP1-1 in stabil transfizierten HEK293 Flp-In-Zellen und in HEK293-Zellen*

- (a) *Pro-T-GPI-SP1-1-EGFP* wurde in der Membranfraktion (M1), nicht aber im Cytosol (C1) mit Hilfe eines EGFP-Antikörpers detektiert. Mit diesem Antikörper wurden die Konstrukte *Pro-T-GPI-SP1-2-EGFP* und *Pro-T-GPI-SP1-3-EGFP* allerdings vornehmlich im Cytosol (C2 und C3) und nur geringfügig in den isolierten Membranfraktionen (M2 und M3) nachgewiesen.
- (b) *Pro-T-GPI-SP1-1* wurde im Zelllysate (Zl), aber nicht im Zellkulturüberstand (Ü1) detektiert, während *Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD* im Lysate (Zl) und im Überstand (Ü1) gefunden wurde. Der Überstand wurde 4 Tage nach Induktion der Proteinexpression abgenommen und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-His-Conjugate zum Nachweis von His₆-Tag-markierten Proteinen. Ü2 zeigt den selben Zellkulturüberstand, der mit Hilfe des von uns generierten T-GPI-SP1-Antikörpers analysiert wurde.

Für das induzierbare System in HEK293 Flp-In-Zellen wurden zwei T-GPI-SP1-1-Konstrukte hergestellt, die einen His₆-Tag am C-Terminus aufwiesen. Das eine Konstrukt beinhaltete neben der katalytischen Domäne das Propeptid und die Transmembrandomäne und wurde als Pro-T-GPI-SP1-1 bezeichnet. Das andere Konstrukt besaß keine Transmembrandomäne (Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD). Western Blot-Analysen wurden zum Nachweis des His₆-Tags mit dem Anti-His-Conjugate durchgeführt. Hierbei wurde Pro-T-GPI-SP1-1 nur in den Zelllysaten, nicht aber im Zellkulturüberstand detektiert, während Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD sowohl in den Zellen als auch im Überstand nachgewiesen werden konnte (Abbildung D.19b). Der polyclonale T-GPI-SP1-Antikörper erkannte im Western Blot ebenfalls das sezernierte Protein Pro-T-GPI-SP1-1-1ØTMD (Abbildung D.19b, Spur Ü2).

Während das theoretische Molekulargewicht von Pro-T-GPI-SP1-1 allerdings mit 37,8 kDa berechnet wurde, lagen die tatsächlich nachgewiesenen Molekulargewichte bei etwa 60 kDa and 45 kDa. Die Western Blot-Analysen zeigten zudem, dass die rekombinant hergestellte Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD auch bei einem höheren Molekulargewicht zu finden war. Die molekulare Masse bewegte sich im Überstand bei etwa 40 kDa, obwohl das berechnete Molekulargewicht bei 35,8 kDa liegen sollte. Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD wurde auch im Zelllysat gefunden und zeigte hier ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa.

D.5.4 Reinigung einer rekombinanten Form von T-GPI-SP1-1

Das in HEK293 Flp-In-Zellen rekombinant hergestellte Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD war das einzige Protein, das in den Kulturüberstand sezerniert wurde. Somit konnte nur mit dieser Form eine Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Sepharose durchgeführt werden. Das eluierte Protein wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Alle Aufreinigungspuffer enthielten 1 mM Benzamidin. Abbildung D.20 zeigt die entsprechenden Ergebnisse, wobei Zellkulturüberstand vor der Aufreinigung (Ü), der nach dem Auftrag auf die Säule gesammelte Durchlauf (D) und die Elutionsfraktionen 1 und 2 aufgetragen wurden. Das gereinigte Protein war in konzentrierter Form in der Elutionsfraktion 2 zu finden.

Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD

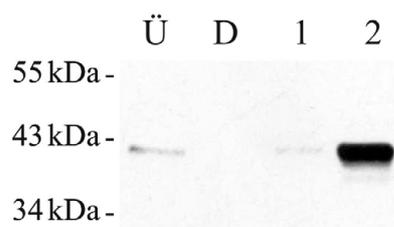


Abbildung D.20 Western Blot-Analyse nach der Aufreinigung von Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Sepharose.

(Ü) Zellkulturüberstand vor der Aufreinigung, (D) Durchlauf und (1) und (2) Elutionsfraktionen.

Die Detektion erfolgte mit dem Anti-His-Conjugate zum Nachweis von His₆-Tag-markierten Proteinen.

D.6 Biochemische Charakterisierung

D.6.1 N-terminale Aminosäuresequenzierung

Alle Sequenzierungen und massenspektroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Reinhard Mentele vom Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) durchgeführt.

Die Spleißvarianten T-GPI-SP1-1, T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 wurden, wie bereits unter D.2 beschrieben (siehe auch Abbildungen D.4 und D.7), in *E. coli* rekombinant hergestellt. Die errechneten Molekulargewichte lagen für T-GPI-SP1-1 bei 40,2 kDa, für T-GPI-SP1-2 bei 31,9 kDa und für T-GPI-SP1-3 bei 34,8 kDa. Tatsächlich fanden sich jedoch um ca. 8 kDa erhöhte Molekulargewichte. Die N-terminale Sequenzierung und die massenspektroskopische Analyse offenbarten eine zusätzliche Aminosäuresequenz am N-Terminus aller Varianten. Es handelt sich dabei um eine Sequenz, die auf eine fehlerhafte Rekombination im Ursprungsvektor zurückzuführen war, und die mit MYKKAGFE beginnt. Die Molekulargewichte lagen daher nach Abschätzungen über Coomassie-gefärbte Gele unter Berücksichtigung der Verlängerung am N-Terminus, des c-myc-Tags und des His-Tags bei etwa 50 kDa (T-GPI-SP1-1) bzw. bei 42 kDa (T-GPI-SP1-2) und bei 45 kDa (T-GPI-SP1-3).

N-terminal wurde auch das Konstrukt 8 (T-GPI-SP1-1ØTMD) sequenziert, das in *Pichia pastoris* rekombinant hergestellt und in das Kulturmedium sezerniert worden war. Dieses Konstrukt (siehe auch Abbildung D.12b und D.12c) zeigte eine Doppelbande: Die obere Bande entspricht der reifen Protease mit dem Motiv ITGG. Bei der unteren Bande handelt es sich um eine Verkürzung von 21 Aminosäuren am N-Terminus.

Alle anderen in den Zellkulturüberstand sezernierten rekombinant generierten T-GPI-SP1-1-Konstrukte konnten aufgrund zu niedriger Proteinmengen und –ausbeuten nicht sequenziert oder massenspektroskopisch identifiziert werden. Der Nachweis erfolgte in diesen Fällen mittels des polyklonalen T-GPI-SP1-Antikörpers bzw. des Anti-His-Conjugate zur Detektion von His₆-Tag-markierten Proteinen.

D.6.2 Glykosylierungsanalysen

Mit dem Computerprogramm NetOGlyc 3.1 (www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc) wurden O-Glykosylierungsstellen für die Aminosäuresequenz von T-GPI-SP1-1 an zwei Threonin-Positionen (Thr²⁵⁷ und Thr³¹³) ermittelt. Für T-GPI-SP1-2 ließen sich keine Glykosylierungsstellen detektieren. Für die Spleißvariante T-GPI-SP1-3 hingegen wurden zwei O-Glykosylierungsstellen festgestellt. Dabei handelt es sich um die Positionen Thr²⁸⁶ und Thr²⁹⁸ (siehe auch Abbildung B.7).

Mit dem Programm NetNGlyc (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc) ließen sich für keine der Spleißvarianten N-Glykosylierungsstellen vorhersagen. Allerdings wurde mit dem Programm PROSITE (www.au.expasy.org/cgi-bin/prosite) eine N-Glykosylierungsstelle zwischen den Positionen Asn²⁴⁰ und Tyr²⁴³ für alle drei Spleißvarianten ermittelt.

Ob T-GPI-SP1 tatsächlich eine N-Glykosylierungsstelle trägt, wurde daher experimentell überprüft. Hierfür wurde rekombinante Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD aus HEK293-Zellen mit der N-Deglykosidase Endo H (Endoglykosidase H) inkubiert und immunologisch untersucht. Es konnte keine N-Glykosylierung festgestellt werden.

Die Zugabe von Tunicamycin zu kultivierten HEK293-Zellen bestätigte ebenfalls die aus dem Endo H-Versuch getroffene Annahme, dass im T-GPI-SP1-Molekül keine N-Glykosylierung vorliegt. Tunicamycin hemmt nämlich die Synthese von Glykoproteinen, bei denen über den Stickstoff Zuckerketten angehängt werden. Für Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD wurde allerdings kein Unterschied im Molekulargewicht im Vergleich zu unbehandelten Zellen gefunden.

D.6.3 Prozessierung des N-Terminus der rekombinanten Pro-T-GPI-SP1-1

Neben den Prozessierungsversuchen, die mit der Spleißvariante T-GPI-SP1-1 aus *E. coli* durchgeführt wurden (siehe D.2.4), erfolgten auch Versuche mit den rekombinanten Formen Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD aus *Pichia pastoris* und aus HEK293-Zellen. Die Inkubation mit Furin erbrachte keine Abspaltung des Propeptides. Ein vergleichbares negatives Ergebnis zeigte sich bereits auch für die rekombinante Proform von T-GPI-SP1-1 aus *E. coli*.

D.6.4 Untersuchungen zur Stabilität der rekombinanten T-GPI-SP1

Stabilität von T-GPI-SP1-1 in physiologischen Puffern

Bezüglich der Stabilität von T-GPI-SP1-1 mussten wir feststellen, dass das rekombinante Protein in physiologischen Puffern sehr instabil ist. Wurde T-GPI-SP1-1ØTMD beispielsweise unter nativen Bedingungen mittels Ni-NTA-Sepharose-Affinitätschromatographie ohne Zusatz von Inhibitoren aufgereinigt, so erhielt man überwiegend niedermolekulare Proteinfragmente von T-GPI-SP1-1 (Abbildung D.21a). Interessanterweise schien die Stabilität von Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD durch die Anwesenheit des Propeptids leicht verbessert, jedoch fanden sich ebenfalls niedermolekulare Spaltprodukte in den Elutionsfraktionen.

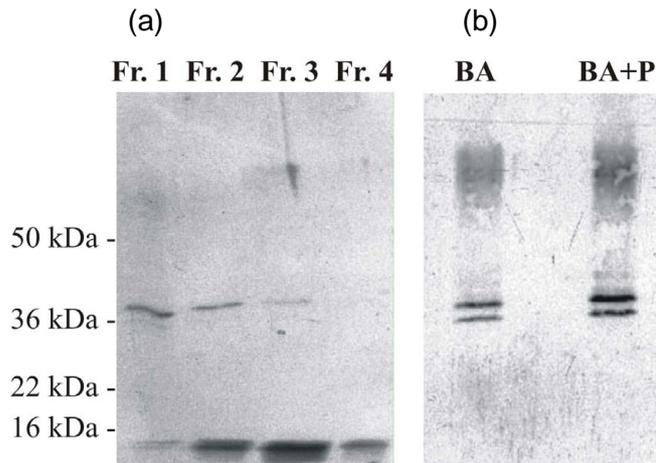


Abbildung D.21 *Western Blot-Analyse der affinitätschromatographischen Aufreinigung des Proteins T-GPI-SP1-10TMD unter nativen Bedingungen ohne und mit Anwendung von Inhibitoren*

- (a) *Aufreinigung ohne die Verwendung von Inhibitoren. Fr. 1-4: Elutionsfraktionen 1-4.*
 (b) *Aufreinigung unter Verwendung des reversiblen Serinprotease-Inhibitors Benzamidin (BA) und des irreversiblen Serinprotease-Inhibitors Pefabloc SC (P).*
 Zur Detektion wurde jeweils das Anti-His-Conjugate verwendet.

Stabilisierung von T-GPI-SP1-1 durch Inhibitoren

Mit Hilfe des reversiblen Inhibitors Benzamidin konnte die Stabilität von T-GPI-SP1-1 erheblich verbessert werden (Abbildung D.21b). So wurde bereits den Hefekulturen während ihrer Wachstums- und Expressionsphase der reversible Inhibitor Benzamidin in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Bei der anschließenden Dialyse des Kulturmediums gegen den Ni-NTA-Säulenauftragspuffer wurde, wie in allen Aufreinigungspuffern, ebenfalls Benzamidin zugegeben.

Eine weitere Verbesserung der Stabilität von T-GPI-SP1-1 konnte mit dem irreversiblen Inhibitor Pefabloc SC in einer Endkonzentration von 1 mM erreicht werden. Dieser Inhibitor wurde zusätzlich zu Benzamidin allen Aufreinigungspuffern zugegeben. Abbildung D.21b zeigt, dass die Zugabe von Benzamidin und Pefabloc SC eine leichte Verbesserung gegenüber der alleinigen Zugabe von Benzamidin hinsichtlich der Proteinmengenausbeute und somit der Degradationsverhinderung erbrachte.

D.7 Funktionelle Charakterisierung

Um auf eine mögliche Funktion von T-GPI-SP1 schließen zu können, wurden verschiedene Aktivitätsmessungen durchgeführt. Aufgrund der bekannten Aminosäuresequenz der drei Spleißvarianten kann angenommen werden, dass möglicherweise nur T-GPI-SP1-1 eine aktive Serinprotease darstellt, da sich ein katalytisches Zentrum nur dieser Variante, nicht aber den Varianten 2 und 3 zuordnen lässt (siehe B.3.3). Aus diesem Grund wurde der Schwerpunkt der Aktivitätsmessungen überwiegend auf die Variante T-GPI-SP1-1 gelegt. Die Messungen erfolgten in einem Spektralphotometer, wobei das Reaktionsvolumen in 96well-Platten jeweils 150 µl betrug. Die Molarität der T-GPI-SP1-Varianten belief sich auf 1,8 nM, die Substratkonzentration lag bei 20 µM. Getestet wurden verschiedene AMC-Substrate der Firma Bachem (siehe Tabelle D.5).

D.7.1 Analyse der proteolytischen Aktivität von rekombinanter T-GPI-SP1 aus *E. coli* und *Pichia pastoris*

Rekombinante Pro-T-GPI-SP1-1, -2 und -3 aus *E. coli* wurden nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung in Elutionspuffer vorgelegt. Alternativ wurde mit reversiblen Inhibitoren aufgereinigte T-GPI-SP1 zur Entfernung der Hemmstoffe gegen PBS dialysiert und anschließend in eine 96well-Platte pipettiert. Zudem wurden die rekombinanten Formen Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD und T-GPI-SP1-1ØTMD aus *Pichia pastoris* gemessen. Die aufgereinigten Fraktionen oder der Kulturüberstand selbst wurden gegen PBS ausgiebig dialysiert und sofort für die Aktivitätsmessung verwendet. In keinem Fall konnte jedoch eine Spaltung der verwendeten Substrate und somit auch kein aktives rekombinantes T-GPI-SP1-Protein detektiert werden (Tabelle D.5).

Tabelle D.5 Übersicht über alle getesteten T-GPI-SP1-Varianten und Substrate.

(-) keine Aktivität nachweisbar; (n.g.) Substrat nicht getestet; (*) Die Substrate wurden auf die Pro-T-GPI-SP1-1-exprimierenden Zellen bzw. in den Zellkulturüberstand gegeben.
(T) 1 nM Trypsin wurde zur Aktivierung zugesetzt.

Substrat	<i>E. coli</i> (Pro-T-GPI-SP1-1, -2, -3)	<i>Pichia pastoris</i> (T-GPI-SP1-1ØTMD, Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD)	HEK293 (Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD, Pro-T-GPI-SP1-1)
Boc-Gly-Arg-Arg-AMC	-	-	- *
Boc-Leu-Lys-Arg-AMC	-	-	- *
Boc-Val-Leu-Lys-Arg-AMC	-	-	- *
Boc-Val-Pro-Lys-Arg-AMC	-	-	- *
HD-Val-Pro-Arg-AMC	-	-	- *
H-Pro-Phe-Arg-AMC	-	-	- *
MeoSuc-Ala-Phe-Lys-AMC	-	-	- *
MeoSuc-Gly-Leu-Phe-Lys-AMC	-	-	- *
Z-Gly-Pro-Arg-AMC	-	-	- * T
Z-Ala-Arg-Arg-AMC	-	-	- * T
Z-Gly-Gly-Arg-Arg-AMC	-	-	- * T
NAc-Phe-Arg-AMC	-	-	-
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC	-	-	- * T
Suc-Ala-Phe-Lys-AMC	-	-	- *
Fluorogenic Substrate II	n. g.	-	-

D.7.2 Aktivitätsmessungen in HEK293-Zellen und Zellkulturüberständen

Um eine mögliche autokatalytische Aktivität zu detektieren, wurden zuerst die Überstände von Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD-exprimierenden HEK293-Zellen vor und nach der Induktion der Proteinexpression gemessen. Es konnte jedoch keine autokatalytische Aktivität festgestellt werden.

Danach wurde eine mögliche proteolytische Aktivität direkt in den Zellen evaluiert. Hierfür wurde in 48well-Platten ausgesäten HEK293 Flp-In-Zellen, die mit dem Konstrukt Pro-T-GPI-SP1-1 transfiziert waren, die Proteinexpression mit Tetrazyklin induziert. Nach zwei Tagen erfolgte die Abnahme des Serum-freien Mediums. Danach wurde auf die mit PBS gewaschenen Zellen die Substratlösung gegeben und eine eventuelle Substratspaltung im Spektralphotometer über einen Zeitraum von 2 Stunden verfolgt.

Zur weiteren Analyse wurde der Serum-freie Überstand von Tetrazyklin-induzierten HEK293 Flp-In-Zellen eingesetzt, da diese Zellen Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD in den Zellkulturüberstand sezernierten. Die Überstände wurden 48 Stunden nach Induktion gegen PBS dialysiert und die Messung von jeweils 100 µl Überstand erfolgte im Spektralphotometer. Auch hier konnte keine Aktivität gezeigt werden (Tabelle D.5)

Aufgrund der Instabilität von T-GPI-SP1 wurde nun ein Versuch konzipiert, der eine Aktivierung von Pro-T-GPI-SP1 und daraufhin eine sofortige Messung der T-GPI-SP1-Aktivität ermöglichen sollte. Hierfür wurden rekombinante Pro-T-GPI-SP1-1, Pro-GPI-SP1-2 und Pro-T-GPI-SP1-3 in Anwesenheit von Trypsin eingesetzt. Durch die Zugabe von 1 nM Trypsin erwarteten wir eine Aktivierung der Proformen und damit einen durch die proteolytische Aktivität bedingten Anstieg der Fluoreszenz nach Spaltung der AMC-Substrate. Wie bereits der Western Blot (siehe Abbildung D.7) zeigte, scheint nämlich eine Prozessierung durch Trypsin durchaus möglich. So konnte schon nach 10 Minuten Inkubationszeit eine Bande von 34,9 kDa dem aktivierten T-GPI-SP1-1 zugeordnet werden (Stern in der Abbildung D.7). Die bei ca. 13 kDa detektierte Bande (ebenfalls in Abbildung D.7 mit einem Stern markiert) stellt möglicherweise das Propeptid dar.

Mit den eingesetzten Substraten Z-Gly-Pro-Arg-AMC, Z-Ala-Arg-Arg-AMC, Z-Gly-Gly-Arg-Arg-AMC und Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC konnte jedoch keine proteolytische Aktivität von T-GPI-SP1-1, T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 festgestellt werden.

D.8 Gewebespezifische Expression des T-GPI-SP1-Proteins

Mit Hilfe des von uns generierten T-GPI-SP1-Antikörpers (siehe D.3) wurde die Lokalisation von nativem T-GPI-SP1 in humanen Hoden- und Nebenhodenpräparaten mittels Immunfluoreszenz untersucht. Des Weiteren wurde menschliches Ejakulat auf das Vorhandensein von T-GPI-SP1 geprüft. Schließlich wurden auch Gewebeschnitte von Ovarialkarzinomen und von einem Prostatakarzinom mittels der Immunfluoreszenzmethode sowie einer chromogenen Nachweismethode evaluiert.

D.8.1 T-GPI-SP1 in humanen Testis- und Epididymispräparaten

Gewebeschnitte von humanem Hoden und Nebenhoden wurden mit dem spezifischen T-GPI-SP1-Antikörper und einem sekundären Kaninchen-IgG-Antikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin markiert und erlaubte somit eine Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die histologische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Andrologen Prof. Dr. W. B. Schill von der Justus-Liebig-Universität in Gießen und Herrn Prof. Dr. Andreas Nerlich, dem Leiter des Pathologischen Institutes des Krankenhauses München-Bogenhausen.

T-GPI-SP1-Protein konnte vornehmlich in den interstitiellen Zellen des humanen Hodens detektiert werden (Abbildung D.22a). Diese Testosteron-produzierenden Zellen werden als Leydigische Zellen bezeichnet und befinden sich außerhalb der Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi*). Aber auch innerhalb dieser Kanälchen waren einzelne T-GPI-SP1-positive Zellen nachweisbar. Es handelt sich dabei um Sertoli Zellen.

Zudem wurde T-GPI-SP1 in den Verbindungsgängen zwischen Hoden und Nebenhoden, den *Ductuli efferentes*, gefunden. Die Epithelzellen dieser Gänge zeigten eine starke Fluoreszenz (Abbildung D.22c).

Vergleichsweise geringe Fluoreszenzintensitäten wurden in den epithelialen Zellen der Nebenhodengänge (Epididymis) gefunden, was auf eine geringe Menge an T-GPI-SP1 im Nebenhoden schließen lässt (Abbildung D.22d).

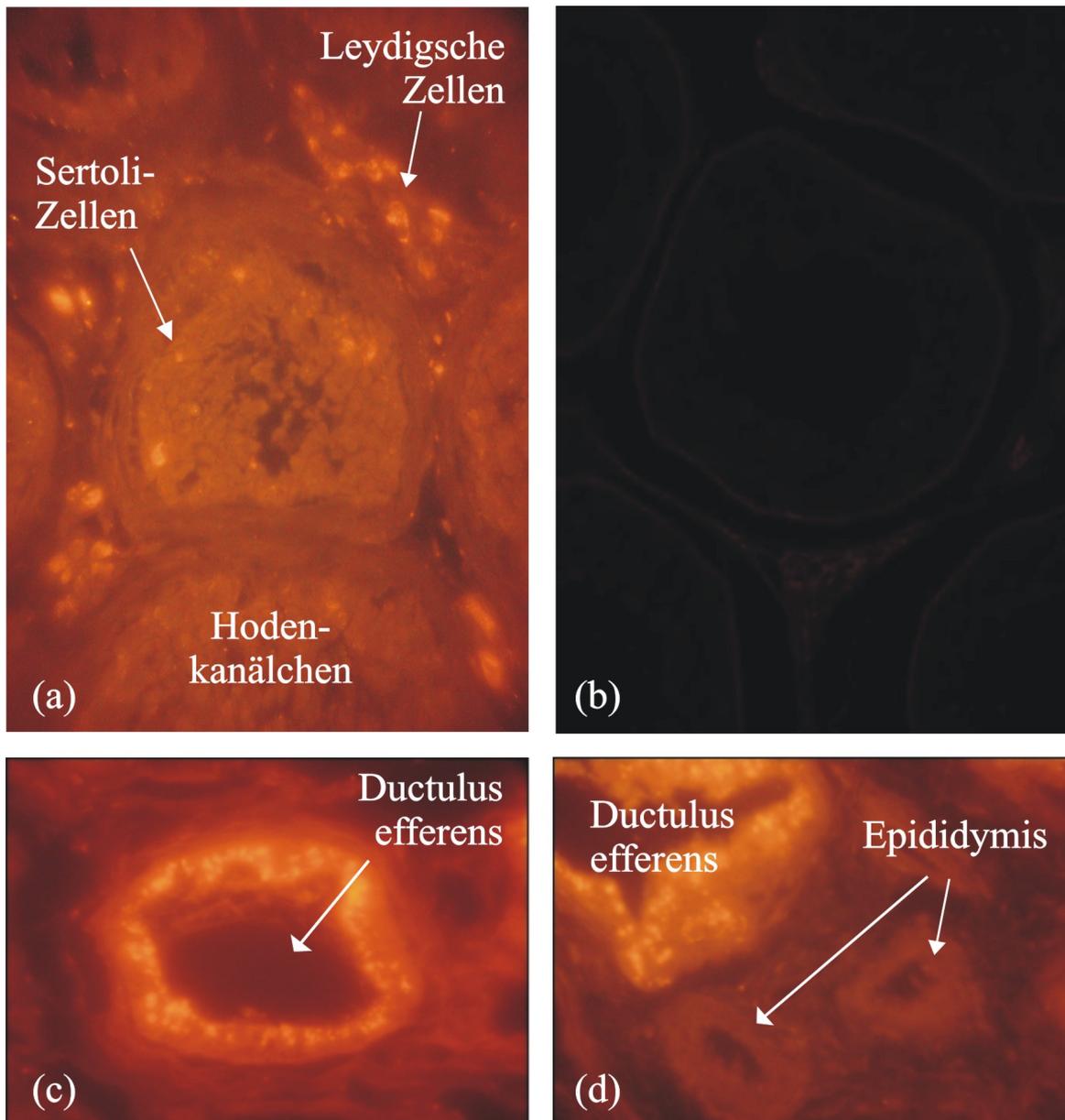


Abbildung D.22 Immunhistologische Analyse von humanen Gewebeschnitten. (a) Hodengewebe (Testis), (b) Kontrolle (c) Ductulus efferens und (d) Nebenhoden (Epididymis) mit einem Ductulus efferens.

- (a) Erkennbar sind die Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi) mit den umliegenden interstitiellen Zellen (Leydigische Zellen), die eine starke Fluoreszenz aufweisen. In den Hodenkanälchen findet sich eine Fluoreszenz von einigen Sertoli Zellen. Die Aufnahme zeigt eine 1000-fache Vergrößerung.
- (b) Hodengewebe ohne die Verwendung des T-GPI-SP1-Antikörpers (Kontrolle).
- (c) Die Epithelzellen der Ductuli efferentes fluoreszieren sehr stark. Die Vergrößerung des Bildes ist 500-fach.
- (d) Eine sehr schwache Fluoreszenz findet man in den epithelialen Zellen der Gänge der Epididymis. Stark fluoreszierende Bereiche wurden erneut in dem Ductulus efferens detektiert. Die Aufnahme ist um den Faktor 500 vergrößert.

D.8.2 T-GPI-SP1 in humanem Ejakulat

Ejakulat besteht aus einem zellulären Teil (Spermien und wenige abgeschilferte Epithelzellen) sowie einem azellulären Teil (Seminalplasma).

Über einen Percoll-Gradienten aufgereinigte Spermien wurden zunächst mit Hilfe des spezifischen T-GPI-SP1-Antikörpers und des Rhodamin-gekoppelten Kaninchen-IgG-Antikörpers unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Mit dieser Methode konnte jedoch kein T-GPI-SP1-Protein auf humanen Spermien nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

Nun wurden nach Zentrifugation des Ejakulats das dadurch gewonnene Seminalplasma und die anschließend lysierten Spermien mittels Western Blot immunologisch untersucht (Abbildung D.23). Der T-GPI-SP1-Antikörper ergab hierbei insbesondere ein starkes Signal bei ca. 150 kDa. Dieses Signal fand sich allerdings nur im Seminalplasma, nicht jedoch im Spermienlysat (Abbildung D.23a). Bei dem für T-GPI-SP1 zu erwartenden Molekulargewicht von ca. 37 kDa war nur ein sehr schwaches Signal erkennbar. Diese äußerst schwache Bande trat ebenfalls nur im Seminalplasma auf und war vor allem erst nach Zugabe eines Proteasen-Inhibitorcocktails zu sehen (Spur +I (*) in Abbildung D.23b).

Ließ man Seminalplasma zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen, so war eine Abnahme der Intensität der weiteren detektierten, aber nicht zuordenbaren Banden zu erkennen (Abbildung D.23b). Interessanterweise konnte durch den Protease-Inhibitor-Cocktail III (PIC III) während der zweistündigen Inkubation diese Degradation verhindert werden.

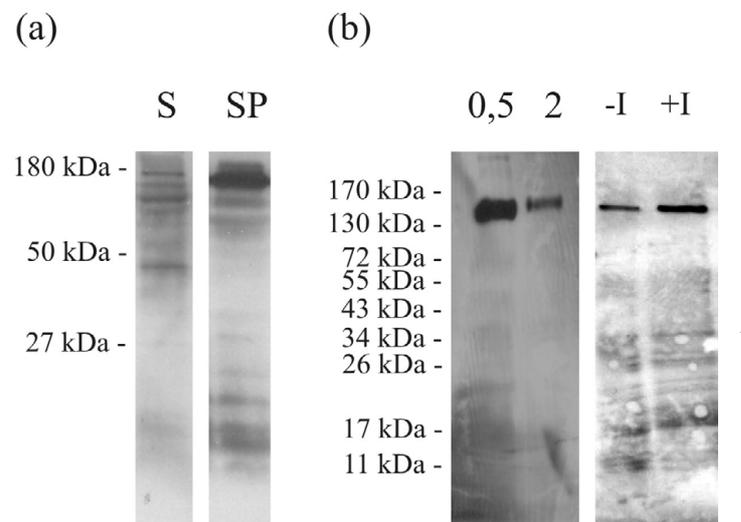


Abbildung D.23 (a) *Western Blot-Analyse von lysierten Spermien und Seminalplasma*
(b) *Western Blot Analyse von Seminalplasma ohne und mit Zugabe des Protease Inhibitor Cocktails III.*

(a) (S) 10 µg Spermienlysat; (SP) 10 µg Seminalplasma

(b) Seminalplasma wurde 0,5 und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch die Zugabe von PIC III (+I) konnte während der zweistündigen Inkubation eine Degradation des detektierten Proteins verhindert werden.

Die Detektion erfolgte mittels des T-GPI-SP1-Antikörpers.

Zur weiteren Charakterisierung des im Seminalplasma detektierten, vermutlichen T-GPI-SP1-Proteins wurden zwei zusätzliche Vorgehensweisen angewandt. So sollte einerseits mit Hilfe verschiedener Immunpräzipitationsmethoden das native Protein aus dem Seminalplasma gefischt werden. Die andere Strategie bestand darin, das Seminalplasma mit rekombinanter T-GPI-SP1-1 zu versetzen (Spiken) und diese dann mittels Western Blot zu detektieren.

Die Immunpräzipitationsversuche wurden nach verschiedenen Protokollen durchgeführt: Zunächst erfolgte eine mögliche Isolierung von T-GPI-SP1 über magnetische MicroBeats der Firma Miltenyi Biotec. Des Weiteren wurde die klassische Immunpräzipitationsmethode verwendet, bei der eine Protein G-Agarose-Matrix mit dem Antigen-Antikörperkomplex ein Präzipitat bildet. Als dritte Methode wurde der *Catch and Release*-Kit der Firma Upstate eingesetzt. Hierbei bindet der Antigen-Antikörperkomplex an ein spezielles Säulenmaterial und ermöglicht somit die Trennung von anderen Proteinen.

Es war jedoch mit keiner der drei Methoden möglich, ein Protein zu isolieren, das der im Western Blot (Abbildung D.23) nachgewiesenen Bande bei ca. 37 kDa entsprach.

Da im oben genannten Western Blot (Abbildung D.23) auch eine Bande bei ca. 150 kDa detektiert wurde, stellte sich die Frage, ob es möglicherweise einen Interaktionspartner gibt, der an T-GPI-SP1 bindet und somit das hohe Molekulargewicht bedingt. Deswegen wurde in einem zweiten strategischen Ansatz Seminalplasma mit rekombinanter T-GPI-SP1-1 aus *E. coli* und *Pichia pastoris* versetzt. Durch dieses Spiken erhofften wir uns das Fischen des Interaktionspartners über das His-Tag-markierte T-GPI-SP1-1-Protein. Nach Aufreinigung des gespikten Seminalplasmas mittels der Ni-NTA-Sepharose-Säule sollte das rekombinante Protein an den Interaktionspartner gebunden in den Elutionsfraktionen zu finden sein.

Da jedoch keine hochmolekularen Signale in den Elutionsfraktionen des mit T-GPI-SP1-1 gespikten Seminalplasmas nachzuweisen waren (ohne Abbildung), war es auch mit dieser Methode nicht möglich, die Identität der Proteinbande mit dem hohen Molekulargewicht im Western Blot zu klären.

D.8.3 T-GPI-SP1 in humanen Ovarial- und Prostatakarzinompräparaten

Gewebeschnitte von 10 humanen Ovarialkarzinomen (4 seriös papilläre, 3 mucinöse und 3 endometroide Karzinome) wurden mittels des T-GPI-SP1-Antikörpers immunhistochemisch analysiert. Als sekundärer Antikörper wurde wie bei der immunhistochemischen Analyse der Hoden- und Nebenhodenpräparate ein Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin markiert war und eine Detektion im Fluoreszenzmikroskop erlaubte. Abbildung D.24 zeigt die Ergebnisse des T-GPI-SP1-Proteinnachweises in den verschiedenen morphologischen Ovarialkarzinom-Typen.

Dabei handelte es sich meist um cytoplasmatische, herdförmig auftretende Färbungen (Abbildung D.24a, b, d und e). Es wurden aber auch Zellen detektiert, bei denen eine membranständige Färbung zu erkennen ist (Abbildung D.24c und f).

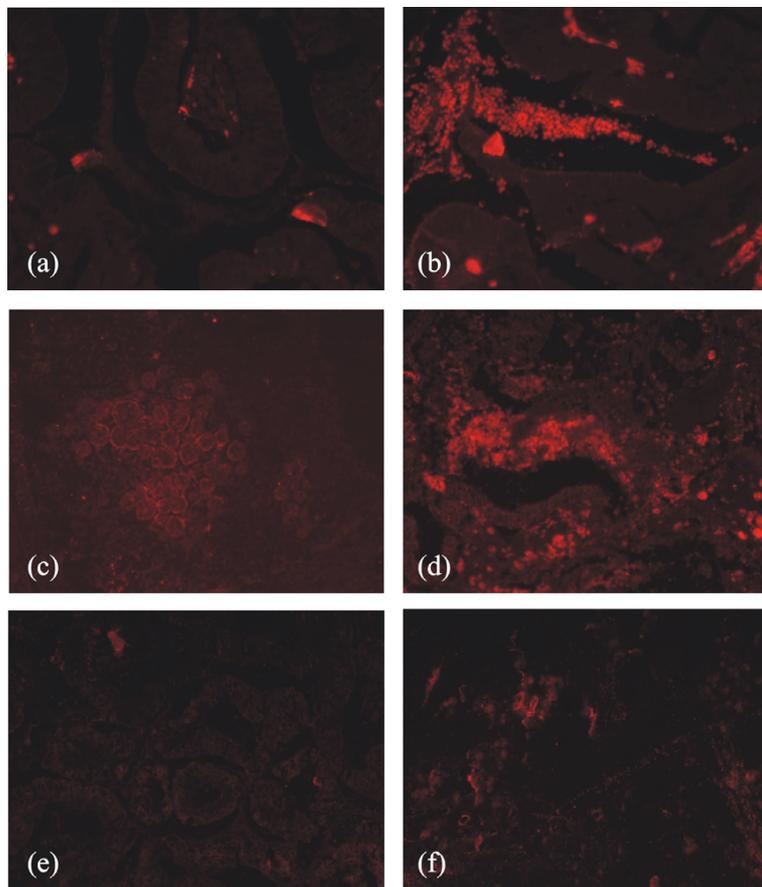


Abbildung D.24 Immunhistologische Analyse von humanen Ovarialkarzinom-Gewebeschnitten.

- (a) Gelegentliche cytoplasmatische Färbung einiger interstitieller Zellen.
- (b) Cytoplasmatische Färbung mit herdförmiger Expression des T-GPI-SP1-Proteins.
- (c) Membranständige Färbung einiger herdförmig T-GPI-SP1-exprimierender Zellen.
- (d) Überwiegend cytoplasmatische Färbung mit einigen herdförmig angeordneten Zellen.
- (e) Diffuse Färbung von Zellen.
- (f) Membranständige Lokalisation von T-GPI-SP1 in einigen Zellen.

Die Aufnahmen D.24a, b, d, e und f sind um den Faktor 100 vergrößert dargestellt.
Die Aufnahme D.24c zeigt eine Vergrößerung um den Faktor 200.

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Andreas Nerlich wurden im Institut für Pathologie des Krankenhauses Bogenhausen/München auch chromogene Färbungen von Hoden-, Ovarial- und Prostatakarzinomschnitten durchgeführt. Ebenso wurde normales Prostatagewebe auf die Expression von T-GPI-SP1-Protein untersucht.

Nach Inkubation der Schnitte mit dem primären T-GPI-SP1-Antikörper erfolgte eine Behandlung der Präparate mit einem Sekundäntikörper, der mit Alkalischer Phosphatase (AP) markiert war. Die Visualisierung wurde über eine Enzym-Substrat-Reaktion eingeleitet, bei der sich ein roter Niederschlag bildet und schließlich eine mikroskopische Auswertung ermöglicht. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Präparate im Gegensatz zur Fluoreszenzmarkierung eine längere Haltbarkeit besitzen, da sie lichtunempfindlich sind.

Die erzielten chromogenen Färbungen bestätigten die Ergebnisse aus den immunhistologischen Fluoreszenz-Untersuchungen. T-GPI-SP1-Protein wurde im Hoden vor allem in den interstitiellen Leydigischen Zellen, aber auch in den Sertoli Zellen gefunden (Abbildung D.25a und b). Die Färbung der Leydigischen Zellen war kräftig, wobei streckenweise neben der cytoplasmatischen auch eine membranständige Färbung zu erkennen war. Nahezu alle Sertoli Zellen waren cytoplasmatisch markiert.

Die Untersuchung von Ovarialkarzinomen verschiedener morphologischer Typen zeigte eine meist cytoplasmatische und nur eine sehr geringe membranständige herdförmige Färbung (Abbildung D.25c – f). Insgesamt gab es jedoch keinen Hinweis darauf, dass nur ein einziger histologischer Typ der Ovarialkarzinome eine Expression des T-GPI-SP1-Proteins aufweist.

Eine überwiegend cytoplasmatische Färbung konnte auch in dem drüsig differenzierten Prostatakarzinom nachgewiesen werden (Abbildung D.25g, h und i). Im normalen Prostatagewebe war hingegen keine Expression des T-GPI-SP1-Proteins zu detektieren (Abbildung D.25j).

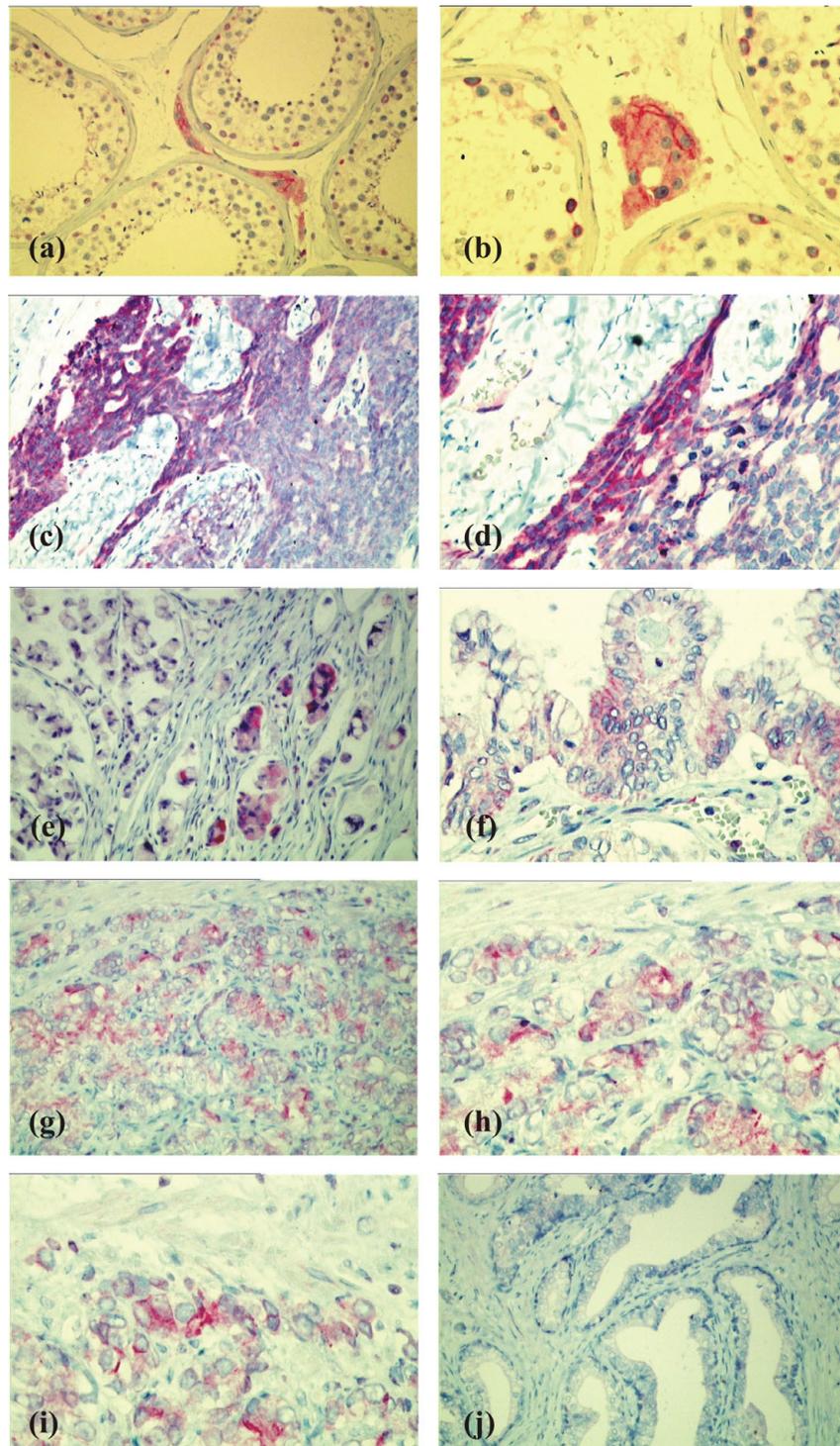


Abbildung D.25 Chromogene Färbung von humanen Hoden-, Ovarial-, Prostatakarzinom- und Prostata-Gewebeschnitten.

(a) Hodengewebe: Kräftige Färbung der interstitiellen Leydigschen Zellen und der Sertoli Zellen.

(b) Hodengewebe (vergrößerte Darstellung): Färbung der Leydigschen Zellen und der Sertoli Zellen.

(c) - (f) Ovarialkarzinomgewebe: Überwiegend herdförmige Färbung einiger Zellen.

(g)- (i) Prostatakarzinomgewebe: Nachweis von T-GPI-SP1 in einigen Zellen.

(j) Prostatagewebe: Keine Expression von T-GPI-SP1-Protein in normalem Gewebe.

Die Aufnahmen D.24a, c, d, g und j sind um den Faktor 100 vergrößert dargestellt.

Die Aufnahmen D.24b, e, f, h und i zeigen eine Vergrößerung um den Faktor 200.

E Diskussion

Ein wichtiges Ziel dieser Promotionsarbeit war es, mit Hilfe geeigneter Methoden grundlegende Beiträge zur Beschreibung des weitgehend unbekanntem Serinprotease-ähnlichen Proteins T-GPI-SP1 zu leisten. Dies sollte unter anderem durch die detaillierte Untersuchung des mRNA-Expressionsprofils in diversen humanen Geweben und die rekombinante Herstellung der Spleißvarianten dieses Proteins in prokaryontischen und eukaryontischen Expressionssystemen erfolgen. Dabei sollten auch polyklonale Antikörper gewonnen werden, um mit deren Hilfe die zelluläre Lokalisation von T-GPI-SP1 auf Proteinebene in verschiedenen humanen Geweben klären zu können. Schließlich wurde von der nachfolgenden biochemischen und enzymatischen Charakterisierung des Proteins erwartet, erste Aufschlüsse über eine mögliche Serinprotease-Funktion von T-GPI-SP1 zu erhalten.

E.1 mRNA-Expressionsprofil von T-GPI-SP1 in verschiedenen humanen Geweben

Zur Überprüfung des Transkriptprofils von T-GPI-SP1 wurden verschiedene humane Gewebe untersucht, wobei die mRNA-Expression insbesondere der Spleißvariante T-GPI-SP1-1 vornehmlich in Hodengewebe gefunden wurde. Eine kleine mRNA-Menge konnte zudem in Schilddrüsengewebe und auch in Bindegewebe von Männern detektiert werden. Tabelle E.1 gibt einen Überblick über unsere Ergebnisse aus den LightCycler-Versuchen zur Spleißvariante T-GPI-SP1-1 im Vergleich zu den im Internet zugänglichen Datenbankinformationen (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer).

Tabelle E.1 *Vergleich der prozentualen Anteile von in humanen Geweben detektierter mRNA der T-GPI-SP1-1 mit den in der Datenbank gefundenen EST-Einträgen zu T-GPI-SP1-1.*

Gewebe	Quantitative RT-PCR-Daten: Transkriptanteil in %	EST-Einträge: Transkripte pro Millionen Transkripte und Transkriptanteil in %
Testis	99,936 %	31 / 86,1 %
Gehirn	0 %	5 / 13,9 %
Schilddrüse	0,06 %	0 / 0 %
Bindegewebe	0,004 %	0 / 0 %

In der Datenbank existieren für T-GPI-SP1 zur Zeit 17 EST-Sequenzen (Tabelle E.2), wovon 11 in Testisgewebe, fünf in Gehirngewebe und einer in einem nicht näher bezeichneten Gewebe gefunden wurden.

Des Weiteren existieren vier mRNA-Einträge zu T-GPI-SP1. Die Accession-Nummer NM_198464 bezieht sich dabei auf T-GPI-SP1-1. Beim Eintrag AY358867 handelt es sich ebenfalls um T-GPI-SP1-1, allerdings mit einer prolongierten 5'-UTR (*untranslated region*).

Die im Gehirn gefundene mRNA BC064412 entspricht einer Isoform der Spleißvariante T-GPI-SP1-1. Bei der mRNA BC033497 ebenfalls aus dem Gehirn handelt es sich um eine Isoform der Spleißvariante T-GPI-SP1-2, deren Sequenz jedoch, wie die von AY358867, durch eine längere 5'-UTR gekennzeichnet ist. Analysen mit Hilfe des Programms SignalP ergaben, dass BC033497 möglicherweise eine im Cytoplasma lösliche T-GPI-SP1-Variante darstellt, die aufgrund ihres Vorkommens in humanem Gehirn anders transkribiert und prozessiert wird. Die Vergleiche anhand der Datenbankeinträge deuten somit darauf hin, dass die Regulationsmechanismen in Gehirn und Hoden unterschiedlich sind.

Tabelle E.2 mRNA- und EST-Einträge zu T-GPI-SP1 (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene).

mRNA-Eintrag	Gewebe
NM_198464 (T-GPI-SP1-1)	Testis
AY358867 (T-GPI-SP1-1)	nicht beschrieben
BC064412 (T-GPI-SP1-1)	Gehirn
BC033497 (T-GPI-SP1-2)	Gehirn

EST-Eintrag	Gewebe
BX088912	Testis
AI214832	Testis
BX492850	nicht charakterisiertes Gewebe
DB048901	Testis
DB338418	Testis
DB517086	Testis
DB517181	Testis
DB451695	Testis
DB636365	Gehirn
DB677876	Testis
BI520214	Testis
BI520845	Gehirn
BI830920	Gehirn
BM908101	Gehirn
AA397833	Testis
AA781356	Testis

Im Gegensatz zu den originalen Spleißvarianten T-GPI-SP1-1 und T-GPI-SP1-2 konnten die Isoformen im Gehirngewebe in unseren LightCycler-Versuchen nicht detektiert werden, obwohl die für die Amplifikation verwendeten Primer im Bereich des Exon 3 binden und somit diese erfassen müssten. Möglicherweise ließen sich auch aufgrund der sehr niedrigen Transkriptmengen im Gehirn diese Varianten nicht in unserer quantitativen RT-PCR nachweisen.

Im Schilddrüsen- und Bindegewebe von Männern gelang es uns erstmals, sehr geringe Mengen an T-GPI-SP1-mRNA zu detektieren. Für diese Gewebe sind bis dato noch keine T-GPI-SP1-Einträge verzeichnet.

Die von uns mit der Array-Technologie erhaltenen Ergebnisse, welche eine mehr universelle Expression suggerieren, konnten mit der wesentlich sensitiveren LightCycler-Methode nicht verifiziert werden. So dürfte das starke Array-Signal, das für die mRNA von Bindegewebe gefunden wurde, möglicherweise einen Artefakt darstellen. Abgesehen davon kann eine gute Übereinstimmung der experimentell erhobenen mRNA-Daten mit den EST-Datenbankeinträgen in sofern festgestellt werden, als T-GPI-SP1-Transkripte hauptsächlich in humanem Hodengewebe zu finden sind.

Zudem konnten Aussagen über die quantitative Ausprägung der drei Spleißvarianten von T-GPI-SP1 in humanem Hodengewebe getroffen werden. T-GPI-SP1-1 zeigt dabei die höchsten Transkriptmengen, während T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 in wesentlich geringem Maße exprimiert werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nur die dominierende Variante T-GPI-SP1-1 eine physiologische Rolle im Hoden spielt. Da es in T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 in der katalytischen Domäne keine homologen Bereiche bezüglich des aktiven Serins gibt, ist es auch sehr wahrscheinlich, dass T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 keine proteolytische Aktivität und somit möglicherweise keine essentielle Bedeutung im menschlichen Hoden haben.

Nach der Aufreinigung von Spermien konnten nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese auch T-GPI-SP1-Transkripte in diesen Zellen nachgewiesen werden. Da sich jedoch mittels Immunfluoreszenz keine entsprechende Protein-Expression auf Spermien detektieren ließ, dürfte es sich bei mRNA-Transkripten eventuell um eine Verunreinigung aus abgeschilferten Epithelzellen des männlichen Genitaltrakts handeln, die bei der Reinigung der Spermien über einen Percoll-Gradienten nicht abgetrennt wurden.

Vor dem Hintergrund, dass eine Reihe von Serinproteasen, wie etwa die Gewebekallikrein-ähnlichen Peptidasen KLK 2, 5, 9, 10, 11, 13 und 15 im Hoden exprimiert und durch Hormone (v.a. Androgene und Progesteron) reguliert werden (Yousef and Diamandis 2001, 2003a, 2003b), stellte sich nun die Frage, ob auch T-GPI-SP1 einer Hormonregulation unterliegen könnte. Deshalb wurde eine *in silico*-Analyse eines 2 kb Sequenzabschnittes stromaufwärts vom Transkriptionsstart vorgenommen (nicht im Ergebnis-Teil beschrieben!). Mit Hilfe des Computerprogramms MatInspector (www.genomatix.de) konnten wir 719 bp vor dem Transkriptionsstart des T-GPI-SP1-Gens eine Bindungsstelle für den Progesteronrezeptor (TAagtcaTGTTCT) identifizieren. Eine mögliche Bindungsstelle für den Androgenrezeptor (GGttCActcTCTTCT) wurde 1642 bp vor dem Transkriptionsstart ermittelt. Der Progesteronrezeptor gehört ebenso wie der Androgenrezeptor zur Superfamilie der Steroidrezeptoren, die identische DNA „response element“-Bindestellen erkennen (Shaffer et al. 2004).

Aufgrund der oftmals vermehrten Hormonexpression in Tumorgeweben erschien uns auch eine Hormon/Tumor-abhängige Expression von T-GPI-SP1-mRNA denkbar, weshalb Gewebe eines humanen Hodentumors (mäßig differenziertes Seminoma) und auch anderer Karzinome evaluiert wurden. Dabei waren allerdings keine spezifischen mRNA-Moleküle zu detektieren, wiewohl sich in einigen Fällen durchaus T-GPI-SP1-Protein nachweisen ließ (siehe hierzu E. 4).

E.2 Rekombinante Expression von humaner T-GPI-SP1

E.2.1 Expression in *E. coli* zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern

Die Herstellung von T-GPI-SP1 und ihrer Spleißvarianten in *E. coli* diente vornehmlich der Generierung von T-GPI-SP1-Antikörpern. Obwohl die rekombinante Expression in *E. coli* durchaus erfolgreich war, wurden die Varianten jedoch als unlösliche Proteine in Einschlusskörperchen exprimiert, weshalb diese mittels verschiedener Denaturierungspuffer solubilisiert wurden. Nach der Rückfaltung im Glutathion-haltigen Puffer betrug die Ausbeuten für T-GPI-SP1-1 etwa 20 µg, für T-GPI-SP1-2 etwa 25 µg und für T-GPI-SP1-3 etwa 50 µg pro Liter, was einer Wiedergewinnung von knapp 15 % entspricht. Dieser Wert liegt etwa in dem Bereich von 15-25 %, der bei der Rückfaltung von vielen anderen rekombinanten Proteinen wie z. B. dem Gewebefibrinogen-Aktivator (tPA) aus Einschlusskörperchen erzielt wurde (Singh & Panda 2005, Datar et al. 1993).

Überraschenderweise zeigten die in *E. coli* hergestellten rekombinanten Proteine nicht den korrekten N-Terminus. So wurde mittels N-terminaler Aminosäuresequenzierung eine Verlängerung festgestellt, die ihren Ursprung weder im T-GPI-SP1-Protein selbst, noch in dem Expressionsvektor hatte. Die Sequenz findet sich vielmehr im Ursprungsvektor pENTR11 und liegt in der Rekombinierungsstelle im attL1-Bereich. Somit scheinen Teile des Ursprungsvektors während der Rekombination in den Zielvektor integriert worden zu sein. Die Vektorbereiche der N-terminalen Verlängerung von T-GPI-SP1-Proteinen ähneln keinen humanen Proteinen, was zumindest auf die fehlerhafte Rekombination für die ersten 15 Aminosäuren zutrifft. So bestanden auch keine Bedenken, die Variante T-GPI-SP1-3 für die Generierung von Antikörpern einzusetzen (siehe E.2.2).

Diese Verlängerung mitsamt des Propeptids konnte mittels der Proteasen Furin und Trypsin *in vitro* nicht abgespalten werden, was im Gegensatz zur Aktivierbarkeit der Plasmaproteasen Profaktor IX und Profaktor X steht (Wasley et al. 1993, Wallin et al. 1994). Dennoch mag sich die Situation *in vivo* möglicherweise anders darstellen. Gerade die Vorhersage der Erkennungssequenz RXRXXR für die ubiquitär vorkommende Protease Furin (Rockwell et al. 2002) passt auffallend gut zu dem Bereich des Propeptids von T-GPI-SP1, das vor dem Isoleucin der katalytischen Domäne liegt. Eine Ursache für die fehlende Prozessierung durch Furin könnte beispielsweise in der nicht korrekt erfolgten Rückfaltung der rekombinanten Proteine liegen, wobei eine veränderte dreidimensionale Struktur die Erreichbarkeit des zu spaltenden Proteinabschnittes für Furin erschweren könnte. Ähnliche Gegebenheiten gelten wohl auch für die Versuche, bei denen T-GPI-SP1 mit Trypsin inkubiert wurde. Ein möglicher Hinweis auf falsch gefaltetes rekombinantes T-GPI-SP1 zeigt Abbildung D.7, wo bereits nach 20 Minuten eventuell aktiviertes T-GPI-SP1 von Trypsin mehrmals gespalten und degradiert worden ist. Bei richtig gefalteten Proteinen ist der proteolytische Angriff von Trypsin erschwert, die Degradation dauert wesentlich länger.

Bei der Expression von T-GPI-SP1-1, T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 wurde auch ein Spaltprodukt detektiert, das anhand der N-terminalen Sequenzierung den rekombinanten Proteinen zugeordnet werden konnte. Es beginnt bei allen drei Spleißvarianten mit MDMDIALL und stellt möglicherweise ein durch eine *E. coli*-spezifische Protease erzeugtes Produkt dar. Denkbar wäre aufgrund des Methionins auch eine mögliche Initiationsstelle für die Translation. Da davon ausgegangen werden kann, dass aufgrund dieses alternativen Translationsstarts etwa 12 % der humanen mRNAs für N-terminal verkürzte Varianten kodieren (Kochetov et al. 2005), könnte dies auch für T-GPI-SP1 gelten.

Die relativ geringe Proteinausbeute könnte eventuell durch die Notwendigkeit von in *E. coli* seltenen tRNAs (Kane 1995) für die Expression von T-GPI-SP1 begründet sein. Es gibt in vielen Organismen bestimmte Codons, die für die jeweiligen organismenspezifischen Proteine selten Verwendung finden. Werden bei einem rekombinant hergestellten Protein diese Codons öfters benötigt, führt dies zu einer limitierten Translation der mRNA und letztlich zu einer geringen Proteinausbeute (Kane 1995). Im Falle von T-GPI-SP1 gibt es solche in *E. coli* seltenen Codons, wie zum Beispiel das AGG, welches für Arginin kodiert und in T-GPI-SP1-1 6mal sowie in T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 jeweils 3mal vorkommt. Das kann auch auf CCC zutreffen, das für Prolin kodiert und in T-GPI-SP1-1 11mal bzw. in T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 jeweils 9mal zu finden ist. Dies ist möglicherweise der Grund dafür, dass die Ausbeuten bei T-GPI-SP1-1 noch geringer waren als für die anderen Spleißvarianten.

E.2.2 Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers

Da T-GPI-SP1-1 nicht in ausreichenden Mengen hergestellt und rückgefaltet werden konnte, erfolgte die Immunisierung mit T-GPI-SP1-3. Hierfür wurde T-GPI-SP1-3 in PBS-Puffer rückgefaltet, wobei die Ausbeute allerdings um 10-20 % niedriger war als mit dem Glutathion-haltigen Puffer. Die Sequenzidentität von T-GPI-SP1-3 mit T-GPI-SP1-1 beträgt etwa 82 % und mit T-GPI-SP1-2 etwa 91 %, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass der generierte Antikörper auch die anderen beiden Varianten erkennen wird.

Die Evaluierung der Sensitivität und Spezifität mit Hilfe der ELISA- und Western Blot-Technik bestätigte dann auch durchaus diese Annahme: Der generierte polyklonale T-GPI-SP1-Antikörper erkannte mit beiden Methoden alle drei in *E. coli* rekombinant hergestellten Spleißvarianten. Mit Hilfe der ELISA-Methode konnte gezeigt werden, dass der T-GPI-SP1-Antikörper T-GPI-SP1-3 und T-GPI-SP1-2 gleich gut identifiziert, während T-GPI-SP1-1 weniger gut erfasst wird. Zudem erkannte der Antikörper auch rekombinant hergestellte Konstrukte von T-GPI-SP1-1 aus den Expressionssystemen *Pichia pastoris* und HEK293-Zellen.

Mit der ELISA-Methode wurde ein Signal in humanem Serum detektiert, das sich im Western Blot in Form eines Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa bestätigte. Diese Bande wurde überraschenderweise im Serum von beiden Geschlechtern gefunden. Möglicherweise

handelt es sich hierbei um eine Kreuzreaktivität mit einem anderen, bisher nicht identifizierbaren Protein. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann jedoch ausgeschlossen werden, dass dies die Proteasen Plasmakallikrein oder Faktor XI betrifft, die die höchste Sequenzidentität zu T-GPI-SP1-1 aufweisen (Abbildung D.9). Mittels des T-GPI-SP1-Antikörpers wurden weder rekombinantes Plasmakallikrein, noch rekombinanter Faktor XI detektiert (Abbildung D.9a). Zudem betragen die Molekulargewichte für diese beiden Plasmaproteine jeweils etwa 70 kDa, welches mit dem nachgewiesenen Molekulargewicht von 30 kDa nicht im Einklang steht. Auffälligerweise konnte im Serum eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa festgestellt werden, die dem im Seminalplasma identifizierten Molekulargewicht eines wahrscheinlich mit T-GPI-SP1 komplexierten Proteins entspräche. Es ist somit durchaus möglich, dass T-GPI-SP1 auch in das Blut sezerniert wird, und es sich sowohl bei dem 30 kDa- als auch bei dem 150 kDa-Signal um T-GPI-SP1 handelt.

Das Vorhandensein von T-GPI-SP1 im Serum von Frauen könnte dadurch erklärt werden, dass es im weiblichen Körper ein Organ gibt, welches ebenfalls T-GPI-SP1 exprimiert und sezerniert. Die von uns getesteten Organe und die in den Datenbanken verfügbaren EST-Einträge stellen nur eine gewisse Auswahl der möglichen Expressionsorte von T-GPI-SP1-mRNA dar und umfassen bei weitem nicht alle (weiblichen) Organe des Menschen. Daher kann ein noch unbekannter T-GPI-SP1-Expressionsort vor allem im weiblichen Körper nicht ausgeschlossen werden.

Auch bei dem im Seminalplasma detektierten Signal könnte es sich einerseits um eine unspezifische Kreuzreaktivität des Antikörpers handeln, der ein anderes Protein als T-GPI-SP1 erkennt. Andererseits ist es hier aber eher wahrscheinlich, dass T-GPI-SP1 von den Epithelzellen der *Ductuli efferentes* sezerniert wird (siehe E.4). Bekanntermaßen werden einige Proteine in das Lumen der *Ductuli efferentes* abgegeben und tragen dort zur Reifung der Spermien bei (siehe B.2.1.2). Dazu gehören beispielsweise Glykosyltransferasen oder Glykohydrolasen (Tulsiani 2006) und das GPI-verankerte Protein HE5 (Kirchhoff & Hale, 1996). Das in Western Blot-Analysen detektierte Molekulargewicht von ca. 150 kDa entspricht jedoch nicht dem erwarteten Molekulargewicht von T-GPI-SP1 mit ca. 37 kDa. Im Seminalplasma könnte daher T-GPI-SP1 ebenso wie im Serum möglicherweise in einem Komplex mit einem anderen Molekül vorliegen. Allerdings war es nicht möglich, mit Hilfe der Immunpräzipitation oder dem Spiken mit rekombinantem Protein eine nähere Charakterisierung der immunologisch erfassten Bande zu erreichen.

Wie in Abschnitt B.4 im Detail diskutiert wird, eignete sich der generierte Antikörper sehr gut für immunohistochemische Analysen, vor allem bei der chromogenen Färbung von Gewebeschnitten. Ein gesundes Prostatagewebe zeigte keine Expression des T-GPI-SP1-Proteins und diente somit als Negativkontrolle. Dagegen konnte in den T-GPI-SP1-exprimierenden Geweben eine eindeutige spezifische Färbung bestimmter Zellen erreicht werden.

E.2.3 Expression in *Pichia pastoris*

Gegenüber anderen Expressionssystemen hat das von uns verwendete *Pichia pastoris*-Expressionssystem mehrere Vorteile. Neben einer Aussicht auf höhere Ausbeuten und der Möglichkeit des ‚scale up‘ im 10 Liter Fermenter beinhaltet die verhältnismäßig einfache Reinigung große Vorteile, da das rekombinante Protein in ein chemisch definiertes Minimal-Medium sezerniert wird. Ein weiterer wichtiger Vorteil war die Möglichkeit der Expression von reifen Proteasen, die ohne Propeptid exprimiert werden können. Dies sollte direkte Messungen einer proteolytischen Aktivität der in *Pichia pastoris* generierten T-GPI-SP1-Konstrukte erlauben.

Die rekombinante Expression von T-GPI-SP1-1-Konstrukten in *Pichia pastoris* war sowohl im 1 Liter Fernbachkolben als auch im Fermenter erfolgreich. Allerdings waren die Ausbeuten an rekombinantem Protein sehr gering, wobei überraschenderweise die Fermentation eine niedrigere Ausbeute als die Expression im Fernbachkolben erbrachte. Diese geringen Mengen können möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Expression von T-GPI-SP1 einen toxischen Effekt auf den Metabolismus der Hefe hatte. Ein ähnliches Phänomen wurde beispielsweise bei der Expression von Rinder-Trypsinogen beobachtet (Hanquier et al. 2003). Ein weiterer Grund für die geringe Ausbeute an T-GPI-SP1 könnte durch den proteolytischen Abbau des rekombinanten Proteins bedingt sein. Sezernierte Proteine können dabei durch extrazelluläre, membrangebundene und durch intrazelluläre Proteasen degradiert werden. Letztere werden bei der Lyse von Zellen frei, wobei den Proteasen aus den Vakuolen ein erheblicher Anteil an der proteolytischen Aktivität zukommt (Jahic et al. 2006). Dazu gehören zum Beispiel die Endoproteinasen A und B, die Carboxypeptidase Y und S und die Amino-peptidase I (Jahic et al. 2006). Diese Proteasen besitzen eine niedrige Substratspezifität und benötigen für die Proteolyse kein ATP. Die Lebensfähigkeit der Hefezellen während der Expression eines Fremdproteins ist deshalb dringend erforderlich, da die Hefezell-Proteasen insbesondere von toten Zellen freigesetzt werden.

Den Effekt der proteolytischen Spaltung des T-GPI-SP1-Proteins konnten wir besonders während der Expression im Fermenter beobachten. Die Anzahl der Degradationsprodukte nahm mit der Expressionsdauer zu, während sich die Menge des intakten *full length*-Proteins über den Zeitverlauf erniedrigte.

Es ist zudem denkbar, dass die geringen Expressionsmengen in *Pichia pastoris*, ebenso wie in *E. coli*, durch die für die Bildung des rekombinanten Proteins notwendigen, aber in dieser Hefe seltenen tRNAs bedingt sind. Interessanterweise existieren in T-GPI-SP1-1 einige in *Pichia pastoris* selten benützte Codons wie zum Beispiel die Nukleotidabfolge CGG oder CGC, die jeweils für die Aminosäure Arginin kodieren.

Ein weiterer wesentlicher Grund für die geringen Expressionsmengen an T-GPI-SP1-1 könnte auch an der geringen Stabilität des rekombinanten Proteins liegen. Hierzu wird im folgenden Kapitel E.3 näher Stellung genommen.

Trotz der niedrigen Expressionsausbeute war es dennoch möglich, das Protein in löslicher Form zu generieren. Allerdings wurden nur die Konstrukte von T-GPI-SP1-1 in den Zellkulturüberstand sezerniert, die eine Deletion des hydrophoben C-Terminus aufwiesen. Dies war ein erster Hinweis auf die mögliche Verankerung der Spleißvariante T-GPI-SP1-1 in der Plasmamembran der Zelle.

Beim Konstrukt Pro-T-GPI-SP1-1 ohne Transmembrandomäne (TMD) war ein Shift im Molekulargewicht um 9 kDa zu beobachten. Die vorhergesagte molekulare Masse sollte 33 kDa betragen, während das tatsächliche Molekulargewicht mit 42 kDa bestimmt wurde. Der Grund für diese Erhöhung des Molekulargewichts kann mit der Fusion der alpha-Faktor Signalsequenz am N-Terminus von T-GPI-SP1-1 erklärt werden. Diese Signalsequenz wurde vermutlich nicht abgespalten. Eine direkte Bestätigung dieser Annahme durch N-terminale Aminosäuresequenzierung der Pro-T-GPI-SP1-1 war aufgrund der niedrigen Expressionsraten allerdings nicht möglich.

E.2.4 Expression in HEK293-Zellen

Da die Mengen an rekombinant herstellbarem Protein im *Pichia pastoris*-System – entgegen den Erwartungen – sehr gering waren, entschieden wir uns für eine weitere Expression von T-GPI-SP1-1 in der humanen Zelllinie HEK293. Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass rekombinant generierte humane Proteine (und damit auch T-GPI-SP1-1) in diesem Expressionssystem richtig glykosyliert und gefaltet werden, weshalb sich solche Proteine vor allem für funktionelle Untersuchungen eignen sollten. Bei der Expression in diesem System sollte zudem die Rolle des hydrophoben C-Terminus, der charakteristisch für T-GPI-SP1-1 ist, näher untersucht werden.

Die erzielten Resultate gaben einen erneuten Hinweis darauf, dass der hydrophobe Bereich von T-GPI-SP1-1 als mögliche Transmembrandomäne der Verankerung in der Zellmembran dient. Konstrukte von T-GPI-SP1-1 ohne TMD wurden in den Überstand sezerniert, während jene mit dem hydrophoben C-Terminus in der Membran der HEK293-Zellen verblieben. Es handelt sich dabei um die Aminosäureabfolge WLLLCPLSHVLFRAILY. Dieser Bereich wurde im Hydropathieplot von T-GPI-SP1-1 (siehe Abbildung B.7) als hydrophober Sequenzabschnitt ausgewiesen und aufgrund dieser bioinformatischen Analyse in den Konstrukten von T-GPI-SP1-1 ohne TMD deletiert. Der hydrophobe Bereich fehlt per se in den Spleißvarianten T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3 und lässt somit auf eine cytoplasmatische Lokalisation dieser Varianten schließen.

Da die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur subzellulären Lokalisation der Fusionskonstrukte von T-GPI-SP1-1 mit EGFP und YFP keine eindeutige Aussage zuließ, wurden zusätzlich Western Blot-Analysen von fraktionierten Zellaufschlüssen durchgeführt. Mit dem Fusionskonstrukt Pro-T-GPI-SP1-1-EGFP war eine Detektion nur in der Membranfraktion, nicht aber in der cytosolischen Fraktion möglich, was als ein Indiz für eine Membranverankerung gewertet werden kann. Im Gegensatz dazu waren die Konstrukte Pro-T-GPI-SP1-2-EGFP und Pro-T-GPI-SP1-3-EGFP nur in der cytoplasmatischen Fraktion lokalisiert.

E.3 Biochemische und funktionelle Charakterisierung von rekombinanter T-GPI-SP1

E.3.1 Membranverankerung und Glykosylierung

Wie unter E.2 angesprochen, ergab sich in Western Blot-Analysen ein eindeutiger Hinweis auf eine mögliche Membranverankerung des Fusionskonstruktes Pro-T-GPI-SP1-1-EGFP. Dieses Protein verblieb aufgrund seines hydrophoben C-Terminus in der Membranfraktion und wurde nur in geringen Mengen in der cytosolischen Fraktion detektiert, während Pro-T-GPI-SP1-2-EGFP und Pro-T-GPI-SP1-3-EGFP vornehmlich in der cytoplasmatischen Fraktion zu finden waren. Da diese Varianten per se keinen hydrophoben Bereich am C-Terminus besitzen, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem C-Terminus von T-GPI-SP1-1 um eine Membranverankerung handelt, wobei allerdings der GPI-Anker als solcher in unseren Experimenten bisher nicht bewiesen wurde.

Bezüglich der Molekulargewichte der ohne EGFP exprimierten Konstrukte lässt sich festhalten, dass diese höher waren als die errechneten molekularen Massen. Diese Erhöhung könnte möglicherweise durch posttranslationale Modifikationen wie einer O-Glykosylierung bedingt sein. So wurde beispielsweise eine Heterogenität von Prostatin und Plasmakallikrein bezüglich ihres jeweiligen Molekulargewichts beschrieben (Yu et al. 1994, Heimark and Davie 1981). Diese Unterschiede sind auf unterschiedliche Zuckerreste entsprechend einer unterschiedlichen Anzahl an Sialsäureketten zurückzuführen. Ein daraus resultierendes unterschiedliches Laufverhalten von glykosylierten Proteinen in der SDS-PAGE wurde z.B. auch für Proacrosin beschrieben (Baba et al. 1989).

Interessanterweise ist eine O-Glykosylierung für T-GPI-SP1-1 an zwei Threoninresten (Thr²⁵⁷ und Thr³¹³) vorhergesagt. Somit könnte eine derartige posttranslationale Modifikation eine Begründung für die Erhöhung des Molekulargewichts von T-GPI-SP1-1 sein. Bei den EGFP-Fusionskonstrukten waren jedoch keine erhöhten Molekulargewichte zu beobachten. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass durch das Fusionsprotein EGFP die dreidimensionale Struktur von T-GPI-SP1 verändert war und somit die potentiellen Glykosylierungsstellen nicht zugänglich waren.

Zur Überprüfung der auf computerbasierten Berechnungen vorhergesagten N-Glykosylierungsstellen wurden eine Deglykosylierung mit N-Deglykosidase Endo H und eine Inkubation von Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD-exprimierenden HEK293-Zellen mit Tunicamycin durchgeführt. Beide Vorgehensweisen erbrachten keine Veränderung des Molekulargewichts von Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD in der SDS-PAGE, was auf eine fehlende N-Glykosylierung hindeutet.

E.3.2 Studien zur proteolytischen Aktivität und Stabilität

Eine potentielle katalytische Aktivität wurde an diversen rekombinanten T-GPI-SP1-Proteinen untersucht, die aus den drei verschiedenen Expressionssystemen isoliert worden waren. Dabei wurden verschiedene AMC-Serinprotease-Substrate und das Fluorogenic Peptide Substrate II (FS II) getestet. AMC-Substrate werden an einer Carboxyester-Bindung gespalten, FS II wird hingegen an einer Amid-Bindungen proteolysiert.

Die Messungen wurden mit aufgereinigten oder rückgefalteten T-GPI-SP1-Proteinen ebenso wie mit Zellkulturüberständen und direkt mit Zellen durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurde sowohl die Möglichkeit einer autokatalytischen Aktivität als auch die Aktivierung von Pro-T-GPI-SP1-1 durch andere Proteasen untersucht. Zudem wurde die in *Pichia pastoris* exprimierte, mutmaßlich bereits aktive Form von T-GPI-SP1-1 geprüft. In keinem Fall konnte jedoch eine proteolytische Aktivität von rekombinanten T-GPI-SP1-Formen nachgewiesen werden.

Eine mögliche Ursache für die nicht messbare proteolytische Aktivität von T-GPI-SP1-1-Konstrukten, bei denen die TMD deletiert war, könnte daran liegen, dass das in das Kulturmedium sezernierte Protein nach seiner Aufreinigung mittels der Ni-NTA-Sepharose-Affinitätschromatographie anfänglich in Western Blot-Analysen einige Signale im niedermolekularen Bereich zeigte, die auf eine Proteindegradation hinweisen. Somit wäre es denkbar, dass Hefe- oder HEK293-spezifische Proteasen als Verunreinigung im Überstand des Expressionsorganismus vorlagen und durch die gewählten Aufreinigungsschritte nicht abgetrennt wurden. Diese Degradation wurde zwar durch Zugabe des reversiblen Serinprotease-Inhibitors Benzamidin (Ensinck et al. 1972) zu allen Aufreinigungspuffern deutlich reduziert, dennoch war auch damit kein Aktivitätsnachweis möglich.

Interessanterweise konnte durch Zugabe eines Breitband-Proteaseinhibitor-Cocktails zu humanem Seminalplasma eine Stabilisierung der vermutlichen T-GPI-SP1-Bande im Western Blot beobachtet werden. Somit könnte T-GPI-SP1 auch *in vivo* eine geringe Stabilität aufweisen.

Möglicherweise liegen daher die Ursachen für die fehlende Protease-Aktivität von T-GPI-SP1 und insbesondere seiner Variante SP1-1 auf molekularer Ebene. Deshalb wurde zunächst ein Aminosäure-Sequenzvergleich der katalytischen Domäne von T-GPI-SP1-1 mit der von anderen Serinproteasen durchgeführt. Wie in Abbildung E.1 dargestellt, ergibt sich eine Sequenzidentität von 42 % mit dem Gerinnungsfaktor F XI und von 40 % mit Plasmakallikrein. Eine weniger hohe Sequenzidentität konnte mit den katalytischen Domänen der männlichen Genitaltrakt-Proteasen Prostasin (35 %), Testisin (36 %), Acrosin (35 %) und Leydin (33 %) identifiziert werden. Ein Vergleich von T-GPI-SP1-1 mit den Gewebekallikrein-ähnlichen Peptidasen zeigte eine Sequenzidentität von 32 % mit hK2 und von 37 % mit hK13. Die Sequenzidentität von T-GPI-SP1-1 mit Trypsin betrug 34 %.

T-GPI-SP1-1	68	ITGGMEAEVGEFPWQVSIQA---R---SEP-----F--CGGSILNKWWILTA ^{AAHCL} --YSEELFP---EEL
FAKTOR XI	388	IVGGTASVRGEWPWQVTLHT---T---SPTQRH--L--CGGSIIGNQWILTA ^{AHCF} --YGVES-P--KIL
PK	391	IVGGTNSWGEWPWQVSLQV---KLTAQRH-----L--CGGSLIGHQWVLTAA ^{HCF} --DGLPLQDVWRIY
PROSTASIN	45	ITGGSSAVAGQWPWQVSIY---E---GVH-----V--CGGSLVSEQWVLSAA ^{HCF} --PSEH-HK--EAY
TESTISIN	42	IVGGEDAELGRWPWQGSRLR---W---DSH-----V--CGVSLLSHRWALTA ^{AHCF} ETYSDLSDP--SGW
ACROSIN	43	IVGGKAAQHGAWPWVSLQIFTYN---SHR-----YHTCGGSLLSNRWVLTAA ^{HCF} --VGKNNV---HDW
LEYDIN	17	IIGGKNSLRGGWPWQVSLRL---K---SSHGDGRLL--CGVTLSSCWVLTAA ^{HCF} --KRYGNST--RSY
HK 2	25	IVGGWECEKHSQPWQVAVYS---H---GWA-----H--CGGVLVHPQWVLTAA ^{HCL} -----K--KNS
HK 13	36	LPGGYTCFPHSQPWQAALLV---Q---GRL-----L--CGGVLVHPKWVLTAA ^{HCL} -----K--EGL
TRYPSIN	24	IVGGYNCEENSVPYQVSLNS-----GYH-----F--CGGSLINEQWVVSAG ^H C-----YK--SRI
CONSENSUS		I GG AE G PWQVS S CGGS L W LTA^{AH}C
T-GPI-SP1-1	121	SVVLGTNDL--T-----S-PSMEIK--E-----VA-----SII ^{LHKDFKR} -A----NM
FAKTOR XI	443	RVYSGILN-----QSEIK--EDTSFFG-VQ-----EII ^{IHDQYKM} -A----ES
PK	449	SGILNLSDI--TKD-----T-PFSQIK--E-----II ^{IHQNYKV} -S----EG
PROSTASIN	97	EVKLG ^{AH} QQL--D-----S-YSEDAKVST-----LK-----DII ^{PHPSYLQ} -E----GS
TESTISIN	97	MVQFG--QL--T-----SMPSFWSL--QAYYTRYFVS-----NIYLSPRYL--G----NS
ACROSIN	100	RLVFGAKEI--TYGNNKPVKA-PVQE-R--Y-----VE-----KII ^{IHEKYNS} -A----TE
LEYDIN	75	AVRVGDYHT--L-----V-P-VEFE--EEIG--VQ-----QIVI ^{HREYRP} -D----DS
HK 2	72	QVWLRGRHNL--F-----E-PEDTQ--R-----VPVSHSPHPLYNMSLLK ^{HQSLR} PDE----RS
HK 13	83	KVYLGKHALGRV-----E-AGEQVR--E-----VV-----HSI ^{PHPEYRR} -SP ^{THLNH}
TRYPSIN	70	QVRLGEHNI--EVL-----E-GNEQFI--N-----AA-----KII ^{RHPQYDR} -K----TL
CONSENSUS		V LG L T P E K E V II H
T-GPI-SP1-1	154	DNDIALLLLASP----IKLDDL--KVPICLPTQPG--P-AT-WR-E-----CWVAGWG--QTNAADK
FAKTOR XI	478	GYDIAL ^{LKLETT} ----VNYTDS--QRPICLPSKGD--RNVI-YT-D-----CWVTGWG--YRKL ^{RDK}
PK	481	NHDIALIKLQAP----LNYTEF--QKPICLPSKGD--T-STIYT-N-----CWVTGWG--FSK--EK
PROSTASIN	132	QGDIALLQLSRP----ITFSRY--IRPICLPAANA--SFPN-GL-H-----CTVTGWG--HVAPSVS
TESTISIN	135	PYDIALVKLSAP----VITYTKH--IQPICLQASTF--E-FE-NRTD-----CWVTGWG--YIKEDEA
ACROSIN	140	GNDIALVEITPP----ISCGRF--IGPGCLPHLKAGLP-RG-SQ-S-----CWVAGWGVI ^E E ^K APRP
LEYDIN	110	DYDIALVRLQGPEEQCARFSSH--VLPACLP-----L-WR-ERPQKTASNCYITGWG--DTGRAYS
HK 2	118	SHDLMLLRLSEP----AKITDV--VKVLGLPTQE---P-AL-GT-T-----CYASGWG--SIEPEEF
HK 13	122	DHDIMLLELQSP----VQLTGYIQTLP ^L SHNRLT--P-GT---T-----CRVSGWG--TTTSPQV
TRYPSIN	105	NNDIMLIKLSR--AVINAR--VSTISLPTAP---P-AT-GT-K-----CLISGWG--NT-ASSG
CONSENSUS		DIAL^L L P PICLP P T CWV GWG T
T-GPI-SP1-1	203	NSVKTDLMKVPVMIMDWE ^E ESCKMF-----P--K---LT-----KNMLCAG--YKNESYDACKGDSGGP
FAKTOR XI	528	--IQNTLQKAKIPLVTNEECQKRY-----RGHK---IT-----HKMICAG--YREGGK ^D ACKGDSGGP
PK	529	GEIQNLQKVNIP ^L VTNEECQKRY-----QDYK---IT-----QRMV ^{CAG} --YK ^E GGK ^D ACKGDSGGP
PROSTASIN	182	LLTPKPLQLEVPLISRETNCCLYNIDAKP--E ^E PHFVQ-----EDMVCAG--YVEGGK ^D ACQGDSGGP
TESTISIN	185	LPSPHTLQEVQVAIINNSMCNHLF-----L--K---YSFRKDIFGDMVCAG--NAQGGK ^D ACFGDSGGP
ACROSIN	193	SSI---LMEARVDLIDL ^L CNSTQWYN--G--R---VQ-----PTNVCAG--YPVGKIDTCQGD ^S GGP
LEYDIN	165	RT---LQQA ^A IPLLPKRFCEERY-----KG-R---FT-----GRMLCAGNLHEHKRV ^D SCQGD ^S GGP
HK 2	166	LRPRS-LQCVSLHLLSNDMCARAY-----SE-K---VT-----EFMLCAG--LWTG ^E KDTCGD ^S GGP
HK 13	171	NYPKT-LQCANIQLRSDEECQVY-----PG-K---IT-----DNMLCAG--TK ^E GGK ^D SC ^E GD ^S GGP
TRYPSIN	152	ADYPDELQCLDAPVLSQAKCEASY-----PG-K---IT-----SNMFCV ^G --FLEGGK ^D SCQGD ^S GGP
CONSENSUS		L V EEC P K T MLCAG Y DAC GDSGGP
T-GPI-SP1-1	254	LVCTPEPGEK ^W YQVGIISWG-K-SCGEKNTPGIYTSLVN ^Y NLWI
FAKTOR XI	579	LSC--KHNEV ^W HLVGITSWG-E-GCAQRERPGVYTNVVEYVDWI
PK	582	LVC--KHNGM ^W RLVGITSWG-E-GCARREQPGVYTKVAEYMDWI
PROSTASIN	242	LSC-PVEG-LWYLTGIVSWG-D-ACGARNRPGVYTLASSYASWI
TESTISIN	242	LAC--NKNGLWYQIGVVS ^W G-V-GCGRPNRPGVYTNISHHFEWI
ACROSIN	244	LMCKDSKESAYVVV ^W GITSWG-V-GCARAKRPGIYTATW ^P YLNWI
LEYDIN	215	LMC-ERPGESWAALGVTSWG-Y-GCGVKDSPGVYTKVSAFVPWI
HK 2	217	LVC-----NGVLQGITSWGPE-PCALPEKPAVYTKVVHYR ^K WI
HK 13	222	LVCNRT-----LYGIVSWG-DFPCGQ ^P DRPGVYTRVSR ^Y VLWI
TRYPSIN	204	VVCNGQ-----LQGVVS ^W G-D-GCAQKNKPGVYTKV ^Y NYVKWI
CONSENSUS		LVC W VGI SWG CG N PG YT Y WI

Abbildung E.1 Aminosäure-Sequenzvergleich der katalytischen Domänen von T-GPI-SP1-1 und anderen humanen Serinproteasen.

Der Sequenzvergleich wurde mit der Software SECentral durchgeführt. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind grau unterlegt, hohe Sequenzidentitäten (größer als 60 %) sind in der Consensus-Sequenz dargestellt. (PK: Plasmakallikrein; hK humane Kallikrein-ähnliche Peptidase).

Aufgrund der hohen Sequenzidentität der katalytischen Domäne von T-GPI-SP1-1 mit jener von Faktor XI wurde nun unter Anwendung des Computerprogramms Swiss-PdbViewer (www.au.expasy.org/spdbv) ein auf der bekannten dreidimensionalen Struktur von Faktor XI (Jin et al. 2005) basierender Strukturvergleich vorgenommen. Diese dreidimensionalen Analysen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Dorit Nögler aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie durchgeführt. An dieser Stelle muss jedoch betont werden, dass es sich hierbei nur um anfängliche Analysen einer theoretisch möglichen dreidimensionalen Struktur von T-GPI-SP1-1 handelt. Wiewohl komplexe weiterführende computergestützte Untersuchungen nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, könnten die nachfolgend diskutierten Pilotdaten aber sehr wohl eine wichtige Grundlage für eine zukünftig fortzuführende, detaillierte Charakterisierung der Struktur von T-GPI-SP1-1 bieten.

Interessanterweise zeigten die Swiss-PdbViewer-Analysen, dass die drei Aminosäuren der katalytischen Triade von T-GPI-SP1-1 (His¹⁰⁸, Asp¹⁵⁶ und Ser²⁵⁰) nahezu die gleiche dreidimensionale Ausrichtung im Protein haben, wie das für Faktor XI der Fall ist (hervorgehoben in Abbildung E.2), und somit nahezu deckungsgleich sind.

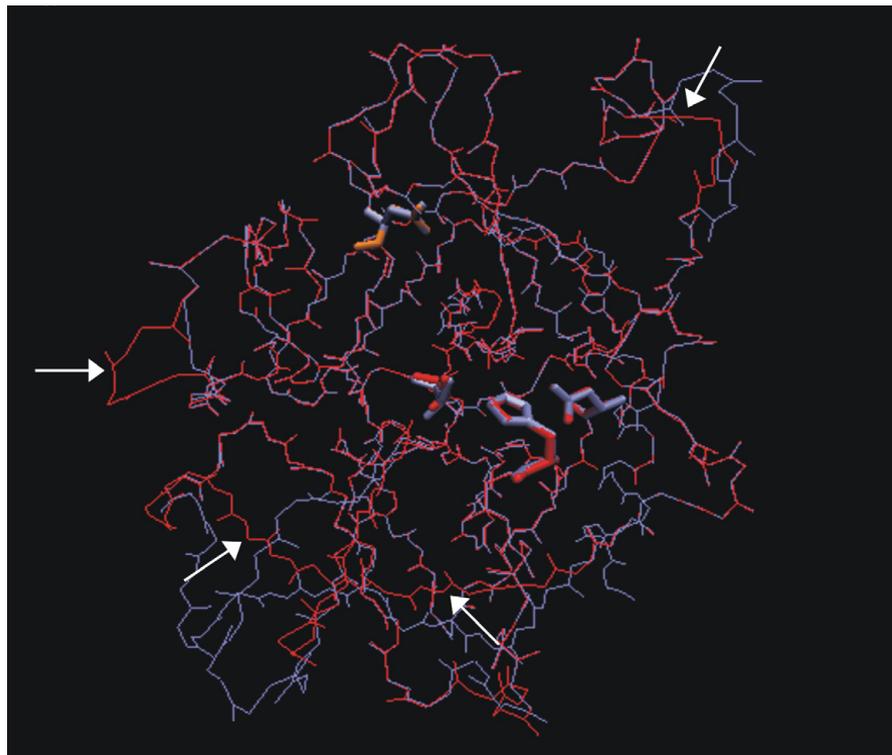


Abbildung E.2 *Dreidimensionale Strukturvorhersage von humaner T-GPI-SP1-1 im Vergleich mit dem humanen Gerinnungsfaktor F XI.*

Homologiemodell der katalytischen Domäne von T-GPI-SP1-1 (rot) mit Faktor XI (blau) in Stereo-Ansicht. Die Aminosäuren der katalytischen Triade im aktiven Zentrum sind hervorgehoben, die weißen Pfeile kennzeichnen Regionen, bei denen die dreidimensionale Struktur von T-GPI-SP1 nicht deckungsgleich mit der von Faktor XI ist.

Der Asp²⁴⁴-Rest (Abbildung E.2) bestimmt dabei möglicherweise die Substratspezifität für Lysin oder Arginin (Huber et al. 1974, Krieger et al. 1974). Dies wäre ein typisches Indiz für Serinproteasen aus der Trypsin-Familie und könnte als ein Hinweis darauf gelten, dass T-GPI-SP1-1 doch eventuell eine proteolytische Aktivität besitzt, obwohl ein T-GPI-SP1-1-spezifisches Substrat von uns bislang noch nicht gefunden wurde. Möglicherweise übernimmt T-GPI-SP1-1 eine dem Faktor XI vergleichbare Rolle im Zusammenspiel von Gerinnung und Verflüssigung des Ejakulates (siehe B.2.3), wiewohl dieser noch nicht vollständig verstandene Vorgang wohl nur bedingt den Mechanismen der klassischen Kaskade der Blutgerinnung folgt (Lwaleed et al. 2004, Lwaleed et al. 2007).

Außerdem gehen noch einige weitere Eigenschaften von T-GPI-SP1-1 aus der dreidimensionalen Analyse hervor, die gegebenenfalls die Instabilität des Proteins erklären könnten. Vergleicht man die Orientierung der Aminosäuresequenz von Faktor XI mit der von T-GPI-SP1-1 im dreidimensionalen Raum, so fällt auf, dass exponierte Regionen bei T-GPI-SP1-1 existieren, die aus der Kernregion hervortreten und somit nicht deckungsgleich zu den Faktor XI-spezifischen Bereichen sind (Abbildung E.2, weiße Pfeile). Diese Bereiche stellen möglicherweise bevorzugte Angriffspunkte für die proteolytische Spaltung bzw. Degradation durch andere Proteasen dar und könnten somit die Instabilität von T-GPI-SP1-1 bedingen, die insbesondere bei Aufreinigungen der rekombinanten Proteine und auch im Seminalplasma beobachtet wurde.

Einen interessanten Hinweis auf die Besonderheit der Molekülstruktur von T-GPI-SP1 bietet auch die Oberflächenbeschaffenheit dieses Protease-ähnlichen Proteins (Abbildung E.3).

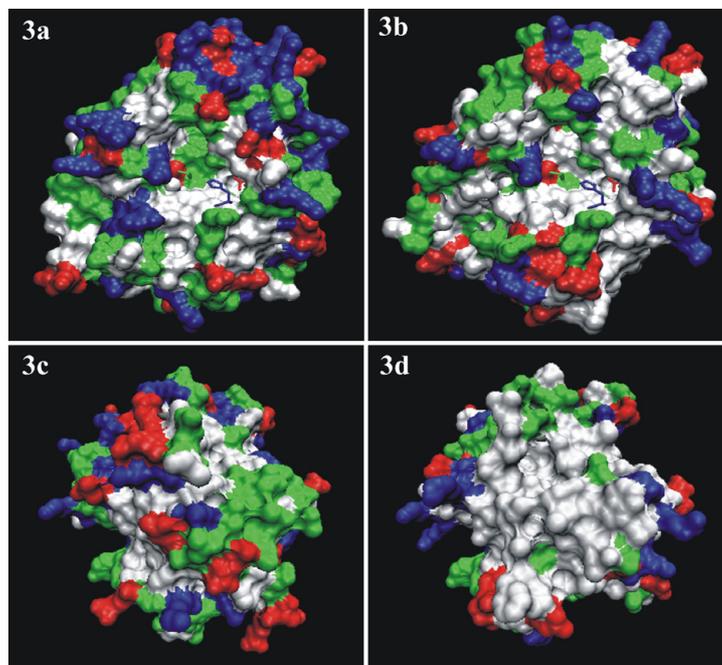


Abbildung E.3 Vergleichende Darstellung von Faktor XIa und T-GPI-SP1-1 im Kalottenmodell.

(a) Frontansicht von Faktor XI und (b) mögliche Frontansicht von T-GPI-SP1-1 mit katalytischer Triade
(c) Rückansicht von Faktor XI und (d) mögliche Rückansicht von T-GPI-SP1-1

Farbkodierung der jeweiligen Aminosäureseitenketten:

saure Reste: rot; basische Reste: blau; neutrale/hydrophile Reste: grün; hydrophobe Reste: grau.

Zum besseren Verständnis sind in Abbildung E.3a und E.3b die Vorderansichten von Faktor XI und T-GPI-SP1-1 mit Blick auf die katalytische Triade räumlich als Kalottenmodell dargestellt. Die entsprechenden Rückansichten sind in Abbildung E.3c und E.3d wiedergegeben. Es zeigen sich vornehmlich hydrophobe Bereiche auf der rückwärtigen Oberfläche von T-GPI-SP1-1 (Abbildung E.3d), die man beim löslichen Gerinnungsfaktor XI nicht findet. Diese prominente hydrophobe Oberfläche von T-GPI-SP1-1 lässt eine Wechselwirkung mit der Membran oder anderen hydrophoben Proteinen vermuten. Ähnliche hydrophobe Bereiche findet man auch auf den Rückansichten der berechneten Proteinoberflächen von Prostasin (Yu et al. 1995, Chen et al. 2001) und Testisin (Hooper et al. 1999, Hooper et al. 2000). Beide Proteine gehören ebenso wie T-GPI-SP1-1 zu der neuen Gruppe der Chymotrypsin (S1)-ähnlichen Serinproteasen, die über verschiedene Bereiche ihrer Domänen mit der Plasmamembran verankert sind (Netzel-Arnett et al. 2003). Prostasin und Testisin werden ebenfalls hauptsächlich in Geweben des humanen männlichen Genitaltrakts exprimiert.

Die aufgrund des Alignments mit der dreidimensionalen Struktur von Faktor XI erklärbare Instabilität von T-GPI-SP1-1 ließ sich auch mit dem bioinformatischen Analyseprogramm ExPasy (www.au.expasy.org/tools/protparam) vorhersagen. So ist z.B. im Molekül T-GPI-SP1-1ØTMD das Verhältnis der negativen Ladungen (28) der einzelnen Aminosäuren wie etwa von Aspartat und Glutamat ungewöhnlich hoch im Vergleich zu den positiven Ladungen (20) der Aminosäuren Arginin und Lysin. Dies führt zu einer hohen negativen Nettoladung des Moleküls im Vergleich zu der von anderen Serinproteasen (Tabelle E.3).

Tabelle E.3 *Vergleich von T-GPI-SP1-1 mit den Serinproteasen Trypsin, Faktor XI und Plasmakallikrein (PK) bezogen auf negative und positive Ladungen der Aminosäuren, der Nettoladung und des Stabilitätsindex.*

Mit Hilfe des Computerprogrammes ProtParam von ExPasy wurde die Nettoladung der positiv und negativ geladenen Aminosäuren berechnet und der Instabilitätsindex ermittelt.

Protease	negative / positive Ladungen	Nettoladung	Instabilitätsindex
Pro-T-GPI-SP1-1	36 / 38	+2	54,6
Pro-T-GPI-SP1-1ØTMD	32 / 29	-3	49,2
T-GPI-SP1-1	32 / 29	-3	51,66
T-GPI-SP1-1ØTMD	28 / 20	-8	44,36
Trypsinogen	22 / 20	-2	30,18
Trypsin	18 / 18	0	30,97
Pro-Faktor XI	59 / 70	+11	39,9
Faktor XI	24 / 27	+3	33,58
Pro-PK	53 / 67	+14	39,7
PK	22 / 24	+2	32,56

Das Expasy-Programm berechnet neben der Nettoladung auch den Instabilitätsindex für das entsprechende Protein. So gelten alle Proteine mit einem Wert über 40 als instabil. Die statistische Auswertung von 12 instabilen und 32 stabilen Proteinen zeigte, dass es bestimmte Dipeptide in einer Aminosäuresequenz gibt, die sich signifikant in instabilen und stabilen Proteinen unterscheiden (Guruprasad et al. 1990). Die Autoren haben einen „Dipeptide Instability Weight Value“ (DIWV) für alle zweistelligen Aminosäurekombinationen errechnet. Der Instabilitätsindex (II) ist wie folgt definiert:

$$\text{II} = (10 / L) \sum_{i=1}^{L-1} \text{DIWV}(x_i y_{i+1})$$

Dabei ist L die Länge der Aminosäuresequenz und $x_i y_{i+1}$ stellt den Wert für das entsprechende Dipeptid dar, das an Position i beginnt.

Vergleicht man die Instabilitätsindices der T-GPI-SP1-1-Konstrukte mit denen der Serinproteasen Faktor XI und Plasmakallikrein, die die höchste Sequenzidentität mit T-GPI-SP1-1 aufweisen, so liegen diese Werte für die T-GPI-SP1-1-Konstrukte deutlich über 40, während die für die anderen Proteasen darunter liegen, weshalb letztere auch als stabil bewertet werden. Interessanterweise besitzen die T-GPI-SP1-1-Konstrukte mit Transmembrandomäne einen höheren Instabilitätsindex als jene ohne den hydrophoben C-Terminus. Somit erreicht man möglicherweise durch eine Deletion der Transmembrandomäne eine Verbesserung der Stabilität des Proteins T-GPI-SP1-1.

Ein weiterer Grund für die Instabilität von T-GPI-SP1-1 könnte in der nicht korrekten Glykosylierung in Hefe und in HEK293-Zellen liegen. Da die Glykosylierung die Stabilität von Proteinen beeinflussen kann (Dwek 1995, Wormald & Dwek 1999), ist die geringe Beständigkeit möglicherweise auf eine fehlerhafte oder unvollständige Glykosylierung zurückzuführen. Zudem kann die Glykosylierung von Proteasen nicht nur deren Struktur und Stabilität betreffen, sondern auch deren proteolytische Aktivität modulieren (Joao et al. 1992, Rudd et al. 1995). Dies ist z.B. bei den Serinproteasen tPa („tissue plasminogen activator“) (Wittwer et al. 1989, Rudd et al. 1995) und Plasminogen (Davidson & Castellino 1993, Rudd et al. 1995) der Fall. Somit könnte eine nicht korrekte Glykosylierung ebenfalls ein Grund für fehlende proteolytischen Aktivität sein, obwohl nach der dreidimensionalen Berechnung die katalytisch aktiven Aminosäuren Histidin, Aspartat und Serin in einer dem Faktor XI ähnlichen Position liegen und eine enzymatische Aktivität von T-GPI-SP1-1 durchaus gegeben sein sollte.

E.4 Gewebelokalisation und mögliche Funktion des T-GPI-SP1-Proteins

Die immunhistologischen Untersuchungen zeigen, dass das T-GPI-SP1-Protein vornehmlich in den Leydigischen Zellen, den Sertoli Zellen und in den Epithelzellen der *Ductuli efferentes* des Hodens nachgewiesen werden kann. Zudem konnte T-GPI-SP1 auch in einigen Zellen von Ovarial- und Prostatakarzinomgeweben detektiert werden. Möglicherweise stellt T-GPI-SP1 daher einen Marker für bestimmte Karzinome dar.

Wie bereits unter E.1 erwähnt, ist aufgrund der Expression in Hoden- und Schilddrüsengewebe eine hormonelle Regulation von T-GPI-SP1 denkbar, vergleichbar mit den Gewebekallikreinen-ähnlichen Peptidasen wie hK2, das in den Leydigischen Zellen, im Nebenhoden und auch in der Schilddrüse exprimiert wird (Olsson et al. 2005). Ebenso wurde hK10 in den Leydigischen Zellen, in den Epithelzellen des Nebenhodens und in den *Ductuli efferentes* und hK13 in den Leydigischen Zellen, in den epithelialen Zellen des Nebenhodens und in der Schilddrüse nachgewiesen (Yousef and Diamandis 2003a, Petraki et al. 2002, Petraki et al. 2003). Zudem scheint hK10 ein neuer diagnostischer Marker für Ovarialkrebs zu sein (Luo et al. 2001). Kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass hK11 ein vielversprechender Marker für Ovarial- und Prostatakrebs ist (Diamandis et al. 2002, Luo et al. 2006). Dies gilt ebenso für hK13 (Scorilas et al. 2004, Dorn et al. 2007). Somit zeigt die Expression von T-GPI-SP1 durchaus etliche Parallelen zu diesen Proteasen, was sowohl die Expressionsorte als auch eine mögliche hormonelle Regulation betrifft.

Da auch immunologisch eine deutliche Färbung der Zellmembranen zu beobachten war, kann dies als weiterer Hinweis auf eine Membranverankerung von T-GPI-SP1-1 gewertet werden. Dennoch ist auch eine Sezernierung von T-GPI-SP1 in das Lumen der *Ductuli efferentes* durchaus vorstellbar, wo T-GPI-SP1 möglicherweise in den komplexen Prozess der Spermienreifung involviert ist. So ist von einigen Proteinen wie z.B. dem humanen HE5 und P34H bekannt, dass sie über Exosomen zu den Spermien transportiert und dort integriert werden (Kirchhoff und Hale 1996, Guillemette et al. 1999). Wir konnten allerdings T-GPI-SP1 nicht auf reifen Spermien nachweisen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass T-GPI-SP1 durch den Prozess des „Sheddings“ von den Spermien abgespalten wird und somit in das Seminalplasma gelangt, wie dies für das „Germinal Angiotensin I-Converting Enzyme“ (gACE) beschrieben wurde (Thimon et al. 2005). ACE spielt eine Schlüsselrolle im Renin-Angiotensin-System, das in die homöostatische Regulation des Blutdruckes involviert ist. Es kann aber auch auf der Membran von Spermien detektiert werden, wobei das membranständige ACE durch eine Serinprotease von der Spermienoberfläche abgespalten wird (Thimon et al. 2005). Interessanterweise scheint ACE eine wichtige Rolle bei der Fruchtbarkeit zu spielen. So konnte bei ACE-*knock out*-Mäusen eine reduzierte Fertilität nachgewiesen werden, die sich zum einen in der verminderten Beweglichkeit der Spermien im weiblichen Genitaltrakt und zum anderen in der eingeschränkten Bindefähigkeit der Spermien an die *Zona pellucida* äußerte (Thimon et al. 2005). ACE kann aber umgekehrt auch GPI-verankerte Proteine von

der Spermienmembran abspalten, wie dies z. B. für die murine Serinprotease TESP5 und die in Mäusen und Menschen vorkommende Hyaluronidase PH-20/SPAM1 der Fall ist (Kondoh et al. 2005, Martin-DeLeon 2006). Interessanterweise gibt es im C-terminalen Bereich von T-GPI-SP1-1 drei mögliche Spaltstellen für ACE. Diese liegen an den Positionen Pro³⁰⁵-Phe³⁰⁶, Ser³²²-Pro³²³ und Ser³³²-Pro³³³. So könnte T-GPI-SP1-1 durchaus auch ein Substrat von ACE darstellen.

Es besteht aber auch grundsätzlich die Möglichkeit, dass T-GPI-SP1 andere membrangebundene Proteine von der Spermienmembran abspaltet und dadurch in den Fertilitätsprozess involviert ist. In diesem Kontext wäre die Analyse einer T-GPI-SP1-*knock out*-Maus sehr interessant, da zwischen dem humanem T-GPI-SP1-1 und dem murinen Ortholog eine Sequenzidentität von immerhin ca. 54 % besteht, weshalb eine vergleichbare Funktion der beiden Proteine nahe läge. Auch die entsprechende murine mRNA wird hauptsächlich in Testis exprimiert (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer).

E.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene deutlich, dass die bislang weitgehend unbekannte T-GPI-SP1 hauptsächlich in humanem Hoden, aber auch in Ovarial- und Prostatakarzinomgeweben exprimiert wird. Für diese nähere Charakterisierung des Serinprotease-ähnlichen Proteins wurde es deshalb rekombinant in verschiedenen Expressionssystemen hergestellt, womit unter anderem eine Generierung eines T-GPI-SP1-erkennenden Antikörpers möglich wurde. Wegen der Instabilität des rekombinanten Proteins und anderer für die Expression widriger Bedingungen (z. B. die Verwendung von seltenen Codons oder die mögliche Toxizität von T-GPI-SP1) war jedoch eine für umfangreiche Aktivitätsmessungen ausreichende Expression dieses strukturell Protease-ähnlichen Proteins nicht möglich.

Die Erkenntnisse hinsichtlich der Stabilität von T-GPI-SP1, die sich sowohl während der Arbeiten im Labor als auch anhand von Computeranalysen ergaben, stellen eine große Herausforderung für zukünftige Arbeiten dar. So ist z.B. trotz der phylogenetischen Distanz von T-GPI-SP1-1 zu den durch Hormone regulierten Gewebekallikrein-ähnlichen Peptidasen eine erhebliche Übereinstimmung bezüglich der Expressionsorte (Hoden, Schilddrüse und maligne Ovarial- und Prostatagewebe) durchaus von hohem klinischen Interesse. Ob ein derartiger Zusammenhang auch hinsichtlich der Expressionsregulation von T-GPI-SP1 zu finden ist, müssen allerdings weitere Untersuchungen zeigen. Klärungsbedürftig wäre zudem, ob T-GPI-SP1 tatsächlich als Marker für bestimmte Tumoren dienen könnte.

Zur weiteren Charakterisierung der Regulation und Funktion von T-GPI-SP1 könnten somit folgende Experimente beitragen:

- Umgehen des Problems der Verwendung von seltenen Codons durch gezielte Mutagenese zur Verbesserung der Expressionsmengen in *E. coli* und *Pichia pastoris*.
- Aufklärung der Wechselwirkung zwischen dem zellmembranständigen ACE und der T-GPI-SP1-1.
- Erweitertes Substratscreening basierend auf 3D-Modellen.
- Charakterisierung der möglichen O-Glykosylierung von T-GPI-SP1.
- Überexpression und/oder Isolierung von T-GPI-SP1 aus T-GPI-SP1-exprimierenden Ovarial- oder Prostatakarzinomzelllinien.
- Untersuchungen zur Regulation der Expression von T-GPI-SP1-mRNA und T-GPI-SP1-Protein über die Gabe von Hormonen (Progesteron, Androgene und Östrogene) in dem Modell der T-GPI-SP1-exprimierenden Tumorzelllinien.
- Funktionsaufklärung durch den *knock down* von T-GPI-SP1 und das möglicherweise damit verbundene Proliferations- und Invasionsverhalten dieser Tumorzellen.
- Studien zur Funktion von T-GPI-SP1 mittels einer T-GPI-SP1-*knock out*-Maus.

Mit Hilfe dieser Experimente ließen sich nicht nur vertiefte Einblicke in die physiologische Rolle von T-GPI-SP1 im Hoden, sondern auch weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion als Tumormarker erreichen.

F **Literaturverzeichnis**

Andrews B. J., Proteau G. A., Beatty L. G., Sadowski P. D. (1985). The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. *Cell* 40 (4), 795-803.

Baba, T., Kashiwabara, S., Watanabe, K., Ito, H., Michikawa, Y., Kimura, K., Takada M., Fukamizu, A. and Arai, Y. (1989). Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *J. Biol. Chem.* 264 (20), 11920-11927.

Bedford, J. M. (1998). Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol. Reprod.* 59(6), 1275-1287.

Boué, F., Bérubé, B., De Lamirande, E., Gagnon, C., Sullivan, R. (1994). Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein. *Biol. Reprod.* 51(4), 577-587.

Breathnach, P. and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 349-383.

Chen, L. M., Skinner, M. L., Kauffman, S.W., Chao, J., Chao, L., Thaler, C. D., and Chai, K. X. (2001). Prostaticin is a glycosylphosphatidylinositol-anchored active serine protease. *J. Biol. Chem.* 276(24), 21434-21442.

Cheng, C.Y., Grima, J., Stahler, M.S., Guglielmotti, A., Silvestrini, B., Bardin, C.W. (1990). Sertoli cell synthesizes and secretes a protease inhibitor, alpha 2-macroglobulin. *Biochemistry* 29(4), 1063-1068.

Clark, H. F., et al. (2003). The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and membrane inserted proteins: A bioinformatics assessment. *Genome Res.* 13, 2265-2270.

Clements, J. (1997). The molecular biology of the kallikreins and their roles in inflammation. In S. Farmer (editor), *The Kinin System* (pp. 71-97), New York: Academic Press.

Cooper, T. G. (1996). Epididymis and sperm function. *Andrologia* 28 Suppl 1, 57-59.

Datar, R.V., Cartwright, T., Rosen, C.G. (1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentation: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio. Technology* 11, 349-357.

Davidson D.J., Castellino F.J. (1993). The influence of the nature of the asparagine 289-linked oligosaccharide on the activation by urokinase and lysine binding properties of natural and recombinant human plasminogens. *J. Clin. Invest.* 92, 249-254.

Diamandis, E.P., Okui, A., Mitsui, S., Luo, L.Y., Soosaipillai, A., Grass, L., Nakamura, T., Howarth, D.J., Yamaguchi, N. (2002). Human kallikrein 11: a new biomarker of prostate and ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 62(1), 295-300.

Dorn, J., Schmitt, M., Kates, R., Schmalfeldt, B., Kiechle, M., Scorilas, A., Diamandis, E.P., Harbeck, N. (2007). Primary tumor levels of human tissue kallikreins affect surgical success and survival in ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 13(6), 1742-1748.

Dwek R.A. (1995) Glycobiology: "towards understanding the function of sugars". *Biochem. Soc. Trans.* 23, 1-25.

Ensinck, J.W., Shepard, C., Dudl, R.J., Williams, R.H. (1972) Use of benzamidine as a proteolytic inhibitor in the radioimmunoassay of glucagons in plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35(3), 463-467.

Erickson-Lawrence, M., Zabludoff, S.D., Wright, W.W. (1991). Cyclic protein-2, a secretory product of rat Sertoli cells, is the proenzyme form of cathepsin L. *Mol. Endocrinol.* 5(12), 1789-1798.

Foekens, J. A., Ries, Ch., Look, M. P., Gippner-Steppert, C., Klijn J. G. M. and Jochum M. (2003). Elevated expression of polymorphonuclear leukocyte elastase in breast cancer tissue is associated with tamoxifen failure in patients with advanced disease. *Brit. J. Cancer* 88 (7), 1084-1090.

Frenette, G., Sullivan, R. (2001). Protasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol. Reprod. Dev.* 59(1), 115-121.

Frey, E.K., Kraut, H., Werle, E. (1968). *Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren.* Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

Furlong, L.I., Hellmann, U., Krimer, A., Tezon, J.G., Charreau, E.H., Vazquez-Levin, M.H. (2000). Expression of human proacrosin in *Echerichia coli* and binding to zona pellucida. *Biol. Reprod.* 62, 606-615.

Ghaddar, G., Ruchon AF, Carpentier M, Marcinkiewicz M, Seidah NG, Crine P, Desgroseillers L, Boileau G. (2000). Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family. *Biochem. J.* 347, 419-429.

Gonzales, G.F., Kortebani, G., Mazzolli, A.B. (1993). Hyperviscosity and hypofunction of the seminal vesicles. *Arch. Androl.* 30(1), 63-68.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA From Human Adenovirus Type 5. *J.Gen.Virol.* 36(1), 59-74.

Green, D. (2006). Coagulation cascade. *Hemodialysis Int.* 10, S2-S4.

Guillemette, C., Thabet, M., Dompierre, L., Sullivan, R. (1999). Some vasovasostomized men are characterized by low levels of P34H, an epididymal sperm protein. *J. Androl.* 20(2), 214-219.

Guruprasad, K., Reddy, B.V., Pandit, M.W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary structure. *Protein Engineering* 4 (2), 155-161.

- Habeck, L.L., Belagaje, R.M., Becker, G.W., Hale, J.E., Churgay, L.M., Ulmer, M., Yang, X.Y., Shackelford, K.A., Richardson, J.M., Johnson, M.G., Mendelsohn, L.G. (2001). Expression, purification, and characterization of active recombinant prostate-specific antigen in *Pichia pastoris* (yeast). *Prostate* 46(4), 298-306.
- Hanquier, J., sorlet, Y., Desplancq, D., baroche, L., Ebtinger, M., Lefevre, J.F., Pattus, F., Hershberger, C.L., Vertes, A.A. (2003) A single mutation in the activation site of bovine trypsinogen enhances its accumulation in the fermentation broth of the yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiology*. 69(2), 1108-1113.
- Heimark, R. L. and Davie, E. W. (1981). Bovine and human plasma prekallikrein. *Methods Enzymol.* 80, 157-172.
- Hinton, B.T., Palladino, M.A. (1995). Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech.* 30(1), 67-81.
- Honda, A., Yamagata, K., Sugiura, S., Watanabe, K., Baba, T. (2002). A mouse serine protease TESP5 is selectively included into lipid rafts of sperm membrane presumably as a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *J. Biol. Chem.* 277(19), 16976-16984.
- Hooper, J. D., Bowen, N., Marshall, H., Cullen, L. M., Sood, R., Daniels, R., Stuttgen, M. A., Normyle, J. F., Higgs, D. R., Kastner, D. L., Ogbourne, S. M., Pera, M. F., Jazwinska, E. C., and Antalis, T. M. (2000). Localization, expression and genomic structure of the gene encoding the human serine protease testisin. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 63-71.
- Hooper, J. D., Nicol, D. L., Dickinson, J. L., Eyre, H. J., Scarman, A. L., Normyle, J. F., Stuttgen, M. A., Douglas, M. L., Loveland, K. A., Sutherland, G. R., and Antalis, T. M. (1999). Testisin, a new human serine proteinase expressed by premeiotic testicular germ cells and lost in testicular germ cell tumors. *Cancer Res.* 59, 3199-3205.
- Huber, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer J., Steigemann, W. (1974). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 89, 73-101.
- Ilio, K.Y., Hess, R.A. (1994). Structure and function of the ductuli efferentes: a review. *Microsc. Res. Tech.* 29(6), 432-467.
- Jahic, M., Veide, A., Charoenrat, T., Teeri, T., Enfors, S. O. (2006). Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* 22, 1465-1473.
- Jin, L., Pandey, P., Babine R. E., Gorga, J. C., Seidl, K. J., Gelfand, E., Weaver, D. T., Abdel-Meguid, S. S. and Strickler, J. E. (2005) Crystal structures of the FXIa catalytic domain in the complex with ecotin mutants reveal substrate-like interactions. *J. Biol. Chem.* 280(6), 4704-4712.
- Joao H.C., Scragg I.G., Dwek R.A. (1992) Effects of glycosylation on protein conformation and amide proton exchange rates in RNase B. *FEBS Lett.* 307, 343-346.

- Jochum, M., Gippner-Steppert, C., Machleidt, W. and Fritz, H. (1994). The role of phagocyte proteinases and proteinase inhibitors in multiple organ failure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, 123-130.
- Johnsen, M., Lund, L. R., Romer, J., Almholt, K., and Dano, K. (1998). Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 667-671.
- Jones, R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 73-84.
- Jones, R. (2004). Sperm survival versus degradation in the Mammalian epididymis: a hypothesis. *Biol. Reprod.* 71(5), 1405-1411.
- Junqueira, L. C, Carneiro, J. (1996). *Histologie*. Springer Verlag, 4. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York.
- Kane, J.F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Cur. Op. Biotechnology.* 6, 494-500.
- Kirchhoff, C. (1996). CD52 is the 'major maturation-associated' sperm membrane antigen. *Mol. Hum. Reprod.* 2(1), 9-17.
- Kirchhoff, C., Hale, G. (1996). Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol. Hum. Reprod.* 2(3), 177-184.
- Klemm, U., Müller-Esterl, W. and Engel, W. (1991). Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease. *Hum. Genet.* 87, 635-641.
- Kochetov, A.V., Sarai, A., Rogozin, I.B., Shumny, V.K., Kolchanov, N.A. (2005). The role of alternative translation start sites in the generation of human protein diversity. *Mol. Gen. Genomics.* 273, 491-496
- Kondoh, G., Tojo, H., Nakatani, Y., Komazawa, N., Murata, C., Yamagata, K., Maeda, Y., Kinoshita, T., Okabe, M., taguchi, R., Takeda, J. (2005). Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nature Medicine*, 11(2), 160-166.
- Krieger, M., Kay, L.M., Stroud, R.M. (1974). Structure and specific binding of trypsin: comparison of inhibited derivatives and a model for substrate binding. *J. Mol. Biol.* 83(2), 209-230.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Légaré, C., Bérubé, B., Boué, F., Lefièvre, L., Morales, C.R., El-Alfy, M., Sullivan, R. (1999). Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol. Reprod. Dev.* 52(2), 225-233.
- Lilja, H., Oldbring, J., Rannevik, G., Laurell, C.B. (1987). Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J. Clin. Invest.* 80(2), 281-285.

- Lilja, H., Laurell, C.B. (1984). Liquefaction of coagulated human semen. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 44(5), 447-452.
- Löffler, G und Petrides P. E. (1997). *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Verlag, 5. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York.
- Longin, J., Guillaumotm P., Chauvinm M.A., Moreram A.M., Le Magueresse-Battistonim, B. (2001). MT1-MMP in rat testicular development and the control of Sertoli cell proMMP-2 activation. *J. Cell Sci.* 114, 2125-2134.
- Luo, L.Y., Bunting, P., Scorilas, A., Diamandis, E.P. (2001). Human kallikrein 10: a novel tumor marker for ovarian carcinoma? *Clin. Chim. Acta.* 306(1-2), 111-118.
- Luo, L.Y., Yousef, G., Diamandis, E. (2003). Human tissue kallikreins and testicular cancer. *APMIS* 111, 225-233.
- Luo, L.Y., Shan, S.J., Elliott, M.B., Soosaipillai, A., Diamandis, E.P. (2006). Purification and characterization of human kallikrein 11, a candidate prostate and ovarian cancer biomarker, from seminal plasma. *Clin. Cancer Res.* 12(3 Pt 1), 742-750.
- Lwaleed, B.A., Greenfield, R., Stewart, A., Birch, B., Cooper, A.J.(2004) Seminal clotting and fibrinolytic balance: a possible physiological role in the male reproductive system. *Thromb. Haemost.* 92(4), 752-766.
- Lwaleed, B.A., Goyal, A., Delves, G.H., Cooper, A.J. (2007). Seminal hemostatic factors: then and now. *Semin. Thromb. Hemost.* 33(1), 3-12.
- Martin-DeLeon, P.A. (2006). Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 250, 114-121.
- Mbikay, M., Tadros, H., Ishida, N., Lerner, C.P., De Lamirande, E., Chen, A., El-Alfy, M., Clermont, Y., Seidah, N.G., Chrétien, M., Gagnon, C., Simpson, E.M. (1997). Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(13), 6842-6846.
- Mason K.E., Shaver, S.L. (1952). Some functions of the caput epididymis. *Ann. NY Acad. Sci.* 55(4), 585-593.
- McMuellen, B. A., Fujikawa, K, and Davie, E. W. (1991a). Location of the disulfide bonds in human plasma prekallikrein: the presence of four novel apple domains in the amino-terminal portion of the molecule. *Biochemistry* 30(8), 2050-2056.
- McMuellen, B. A., Fujikawa, K, and Davie, E. W. (1991b). Location of the disulfide bonds in human coagulation factor XI: the presence of tandem apple domains. *Biochemistry* 30(8), 2056-2060.
- Métayer, S., Dacheux, F., Dacheux, J.L., Gatti, J.L. (2002). Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biol. Reprod.* 66(5), 1219-1229.

- Nakayama, K. (1997). Furin: A mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* 327, 625-635.
- Netzel-Arnett, S., Hooper, J.D., Szabo, R., Madison, E.L., Quigley, J.P., Bugge, T.H., and Antalis, T.M. (2003). Membrane-anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 22, 237-258.
- Okamura N, Tamba M, Uchiyama Y, Sugita Y, Dacheux F, Syntin P, Dacheux JL. (1995). Direct evidence for the elevated synthesis and secretion of procathepsin L in the distal caput epididymis of boar. *Biochim. Biophys. Acta.* 1245(2), 221-226
- Olsson, A.Y., Bjartell, A., Lundwall, A. (2004). Expression of prostate-specific antigen (PSA) and human glandular kallikrein 2 (hK2) in ileum and other extraprostatic tissues. *Int. J. Cancer* 113(2), 290-297.
- Owen, D.H., Katz, D.F. (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J. Androl.* 26(4), 459-469.
- Parent, S., Brindle, Y., Sullivan, R. (1999). Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. *Mol. Reprod. Dev.* 52, 57-65.
- Pelouille, S., Esnard, A., Dacheux, J.L., Guillou, F., Gauthier, F., Esnard, F. (1997). Interactions between ovine cathepsin L, cystatin C and alpha 2-macroglobulin. Potential role in the genital tract. *Eur. J. Biochem.* 244(1), 140-146.
- Petraki, C.D., Karavana, V.N., Luo, L.Y., Diamandis, E.P. (2002). Human kallikrein 10 expression in normal tissues by immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 50(9), 1247-1261.
- Petraki, C.D., Karavana, V.N., Diamandis, E.P. (2003). Human kallikrein 13 expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 51(4), 493-501.
- Polak, B., Daunter, B. (1989). Seminal plasma biochemistry. IV: Enzymes involved in the liquefaction of human seminal plasma. *Int. J. Androl.* 12(3), 187-194.
- Polgar, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2161-2172.
- Primakoff, P., Myles, D.G. (2002). Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296(5576), 2183-2185.
- Raczek, S., Yeung, C.H., Hasilik, A., Robenek, H., Hertle, L., Schulze, H., Cooper, T.G. (1995). Immunocytochemical localisation of some lysosomal hydrolases, their presence in luminal fluid and their directional secretion by human epididymal cells in culture. *Cell Tissue Res.* 280(2), 415-425.
- Rawlings, N. D. and Barrett, A. J. (1994). Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* 244, 19-61.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P. and Barrett, A. J. (2004) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 32, D160-D164.

- Reuning, U., Sperl, S., Kopitz, C., Kessler, H., Krüger, A., Schmitt, M. and Magdolen, V. (2003). Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): development of antagonists of uPA/uPAR interaction and their effects in vitro and in vivo. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1529-1543.
- Robaire, B., Hinton, B.T. (2002). *The epididymis. From molecules to clinical practice.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Robinson, L.L., Sznajder, N.A., Riley, S.C., Anderson, R.A. (2001). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. *Mol. Hum. Reprod.* 7(7), 641-648.
- Rockwell, N. C., Krysan, D. J., Komiyama, T., and Fuller, R. S. (2002). Precursor processing by Kex2/Furin proteases. *Chem. Rev.* 102, 4525-4548.
- Rudd P.M., Woods R.J., Wormald M.R., Opdenakker G., Downing A.K., Campbell I.D., Dwek R.A. (1995). The effects of variable glycosylation on the functional activities of ribonuclease, plasminogen and tissue plasminogen activator. *Biochim. Biophys. Acta* 1248, 1-10.
- Sanger, F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (12), 5463-5467.
- Saedi, M.S., Cass, M.M., Goel, A.S., Grauer L., Hogren, K.L., Okaneya, T., Griffin, B., Klee, G.G., Young, C.Y., Tindall, D.J. (1995). Overexpression of human prostate-specific glandular kallikrein, hK2, in *E. coli* and generation of antibodies. *Mol. Cell. Endocrinology* 109, 237-241.
- Shaffer, P.L., Jilvan, A., Dollins, D.E., Claessens, F., Gewirth, D.T. (2004). Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *PNAS* 101(14), 4758-4763.
- Shetty, J., Wolkowicz, M.J., Digilio, L.C., Klotz, K.L., Jayes, F.L., Diekman, A.B., Westbrook, A., Farris, E.M., Hao, Z., Coonrod, S.A., Flickinger, C.J., Herr, J.C. (2003). SAMP14, a novel, acrosomal membrane-associated, glycosylphosphatidylinositol-anchored member of the Ly-6/urokinase-type plasminogen activator receptor superfamily with a role in sperm-egg interaction. *J. Biol. Chem.* 278, 33, 30506-30515.
- Scorilas, A., Borgono, C.A., Harbeck, N., Dorn, J., Schmalfeldt, B., Schmitt, M., Diamandis, E.P. (2004). Human kallikrein 13 protein in ovarian cancer cytosols: a new favorable prognostic marker. *J. Clin. Oncol.* 22(4), 678-685.
- Singh, S.M., Panda, A.K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion bodies. *J. Biosc. Bioeng.* 99(4), 303-310.
- Stephan, C, Cammann, H., Meyer, S., Lein, M., Jung, K. (2007). PSA and new biomarkers within multivariate models to improve early detection of prostate cancer. *Cancer Lett.* 249 (1), 18-29.
- Steuber, T., Pauliina, H., Lilja, H. (2007). Circulating biomarkers for prostate cancer. *World J. Urol.* 25, 111-119.

- Stumvoll M., Goldstein B. J., van Haeften T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365 (9467): 1333-1346.
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., Frenette, G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol. Dis.* 35(1), 1-10.
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L. *Biochemie*. 5. Auflage 2002, Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg, Berlin.
- Takayama, T.K., McMullen, B.A., Nelson, P.S., Matsumura, M., Fujikawa, K. (2001). Characterization of hK4 (prostate), a prostate specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry*, 40 (50), 15341-15348.
- Tang, J., Yu, C.L., Williams, S.R., Springman, E., Jeffery, D., Sprengeler, P.A., Estevez, A., Sampang, J., Shrader, W., Spencer, J., Young, W., McGrath, M., Katz, B.A. (2005). Expression, crystallization, and three-dimensional structure of the catalytic domain of human plasma kallikrein. *J. Biol. Chem.* 280(49), 41077-41089.
- Tang, T., Kmet, M., Corral, L. Vartanian S., Tobler, A. and Papkoff, J. (2005). Testisin, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked serine protease, promotes malignant transformation in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 65 (3), 868-878.
- Takeda, J. and Kinoshita, T. (1995). GPI-anchor biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 20 (9), 367-371.
- Thaler, C.D., Cardullo, R.A. (1995). Biochemical characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked hyaluronidase on mouse sperm. *Biochemistry*. 34(24), 7788-7795.
- Thimon, V., Métayer, S., Belghazi, M., Dacheux, F., Dacheux, J.L., Gatti, J.L. (2005). Shedding of the germinal angiotensin I-converting enzyme (gACE) involves a serine protease and is activated by epididymal fluid. *Biol. Reprod.* 73, 881-890.
- Trombetta, E.S., Parodi, A. J. (2003). Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19, 649-676.
- Tulsiani, D.R. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 250(1-2), 58-65.
- Uhrin, P., Dewerchin, M., Hilpert, M., Chrenek, P., Schofer, C., Zechmeister-Machhart, M., Kronke, G., Vales, A., Carmeliet, P., Binder, B.R., Geiger, M. (2000). Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility. *J. Clin. Invest.* 106(12), 1531-1539.
- Wallin, R., Stanton, C., Ross, R.P. (1994). Intracellular proteolytic processing of the two-chain vitamin K-dependent coagulation factor X. *Thromb. Res.* 73, 395-403.
- Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., Chu, T.M. (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol.* 17(2), 159-163.

- Wasley, L.C., Rehemtulla, A., Bristol, J.A., Kaufmann, R.J (1993). PACE/furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 268, 8458-8465.
- Waydhas, Ch., Nast-Kalb, D., Trupka, A., Zettl, R., Kick, M., Wiesholler, J., Schweiberer, L. and Jochum, M. (1996). Posttraumatic inflammatory response, secondary operations, and late multiple organ failure. *J. Trauma* 40 (4), 624-630.
- Whitcomb, D.C., Lowe, M.E. (2007). Human pancreatic digestive enzymes. *Dig. Dis. Sci.* 52, 1-17.
- Wittwer A.J., Howard S.C., Carr L.S., Harakas N.K., Feder J., Parekh R.B., Rudd P.M., Dwek R.A., Rademacher T.W. (1989). Effects of N-glycosylation on in vitro activity of Bowes melanoma and human colon fibroblast derived tissue plasminogen activator. *Biochemistry* 28, 7662-7669.
- World Health Organization (WHO), ed. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. New York, NY: Cambridge University Press; 1999.
- Wormald, M.R., Dwek, R.A. (1999). Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure.* 7(7), R155-160.
- Yeung, C.H., Schroter, S., Wagenfeld, A., Kirchhoff, C., Kliesch, S., Poser, D., Weinbauer, G.F., Nieschlag, E., Cooper, T.G. (1997). Interaction of the human epididymal protein CD52 (HE5) with epididymal spermatozoa from men and cynomolgus monkeys. *Mol. Reprod. Dev.* 48(2), 267-275.
- Yousef, G. M. and Diamandis E. P. (2001). The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocrin. Rev.* 22, 184-204.
- Yousef, G.M. and Diamandis, E.P. (2003a). Human kallikreins: Common structural features, sequence analysis and evolution. *Current Genomics* 4, 147-165.
- Yousef, G. M. and Diamandis, E. P. (2003b). An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers. *Clin. Biochem.* 36, 443-452.
- Yousef, G. M., Elliott, M. B., Kopolovic, A. D., Serry, E., and Diamandis, E. P. (2004). Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1698, 77-86.
- Yu, J. X., Chao, L., and Chao, J. (1994). Prostasin is a novel human serine proteinase from seminal fluid. *J. Biol. Chem.* 269 (29), 18843-18848.
- Yu, J. X., Chao, L., and Chao, J. (1995). Molecular cloning, tissue-specific expression, and cellular localization of human prostasin mRNA. *J. Biol. Chem.* 270, 13483-13489.
- Zhang, H., Martin-Deleon, P.A. (2003). Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J. Androl.* 24(1), 51-58.

G Anhang

Nukleotidsequenz der drei Spleißvarianten T-GPI-SP1-1, T-GPI-SP1-2 und T-GPI-SP1-3.

Die Exon-umspannenden Bereiche sind eingezeichnet, die Polyadenylierungssignale sind fett und unterstrichen dargestellt. T-GPI-SP1-1 umfasst die Exons 1, 2, 3, 4 und 6, T-GPI-SP1-2 die Exons 1, 2, 3, 4 und 7 und T-GPI-SP1-3 die Exons 1, 2, 3, 4, 5 und 7.

```

T-GPI-SP1-1      1  attgtgacat cacttggggg ctctggatct gagctggagg ctctcagcct cactgcctca gccctggcct ctgtcaccoc
T-GPI-SP1-2      1  attgtgacat cacttggggg ctctggatct gagctggagg ctctcagcct cactgcctca gccctggcct ctgtcaccoc
T-GPI-SP1-3      1  attgtgacat cacttggggg ctctggatct gagctggagg ctctcagcct cactgcctca gccctggcct ctgtcaccoc

>.....Exon 1.....

T-GPI-SP1-1      81  cgggcccaca gcacagccca gggccatgct cctgttctca gtgttgctgc tcctgtccct ggtcacggga actcagctcg
T-GPI-SP1-2      81  cgggcccaca gcacagccca gggccatgct cctgttctca gtgttgctgc tcctgtccct ggtcacggga actcagctcg
T-GPI-SP1-3      81  cgggcccaca gcacagccca gggccatgct cctgttctca gtgttgctgc tcctgtccct ggtcacggga actcagctcg

..... Exon 1.....

T-GPI-SP1-1     161  gtccacggac tcctctocca gaggctggag tggctatcct aggcagggct aggggagccc accgccctca gccccgtcat
T-GPI-SP1-2     161  gtccacggac tcctctocca gaggctggag tggctatcct aggcagggct aggggagccc accgccctca gccccgtcat
T-GPI-SP1-3     161  gtccacggac tcctctocca gaggctggag tggctatcct aggcagggct aggggagccc accgccctca gccccgtcat

.....Exon 1.....

T-GPI-SP1-1     241  cccccagcc cagtcagtga atgtggtgac agatctatct tcgaggggaag aactcggtat tccagaatca caggggggat
T-GPI-SP1-1     241  cccccagcc cagtcagtga atgtggtgac agatctatct tcgaggggaag aactcggtat tccagaatca caggggggat
T-GPI-SP1-1     241  cccccagcc cagtcagtga atgtggtgac agatctatct tcgaggggaag aactcggtat tccagaatca caggggggat

.....>
>.....Exon 2.....

T-GPI-SP1-1     321  ggaggcggag gtgggtgagt ttccgtggca ggtgagtatt caggcaagaa gtgaaccttt ctgtggcggc tccatctca
T-GPI-SP1-2     321  ggaggcggag gtgggtgagt ttccgtggca ggtgagtatt caggcaagaa gtgaaccttt ctgtggcggc tccatctca
T-GPI-SP1-3     321  ggaggcggag gtgggtgagt ttccgtggca ggtgagtatt caggcaagaa gtgaaccttt ctgtggcggc tccatctca

.....Exon 2.....

T-GPI-SP1-1     401  acaagtggg gattctcaact gcggctcaact gtttatattc cgaggagctg ttccagaag aactgagtgt cgtgctgggg
T-GPI-SP1-2     401  acaagtggg gattctcaact gcggctcaact gtttatattc cgaggagctg ttccagaag aactgagtgt cgtgctgggg
T-GPI-SP1-3     401  acaagtggg gattctcaact gcggctcaact gtttatattc cgaggagctg ttccagaag aactgagtgt cgtgctgggg

..... Exon 2.....>
>.....Exon 3.....

T-GPI-SP1-1     491  accaacgact taactagccc atccatggaa ataaaggagg tcgccagcat cattcttcaac aaagacttta agagagccaa
T-GPI-SP1-2     491  accaacgact taactagccc atccatggaa ataaaggagg tcgccagcat cattcttcaac aaagacttta agagagccaa
T-GPI-SP1-3     491  accaacgact taactagccc atccatggaa ataaaggagg tcgccagcat cattcttcaac aaagacttta agagagccaa

.....Exon 3.....

T-GPI-SP1-1     521  catggacaat gacattgcct tgctgtgctt ggcttcgccc atcaagctcg atgacctgaa ggtgcccatc tgcctcccca
T-GPI-SP1-2     521  catggacaat gacattgcct tgctgtgctt ggcttcgccc atcaagctcg atgacctgaa ggtgcccatc tgcctcccca
T-GPI-SP1-3     521  catggacaat gacattgcct tgctgtgctt ggcttcgccc atcaagctcg atgacctgaa ggtgcccatc tgcctcccca

.....Exon 3.....

T-GPI-SP1-1     601  cgcagcccgg ccttgccaca tggccgcaat gctgggtggc aggttggggc cagaccaatg ctgctgacaa aaactctgtg
T-GPI-SP1-2     601  cgcagcccgg ccttgccaca tggccgcaat gctgggtggc aggttggggc cagaccaatg ctgctgacaa aaactctgtg
T-GPI-SP1-3     601  cgcagcccgg ccttgccaca tggccgcaat gctgggtggc aggttggggc cagaccaatg ctgctgacaa aaactctgtg

.....Exon 3.....>
>.....Exon 4.....

T-GPI-SP1-1     691  aaaacggatc tgatgaaagt gccaatggct atcatggact gggaggagtg ttcaaagatg tttccaaaac ttacaaaaaa
T-GPI-SP1-2     691  aaaacggatc tgatgaaagt gccaatggct atcatggact gggaggagtg ttcaaagatg tttccaaaac ttacaaaaaa
T-GPI-SP1-3     691  aaaacggatc tgatgaaagt gccaatggct atcatggact gggaggagtg ttcaaagatg tttccaaaac ttacaaaaaa

.....Exon 4.....

T-GPI-SP1-1     771  tatgctgtgt gccggataca agaatgagag ctatgatgcc tgcaag-----
T-GPI-SP1-2     771  tatgctgtgt gccggataca agaatgagag ctatgatgcc tgcaag-----
T-GPI-SP1-3     771  tatgctgtgt gccggataca agaatgagag ctatgatgcc tgcaagtcaac ctctcaagga teatggaatg agacatcatc

.....Exon 4.....>
>.....Exon 5.....

```

```

T-GPI-SP1-1      817 -----ggt gacagtggg ggcctctggt ctgcacccca
T-GPI-SP1-1      -----
T-GPI-SP1-1      851 tetccaactga agactgcttg caaggttgta gctgctcagc tcctttg-----
      .....Exon 5.....>
      >.....Exon 6.....

T-GPI-SP1-1      851 gagcctgggtg agaagtggta ccaggtgggc atcctcagct ggggaaagag ctgtggagag aagaacccc cagggatata
T-GPI-SP1-2      -----
T-GPI-SP1-3      -----
      .....Exon 6.....

T-GPI-SP1-1      931 cacctcgttg gtgaactaca acctctggat cgagaaagtg acccagctag agggcaggcc ctccaatgca gagaaaagga
T-GPI-SP1-2      -----
T-GPI-SP1-3      -----
      .....Exon 6.....

T-GPI-SP1-1      1011 ggacttctgt caaacagaaa cctatgggct cccagctctc gggagtccca gagccaggca gcccagatc ctggctcctg
T-GPI-SP1-2      -----
T-GPI-SP1-3      -----
      .....Exon 6.....

T-GPI-SP1-1      1091 ctctgtccc tgtcccattgt gttgttcaga gctatctgt actgataaata aaatagaggc tattctttca accgag----
T-GPI-SP1-2      817 -----caaa
T-GPI-SP1-3      898 -----caaa
      .....Exon 6.....>
      >...

T-GPI-SP1-1      -----
T-GPI-SP1-2      821 gctatcttcc cactttacaa agaatgaaca ccggaagctc tcaaacaaag ccgcctgggt ctcacacctt tcatctgcaa
T-GPI-SP1-3      902 gctatcttcc cactttacaa agaatgaaca ccggaagctc tcaaacaaag ccgcctgggt ctcacacctt tcatctgcaa
      .....Exon 7.....

T-GPI-SP1-1      -----
T-GPI-SP1-2      901 aactgatgct ttgctcttcc ttctacatgg agccattttt ggggcagaaa acataccctt gggcatagcc ttgagttgaa
T-GPI-SP1-3      982 aactgatgct ttgctcttcc ttctacatgg agccattttt ggggcagaaa acataccctt gggcatagcc ttgagttgaa
      .....Exon 7.....

T-GPI-SP1-1      -----
T-GPI-SP1-2      981 aatctttgag ggtgttttct gtccaaatga ctgaaaaaat gaataaaagc ctccccattt tcatgatgct t
T-GPI-SP1-3      1062 aatctttgag ggtgttttct gtccaaatga ctgaaaaaat gaataaaagc ctccccattt tcatgatgct t
      .....Exon 7.....>

```

H Lebenslauf

Persönliche Daten und Lebenslauf

Name: Birgit Profanter, Diplom-Biologin
 Wohnort: Schondorf am Ammersee
 Geburtsdatum und -ort: 26.02.1977 in München
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulbildung

Sept. 1984 – Juli 1988 Besuch der Grundschule an der Grandlstraße in München
 Sept. 1988 – Juli 1997 Besuch des Gymnasiums der Englischen Fräulein an der Maria-Ward-Straße in München
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Nov. 1997 – Juni 2003 Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt am Gymnasium an der LMU München
 Abschluss: 1. Staatsexamen

Mai 2000 – Jan. 2002 Diplomarbeit am Botanischen Institut der LMU München
 Betreuung: Dr. Rainer Maier und Prof. Dr. Reinhold G. Herrmann
 Thema: *Analyse differentieller NEP- und PEP-Promotor-nutzungen am Beispiel des Operons *psaA/psaB/rps14* sowie dessen Regulation auf posttranskriptioneller und posttranslationeller Ebene*

Juni 2003 – Dez. 2003 Hauptdiplomprüfung in Biologie
 Hauptfach: Physiologische Botanik

seit Okt. 2003 Promotion in der Abteilung Klinische Chemie und Klinische Biochemie am Klinikum der LMU München
 Betreuung: Dr. Peter Neth und Prof. Dr. Marianne Jochum
 und am Institut für Pharmazeutische Biologie I der LMU München
 Betreuung: Prof. Dr. Angelika Vollmar
 Thema: *Klonierung, rekombinante Expression und erste Charakterisierung des humanen hodenspezifischen Serinprotease-ähnlichen Proteins T-GPI-SP1*

Veröffentlichungen

- Publikationen
- Legen, J., Kemp, S., Krause, K., **Profanter, B.**, Herrmann, R. G. and Maier, R. M.
Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries
 The Plant Journal 2002, 31(2), 171-188
- Neth, P.*, **Profanter, B.***, Geißler, C., Sommerhoff, C. P., Nögler, D. and Jochum, M.
T-GPI-SP1 – A novel serine protease selectively expressed in testis (eingereicht) * gleichberechtigte Erstautorenschaft
- Vorträge
- Vortrag auf dem Meeting „Winter School on Proteinases“ in Tiers, Südtirol (2. – 6. März 2005)
Cloning, expression and initial characterization of T-GPI-SP1 – A novel serine protease expressed in testis
- Vortrag auf dem „1st International Symposium on Kallikreins“ in Lausanne, Schweiz (1. – 3. September 2005)
Cloning, expression and molecular characterization of T-GPI-SP1 – A kallikrein-like serine protease expressed in testis

Praktika und Lehrerfahrung

- Juli 1997 – Sept. 1997
- Freiwilliges Praktikum am Institut für Genetik und Mikrobiologie der LMU München
 Hilfskraft bei der Identifizierung und molekularen Charakterisierung von Pathogenitätsmutanten von *Ustilago maydis*
- Sept. 1999 – Okt. 2001
- Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Botanischen Institut der LMU München
 Molekularbiologische Analyse plastidärer Genome und Transkriptionsanalysen
- Mai 2000 – April 2001
- Betreuung von Biologiestudenten im Pflanzenphysiologischen Praktikum am Botanischen Institut der LMU München
- März 2005 – Juli 2005
- Individuelle Betreuung eines Studenten der Biotechnologie im Rahmen seines ersten praktischen Semesters in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der LMU München
- März 2006 – März 2007
- Planung und Durchführung eines Biochemie-Praktikums in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie für 4 Pharmaziestudierende
- Okt. 2003 – März 2007
- Betreuung von Studenten der Medizin im Praktikum „Klinische Chemie und Hämatologie“

I Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität in München angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt der Leiterin der Abteilung, Frau Prof. Dr. Marianne Jochum, für die Überlassung des interessanten Themas, die großzügige finanzielle und fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie der Erstellung der Promotionschrift.

Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar danke ich sehr für die Betreuung seitens der Fakultät für Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München und für die Möglichkeit der Teilnahme an den Seminaren ihres Arbeitskreises.

Danken möchte ich vor allem auch meinem Betreuer Dr. Peter Neth (Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie) für seine fachliche Unterstützung durch zahlreiche Anregungen und interessante Diskussionen, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank geht zudem an Herrn Prof. Dr. Christian Sommerhoff (Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie) für seine hervorragenden fachlichen Anregungen und sein Geleit während dieser Arbeit.

Ebenso sei an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Bernhard Schill (Zentrum für Dermatologie und Andrologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) und Herrn Prof. Dr. Andreas Nerlich (Institut für Pathologie des Krankenhauses Bogenhausen) für ihre fachliche Unterstützung bezüglich der histologischen Fragestellungen in dem Projekt und Frau Dr. Dorit Nägler (Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie) für ihre kompetente Unterstützung bei der Entwicklung der dreidimensionalen Modelle gedankt.

Mein Dank geht auch an Herrn Reinhardt Mentele (Institut für Biochemie MPI, Martinsried) für die Durchführung der Aminosäuresequenzierung, an Herrn Prof. Dr. Werner Machleidt und Frau Dr. Irmgard Machleidt (Adolf-Butenandt-Institut, LMU München) für ihre Unterstützung und an Herrn Dr. Peter Scheuber (Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie) für die Hilfe bei der Durchführung der Immunisierungen.

Meinen jetzigen und früheren Kollegen in unserer Arbeitsgruppe, Marisa Karow, Claudia Geißler, Matthias Illmer, Marei Drechsel, Jürgen Hölter, Marcus Beißner, Josef Steckenbiller, Boris Rodriguez, Juliana Maiostre, Thomas Kolben, Lourdes Ruiz Heinrich und Ruza Hell möchte ich ganz herzlich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die fachlichen Diskussionen danken.

Ebenso bin ich Frau Karola Rügamer-Biese und Frau Evi Themel für ihre stets freundliche Hilfe in verwaltungstechnischen Fragen sehr verbunden.

Nicht zuletzt gilt natürlich mein herzlichster Dank meinen Eltern, die mich in all den Jahren unterstützt haben. Mein besonderer und allerliebster Dank geht an Peter für seine Begleitung während dieser Arbeit und seine stetigen Ermutigungen. Ich hoffe, dass wir noch viele kleine und große Herausforderungen zusammen bestehen werden.