

**Identifizierung und Charakterisierung
von neuen Proteinen der Haut
mittels eines Panels monoklonaler Antikörper**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Anja Geiger
aus Rösrath

Rösrath 2001

Berichterstatter: Prof. Dr. Mats Paulsson
Prof. Dr. Dietmar Schomburg

Tag der mündlichen Prüfung: 2.Juli 2001

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
I Einleitung	3
1.1 Haut	3
1.2 Epithel- und Bindegewebe	5
1.2.1 Zell-Zell-Adhäsion	6
1.2.2 Integrine	7
1.3 Extrazelluläre Matrix	7
1.3.1 Glykosaminoglykane	8
1.3.2 Fibrilläre Proteine	9
1.3.3 Adhäsionsproteine	10
1.4 Wundheilung	11
1.5 Auf der Suche nach neuen Proteinen	12
1.6 Identifizierung von Proteinen mittels monoklonaler Antikörper	14
II Zielsetzung	16
III Ergebnisse	17
3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein komplexes Gemisch dermalen Proteine	19
3.2 Charakterisierung der Antikörper	23
3.3 Durchmustern einer Haut-Expressions-cDNA-Bibliothek	29
3.4 Aufreinigung und Identifizierung des 4B2-Antigens	31
3.5 Gewebeverteilung von AHNAK	42
3.5.1 Analyse von Gewebe-Extrakten	42
3.5.2 Immunfluoreszenz	43
3.5.3 Lokalisierung von AHNAK in adulter humaner Haut	49
3.5.4 Analyse der endogenen Expression von AHNAK in verschiedenen Zelllinien	50
3.6 Funktionsstudien von AHNAK	52
3.6.1 Doppel-Immunfluoreszenz mit AHNAK und β -Catenin bzw. Cadherin	52

3.6.2	Calcium-abhängige Lokalisation	53
3.6.3	Zell-Fraktionierung	56
3.6.4	Suche nach Bindungspartnern – Co-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen β -Catenin	58
3.7	Aufreinigung und Identifizierung des 8F10-Antigens	59
3.8	Charakterisierung des 8F10-Antigens	65
3.8.1	Gewebeverteilung des 8F10-Antigens	65
3.8.2	Endogene Expression in verschiedenen Zelltypen	68
3.8.3	Analyse der Glykosylierung des bovinen 8F10-Antigens	70
IV	Diskussion	72
4.1	Herstellung eines Panels monoklonaler Antikörper gegen Haut-Proteine	72
4.2	Isolierung und Identifizierung von AHNAK	75
4.3	AHNAK ist das Antigen für den monoklonalen Antikörper 4B2.	77
4.4	AHNAK wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und durch verschiedene Zelltypen produziert	78
4.5	AHNAK wird in humaner Haut hauptsächlich in der Epidermis und in Blutgefäßen exprimiert	79
4.6	AHNAK ist in epithelialen Zellen hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert	79
4.7	Die Lokalisierung von AHNAK in Epithelzellen ist von den Kultivierungsbedingungen abhängig	81
4.8	Das 8F10-Antigen ist in hohem Maße heterogen.	83
4.9	Das 8F10-Antigen wird nur in bestimmten Geweben exprimiert und von epithelialen Zellen exprimiert	85
4.10	Ausblick	86
V	Material und Methoden	88
5.1	Reagenzien, allgemeine Lösungen und Puffer	88
5.2	Herstellung eines Protein-Pools aus Maus-Haut zur Immunisierung	89
5.3	Herstellung monoklonaler Antikörper	89
5.3.1	Immunisierungsschema	89
5.3.2	Herstellung von Feeder-Layern	90
5.3.3	Präparation der Milzzellen und Zellfusion	90

5.3.4	Selektion der Hybridomzellen	91
5.3.5	Hybridomanalyse	91
5.3.6	Klonierung und Reklonierung	91
5.3.7	Kultur der Hybridome	92
5.3.8	Typisierung der Antikörper	92
5.3.9	Reinigung monoklonaler Antikörper	92
5.4	Durchmustern einer Expressions-Bibliothek	93
5.4.1	Ausplattieren der Bibliothek	93
5.4.2	Transfer der Phagenplaques auf Filter	93
5.4.3	Analyse der Bibliothek mittels monoklonaler Antikörper	93
5.5	Zellkultur	94
5.5.1	Verwendete Zelllinien	94
5.5.2	Inkubationsbedingungen und Medium	94
5.5.3	Vereinzeln	94
5.5.4	Lagerung	95
5.5.5	Ernte	95
5.6	Immunhistologische Arbeiten	95
5.6.1	Verwendete Antikörper	95
5.6.2	Immunhistochemie auf Gewebe	95
5.6.3	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen und auf Gewebe	96
5.7	Proteinchemische Arbeiten	97
5.7.1	Ionenaustauscher	97
5.7.2	Gelfiltration	99
5.7.3	Affinitätsreinigung mittels Antikörper	100
5.7.4	Proteinextraktion aus Gewebe	101
5.7.5	Proteinextraktion aus Zellen	101
5.7.6	Zell-Fraktionierung	101
5.7.7	ELISA	102
5.8	Allgemeine Proteinchemische Verfahren	102
5.8.1	Proteinfällung mit Ethanol	102
5.8.2	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	103
5.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	103
5.8.4	Coomassie Blue-Färbung	104
5.8.5	Silber-Färbung	104

5.8.6	Immunoblot	104
5.9	Proteinidentifizierung	105
5.9.1	Probenvorbereitung	105
5.9.2	Analyse der Peptide	106
5.9.3	Vergleich mit Datenbanken	106
5.10	Protein-Charakterisierung	107
5.10.1	Analyse der Glykosylierung mittels enzymatischem Verdau	107
5.10.2	Chemische Entfernung aller O-Glykoside	107
VI	Literatur	108
	Verzeichnis der Abkürzungen	115
	Danksagung	116
	Erklärung	117
	Summary	118
	Lebenslauf	119

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Panel monoklonaler Antikörper gegen Hautbestandteile hergestellt und zur Identifizierung und Charakterisierung der korrespondierenden Antigene eingesetzt.

Durch die Verwendung junger Maushaut ist es gelungen, eine komplexe Mischung verschiedenster Proteine unter schonenden nativen Bedingungen aus dem Gewebe zu isolieren. Die Immunisierung von zwei Ratten mit der so hergestellten Proteinlösung führte in zwei unabhängigen Fusionen zu einer beträchtlichen Zahl monoklonaler Antikörper, welche nach einer ersten Charakterisierung zur Identifizierung der entsprechenden Antigene zur Verfügung stehen.

Der monoklonale Antikörper 4B2 wurde zur Anreicherung des korrespondierenden Antigens aus Hautextrakt verwendet. Die massenspektrometrische Sequenzierung mittels Q-TOF führte zur Identifizierung von AHNAK.

AHNAK ist ein extrem großes intrazelluläres Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 680 kDa.

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers wurde die Proteinlokalisierung in embryonalem und adultem Gewebe untersucht. AHNAK ist ein sehr breit exprimiertes Protein. Die stärkste Expression findet man in epithelialen und endothelialen Geweben.

AHNAK wird von Epithelzellen, Keratinozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, und Myoblasten exprimiert. Das Protein ist in epithelialen Zellen vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert, meistens kann jedoch zudem eine cytoplasmatische und leicht nukleäre Verteilung beobachtet werden. Auch in nicht-epithelialen Zellen wurde AHNAK nach subzellulärer Fraktionierung hauptsächlich in der Membranfraktion nachgewiesen, obwohl in der Literatur eine cytoplasmatische Verteilung beschrieben wird. In Abhängigkeit von der analysierten Zelllinie konnte AHNAK in der Cytoplasma- und Membranfraktion nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenzfärbung konnte eine Kollokalisierung von AHNAK mit Cadherin als auch mit β -Catenin in Keratinozyten gezeigt werden. In beiden Fällen konnte eine übereinstimmend Verteilung der Proteine festgestellt werden. AHNAK und β -Catenin zeigten zudem unter modifizierten Kultivierungsbedingungen, d.h. nach der Reduktion der extrazellulären Calciumkonzentration, eine Translokation von der Plasmamembran zum Cytoplasma. Diese Translokation konnte in beiden Fällen durch Zugabe von Calcium wieder

rückgängig gemacht werden. Eine direkte Bindung von AHNAK an β -Catenin konnte mit Hilfe von Co-Immünpräzipitationen nicht nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf die erzielten Ergebnisse ist anzunehmen, daß AHNAK eine Rolle bei der Ausbildung von Zell/Zell-Kontakten in Epithelzellen spielt. Ferner ist es möglich, daß AHNAK aufgrund der beobachteten cytoplasmatischen Lokalisation in epithelialen und nicht-epithelialen Zellen an Signalübertragungen beteiligt ist.

Das 8F10-Antigen weist in der SDS-PAGE eine starke Heterogenität im Laufverhalten auf, die im Fall des bovinen Proteins zum Teil auf eine Anheftung von Keratansulfatketten zurückgeführt werden kann. Ein charakteristisches Bandenmuster zwischen 100 und 600 kDa wird sowohl bei dem endogenen Protein aus Zellen als auch aus verschiedenen murinen sowie bovinen Geweben detektiert.

Die Anreicherung des Proteins aus Gewebeextrakten sowie Zellkulturüberständen gestaltete sich extrem schwierig. Das 8F10-Antigen konnte mittels Antikörper-Affinitätschromatographie sowie mittels anderer chromatographischer Verfahren angereichert werden. Die verschiedensten Ansätze führten jedoch auch nach zahlreichen Modifikationen nicht zu Proteinmengen, die für eine Sequenzierung ausreichend waren.

Das 8F10-Antigen wird von spezialisierten Epithelzellen exprimiert und sekretiert. Eine generelle Expression in epithelialen Zellen liegt nicht vor. Es konnte gezeigt werden, daß das Protein von exprimierenden Zellen unter Kultivierungsbedingungen sekretiert wird, aber nicht an der Ausbildung extrazellulärer Strukturen beteiligt ist und nicht an der Zelloberfläche gebunden vorliegt.

Das Protein wurde in immunhistochemischen Untersuchungen in der Haut sowie im oberen Verdauungstrakt lokalisiert. In diesen Geweben kann eine starke Expression im Bereich der Haarfollikel und Hautdrüsen sowie in verschiedenen Speicheldrüsen festgestellt werden.

I Einleitung

1.1 Haut

Die Haut ist mit fast 2 m² Oberfläche beim erwachsenen Menschen das größte Organ des Körpers und vereinigt mannigfaltige Aufgaben. Durch sie wird der Körper vor mechanischen, thermischen und chemischen Schäden geschützt. Durch Verhornung des Epithels und verschiedene Drüsensekrete stellt sie eine Barriere gegen viele Krankheitserreger dar. Die Haut trägt weiterhin entscheidend zur Temperaturregulierung des Organismus bei. Durch Erweiterung oder Verengung der Hautblutgefäße und durch Flüssigkeitsabgabe kann die Wärmeemission reguliert werden. Auch der Wasserhaushalt des Körpers unterliegt einer Regulierung über die Haut. Durch zahlreiche Rezeptoren können zudem mechanische und thermische Reize sowie Schmerzreize wahrgenommen und weitergeleitet werden.

Systemische Dysfunktionen können über die Haut erkannt und so zur klinischen Diagnostik herangezogen werden. Zahlreiche Symptome von Allgemeinerkrankungen (z.B. Rötungen bei Infektionskrankheiten, Zyanose bei Herzerkrankungen) können durch eine genaue Beobachtung der Haut erkannt werden.

Der Aufbau der Haut zeigt generell eine Unterteilung in drei verschiedene Schichten, Epidermis, Dermis sowie Subcutis (Abb. 1). Je nach spezieller Funktion sind einzelne Bereiche jedoch regional unterschiedlich stark ausgeprägt.

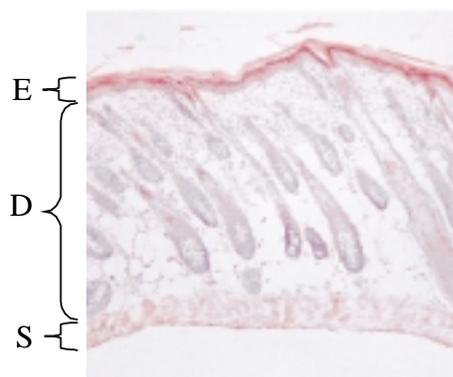


Abb. 1: **Aufbau junger Maushaut.** Die Epidermis (E) ist die oberste, epitheliale Hautschicht. Ihre Stärke wechselt von Körperstelle zu Körperstelle. Unter der Epidermis liegt die Dermis (D) mit zwei Schichten, einem oberflächlichen, lockeren Stratum papillare und einem strafferen Stratum reticulare, das den Hauptanteil ausmacht. Die tiefste Hautschicht, die Subcutis (S), besteht im wesentlichen aus Fettgewebe. Das abgebildete Präparat wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Die Epidermis stellt den äußersten Bereich der Haut dar. Sie besteht aus einem mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel, welches in vier unterschiedliche Schichten unterteilt werden kann, die jeweils durch einen unterschiedlichen Reifungszustand der Keratinozyten gekennzeichnet sind (Abb. 2). Das Stratum basale, die unterste Schicht, besteht aus teilungsfähigen Keratinozyten. Die Zellen sind durch Hemidesmosomen mit der Basalmembran, die sie von der darunterliegenden Dermis trennt, und mit den benachbarten Basalzellen durch Desmosomen verankert. Über dem Stratum basale befinden sich das Stratum spinosum, das Stratum granulosum sowie das Stratum corneum. Im Laufe der Reifung wandern die Keratinozyten zur Oberfläche. Hierbei erfahren die Epithelien eine Verhornung. Die verhornten Zellverbände werden in der obersten Schicht als Hornschuppen abgestoßen. In gesunder humaner Haut besteht ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Abschilferung, was zu einer vollständigen Erneuerung in etwa 28 Tagen führt. Während dieser Differenzierung werden verschiedene Gene aktiviert bzw. inaktiviert, was zu einer veränderten Proteinexpression führt.

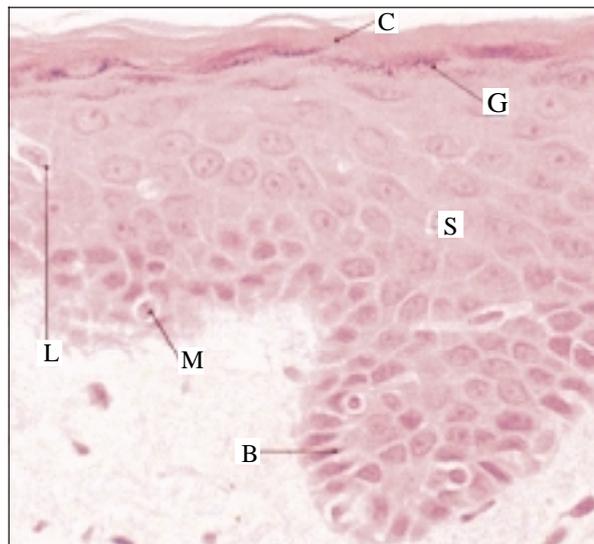


Abb. 2: **Aufbau der humanen Epidermis.** In der Leistenhaut können die vier verschiedenen Zellschichten der Epidermis unterschieden werden. Das Stratum basale (B) liegt auf der Basalmembran, darüber folgen das Stratum spinosum (S), das Stratum granulosum (G) sowie das Stratum corneum (C). In der Leistenhaut tritt eine dicke Hornschicht aus dichtem zellfreiem Keratin auf. Weiterhin sind Langerhans-Zellen (L) und Melanozyten (M) zu erkennen. Die verschiedenen Strukturen wurden mit einer HE-Färbung sichtbar gemacht.

Die Basalmembran der Haut ist eine dünne Schicht aus spezialisierter extrazellulärer Matrix, deren Hauptkomponenten Kollagen Typ IV, Perlecan, Laminin und Nidogen untereinander

vernetzt sind. Sie beeinflusst die Polarität, den Differenzierungs- und Proliferierungszustand und die Mobilität der Keratinozyten. Das darunterliegende Bindegewebe der Dermis wird durch Verankerungsfibrillen (Kollagen Typ VII) verknüpft.

Die Dermis besteht aus einem dichten Kollagenfasergeflecht (Kollagen I, III, V), durchsetzt von elastischen Netzen (Elastin, Fibrillin), welches der Haut Reißfestigkeit und reversible Verformbarkeit verleiht. Blut- und Lymphgefäße, Nervenverzweigungen sowie Bindegewebszellen und Zellen der Abwehr sind in dieses Bindegewebe eingebettet. Haarwurzeln als auch Hautdrüsen (beides epitheliale Gebilde) reichen in diese Schicht hinein. Aufgrund der Faseranordnung unterscheidet man zwei verschiedene Schichten. Das Stratum papillare grenzt unmittelbar an die Epidermis, gefolgt vom Stratum reticulare, welche sich bis zur Subcutis erstreckt. Aus der papillaren Dermis ragen Bindegewebspapillen in Vertiefungen der Epidermis und sorgen somit für eine Verzahnung beider Schichten. Im Gegensatz zur papillaren Dermis zeichnet sich die reticulare Dermis durch eine geringere Anzahl von Fibroblasten aus. Die Kollagen- und Elastin-Fibrillen sind deutlich dicker und dienen der Festigkeit des Gewebes.

In der darunterliegenden Subcutis verlaufen zwischen den Fettzellen zahlreiche Blut- und Lymphgefäße und periphere Nerven. Die Adipocyten sind sowohl ein wichtiges Fettreservoir als auch Isolierungsschicht für die inneren Organe.

Biosynthese und Abbau der Matrixbestandteile werden durch eine Vielzahl von Enzymen bewerkstelligt, deren Aktivität durch Zytokine reguliert wird. Diese Prozesse spielen eine besondere Rolle während der Embryogenese und bei der Wundheilung. Störungen dieser komplexen Vorgänge bilden die Grundlage von Organfibrosen oder Invasion und Metastasierung im Rahmen der Tumorerkrankungen.

1.2 Epithel- und Bindegewebe

Bei der Betrachtung des Aufbaus der Haut fällt auf, daß zwei Haupttypen von Geweben mit einander verknüpft sind: Epithel- und Bindegewebe. Zell-Zell-Adhäsionen des Epithelgewebes sowie die extrazelluläre Matrix des Bindegewebes besitzen grundsätzlich unterschiedliche Strukturaufgaben. Im folgenden werden die Struktur und Organisation der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen eingehender beschrieben.

1.2.1 Zell-Zell-Adhäsion

Im Epithelgewebe nehmen die Zellen den größten Teil des Gewebevolumens ein. Mechanische Belastungen werden durch Transmembranproteine der Plasmamembran von Zelle zu Zelle übertragen und durch intrazelluläre Proteinfilamente des Cytoskeletts aufgenommen. Die Verknüpfung zwischen den Epithelzellen verläuft zum einen über Ca^{2+} -abhängige Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (Cadherine), zum anderen über Ca^{2+} -unabhängige Adhäsionsmoleküle, die vorwiegend aus der Immunglobulin-Superfamilie stammen.

Cadherine sind Transmembran-Glykoproteine, deren großer extrazellulärer Teil in der Regel zu fünf ähnlichen Domänen gefaltet ist. Drei dieser Domänen enthalten Bindungsstellen für Ca^{2+} .

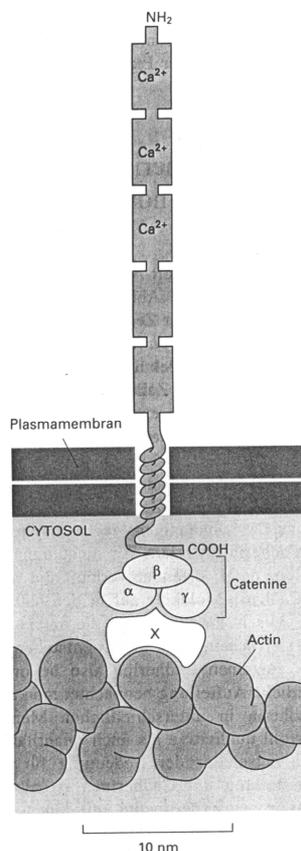


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Cadherin-Moleküls.

Der extrazelluläre Teil des Proteinmoleküls ist zu fünf ähnlichen Domänen gefaltet, drei davon enthalten Bindungsstellen für Calcium. Der ins Cytoplasma ragende Schwanz tritt über mehrere intrazelluläre Anheftungsproteine mit Actin des Cytoskeletts in Wechselwirkung. Zu den Anheftungsproteinen gehört die Familie der Catenine. X bezeichnet noch nicht charakterisierte Anheftungsproteine, die an der Verbindung zwischen Cadherin, Catenin und den Actin-Filamenten beteiligt sind.

Der ins Cytoplasma ragende Teil des Moleküls tritt über mehrere intrazelluläre Anheftungsproteine mit dem Actin des Cytoskeletts in Wechselwirkung (Abb. 3). Zu diesen Anheftungsproteinen gehört unter anderem die Familie der Catenine (Ozawa et al., 1989; Rimm et al., 1995).

Wie sich bei *in vitro* und *in vivo* Experimenten gezeigt hat, sind Cadherine die wichtigsten Adhäsionsmoleküle, die Zellen im jungen Embryonalgewebe zusammenhalten (Geiger et al., 1992).

1.2.2 Integrine

Wechselwirkungen zwischen der extrazellulären Matrix und dem Cytoskelett der Zellen werden in beiden Richtungen durch Transmembran-Proteine vermittelt. Integrine, eine große Familie homologer Transmembran-Verbindungsproteine, sind die wichtigsten Rezeptoren für die meisten Matrixproteine. Die Ligandenbindung der Integrine ist von extrazellulären zweiwertigen Ionen (Ca^{2+} oder Mg^{2+} je nach Integrin-Typ) abhängig. Durch die Bindung an extrazelluläre Komponenten werden Integrine aktiviert und in der Zelle verschiedene Signalübertragungskaskaden in Gang gesetzt (Juliano et al., 1993).

Der extrazelluläre Raum kann somit Polarität, Bewegung, Stoffwechsel und Entwicklung der Zellen beeinflussen.

Rezeptoren der Integrin-Familie gewährleisten die Adhäsion der Keratinozyten an die extrazelluläre Matrix (Watt und Hertle, 1994). Während der Differenzierung erfolgt eine Inaktivierung von $\beta 1$ Integrin und anschließender Abbau des Rezeptors (Adams und Watt, 1990, Hotchin et al., 1993).

Desweiteren werden Interaktionen zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix durch Transmembran-Proteoglykane (z.B. Syndecan) vermittelt.

1.3 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix bestimmt die physikalischen Eigenschaften des Bindegewebes und beeinflusst die Zellen in ihrer Differenzierung, Migration und Proliferation. Die Matrix wird von den in ihr liegenden Zellen (Fibroblasten, Myofibroblasten, Lipoblasten, Osteoblasten und Chondroblasten) gebildet. Nach Art und Funktion des betreffenden Organs besitzt die Matrix eine unterschiedliche Zusammensetzung und vielfältige Strukturen, von steinhartem Knochen über elastische Bänder bis zu spezialisierten Grenzschichten (Basalmembranen). Die Makromoleküle, aus denen die extrazelluläre Matrix aufgebaut ist, bestehen aus zwei Hauptgruppen: 1. Glykosaminoglykane (GAG), die gewöhnlich an Proteine gekoppelt in Form von Proteoglykanen vorliegen, und 2. Faserproteine, die man anhand ihrer Funktion in zwei Gruppen einteilen kann: Strukturproteine (z.B. Kollagen und Elastin) und Adhäsionsproteine (z.B. Laminin und Fibronectin). Eine extrem hohe Zahl unterschiedlicher Zusammensetzungen der extrazellulären Matrix wird sowohl durch eine große Zahl verschiedener Familienmitglieder als auch durch alternativ gespleißte Varianten dieser Komponenten möglich.

1.3.1 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane (GAG) sind unverzweigte Polysaccharidketten aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten (70-200 Reste), die unterschiedlich häufig im Gewebe vorkommen. Die Anwesenheit spezieller Glykosaminoglykantypen in verschiedenen Geweben verleiht der extrazellulären Matrix besondere Eigenschaften in Hinblick auf Diffusion oder Bindung anderer extrazellulärer Substanzen. Durch Sulfatierung tragen die Moleküle stark negative Ladungen, wodurch eine Retention von Kationen und Wasser erleichtert wird. Charakteristisch ist weiterhin ein stark hydrophiles Verhalten dieser Verbindungen. Die Glykosaminoglykane können aufgrund ihrer Zusammensetzung in vier Gruppen eingeteilt werden: 1. Hyaluronsäure, 2. Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, 3. Keratansulfat, 4. Heparansulfat und Heparin.

Mit Ausnahme der Hyaluronsäure werden die Glykosaminoglykane mit Proteinen zu Proteoglykanen verknüpft (Hassel et al., 1986). Die molare Masse des Proteinkerns der Proteoglykane variiert von 10 bis 600 kDa, und durch eine unterschiedliche Zahl und Art der angehefteten Glykosaminoglykanketten ergibt sich zusätzlich eine enorme Heterogenität. Der Proteinanteil dieser Verbindungen liegt bei 6-70%. Somit können die Glykosaminoglykanketten bis zu 94% des Gesamtgewichts ausmachen.

Die Funktion der Proteoglykane ist wie ihre Struktur sehr vielseitig (Ruoslathi, 1988). Neben der Ausbildung hydrathaltiger Gele haben Proteoglykane vermutlich eine wichtige Funktion bei der Signalübertragung zwischen Zellen als auch der Regulation der Funktion und Aktivität anderer Proteine (Ruoslathi und Yamaguchi, 1991).

Proteoglykane sind jedoch nicht nur Bestandteil der extrazellulären Matrix, sondern kommen auch in der Plasmamembran vor wie z.B. Syndecan. Der Proteinkern durchspannt die Membran während die extrazelluläre Domäne unterschiedlich viele Glycosaminoglykan-Ketten trägt und der in der Zelle liegende Teil mit dem Actin-Cytoskelett in Wechselwirkung tritt. Sie dienen unter anderem zusammen mit Integrinen als Rezeptoren für extrazelluläre Komponenten (Woods und Couchman, 1994).

1.3.2 Fibrilläre Strukturproteine

Die drei wichtigsten Proteine, die Fibrillen in der extrazellulären Matrix bilden, sind Kollagen, Fibrillin und Elastin.

Kollagene bilden eine Familie nah miteinander verwandter Proteine und stellen die zahlreichsten fibrillären Proteine des extrazellulären Raums dar. Das charakteristische Merkmal eines Kollagenmoleküls ist eine dreisträngige Tripelhelix, die von drei identischen oder unterschiedlichen α -Ketten gebildet wird. Bisher wurden 19 verschiedene Kollagen-Typen in Vertebraten identifiziert, die als Typ I-XIX bezeichnet werden. Die Mitglieder der Proteinfamilie der Kollagene können nach den dreidimensionalen Strukturen, die sie ausbilden, in zwei Hauptklassen eingeteilt werden. Hierbei unterscheidet man zwischen fibrillären Kollagenen und nicht-fibrillären Kollagenen. Fibrilläre Kollagene (Typ I, II, III, V, XI) zeichnen sich durch eine lange, ununterbrochene Tripelhelix aus, während die restlichen Kollagene nicht in der Lage sind, Fibrillen zu formen. Sie zeigen eine enorme strukturelle Vielfalt, verschiedenste makromolekulare Organisationen, unterschiedlichste Gewebeverteilungen sowie Funktionen. Die nicht-fibrillären Kollagene können in mehrere Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet zwischen netzbildenden Kollagenen (Typ IV, VIII und X), Fibrillen-assoziierten (FACIT) Kollagenen (z.B. Typ IX, XII, XIV, XVI und XIX), die sich durch längere nicht helikale Regionen auszeichnen, sowie Filament-bildendem Kollagen Typ VI und einer Gruppe aus den Kollagenen des Typs XV und XVIII. Die Moleküle des Kollagen Typ VII bilden Dimere, die sich zu Verankerungsfibrillen verbinden und Basalmembranen an das darunterliegende Bindegewebe knüpfen, während Kollagen Typ XIII ein hexagonales Gitter ausbildet. Weiterhin existieren Kollagene (z.B. Kollagen Typ XVII), die nicht sekretiert werden sondern als Bestandteil von Hemidesmosomen eine transmembrane Domäne besitzen (Li et al., 1993).

Obwohl Fibroblasten den Hauptteil des Kollagens herstellen, kann Kollagen auch von anderen vom Mesenchym abstammenden Zellen gebildet werden. Epithel- und Endothelzellen exprimieren z.B. Typ IV-Kollagen der Basalmembran.

Elastische Fasern verleihen dem Bindegewebe Flexibilität. Die elastischen Fasern bestehen aus interagierenden Molekülen, vorrangig Elastin und Fibrillin. Elastin ist ein hydrophobes Protein, welches nach der Sekretion über Lysinreste stark untereinander quervernetzt wird. Wie Kollagen wird auch Elastin von Fibroblasten gebildet. Eine weitere Hauptstrukturkomponente der Fasern ist Fibrillin, welches wesentlich an der Organisation der Fibrillen beteiligt zu sein scheint.

1.3.3 Adhäsionsproteine

Die Interaktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix wird weiterhin durch verschiedene nichtfilamentöse Glykoproteine, z.B. Laminin, Nidogen, Fibronectin und Tenascin vermittelt.

Laminin wird von Epithel- und Endothelzellen als heterotrimeres Protein gebildet und stellt in seinen diversen Isoformen einen essentiellen Bestandteil aller Basalmembranen dar. Alle bekannten Laminine sind aus drei Polypeptidketten (α , β , γ) zusammengesetzt. Bis heute sind 12 verschiedene Laminine bekannt, die sich aus 11 genetisch verschiedenen Ketten bilden ($\alpha 1$ - $\alpha 5$, $\beta 1$ - $\beta 3$ sowie $\gamma 1$ - $\gamma 3$) (Tunggal et al., 2000). Zusätzlich zu dieser Vielfalt kann es durch alternatives Spleißen und proteolytische Prozessierung zu weiteren Veränderungen kommen, die sich auf die Funktion der Isoformen auswirken. Jede Isoform besitzt eine charakteristische Gewebeverteilung. Die Expression einiger Isoformen bzw. Lamininketten ist zudem abhängig vom embryonalen Entwicklungsstadium (Miner et al., 1997).

Das am besten charakterisierte Laminin ist das Laminin-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$). Es besteht aus einem langen und drei kurzen Armen (Engel et al., 1981). Durch multiple bindende Liganden (Nidogen, Perlecan, Kollagen Typ IV, Fibulin etc.) fungiert es als Bindemolekül zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix. Laminin bildet durch Selbstaggregation im Bereich der kurzen Arme ein hexagonales Netzwerk aus. Die Vernetzung zwischen Laminin und Kollagen IV geschieht über das Glykoprotein Nidogen, einem sehr vielseitigen Protein in Basalmembranen.

In der humanen Haut findet man Laminin-5 ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$), sowie in geringeren Mengen Laminin-6 ($\alpha 3\beta 1\gamma 1$) sowie Laminin-10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) (Nievers et al., 1999). Laminin-5 ist ein essentieller Bestandteil der hemidesmosomalen Verankerungsfilamente (Rousselle et al., 1991). Das Protein wird von basalen Keratinozyten sekretiert und bildet ein spezifisches Substrat für die Adhäsion verschiedener Zellen. Laminin-5 beeinflusst unter anderem das Zellwachstum sowie die Zellmigration.

Defekte der Laminin-Gene, insbesondere die zum Fehlen oder zur starken Veränderung der $\beta 1$ oder $\gamma 1$ -Kette führen, sind im frühen Entwicklungsstadium letal (Smyth et al., 1999). Mutationen der Lamininketten $\alpha 3$, $\beta 3$ und $\gamma 2$ führen zu schweren Hauterkrankungen (epidermolysis bullosa junctionalis) (Kivirikko et al., 1995; Pulkkinen et al., 1994a,b).

Fibronectin ist ein gut charakterisiertes, aus vielen Domänen bestehendes großes Glykoprotein, welches in Bindegeweben weit verbreitet ist. Die lösliche Form des Fibronectins ist hauptsächlich Bestandteil von Blutplasma und wird von Hepatozyten

produziert (Tamkun und Hynes, 1983). In der extrazellulären Matrix wird Fibronectin von Endothel- und Epithelzellen sowie von vielen verschiedenen Bindegewebszellen wie Fibroblasten, Chondrozyten, Myoblasten und glatten Muskelzellen exprimiert. Es bildet fibrilläre Netzwerke aus, an denen Zellen adherieren (Hynes, 1989).

Ein besonders in embryonalen Geweben exprimiertes und während der Wundheilung hochreguliertes Protein ist Tenascin-C. Zu den Funktionen dieses Glykoproteins zählt vor allem die Zelladhäsion (Chiquet-Ehrisman, 1991).

Zusätzlich zu den hier beschriebenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix, der Zell-Matrix- sowie Zell-Zell-Interaktionen trägt eine große Anzahl weiterer Verbindungen zum Zusammenspiel zwischen Zellen und extrazellulärem Raum bei.

1.4 Wundheilung

Wundheilung ist ein extrem komplexer Vorgang, der Entzündung, Zellwanderung, Re-Epithelisierung, Matrix-Neubildung sowie -Umwandlung beinhaltet. All diese Vorgänge müssen koordiniert werden, was eine konstante Kommunikation aller beteiligten Komponenten voraussetzt. Zur Heilung dermalen Wunden müssen Keratinozyten, Endothelzellen, Fibroblasten usw. über Cytokine und andere Mediatoren miteinander kommunizieren. Diese Signale werden durch die extrazelluläre Matrix vermittelt (Nathan und Sporn, 1991). Eine zeitlich fein abgestimmte Interaktion zwischen Zellen, Cytokinen und Matrix ist somit Voraussetzung zur Wundheilung.

Der Prozeß kann in drei sich überlagernde Phasen eingeteilt werden: Entzündung, Proliferation und Regeneration. Der Wundheilung geht eine Verletzung voraus, durch die Blutplättchen und Mastzellen aktiviert werden. Während der Entzündungsphase erfolgt die Blutgerinnung, der Abbau von zerstörtem Gewebe sowie die Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren (TGF, PDGF), die im weiteren Verlauf zur Bildung des Granulationsgewebes führen. Miteinander verflochtene Fibrin- und Fibronectinmoleküle verschließen die Wunde und stimulieren die Zellmigration aus dem umgebenden Gewebe (Clark, 1993). In der Proliferationsphase nehmen Zellzahl und Interzellularsubstanz unter Bildung des Granulationsgewebes zu. Das Granulationsgewebe ist hochvaskularisiert und besteht aus Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen, die in eine Matrix aus Fibronectin, Proteoglykanen und Kollagenen eingebettet sind. Die beteiligten Zellen ändern ihre Morphologie, Polarisierung, Wanderungsaktivität und Wechselwirkungen untereinander. Die

durch die Hämatostase entstandene Fibrin-Matrix wird langsam abgebaut, während gleichzeitig eine Synthese neuer extrazellulärer Komponenten einsetzt. Im weiteren Verlauf der Proliferationsphase entwickeln sich die Fibroblasten des Granulationsgewebes zu Myofibroblasten. Diese sind verantwortlich für die Wundkontraktion. Keratinozyten werden zur raschen Proliferation und Migration in Richtung des Wundbereichs angeregt (O'Leary, 1997). In der Regenerationsphase wird schließlich das Granulationsgewebe durch Narbengewebe mit wenigen Zellen und Blutgefäßen ersetzt.

Wie die extrazelluläre Matrix die Wundheilung dirigiert, ist bisher nur in Ansätzen bekannt. In den letzten Jahren wurden zahlreich extrazelluläre Matrixkomponenten auf der Ebene der mRNA sowie Protein-Expression hinsichtlich ihrer Beteiligung und Funktion in der Wundheilung untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die Expression von verschiedenen Kollagentypen, Fibronectin und anderen Matrixbestandteilen eine wichtige Rolle spielt (Gailit et al., 1994; Reed et al., 1993). Es kann zudem eine Expression von Proteinen im Granulationsgewebe festgestellt werden, die in adultem, gesunden Gewebe kaum exprimiert werden (z.B. Tenascin-C) (Latijnhouwers et al., 1996). Zum Verständnis des Wundheilungsprozesses auf molekularer Ebene ist die weitere Identifizierung und detaillierte Charakterisierung der beteiligten Komponenten essentiell.

1.5 Auf der Suche nach neuen Proteinen

Zur Identifizierung bisher unbekannter Bestandteile eines Gewebes können mehrere Ansätze gewählt werden.

Eine sehr geläufige Methode, die vorrangig bei der Suche nach neuen Mitgliedern einer Proteinfamilie eingesetzt wird, ist das Durchsuchen von EST(expressed sequence tags)-Datenbanken mit bekannten Domänen dieser Proteine. EST-Datenbanken enthalten kleine, teilsequenzierte cDNA-Sequenzen, welche als Klone bestellt, vollständig sequenziert und zur weiteren Durchsuchung von cDNA- oder genomischen Bibliotheken genutzt werden können. Auf diese Weise wurde in den letzten Jahren eine große Anzahl neuer Mitglieder von Proteinfamilien wie z.B. Fibulin-3 und -4 (Giltay et al., 1999), Matrilin-3 und -4 (Wagener et al., 1998) identifiziert und teilweise charakterisiert.

Eine weitere Methode ist die Suche nach Interaktionspartnern bekannter Proteine mittels Affinitätschromatographie, Co-Immunpräzipitation oder der Two-Hybrid-Technologie. Mit Hilfe dieser Verfahren sollte es möglich sein, bisher unbekannte Bindungspartner für ein bestimmtes Protein zu isolieren. Das Two-Hybrid-System bietet gegenüber dem

Präzipitationsansatz den Vorteil, daß direkt Informationen zu den kodierenden cDNAs des Interaktionspartners erhalten werden können und für die eventuell anschließende Expression des Proteins vorliegen.

Während der letzten Jahre wurde aufgrund der enormen Anstrengungen in verschiedenen Genomprojekten eine große Anzahl an Proteinsequenzen in Datenbanken veröffentlicht. Einige der Sequenzen stammen von rekombinant exprimierten und gut untersuchten Proteinen, der große Teil der Sequenzen wird jedoch nur aus Nukleinsäuresequenzen abgeleitet. Funktionen dieser Proteine werden routinemäßig auf Basis von Motivanalysen und Vergleich mit bereits charakterisierten Proteinen postuliert. In einigen Fällen kann jedoch auch keine Vorhersage über die Funktion gemacht werden (Wilkins et al., 1997). Neben der stetig wachsenden Anzahl von Informationen in diversen Protein- und Nukleinsäure-Datenbanken wurden in den letzten Jahren auch hochauflösende Trenntechniken zur Isolierung von Proteinen aus komplexen Zell- oder Gewebeeextrakten (2D-Gelelektrophorese) sowie die massenspektrometrische Sequenzierung (MALDI-TOF bzw. ESI MS/MS) weiterentwickelt bzw. verfeinert. Das Detektionslimit dieser Mikrosequenzierung liegt bei etwa 2 pmol Protein. Die erhaltenen experimentellen Daten können mit den Informationen aus genomischen und EST-Datenbanken verglichen werden und erlauben im günstigsten Fall eine Identifizierung des Proteins.

Eine Kombination dieser Techniken wird in der sogenannten Proteomanalyse verwendet. Hierbei wird das gesamte Proteinexpressionsmuster einer Zelle, eines Gewebes oder Organismus nach quantitativer Darstellung mittels 2D-Gelelektrophorese massenspektrometrisch analysiert. Die hervorragende Auftrennung von Proteingemischen in 2D-Gelen erlaubt es, Proteine zu lokalisieren, kartieren und gegebenenfalls zu identifizieren.

Neben der Kartierung verschiedener Proteinextrakte unter genau definierten Bedingungen kann auch in einem „subtraktiven Ansatz“ das Proteinexpressionsmuster einer Zelle unter verschiedenen Zuständen verglichen werden. Dies ermöglicht die Identifizierung von Proteinen, die unter bestimmten Umständen, wie z.B. in verletztem Gewebe unterschiedlich reguliert werden. Eine veränderte Umgebung kann jedoch nicht nur eine unterschiedliche Expressionsrate hervorrufen, sondern auch einen Einfluß auf posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierung oder Sulfatierung eines Proteins, welche einen ganz entscheidenden Einfluß auf die Funktion der Proteine haben, besitzen. Die Lokalisierung solcher Modifikationen kann erheblich zum Verständnis der Funktion eines Proteins beitragen.

Problematisch ist hierbei jedoch zur Zeit die Darstellung und Identifizierung seltener Proteine, da diese oft in nur wenigen Kopien in der Zelle vorkommen (z.B. Transkriptionsfaktoren) sowie eine fehlende Automatisierung und eingeschränkte Reproduzierbarkeit der zweidimensionalen Gelelektrophorese.

Ein weiterer systematischer Ansatz zur Identifizierung neuer Proteine ist die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein Gemisch isolierter Komponenten aus einem Gewebe. Es können komplexe Proteingemische zur Immunisierung verwendet werden. Die aus der Fusion hervorgehenden Antikörper werden schrittweise selektiert und zur Identifizierung der korrespondierenden Antigene verwendet. Ein großer Vorteil dieser Methode liegt in der Chance auch gering exprimierte Proteine detektieren zu können. Die monoklonalen Antikörper bieten weiterhin eine hervorragende Möglichkeit zur anschließenden Charakterisierung der Proteine. In den letzten Jahren wurde mit Hilfe dieser Technologie zahlreiche neue Proteine identifiziert und charakterisiert (Lunstrum et al., 1987; Maekawa et al., 1989; Kinch et al., 1998).

Die verschiedenen Wege zur Identifizierung der korrespondierenden Antigene mit Hilfe der monoklonalen Antikörper sind im folgenden Abschnitt zusammengestellt.

1.6 Verschiedene Wege zur Proteinidentifizierung und Charakterisierung mittels monoklonaler Antikörper

Zur Identifizierung neuer Proteine mittels eines Panels monoklonaler Antikörper gibt es verschiedene Vorgehensweisen. Mit den hergestellten monoklonalen Antikörpern können zum einen cDNA-Expressionsbibliotheken durchsucht werden, zum anderen kann mit Hilfe der Antikörper eine Anreicherung bzw. Reinigung der entsprechenden Antigene vorgenommen werden (Abb. 4).

Nach abgeschlossener Identifizierung besitzt man zudem ein wichtiges Hilfsmittel zur weiteren Charakterisierung des Proteins, da der Antikörper z.B. zur Bestimmung der Gewebeverteilung mittels Immunhistochemie oder zur Immunpräzipitation potentieller Bindungspartner verwendet werden kann (Abb. 4).

cDNA-Expressionsbibliotheken können sowohl mit DNA-Sonden als auch mit Antikörpern oder anderen bindenden Liganden durchsucht werden. Hierbei bietet sich nicht nur die Möglichkeit, das produzierte Protein eines Klons zu sequenzieren, sondern auch die kodierenden DNA-Fragmente zu isolieren. Diese können entweder zur Identifizierung des

Antigens oder auch zur Vervollständigung der Proteinsequenz eingesetzt werden. Im günstigsten Fall kann mit Hilfe dieser Methode auch ein in Geweben sehr gering exprimiertes Protein identifiziert werden.

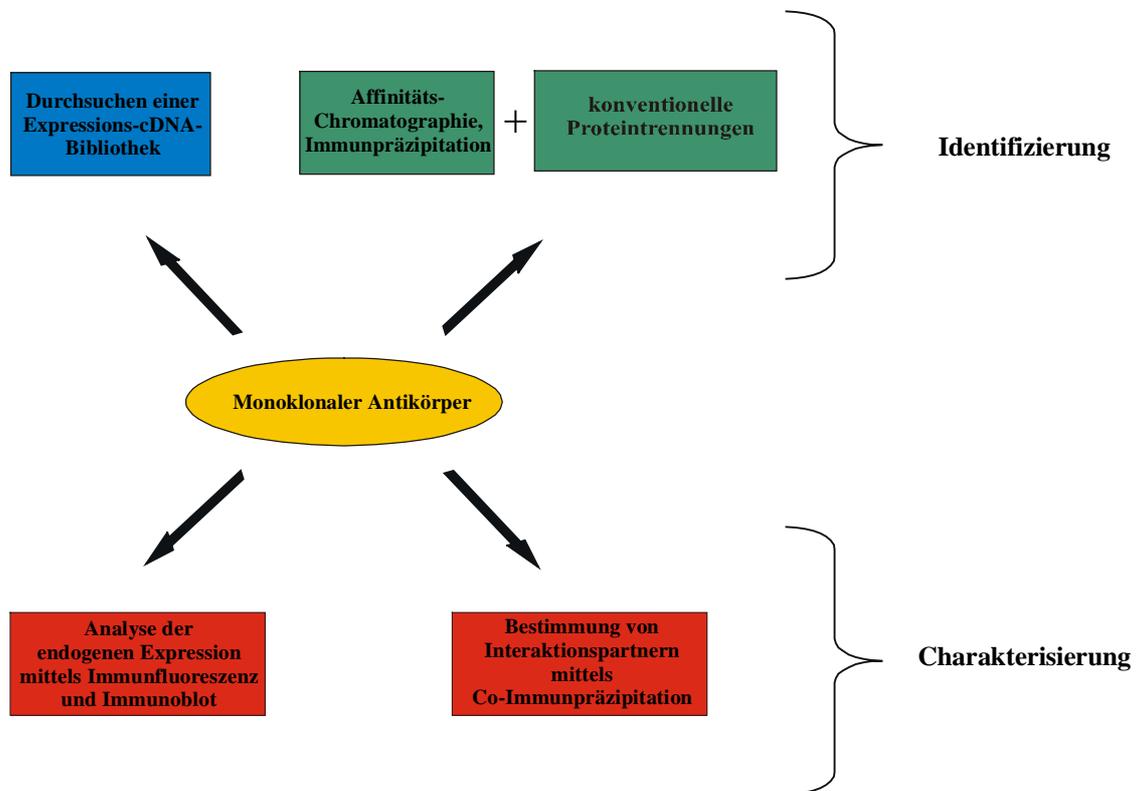


Abb. 4: Zusammenstellung verschiedener Einsatzmöglichkeiten monoklonaler Antikörper zur Identifizierung und Charakterisierung der korrespondierenden Antigene.

Die Antikörper können zudem zur Isolierung der korrespondierenden Antigene aus Gewebeextrakten eingesetzt werden. Es besteht zum einen die Möglichkeit die entsprechenden Antigene mittels Immunpräzipitation oder Affinitätschromatographie anzureichern oder den Verlauf anderer Chromatographieschritte mit Hilfe der Antikörper zu analysieren (Abb. 4). Die Reinigungsstrategie ist hierbei für jedes Protein individuell zu entwickeln.

Gereinigte Proteine erlauben im Anschluß eine Mikrosequenzierung auf Proteinebene (MALDI-TOF bzw. Q-TOF). Die hierbei erhaltenen Sequenzen können mit unterschiedlichen Datenbanken verglichen werden und lassen unter Umständen eine Identifizierung des Proteins zu.

Gelingt dies nicht, kann die erhaltene Sequenzinformation verwendet werden um cDNA-Datenbanken zu durchsuchen, Primer zu konstruieren und das unbekannte Protein zu klonieren.

II Zielsetzung

Die extrazelluläre Matrix der Haut besteht aus einer großen Vielfalt verschiedener Makromoleküle, die miteinander vernetzt sind. Bisher ist die Organisation des spezifischen Netzwerks sowie der Mechanismus, mit dem die Zellen Synthese und Abbau der Proteine regulieren, nur wenig verstanden. In den letzten Jahren wurden zudem vermehrt neue Familien extrazellulärer Proteine entdeckt bzw. bereits bekannte Familien erweitert. Die Identifizierung und Charakterisierung weiterer essentieller Hautbestandteile sollte zu einem detaillierteren Verständnis der vielfältigen und komplexen Wechselwirkungen der beteiligten Komponenten führen. Die Kenntnis des Zusammenspiels einzelner Bestandteile ist von wesentlicher Bedeutung zur Etablierung neuer therapeutischer Strategien z.B. im Rahmen der Haut-Wundheilung.

Zur Entdeckung bisher unbekannter Proteine in der Haut soll ein Panel monoklonaler Antikörper hergestellt werden. Nach einer ersten Selektion der Antikörper produzierenden Klone mittels ELISA, Immunfluoreszenz und Immunoblot sollen einige vielversprechende Klone subkloniert und zur Identifizierung der korrespondierenden Antigene herangezogen werden. Die Bestimmung der Reaktivität dieser Antikörper in verschiedenen Methoden (Immunfluoreszenz, Immunoblot sowie Immunpräzipitation) unter nativen und denaturierenden Bedingungen sowie die Typisierung der Antikörper ermöglicht eine erste Charakterisierung der Antikörper.

Abhängig vom Potential der Antikörper werden diese im weiteren Verlauf in verschiedenen Methoden zur Identifizierung der entsprechenden Antigene mittels Durchmustern von cDNA-Expressionsbanken als auch zur Reinigung des Protein und anschließender Sequenzierung eingesetzt.

Die Bestimmung der Größe der Proteine sowie der Art und Anzahl der potentiellen Untereinheiten ist in Immunoblots möglich.

Die monoklonalen Antikörper können weiterhin zur Lokalisation der Proteine im embryonalen und adulten Gewebe mittels Immunfluoreszenz verwendet werden. Schließlich kann eine Bestimmung potentieller Bindungspartner kann mit Hilfe von ELISA-Style-Bindungsstudien, Co-Immunpräzipitationen und Co-Immunfluoreszenzen auf Geweben durchgeführt werden.

III Ergebnisse

Zur gezielten Identifizierung neuer Proteine in einem gegebenen biologischen System können die verschiedensten Methoden gewählt werden. Eine Möglichkeit besteht in der Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk) gegen ein Gemisch verschiedener Proteine mit anschließender Identifizierung der korrespondierenden Antigene mit Hilfe dieser Antikörper. Generell können hierzu verschiedene Ansätze gewählt werden.

Zum einen kann eine Expressions-cDNA-Bibliothek mit diesen Antikörpern durchsucht werden, zum anderen können die Antikörper direkt sowie indirekt zur Reinigung der Antigene eingesetzt werden (Abb. 5).

Der Vorteil des Durchsuchens einer Expressions-cDNA-Bibliothek liegt darin begründet, daß auch Proteine, die im Gewebe nur in geringen Mengen vorhanden sind, identifiziert werden können, da eine geringe Proteinexpression die Anreicherung eines Proteins aus Gewebeextrakten erschwert bzw. verhindert.

Desweiteren kann die DNA positiver Klone aus der Expressions-cDNA-Bibliothek sequenziert und damit Informationen über das gesuchte Protein erhalten werden. Die erhaltenen Sequenzinformationen können zum einen eine Identifizierung des Antigens ermöglichen, bilden jedoch auch die Basis für die weitere Durchsuchung anderer cDNA- sowie genomischer Bibliotheken zur Komplettierung der Proteinsequenz.

Eine andere Möglichkeit besteht in der Reinigung des Antigens mit den vorliegenden Antikörpern. Hierzu kann der Antikörper zum einen direkt (Immunpräzipitationen und Affinitätsreinigungen) als auch indirekt zur Detektion des Proteins in anderen chromatographischen Verfahren (Gelfiltration, Ionenaustauscher etc.) verwendet werden. Liegt das Antigen nach einigen Anreicherungsschritten als SDS-PAGE-Bande vor, so kann nach proteolytischem Verdau eine Sequenzierung erhaltener Peptide mittels MALDI-TOF bzw. LC MS/MS vorgenommen werden. Ein Vergleich dieser Peptidsequenzen mit Datenbanken ermöglicht unter Umständen die Identifizierung des korrespondierenden Antigens.

Die Wahl der Identifizierungsmethoden ist vom Potential der Antikörper in den einzelnen Methoden abhängig. Weiterhin ist die Expressionsrate des Antigens im Gewebe ein entscheidender Faktor.

Von grundlegender Bedeutung für eine erfolgreiche Identifizierung bisher unbekannter Proteine ist zudem die Auswahl der Spezies, des Gewebes sowie der Proteinextraktions-Bedingungen.

Die Auswahl der Spezies Maus zu Beginn dieses Projektes ist in dem relativ großen Repertoire von verfügbaren Antikörpern gegen murine extrazelluläre Matrix-Proteine begründet. Viele dieser Antikörper, die zur Identifizierung oder Verifizierung eingesetzt werden können, sind in anderen Arbeitsgruppen in unserem Institut bereits vorhanden oder kommerziell erhältlich.

Ein weiterer Vorteil ist die große Verfügbarkeit von diversen Mausgeweben zur Gewinnung von Proteinen sowie die umfassenden Sequenzinformationen in Maus-spezifischen genomischen wie auch in EST-Datenbanken. Dies erleichtert eine mögliche Identifizierung der Proteine beim Durchsuchen von Datenbanken mit kleineren Sequenzstücken.

Die Verwendung von Haut 3-4 Tage alter Tiere bietet den Vorteil, daß in diesem Entwicklungsstadium noch kein Fell vorhanden ist. Haarfollikel sowie Drüsen sind jedoch schon ausgebildet und somit sollte ein voll differenziertes Spektrum von gewebespezifischen Antigenen abgedeckt sein. Die Abwesenheit der Haare erleichtert das Zerkleinern des Gewebes und damit die Isolierung der Proteine. Zudem ist zu diesem Zeitpunkt die Quervernetzung der extrazellulären Proteine untereinander weniger stark ausgeprägt und die Proteine können unter schonenderen Bedingungen extrahiert werden.

Die folgende Abbildung faßt die unterschiedlichen Schritte, die zur Identifizierung eines Proteins mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern führen können, schematisch zusammen.

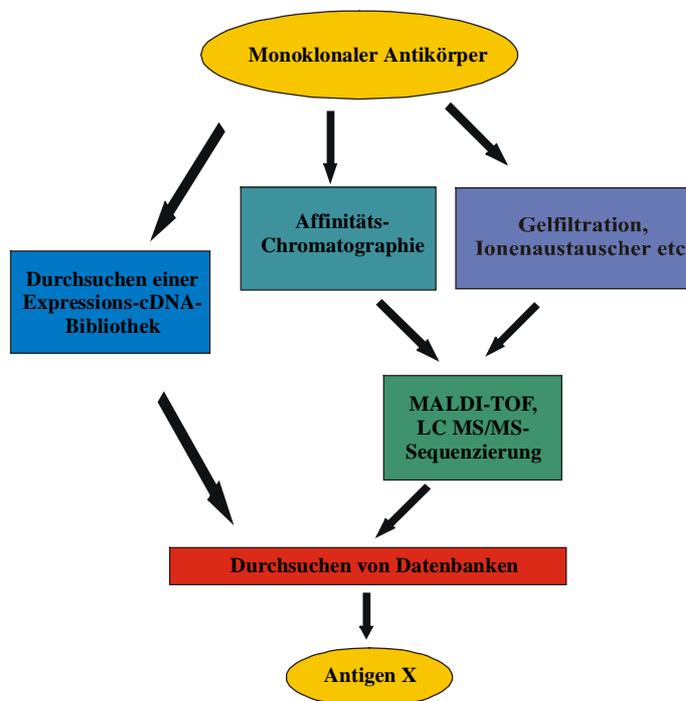


Abb. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten zur Identifizierung eines Proteins mit monoklonalen Antikörpern.

3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein komplexes Gemisch dermalen Proteine

Für die Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk) gegen ein Gemisch diverser dermalen Proteine wurde Haut aus dem Bereich des Rückens von 3-4 Tage alten Mäusen präpariert. Dermis und Epidermis der isolierten Haut wurden mittels hyperosmolarem Schock voneinander getrennt. Die Spaltung wird unter diesen Bedingungen in der Basalmembran vollzogen. Die Bestandteile der Basalmembran befinden sich anschließend zu gleichen Teilen in beiden Fraktionen.

Die Proteine der Dermis wurden anschließend sequentiell extrahiert. Die schrittweise Isolierung der Proteine aus einem Gewebe ermöglichte die Bestimmung idealer Extraktionsbedingungen für einzelne Bestandteile.

In einem ersten Schritt wurden isotonische Pufferbedingungen (Puffer A) und daran anschließend ein EDTA-haltiger Puffer mit erhöhter Salzkonzentration (Puffer B) verwendet. Durch die Abfolge dieser beiden Extraktionsmethoden sollte es gelingen, im ersten Schritt sehr leicht lösliche Proteine zu isolieren. Im zweiten Schritt wurden Proteine angereichert, die durch Calcium-abhängige Interaktionen mit anderen Matrix-Bestandteilen verbunden sind. Bis dahin unlösliche Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen (Puffer C), sowie anschließend proteolytischen Verdau mit Pepsin (Puffer D) extrahiert. Unter diesen Bedingungen wurden kovalent quervernetzte Proteine, wie z.B. Kollagene, herausgelöst.

Den verwendeten Puffern wurden jeweils 1 mM PMSF sowie 1 mM NEM als Proteaseinhibitoren zugefügt. Die Extraktionen A und B wurden zur quantitativen Proteinisolierung jeweils zweifach durchgeführt. Die folgende Auflistung zeigt die Zusammensetzung der verschiedenen Puffer:

Puffer A	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4
Puffer B	1 M NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7,4
Puffer C	6 M GuHCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,4
Puffer D	0,5 M Essigsäure, pH 1,8, 10 mg Pepsin/g Dermis.

Eine erste Überprüfung der verschiedenen Extraktionen mittels SDS-PAGE zeigte, daß ein großer Teil der Proteine sehr leicht aus dem Gewebe zu isolieren ist. Der größte Teil der zu extrahierenden Proteine (ca. 75%) befand sich schon in Extrakt A (Abb. 6). Durch die anschließende Behandlung des Gewebes mit einem EDTA-haltigen Puffer konnten weitere

Proteine extrahiert werden. Die absolute Proteinkonzentration bzw. -menge war hierbei jedoch deutlich niedriger. Der Einsatz denaturierender sowie proteolytischer Extraktionsbedingungen führte nur zur Isolierung einiger stark quervernetzter Proteine (Abb. 6).

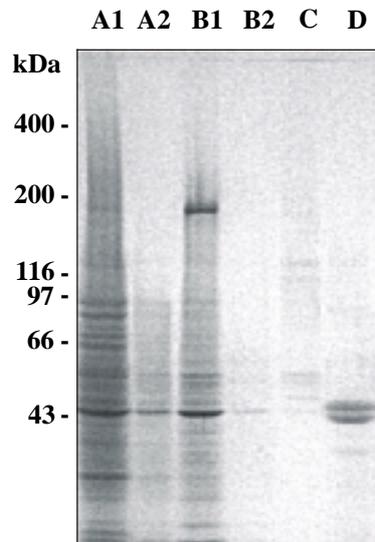


Abb. 6: **Analyse der sequenziellen Proteinextraktion aus Maus-Haut.** Das Gewebe wurde zerkleinert und schrittweise unter den folgenden Bedingungen extrahiert: (A) isotonischer Puffer, (B) Hochsalz-EDTA-Puffer, (C) denaturierender Puffer, (D) Pepsin-Verdau. Jeweils gleiche Mengen der Extrakte wurden in einem 3-15%igen SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Extrakt C wurde zuvor mit Ethanol präzipitiert. Die Extraktionen A und B wurden hierbei doppelt durchgeführt (A1, A2 und B1, B2).

Die weitere Analyse der Proben mittels Immunoblot ergab, daß eine Vielzahl von bekannten Bestandteilen der extrazellulären Matrix (z.B. Laminin, Fibronectin, BM-40 etc.) unter nativen, isotonischen Bedingungen zu isolieren ist und somit schon in Extrakt A enthalten ist. Abbildung 3 zeigt eine hohe Konzentration von Laminin und BM-40 in Extrakt A im Gegensatz zu den Extrakten B, C und D. Die Verwendung eines Hochsalz-Puffers, EDTA oder denaturierender Reagenzien zur Isolierung dieser Komponenten ist somit nicht nötig. Auch Fibronectin kann zum Teil leicht aus dem Gewebe isoliert werden. Die Anreicherung des Proteins in Puffer A ist jedoch in diesem Fall nicht vollständig (Abb. 7).

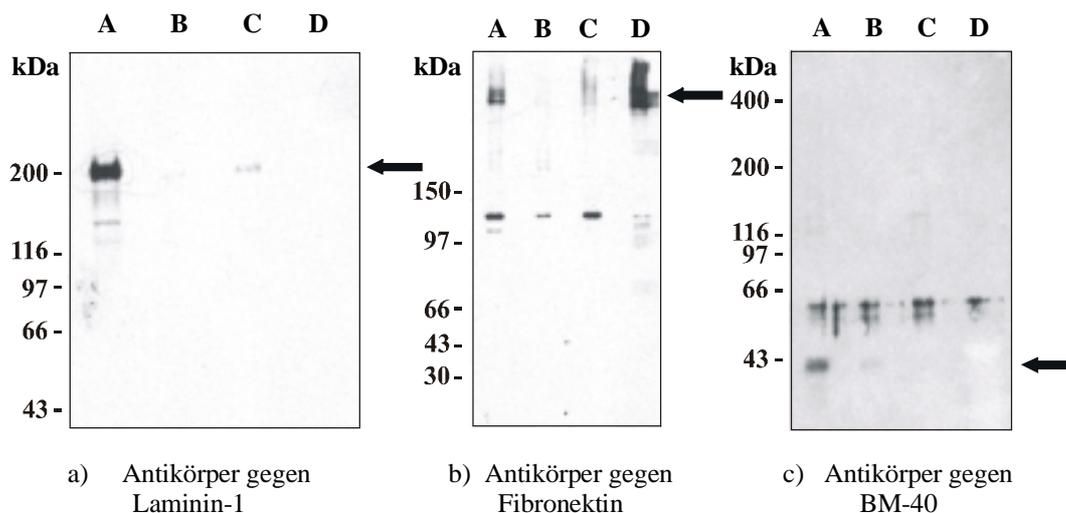


Abb. 7: **Untersuchung der verschiedenen Extrakte im Immunoblot mit Antikörpern gegen einige bekannte extrazelluläre Matrix-Proteine.** Jeweils 150 μ l der Extrakte A-D wurden in 3-15%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen reduziert (a, c) bzw. nicht reduziert (b) aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und mit Antikörpern gegen Laminin-1 (a), Fibronectin (b) und BM-40 (c) entwickelt. Die entsprechenden Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die verwendeten polyklonalen Antikörper gegen Fibronectin und BM-40 zeigten neben diesen Banden jedoch auch Kreuzreaktivitäten zu Kollagen Typ I (b) bzw. Keratin (c) auf, die bei der Auswertung vernachlässigt werden können.

Aufgrund diese Analysen wurden die weiteren Experimente mit dem TBS-Extrakt (Extrakt A) durchgeführt. Dieser Extrakt gewährleistet ein breites Spektrum an verschiedenen Proteinen in nativer Form zur Herstellung eines Pools monoklonaler Antikörper. Die Identifizierung bisher unbekannter Hautbestandteile sollte somit möglich sein.

Zur Eingrenzung von Matrix-Proteinen, welche zumeist hochmolekulare Bestandteile darstellen, bzw. zur Abtrennung kleinerer intrazellulärer Proteine wurde eine Größenausschluß-Chromatographie durchgeführt. Nach Konzentrierung wurde diese Proteinmischung für die Immunisierung verwendet. Weitere Reinigungsschritte (z.B. mittels Ionenaustauscher-Chromatographie) wurden unterlassen, um nicht eventuell wichtige Bestandteile abzutrennen. Proben der erhaltenen Proteinlösung wurden zur Immunisierung von zwei Ratten verwendet. Das Serum dieser Tiere wurde zur Bestimmung des Titers etwa alle zwei Wochen in verschiedenen Verdünnungen immunhistochemisch auf Maus-Haut-Schnitten und im ELISA getestet. Nach Erreichen eines Titers von 1:10000 wurde die Immunisierung gestoppt und die Milzzellen der beiden Tiere getrennt voneinander für zwei Fusionen verwendet.

Die Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgte mittels der von Köhler und Milstein (1975) entwickelten Lymphozyten-Hybridom-Technik (Abb. 8). Hierbei werden die Antikörperproduzierenden Milzzellen einer immunisierten Ratte mit den Zellen einer geeigneten Zelllinie (Myelom-Zellen), die permanent in vitro kultivierbar ist, gemischt und durch Zusätze zur Fusion gebracht. Die entstehenden Hybridomzellen enthalten sowohl genetisches Material der Milzlymphozyten als auch der Myelomzellen. Nach Selektion und Durchmustern der Hybridzellen werden die Klone mit der gewünschten Spezifität zur Produktion der Antikörper weiter kultiviert.

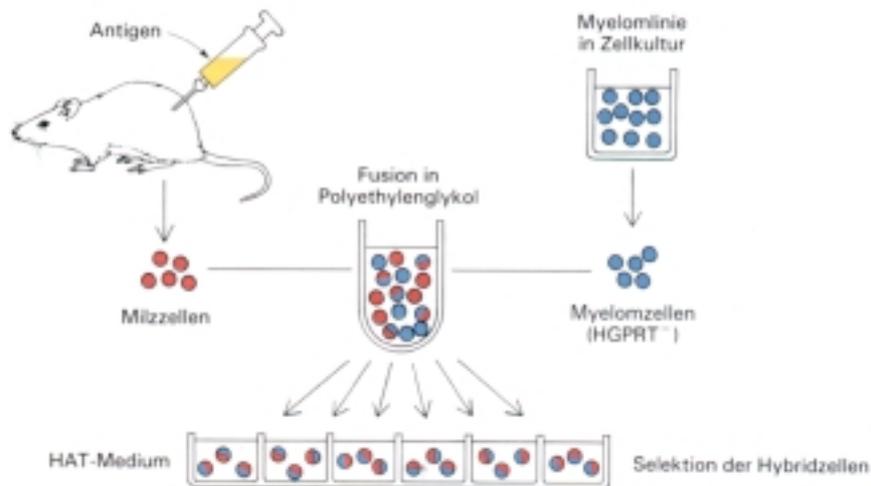


Abb. 8: **Schematische Darstellung zur Herstellung monoklonaler Antikörper.** Hybridomzellen, die durch Fusion von Milzzellen mit Myelomzellen entstanden sind, werden in HAT-Medium kultiviert, selektioniert und die Zellkulturüberstände der Klone auf die Spezifität der Antikörper getestet.

Fusion, Selektion und erste Analyse der erhaltenen Klone wurde von mir unter Anleitung von Dr. L. Sorokin am Institut für Experimentelle Medizin in Erlangen durchgeführt und anschließend am Institut für Biochemie II in Köln etabliert und fortgeführt.

3.2 Charakterisierung der Antikörper

Die beiden unabhängigen Fusionen ergaben zusammen einen Pool von ca. 800 verschiedenen Klonen. Eine erste Analyse dieser Klone wurde mit Hilfe eines ELISA-Assays durchgeführt. Hierzu wurden ELISA-Platten mit TBS-Haut-Extrakt (Extrakt A) beschichtet, mit den Zellkulturüberständen der verschiedenen Klone inkubiert und auf ihre Reaktivität getestet. Etwa 150 der untersuchten Antikörper zeigten während dieser Untersuchungen signifikante Signale und wurden weiter untersucht. Ihre Aktivität wurde sowohl in der Immunfluoreszenz (IF) auf Kryostat-Schnitten von muriner Haut als auch im Immunoblot (IB) auf Haut-Extrakt getestet. In Abb. 9 sind die Ergebnisse dieser ersten Untersuchungen zusammengefasst.

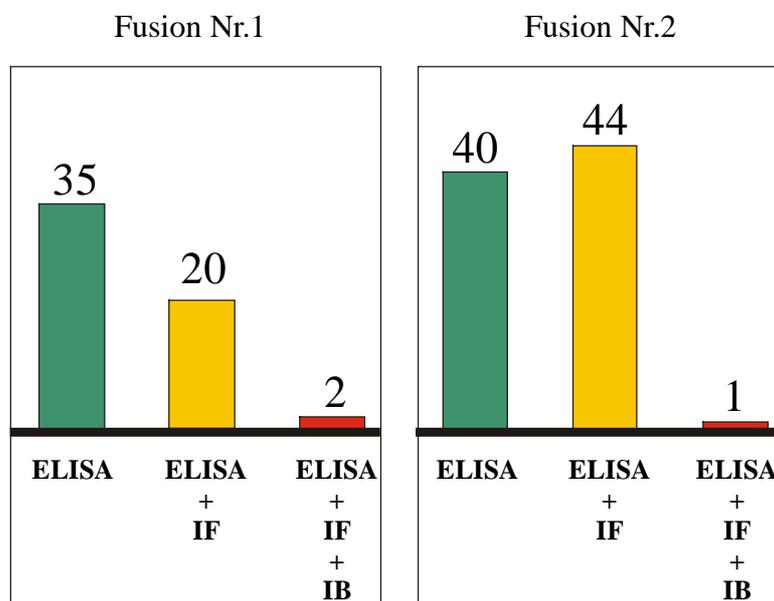


Abb. 9: **Klassifizierung der verschiedenen monoklonalen Antikörper hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber Maus-Haut.** Die unverdünnten Zellkulturüberstände der Hybridomzell-Klone wurden jeweils im ELISA mit Haut-Extrakt, in der Immunfluoreszenz (IF) auf Haut-Schnitten und im Immunoblot (IB) auf Haut-Extrakt analysiert. Die Klone wurden entsprechend ihrer Reaktivität in drei verschiedene Kategorien eingeteilt: grün = nur im ELISA reaktiv; gelb = im ELISA und der IF positiv; rot = reaktiv im ELISA, der IF und im IB.

Etwa 17% der 800 untersuchten Klone zeigten deutliche Reaktionen im ELISA-Test. Die weitere Analyse dieser Klone mittels IF und IB führte zu der in Abb. 9 dargestellten Einteilung der Antikörper. Fast die Hälfte dieser Antikörper wiesen neben ihrer Reaktivität im ELISA-Test zudem die unterschiedlichsten Färbemuster auf Maus-Haut-Schnitten in der Immunfluoreszenz auf. Drei der produzierten Antikörper waren zusätzlich reaktiv im Immunoblot (Abb. 9).

Einige Ergebnisse dieser ersten immunhistochemischen Analysen sind im folgenden (Abb. 10) zusammengestellt.

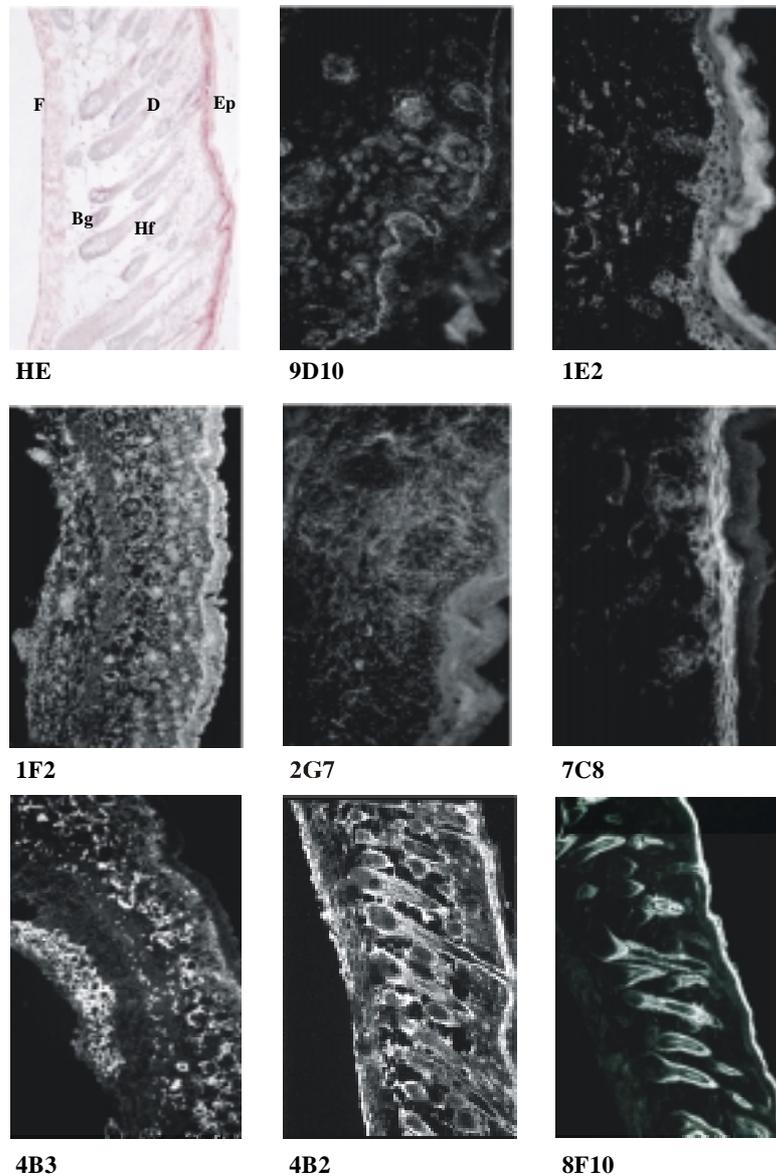


Abb. 10: **Färbemuster einiger ausgewählter Antikörper in der Immunfluoreszenz auf Haut-Schnitten von neugeborenen Mäusen.** Die Antikörper wurden entsprechend ihrer Position in den 96-Loch-Platten mit Nummern versehen (9D10, 1E2 etc.). Haut-Schnitte wurden mit den unverdünnten Zellkulturüberständen der Klone inkubiert und die Signale anschließend mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern detektiert. Als Orientierungshilfe wurde zudem eine Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefertigt. Epidermis (Ep), Dermis (D), Fett (F), Haarfollikel (Hf), Blutgefäße (Bg).

Die obige Zusammenstellung zeigt, daß die einzelnen Klone zu deutlich unterschiedlichen Färbemustern führen.

Die Lokalisierung der korrespondierenden Antigene ist hierbei zum Teil auf einen bestimmten Bereich der Haut beschränkt (mAk 9D10, 2G7, 7C8, 4B3 und 8F10). In anderen Fällen sind die Proteine eher ubiquitär verteilt (mAk 1E2, 1F2, 4B2) (Abb. 10).

Die Färbungen mit den monoklonalen Antikörpern 2G7 und 4B3 legen die Vermutung nahe, daß es sich um extrazelluläre Proteine handelt, da in beiden Fällen die Ausbildung von Netzwerken in der Dermis beobachtet werden kann.

Der mAk 9D10 zeigt eine kontinuierliche Färbung entlang der Basalmembran sowie der oberen Bereiche der Dermis. Epidermis als auch Fettgewebe weisen keinerlei Expression des Antigens auf. Die Antigene 1E2 und 1F2 besitzen eine breitere Verteilung in der Haut. Neben der Lokalisierung in basalen Keratinozyten der Epidermis werden die Proteine auch in allen Bereichen der Dermis und im Fettgewebe exprimiert. Das Erscheinungsbild ist hierbei jedoch jeweils unterschiedlich.

Eine extrazelluläre, netzartige Proteinverteilung in der gesamten Dermis erhält man mit mAk 2G7, während das Antigen zu mAk 7C8 nur in der Epidermis exprimiert wird.

Der monoklonale Antikörper 4B3 zeigte bei diesen Untersuchungen, daß das entsprechende Protein eine breite Verteilung in der Dermis und Subcutis besitzt, in der Epidermis als auch der Basalmembran jedoch nicht vorhanden ist. Das 4B2-Antigen weist eine starke Expression in der Epidermis und eine eher breitere Verteilung in der Dermis auf während die Expression des 8F10-Antigens in der Haut auf einen Bereich um die Haarfollikel herum beschränkt ist (Abb. 10).

Keines dieser Antigene konnte aufgrund der beobachteten Proteinverteilung in Haut einem bekannten Protein zugeordnet werden. Die Verteilung dieser Antigene in verschiedenen Hautbereichen zeigt, daß eine sehr große Zahl verschiedener monoklonaler Antikörper produziert wurde, mit deren Hilfe im weiteren Verlauf des Projektes eine Identifizierung der korrespondierenden Antigene vorgenommen werden kann. Liegen erste Hinweise zur Identifizierung eines dieser Antigene vor, kann, falls es sich um ein bereits bekanntes Protein handelt, durch den Vergleich immunhistochemischer Daten eine Bestätigung oder Widerlegung der Vermutungen gelingen.

Um herauszufinden, ob es sich bei den oben beschriebenen Antigenen um Haut-spezifische Proteine handelt oder ob eine Expression auch in anderen Geweben zu beobachten ist, wurden 16,5 Tage alte Mausembryonen immunhistochemisch untersucht. Da die verschiedenen Gewebe und Organe zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig entwickelt sind, kann ein

Überblick über das Expressionsmuster erhalten werden. Die Detektion der Signale erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper, der die AEC-Färbung (3-Amino-9-ethylcarbazol) katalysiert.

Die Ergebnisse sind in Abb. 11 zusammengestellt.

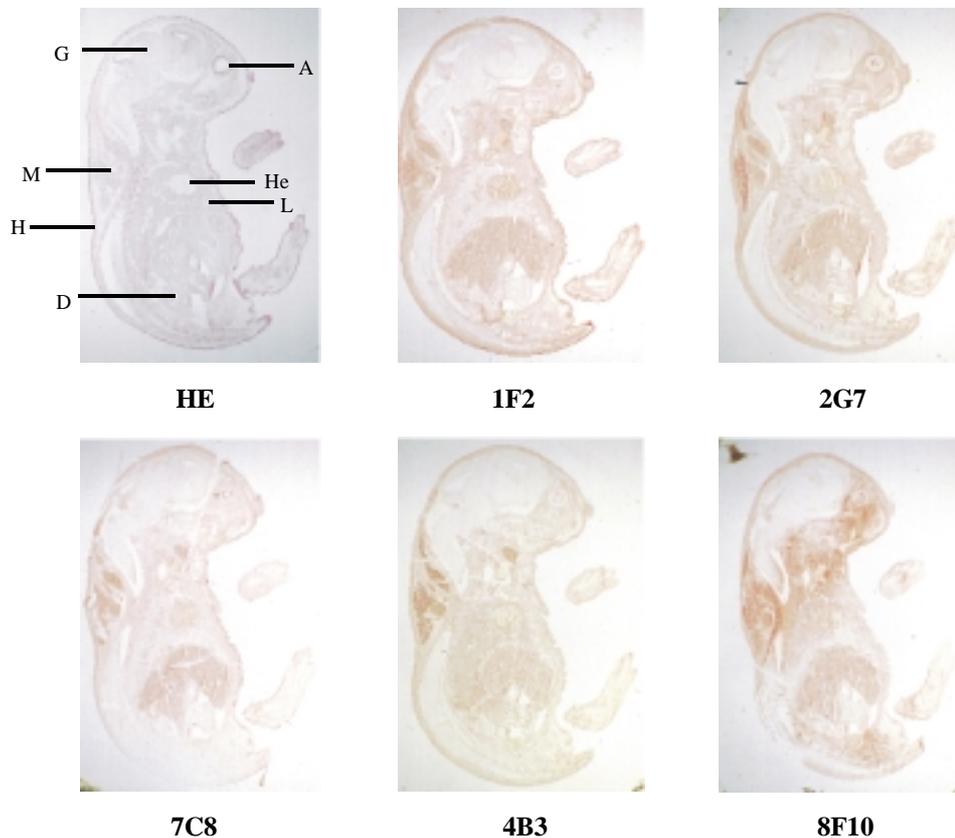


Abb. 11 : **Immunhistochemische Untersuchung mit ausgewählten Zellkulturüberständen auf 16,5 Tage alten Mausembryonen.** Kryostat-Schnitte von 16,5 Tage alten Mausembryonen wurden mit unverdünnten Zellkulturüberständen einiger Klone inkubiert und die Signale nach Inkubation mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper mit AEC detektiert. Zum Vergleich wurde eine HE-Färbung angefertigt. Gehirn (G), Auge (A), Herz (He), Lunge (L), Muskeln (M), Haut (H), Därme (D).

Es zeigt sich, daß die Antigene 1F2, 2G7, 4B3 und 8F10 nicht nur in Haut sondern auch in anderen Geweben exprimiert werden. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei dem Antigen 7C8 um ein Haut-spezifisches Protein.

Mit dem monoklonalen Antikörper 1F2 können neben der Färbung in der Haut weiterhin deutliche Signale im Herzen und in den Skelettmuskeln im Bereich des Rückens beobachtet werden. Das Antigen 2G7 besitzt eine sehr breite Verteilung im gesamten Organismus. Starke Signale sind im Herzen, der Lunge, dem Auge, den Muskeln und der Haut vorhanden (Abb. 11).

Die Expression des Antigens 7C8 beschränkt sich auf die Haut. 4B3 wiederum besitzt eine ubiquitäre Proteinverteilung. Herz, Lunge, Muskeln, Därme sind Gewebe mit einer starken Expression des Proteins, während keinerlei Färbung im Gehirn zu beobachten ist. Mit dem mAk 8F10 kann keinerlei Färbung im Herzen, Gehirn, Lunge und Muskeln beobachtet werden. Haut und bestimmte Teile des Gaumens und Rachenraumes sind hier deutlich gefärbt.

Diese Ergebnisse bestätigen erneut, daß ein großes Panel verschiedener Antikörper hergestellt wurde, welches zur Identifizierung unbekannter Proteine genutzt werden kann. Die meisten dieser Antigene scheinen zudem nicht nur in der Haut vorzukommen, sondern eine breitere Verteilung im Organismus zu besitzen. Diese Gewebe könnten somit auch zur Identifizierung der korrespondierenden Antigene herangezogen werden.

Zusätzlich zu den in der Immunfluoreszenz erhaltenen Daten konnte mit den monoklonalen Antikörpern 4B3, 4B2 und 8F10 auch ein erster Eindruck über die Größe der Antigene gewonnen werden, da die mAk auch im Immunoblot reaktiv waren. Im Immunoblot liegen die Proteine im Vergleich zum ELISA oder der Immunfluoreszenz in denaturierter Form vor. Denaturierung oder reduktive Spaltung von Disulfidbrücken kann zu einer Veränderung der antigenen Determinante führen. Die Folge ist eine mögliche Verminderung der Antikörper-Antigen-Bindung.

Der Antikörper 4B3 detektiert im Immunoblot unter reduzierten und nicht reduzierenden Bedingungen (ohne Abbildung) eine Bande in der Größenordnung von ca. 400 kDa. Diese hochmolekulare Bande wurde auch bei Immunpräzipitationen mit dem Antikörper erhalten (Abb. 12).

Die mAk 4B2 und 8F10 färbten mit und ohne Reduktion Banden im Bereich von etwas über 200 kDa, wobei mAk 8F10 eine eher diffuse Färbung aufwies.

Alle drei Antigene stellen somit hochmolekulare Hautbestandteile dar. Die entsprechenden Antikörper (4B3, 4B2 und 8F10) sind sehr vielseitig einsetzbar, da sie unter nativen und denaturierenden Bedingungen reaktiv sind.

Es ist ersichtlich, daß beide Fusionen eine beträchtliche Anzahl an verschiedenen Antikörpern mit unterschiedlichem Potential hervorgebracht haben. Die einzelnen Klone wurden zur Aufbewahrung eingefroren. Aus diesem Vorrat können nach und nach einzelne Antikörper selektiert und zur Reinigung und Identifizierung der korrespondierenden Antigene verwendet werden.

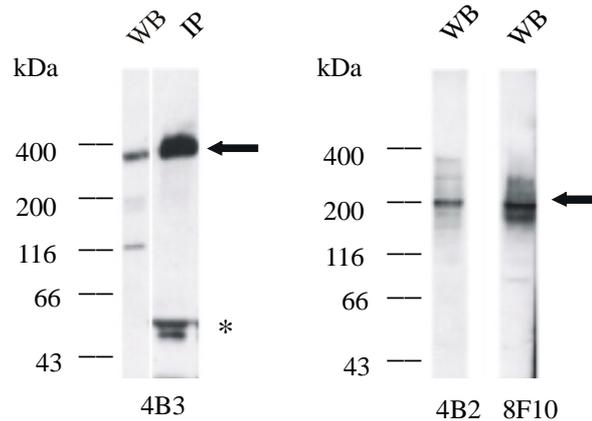


Abb. 12: **Analyse der monoklonalen Antikörpern 4B3, 4B2 und 8F10 im Immunoblot und Immunpräzipitation mit Hautextrakt.** Für die dargestellten Immunoblots wurden jeweils 30 µl von Extrakt A aus Maus-Haut unter reduzierenden Bedingungen im 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran überführt und mit den Zellkulturüberständen der entsprechenden Klone inkubiert. Die Immunpräzipitation mit dem mAk 4B3 wurde mit 1 ml Extrakt A durchgeführt. Die Hauptbanden sind jeweils mit Pfeilen gekennzeichnet, * markiert eine Bande des zur IP verwendeten Antikörpers.

Alle im weiteren verwendeten Klone wurden vor Beginn der sich anschließenden Untersuchungen subkloniert, d.h. die Zellen wurden vereinzelt. So konnte garantiert werden, daß die von diesem Klon produzierten Antikörper monoklonal waren.

Der Klon 4B3 konnte zwar vereinzelt werden, keiner der erhaltenen Einzel-Klone war jedoch positiv und zusätzlich verlor auch der Ursprungs-Klon zunehmend an Reaktivität. Die weiteren Arbeiten mit diesem instabilen Klon wurden daher eingestellt.

Die Bestimmung der Subklassen der subklonierten monoklonalen Antikörper erfolgte mit einem kommerziellen Idotyping Kit. Hierbei ergab sich, daß der Großteil der Antikörper vom Typ IgM war. Diese Tatsache ist von großer Bedeutung, da die verschiedenen Subklassen in diversen Anwendungsbereichen (wie z.B. Affinitätsreinigung und Immunpräzipitation) unterschiedliche Eigenschaften besitzen.

Die weitere Arbeit konzentrierte sich auf die Identifizierung und Charakterisierung der korrespondierenden Antigene der Antikörper 4B2 und 8F10, da diese Antikörper in allen drei getesteten Verfahren (ELISA, Immunfluoreszenz und Immunoblot) reaktiv waren und eine Identifizierung dieser Antigene am vielversprechendsten erschien.

3.3 Durchmustern einer Haut-Expressions-cDNA-Bibliothek

Eine mögliche Vorgehensweise zur Identifizierung eines Proteins mit Hilfe eines Antikörpers ist das Durchmustern einer Expressionsbank. Im vorliegenden Fall wurde hierzu eine Haut-Expressions-cDNA-Bank der Firma Stratagene verwendet. Es handelt sich hierbei um eine cDNA-Bibliothek, die entweder mit entsprechenden DNA-Proben oder auch mit Antikörpern durchsucht werden kann.

Ein großer Vorteil dieser Methode liegt darin, daß es auch möglich ist Sequenzinformationen von Proteinen zu erhalten, die in Geweben nur sehr gering exprimiert werden. Eine geringe Proteinexpression erschwert bzw. verhindert die Reinigung eines Proteins. Ohne eine ausreichende Menge des gereinigten Proteins ist eine Proteinsequenzierung und damit die Identifizierung nicht möglich.

Das Durchmustern einer solchen Bibliothek mit Antikörpern ist jedoch zumeist nicht einfach, sondern bereitet große methodische Schwierigkeiten. Ein extrem wichtiger Punkt ist die Auswahl des verwendeten Antikörpers. Dieser sollte idealerweise das korrespondierende Antigen unter nativen, sowie denaturierenden Bedingungen erkennen, einen hohen Titer und eine hohe Spezifität besitzen. Obwohl generell ein polyklonales Antiserum einem monoklonalen Antikörper vorzuziehen ist, kann auch ein Gemisch von mAk, die gegen verschiedene Epitope desselben Proteins gerichtet sind, eingesetzt werden. Ein Vorteil von monoklonalen Antikörpern im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern ist zudem eine geringere unspezifische Reaktivität. Vor Beginn des Durchmusterns sollte für jeden Antikörper einzeln die optimale Verdünnung gefunden werden.

Die Haut-Expressions-Phagen-Bibliothek wurde ausplattiert und die Expression der Proteine mit IPTG induziert. Hierzu wurden IPTG-haltige Nitrocellulose-Filter auf die Oberfläche der Platten aufgelegt.

Die so hergestellte Matrizen wurden mit monoklonalen Antikörpern durchmustert. Da eine korrekte Faltung der Antigene nach Expression in *E. coli* nicht zu erwarten ist, wurde die Auswahl, der zum Durchmustern verwendeten monoklonalen Antikörper (4B2 und 8F10), auf der Grundlage ihrer Reaktivität unter denaturierenden Bedingungen im Western-Blot getroffen.

Als Positivkontrolle wurde ein polyklonales Serum gegen Laminin-1 und als Negativkontrolle der Sekundärantikörper alleine verwendet. Hiermit sollten Fehler bei der Herstellung und dem Durchmustern der Matrizes ausgeschlossen werden können.

Das Durchmustern der Haut-Expressionsbank mit den mAk 4B2 (Abb. 13) und 8F10 führte zu zahlreichen Klonen, die sich aber allesamt in den anschließenden Vereinzelungsschritten

als „falsch positiv“ herausstellten (Tab. 1). Bei der Entwicklung der einzelnen Filter ergaben sich für beide monoklonalen Antikörper jeweils ca. 60 verschiedene Klone mit unterschiedlicher Intensität. Diejenigen Klone, die am vielversprechendsten erschienen, wurden gepickt, erneut ausplattiert und die Filter durchsucht. Keiner dieser Klone war jedoch im weiteren positiv (Tab. 1). Ein ähnliches Bild ergab sich mit dem Antikörper gegen Laminin-1.

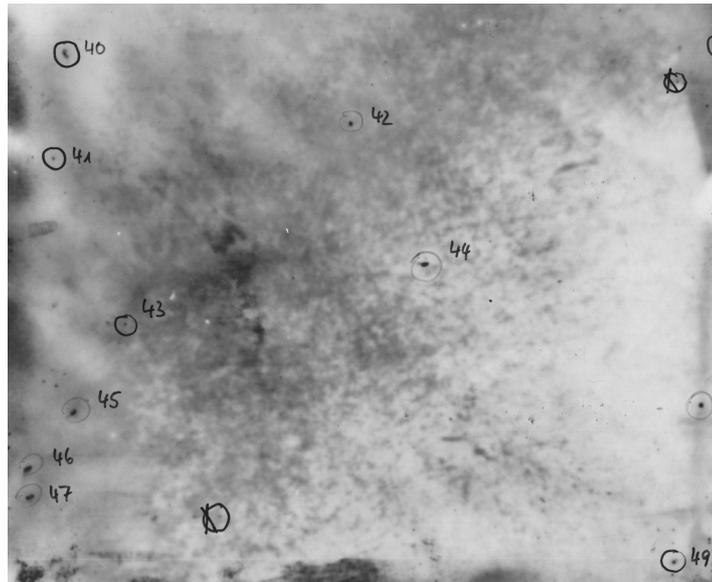


Abb. 13: **Durchmustern einer Matrize mit dem monoklonalen Antikörper 4B2.** Positive Klone wurden umrandet, mit Nummern versehen, auf der entsprechenden Platte gepickt, erneut ausplattiert und durchmustert.

Die Ergebnisse der Experimente sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Antikörper	gepickte Klone	vereinzelte Klone	positive Klone
mAk 4B2	62	50	0
mAk 8F10	57	40	0
anti Laminin-1	55	20	0

Tab. 1: **Durchsuchung einer Haut-cDNA-Expressions-Bibliothek mit den mAk 4B2, 8F10 sowie einem anti-Laminin-1 Antikörper.** Die präparierten Nitrocellulose-Filter wurden mit unverdünnten Zellkulturüberständen der Klone 4B2 und 8F10 sowie einem Antikörper gegen Laminin-1 durchsucht.

Da keiner der durchgeführten Ansätze zum gewünschten Ergebnis führte, wurden im weiteren Verlauf proteinchemische Methoden zur Identifizierung verwendet.

3.4 Aufreinigung und Identifizierung des 4B2-Antigens

Zur Identifizierung des korrespondierenden Antigens ist eine Anreicherung des Proteins, jedoch keine vollständige Reinigung notwendig. Liegt das Protein z.B. als mit Coomassie Brilliant Blue gefärbte Gelbande vor, kann nach proteolytischem Verdau eine Sequenzierung des Proteins mit Hilfe der Massenspektroskopie (MALDI- bzw. Q-TOF) vorgenommen werden. Die Auswahl der Anreicherungsverfahren und Bedingungen ist hierbei jeweils auf das Potential des monoklonalen Antikörpers abzustimmen.

Die Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 4B2 (siehe Ergebnisse Teil B) ergab, daß der Antikörper unter nativen und denaturierenden Bedingungen reaktiv ist. Die Detektion des korrespondierenden Antigens ist somit immunhistochemisch als auch im Immunoblot möglich. Zur Klärung der Frage, ob der Antikörper auch zur Affinitätsreinigung des Proteins eingesetzt werden kann, wurde eine Immunpräzipitation mit Zellkulturüberstand des Klons versucht.

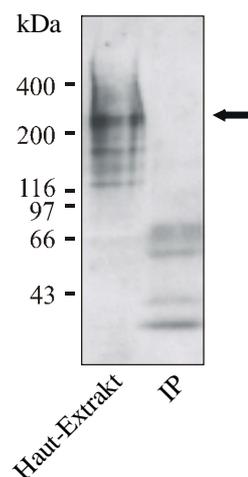


Abb. 14: **Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper 4B2.** Zellkulturüberstand des Klons 4B2 und Maus-Haut-Extrakt wurden präzipitiert und in einem 3-15%igen SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurden 30 µl des Haut-Extraktes mit aufgetragen. Die Detektion erfolgte im Immunoblot mit mAk 4B2.

Der Antikörper detektierte im Immunoblot auf Maus-Haut-Extrakt unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen eine Doppelbande bei ca. 220 kDa sowie weitere Banden bei geringerem Molekulargewicht. Die Immunpräzipitation mit Haut-Extrakt unter Verwendung von Protein G verlief im Gegensatz hierzu negativ (Abb. 14). Der Antikörper vom Typ IgM konnte zwar zum Teil an Protein G gebunden werden, eine Präzipitation des

Antigens aus Haut-Extrakt war jedoch unter diesen Bedingungen nicht möglich. Aus diesem Grund wurde im weiteren der Antikörper gereinigt, kovalent an CNBr-Sepharose gekoppelt und in dieser Form erneut in Präzipitations-Studien eingesetzt. Das Antigen konnte aber auch unter den variierten Bedingungen nicht präzipitiert werden (ohne Abb.).

Eine Anreicherung des Proteins mittels Immunpräzipitation oder Antikörper-Affinitätschromatographie ist unter den bisher verwendeten Bedingungen mit diesem Antikörper somit nicht möglich.

Zur Reinigung von Proteinen aus komplexen Gewebe-Extrakten können verschiedene andere chromatographische Verfahren kombiniert werden. Die diversen Fraktionen eines Reinigungsschrittes werden hierbei mittels Immunoblot sowie Coomassie Brilliant Blue- bzw. Silber-Färbung analysiert.

Immunoblot-Analysen ergaben, daß das Antigen nicht nur in Haut-Extrakten sondern auch in großen Mengen in Lungen-Extrakt zu finden ist. Weiterhin ist die Reaktivität des Antikörpers nicht auf die Spezies Maus beschränkt. Positive Signale ergaben sich auch bei der Verwendung von Rinder-Proben sowie mit humanem Material (Abb. 15).

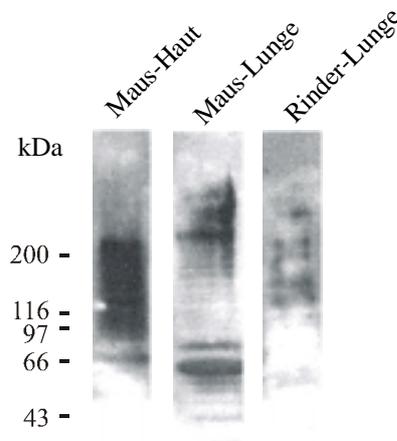


Abb. 15: **Analyse verschiedener Gewebeextrakte im Immunoblot mit mAk 4B2.** Maus-Haut, Maus-Lunge und Rinder-Lunge wurden extrahiert und nach Auftrennung im 3-15%igen SDS-PAGE auf Nitrocellulose-Membran transferiert und mit mAk 4B2 entwickelt.

Aufgrund der guten Verfügbarkeit wurden nun im weiteren die Reinigungsversuche mit Rinder-Lungen-Extrakt durchgeführt. Das Protein konnte auch aus diesem Gewebe unter isotonischen Bedingungen mit TBS, pH 7,4, (Puffer A) extrahiert werden.

Nach zahlreichen Vorversuchen zur Bestimmung der geeignetsten Säulenmaterialien und Chromatographiebedingungen wurde für die Anreicherung des 4B2-Antigens aus Rinder-Lungen-Extrakt folgendes Protokoll verwendet (Abb. 16).

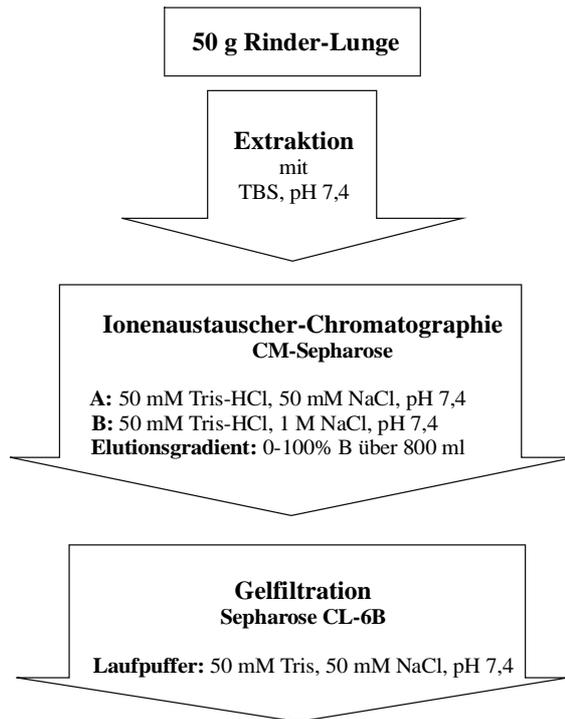


Abb. 16: Flußdiagramm der Chromatographieschritte zur Anreicherung des 4B2-Antigens aus Rinder-Lungen-Extrakt.

Nach einer 1:3-Verdünnung mit 50 mM Tris, pH 7,4 wurde Rinder-Lungen-Extrakt auf eine CM-Sepharose-Säule aufgetragen, die Säule mit Puffer A gespült und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten über vier Säulenvolumen (800 ml) von 50 mM bis 1 M NaCl eluiert.

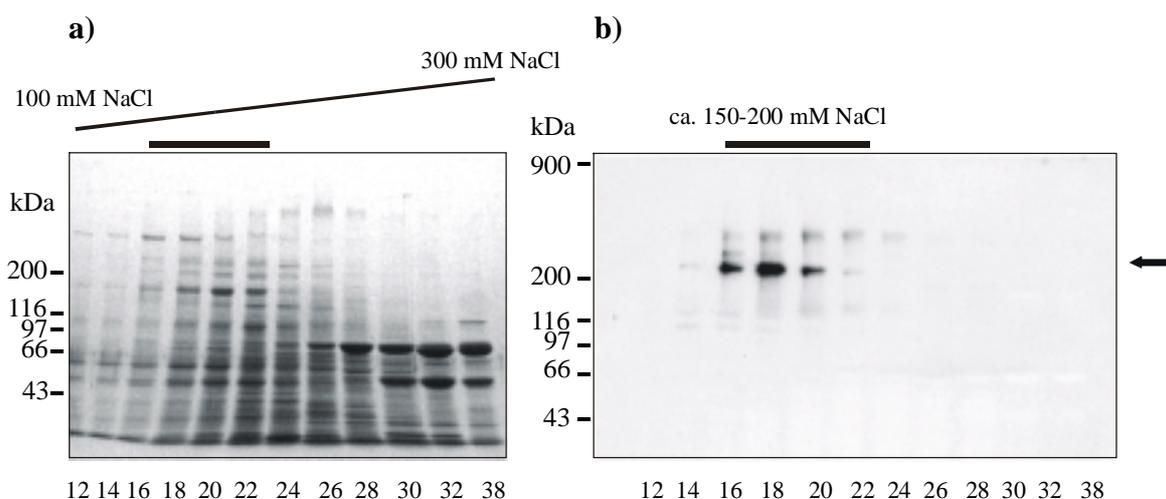


Abb. 17: Analyse ausgewählter CM-Sepharose-Fractionen. Jeweils 30 μ l der Fractionen werden unter reduzierten Bedingungen im 3-15%igen SDS-PAGE analysiert. Coomassie Brilliant Blue Färbung des Gels (a), Immunoblot mit mAk 4B2 (b).

Die einzelnen Fraktionen wurden reduziert (Abb. 17) und nicht-reduziert (ohne Abb.) in SDS-Polyacrylamid-Gelen und mit Immunoblots (mAk-4B2) analysiert. Hierbei zeigte sich, daß das Protein unter obigen Bedingungen bei relativ geringen Salzkonzentration (150 bis 200 mM NaCl) in den Fraktionen 16-22 eluiert wird.

Die positiven Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und auf eine Sepharose CL-6B-Säule aufgetragen. Die einzelnen Fraktionen des Gelfiltrationslaufs wurden mittels Immunoblot analysiert (Abb. 18). Das Protein eluiert hierbei nach 350 bis 450 ml (d.h. nach 70-90% des Säulenvolumens) in den Fraktionen 75-92.

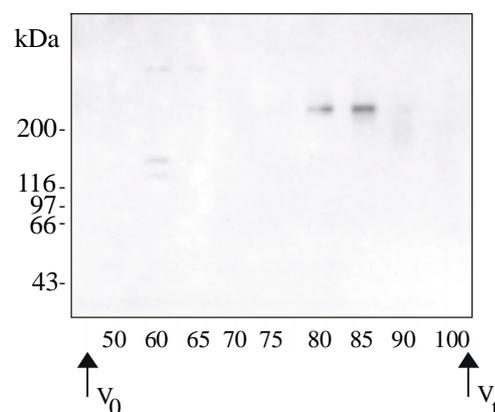


Abb. 18: **Immunoblot von Fraktionen der Sepharose CL-6B.** 30 μ l der einzelnen Fraktionen wurden aufgetragen, mit einem reduzierten 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und das Antigen mit mAk 4B2 detektiert.

Die vereinten Fraktionen vom Gelfiltrationslauf wurden wiederum konzentriert und analysiert (Abb. 19). Das mit Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Polyacrylamidgel zeigte, daß eine Doppelbande im Bereich von ca. 220 kDa angereichert werden konnte. Die Analyse der Proteinlösung im Immunoblot mit mAk 4B2 wies an dieser Stelle ebenfalls eine Doppelbande auf, wobei die obere Bande deutlich stärker gefärbt wurde, und bestätigte somit das es sich bei der angereicherten Doppelbande um das 4B2-Antigen handelt.

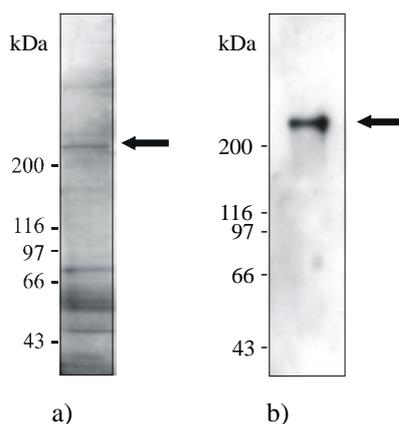


Abb. 19: **Analyse des 4B2-Pools nach Konzentrierung.** Jeweils 150 μ l der Fraktionen werden unter reduzierten Bedingungen im 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Coomassie Brilliant Blue Färbung des Gels (a), Immunoblot mit mAk 4B2 (b). Die entsprechenden Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Proben dieser Doppelbande wurden aus einem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die resultierenden Peptide von Dr. J. Fox, University of Virginia, sequenziert. Dr. Fox gelang es mittels LC MS/MS zwei verschiedene Proteine in der abgegebenen Proteinbande zu identifizieren. Seine Resultate ergaben zum einen Talin und zum anderen AHNAK (Tab. 2).

Talin

Nr.	gefundene Sequenzen	Position Talin_Maus P26039
1	MATNAAAQNAIK	988 – 910
2	VLVQNAAGSQEK	2032 – 2043
3	TMLESAGGLIQTAR	1605 – 1618
4	DHFGLEGDEESTMLEDSVSPK	407 – 427
5	TSTPEDFIRMTKGITMATAK	2169 – 2188
6	SNTSPEELGPLANQLTSDYGR	1875 – 1895
7	GSQAQPDSPSAQLALIAASQSFLQPGGK	972 – 999
8	TLAESALQLLYTAK	1767 – 1780

AHNAK

Nr.	gefundene Sequenzen	Positionen AHNAK_Human AC004230
1	FKMPEMNIK (13x)	559 – 567, 687 – 695, 2448 – 2456, 2704 – 2712, 2832 – 2840, 2960 – 2968, 3412 – 3420, 3614 – 3622, 3742 – 3750, 3998 – 4006, 4126 – 4134, 4200 – 4208, 4590 – 4598
2	ADIDVSGPK (6x)	1034 – 1042, 2418 – 2426, 2546 – 2554, 3840 – 3847, 4432 – 4440, 4560 – 4568
3	FSMPGFK (18x)	638 – 644, 1015 – 1021, 1143 – 1149, 1271 – 1277, 1473 – 1479, 1809 – 1815, 2004 – 2010, 2271 – 2277, 2399 – 2405, 2655 – 2661, 2783 – 2789, 3363 – 3369, 3565 – 3571, 3821 – 3827, 3949 – 3955, 4077 – 4083, 4413 – 4419, 4541 – 4547
4	VEGDLDKGPEIDVK (1x)	1357 - 1369
5	VKGDVDVTLPK (1x)	4488 – 4498
6	GEGPEVDVNP (4x)	894 – 905, 2011 – 2022, 2918 – 2929, 3828 – 3839
7	ISMPDIDLNLKGPK (5x)	2844 – 2857, 3296 – 3309, 3498 – 3511, 3626 – 3639, 4474 – 4487
8	VDTNAPDLSLEGPEGK (1x)	787 – 802
9	VDINTPDVDVHGPDWHLK (1x)	4515 – 4532

Tab. 2: **Resultate der Peptidsequenzierung.** Die entsprechenden Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und die nach In-Gel-Trypsin-Verdau entstandenen Peptide mittels LC MS/MS sequenziert. Ein Vergleich dieser Sequenzen mit Sequenzinformationen aus Datenbanken führte zur Identifizierung von zwei verschiedenen Proteinen. Die Aminosäurepositionen der einzelnen Sequenzen sind jeweils aufgelistet. Im Fall einer mehrfachen Zuordnung der Sequenzen ist die Anzahl dieser Wiederholungen in Klammern angegeben.

Beide Möglichkeiten erschienen auf den ersten Blick recht unwahrscheinlich. AHNAK ist ein sehr großes intrazelluläres Protein (680 kDa), während es sich bei Talin um einen Bestandteil

der Fokalkontakte handelt. Mit dem mAk 4B2 konnte jedoch weder ein Protein in der Größe von 680 kDa detektiert, noch mittels Immunhistochemie Fokalkontakte angefärbt werden. Zudem könnte es im Bereich des Möglichen liegen, daß sich neben diesen Proteinen noch weitere Proteine in dieser einen Gelbande befinden.

Ein Vergleich der Informationen aus der Literatur über die Proteine AHNAK und Talin mit den mittels mAk 4B2 gewonnenen Daten zeigte im folgenden, daß Talin als 4B2-Antigen sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann, da Talin im Gegensatz zum Antigen 4B2 eine breitere Verteilung im gesamten Organismus besitzt und mit dem mAk 4B2 keinerlei Fokalkontakte angefärbt werden konnten. Das Studium der AHNAK-Literatur zeigte gewisse Ähnlichkeiten zu den mit mAk 4B2 in der Immunfluoreszenz gewonnenen Daten – vor allem im Verteilungsmuster der Proteine in der Haut. Jedoch handelt es sich bei AHNAK um ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 680 kDa, was nicht mit der bis dahin gefundenen Größe des 4B2-Antigens von ca. 220 kDa zu vereinbaren ist. Möglich wäre jedoch ein proteolytischer Abbau des Proteins unter den verwendeten Extraktions- und Lagerungsbedingungen, da bei den bisherigen Extraktionen nur PMSF und NEM als Protease-Inhibitoren verwendet wurden.

Aus diesem Grund wurden erneut Proteinextrakte unter der Verwendung eines kommerziellen Protease-Inhibitor-Mixes hergestellt. Ein Teil der Probe wurde sofort nach der Extraktion bei -20°C eingefroren, ein anderer Teil bei 37°C gelagert und nach unterschiedlichen Zeitperioden eingefroren. Das Degradationsverhalten der verschiedenen Proben wurde mittels Immunoblot überprüft (Abb. 20).

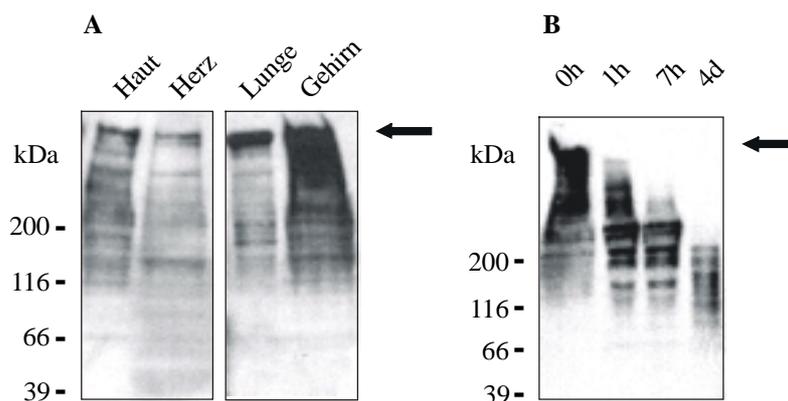


Abb. 20: Immunoblot mit frisch isolierten Gewebe-Extrakten und Zugabe von Proteaseinhibitor (A) sowie dem Degradationsverhalten (B). Es wurden je 30 μl der verschiedenen Proben reduziert auf einem 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran überführt und der Blot mit mAk 4B2 inkubiert. (A) Gewebeextrakte unter Verwendung eines Protease-Inhibitor-Mixes, (B) Haut-Gewebe-Extrakt wurde bei 37°C inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

Es zeigt sich, daß der mAk 4B2 unter den modifizierten Bedingungen in den verschiedensten Gewebeextrakten (Haut, Herz, Lunge, Gehirn) ein Protein in der Größenordnung von ca. 700 kDa erkennt. Eine Lagerung des Extraktes bei 37°C bestätigt einen starken Abbau des Proteins bei längerer Lagerung. Diese Tatsache macht es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei dem 4B2-Antigen um AHNAK handelt und gibt einen ersten wichtigen Hinweis zur Widerlegung der Hypothese, das es sich um Talin handeln könnte.

Da bisher kein Antikörper gegen AHNAK käuflich zu erwerben ist, wurde nach einer alternativen Methode gesucht, diese Hypothese zu bestätigen oder zu widerlegen. Zur Klärung der Fragestellung wurde nun versucht das AHNAK-Protein in voller Länge zu isolieren und dieses Protein erneut zu sequenzieren. Im Gegensatz zum ersten Reinigungsversuch wurde in diesem Ansatz unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Dies sollte schon zu Beginn eine Degradation des Proteins durch Proteasen verhindern. Weiterhin wurde ein anderes Gewebe zur Extraktion verwendet. Die Entscheidung, von Rinder-Lungengewebe zu Rinder-Haut zu wechseln, wurde aus Gründen der geringeren proteolytischen Aktivität getroffen.

Nach der Extraktion der Proteine aus der Haut wurde die Lösung direkt durch Zufügen einer 8 M Harnstoff-Lösung auf eine Endkonzentration von ca. 7M Harnstoff eingestellt.

Für die Reinigung bzw. Anreicherung des 700 kDa Proteins wurde folgendes Protokoll verwendet:

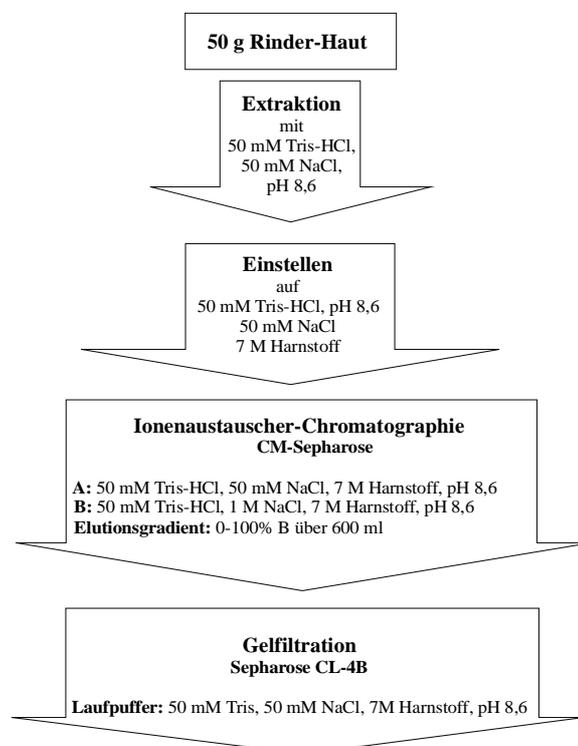


Abb. 21: Flußdiagramm der Chromatographie-Schritte zur Anreicherung des 4B2-Antigens als 700 kDa Protein.

Eine CM-Sepharose-Säule wurden mit einem Tris-Harnstoff-Puffer (7 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8,6) äquilibriert und mit dem vorbehandelten Extrakt aus boviner Haut beladen. Die gebundenen Proteine wurden mittels eines linearen Salzgradienten eluiert und die einzelnen Fraktionen mittels Immunoblot (mAk-4B2) analysiert.

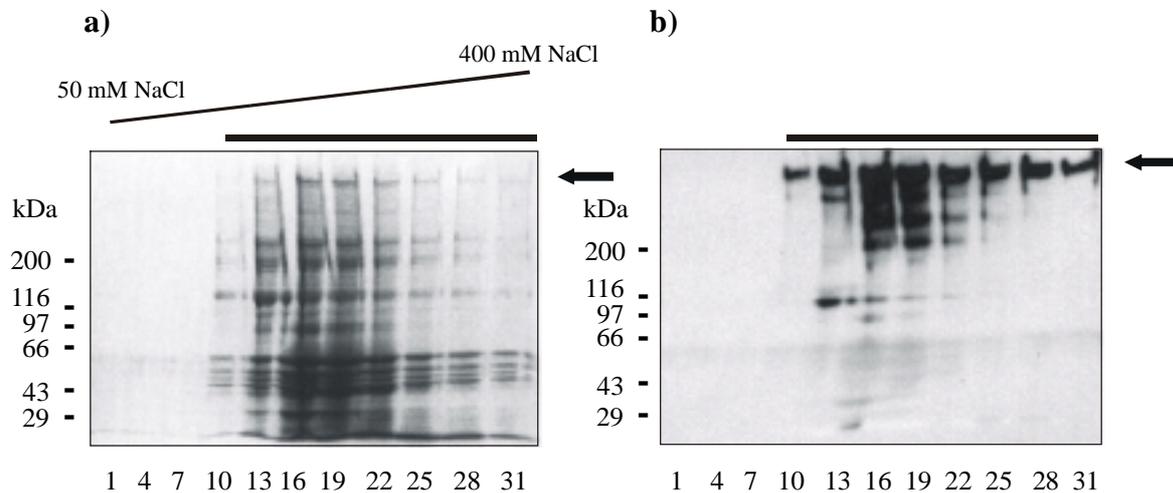


Abb. 22: **Analyse ausgewählter Fraktionen der CM-Sepharose-Säule.** Es wurden jeweils 30 μ l ausgewählter Fraktionen aufgetragen und in einem 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Coomassie Brilliant Blue Färbung des Gels (a) sowie Immunoblot mit mAk 4B2 (b).

Die positiven Fraktionen 13-40 wurden vereinigt. Neben einer ersten Abtrennung zahlreicher anderer Proteine diente dieser Schritt vor allem der Konzentrierung des zu reinigenden Proteins.

Die Proteine der vereinigten Fraktionen wurden anschließend portionsweise nach ihrer Größe über eine Gelfiltration (Sepharose CL-4B) getrennt. Die Fraktionen, die das 4B2-Antigen enthielten, wurden abschließend konzentriert und unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen analysiert (Abb. 23).

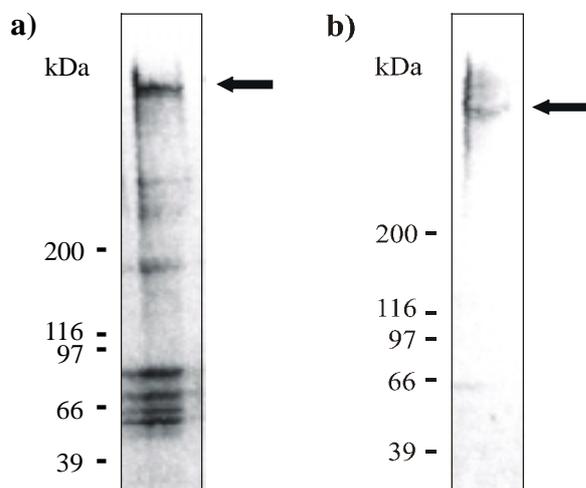


Abb. 23: **Analyse des Konzentrierungsschrittes nach der Gelfiltration.** Jeweils 30 μ l wurden unter reduzierenden (a) und nicht reduzierenden (b) Bedingungen auf einem 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Es zeigte sich, daß unter denaturierenden Bedingungen in wenigen Schritten ein 700 kDa Protein angereichert werden kann. Die Haupt-Verunreinigung, die während dieser Prozedur nicht abgetrennt werden konnte, besteht größtenteils aus Keratinen des Haut-Extraktes (Abb. 23). Die entsprechende Bande wurde aus dem reduzierten Coomassie Brilliant Blue gefärbten SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und für die Ansequenzierung mittels Q-TOF vorbereitet. Hierzu wurde ein In-Gel-Trypsin-Verdau durchgeführt und die resultierenden Peptide aus dem Gel eluiert.

Die Analyse der erhaltenen Peptide wurde von Dr. M. Macht im Servicelabor, ZMMK, der Med. Fakultät Köln, durchgeführt. Es konnten drei verschiedene Peptide mit einer Länge zwischen 14 und 19 Aminosäuren komplett sequenziert werden (Tab. 3). Der Vergleich dieser Daten mit der in Datenbanken vorliegenden humanen AHNAK-Sequenz bestätigte, daß es sich bei dem untersuchten Protein um AHNAK handelt.

Nr.	Masse (Da)	gefundene Sequenzen	Positionen AHNAK_Human AC004230
1	1555,83	ISMPDIDLNLKGPK (6x)	2460 – 2473, 2844 – 2857, 3296 – 3309, 3498 – 3511, 3626 – 3639, 4474 – 4487
2	1541,82	ISMPDVLDNLKGPK (2x)	1076 – 1089, 2206 – 2219
3	2064,23	FSMPGFKGEGPEVDVNLPK (2x)	2004 – 2022, 3821 – 3839

Tab. 3: **Resultate der Peptidsequenzierung der 700 kDa-SDS-PAGE-Bande.** Die entsprechende Bande wurden aus dem SDS-PAGE-Gel herausgeschnitten und die nach In-Gel-Trypsin-Verdau entstandenen Peptide mittels LC MS/MS sequenziert. Ein Vergleich dieser Sequenzen und Peptidgrößen mit der humanen AHNAK-Sequenz bestätigte, daß der monoklonale Antikörper 4B2 gegen AHNAK gerichtet ist. Alle drei erhaltenen Sequenzen befinden sich im mittleren repetitiven Bereich des Proteins und konnten mehrfach zugeordnet werden (in Klammern).

AHNAK/Desmoyokin, ein sehr großes intrazelluläres Protein, wurde ursprünglich sowohl als nukleäres Phosphoprotein, das in humanen Neuroblastomen und zahlreichen anderen Tumorzellen herunterreguliert wird, identifiziert (Shivelman et al., 1992) als auch als ein desmosomales Protein in Epithelzellen (Hashimoto et al., 1993). Anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde eine direkte Lokalisierung des Proteins in Desmosomen jedoch widerlegt (Masunaga et al., 1995).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß AHNAK in Kardiomyozyten assoziiert mit L-Typ Calciumkanälen vorliegt (Haase et al., 1999). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß AHNAK Phospholipase C- γ 1 in Anwesenheit von Arachidonsäure bindet und aktiviert

(Sekiya et al., 1999). Neueste Ergebnisse haben zudem gezeigt, daß AHNAK in der Anwesenheit von Calcium an S100B, ein Mitglied der S100-Calmodulin-Troponin-Superfamilie, bindet (Gentil et al., 2001).

AHNAK besitzt eine breite Verteilung in verschiedenen Zelltypen und zellulären Kompartimenten. Das Protein wurde in Neuroblastomen und HeLa-Zellen vorrangig aber nicht ausschließlich im Nukleus lokalisiert (Shivelman et al., 1993). Im Gegensatz hierzu wurde für epitheliale Zellen eine Assoziation des Proteins mit der Plasmamembran beschrieben sowie eine cytoplasmatische Verteilung in Melanomzellen beobachtet (Hashimoto et al., 1993; Hashimoto et al., 1995).

AHNAK kann in drei verschiedene strukturelle Regionen eingeteilt werden: 251 Aminosäuren N-terminal, gefolgt von einem großen mittleren Bereich mit ca. 4300 Aminosäuren bestehend aus über 30 repetitiver Motiven, sowie 1002 Aminosäuren C-terminal (Abb. 24). Eine Analyse der verschiedenen repetitiven Motive ergibt eine 80%ige Identität untereinander. Der C-terminale Bereich enthält sowohl einige mögliche Nukleus-lokalisierungssignale, ein Leuzin-Zipper Motiv als auch potentielle Phosphorylierungsstellen (Shivelman et al., 1992).

Durch Vergleich genomischer DNAs verschiedener Spezies wurde festgestellt, daß AHNAK phylogenetisch hoch konserviert vorliegt.

Die im Laufe der Identifizierung der 220 kDa-Fragmente sowie des AHNAK-Proteins in voller Länge erhaltenen Sequenzen befinden sich im mittleren repetitiven Bereich. Keine der Sequenzen konnte dem N- bzw. C-Terminus zugeordnet werden (Abb. 24).

3.5 Gewebeverteilung von AHNAK

Mit Hilfe der immunhistologischen Technik sowie anhand von Gewebe-Extrakten wurde die Expression von AHNAK im Mausgewebe bestimmt.

3.5.1 Analyse von Gewebe-Extrakten

Zur Bestimmung der Gewebeverteilung wurden verschiedene Gewebe und Organe aus adulten Mäusen präpariert. Wie schon zuvor zur Reinigung des Proteins wurde auch hier zur Extraktion unter nativen Bedingungen ein Puffer unter Zusatz eines Protease-Inhibitor-Cocktails verwendet. Die so hergestellten Protein-Extrakte wurden im Immunoblot analysiert (Abb. 25).

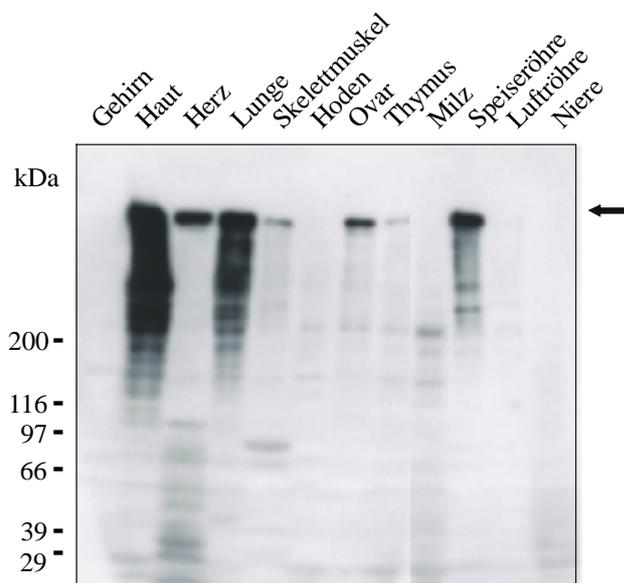


Abb. 25: **Expression von AHNAK in verschiedenen Geweben.** Es wurden je 30 μ l der verschiedenen Extrakte reduziert in einem 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran überführt und der Blot mit mAk 4B2 umgesetzt.

AHNAK weist eine sehr breite Expression in diversen Geweben und Organen auf (Abb. 25). Speziell Haut und Lunge sind Gewebe mit einer sehr hohen Expression des Proteins. Aber auch in Herz, Skelettmuskel, Ovar, Thymus und Speiseröhre kann das Protein als ca. 700 kDa Bande detektiert werden. Neben dieser hochmolekularen Bande bei etwa 700 kDa können in einigen Geweben zusätzlich Degradationsbanden zwischen 700 und 150 kDa entdeckt werden. Extrakte aus Gehirn, Hoden und Luftröhre zeigten nach längeren Belichtungszeiten des Blots ebenfalls Banden im Bereich von ca. 700 kDa. Keinerlei AHNAK-Expression konnte in Milz- und Nieren-Extrakten nachgewiesen werden.

3.5.2 Immunfluoreszenz

Zur detaillierteren Analyse der Lokalisation von AHNAK im Gewebe wurden Kryostat-Schnitte verschiedener adulter Gewebe sowie von 16.5 Tage alten Mausembryonen angefertigt. Zur Bestimmung der Verteilung in Haut wurden Tiere im Alter von 3-4 Tagen verwendet, da die Herstellung der Kryostat-Schnitte einfacher ist. Die Detektion der AHNAK-Signale erfolgte mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper.

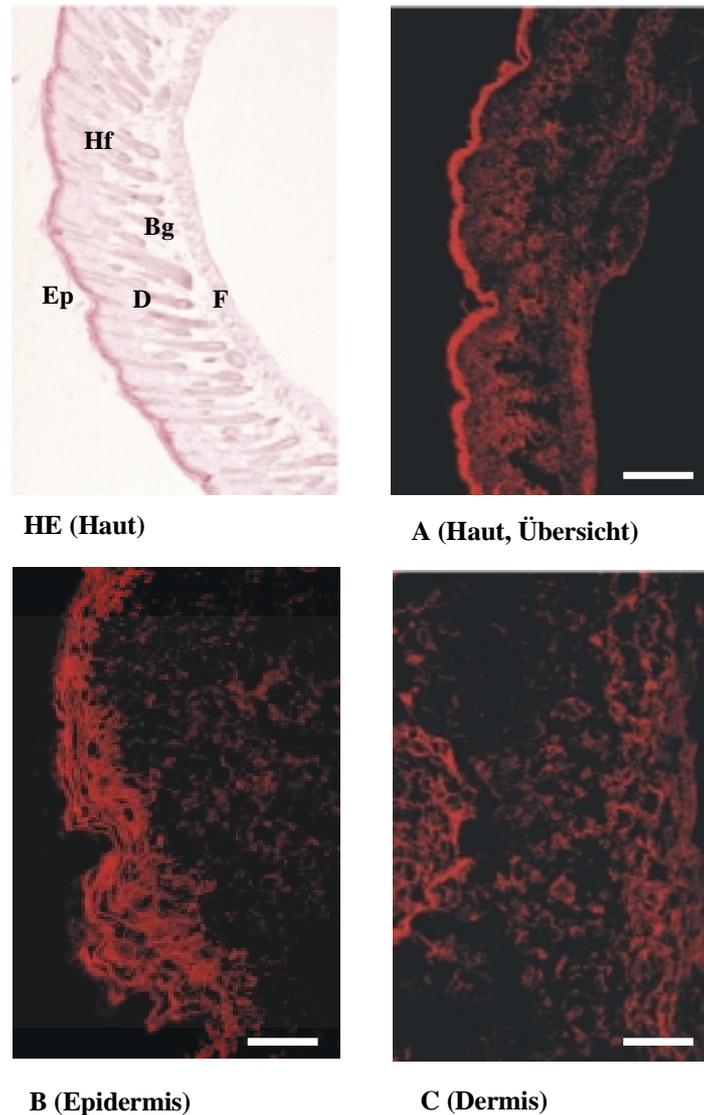


Abb. 26: **Immunfluoreszenz-Färbung zur Lokalisierung von AHNAK in Haut von neugeborenen Mäusen mit mAk 4B2 (A-C).** Die Balken entsprechen (A) 400 μm sowie (B, C) 50 μm . Als Orientierungshilfe wurde zudem eine Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefertigt. Epidermis (Ep), Dermis (D), Fettgewebe (F), Haarfollikel (Hf), Blutgefäße (Bg).

Abb. 26 zeigt die Lokalisation von AHNAK in der Haut von neugeborenen Mäusen (A-C). Es kann eine starke Färbung der Epidermis beobachtet werden (A, B). Bei genauerer Betrachtung ist eine Färbung im Bereich der Keratinozyten-Zellmembran im Stratum basale und Stratum spinosum zu erkennen (B). In der Dermis besitzt das Protein ebenfalls eine breite Verteilung (A, C). In allen drei Dermissschichten (Stratum papillare, Stratum reticulare und Subcutis) kann AHNAK detektiert werden. Der mAk 4B2 färbt hierbei unter anderem hautversorgende Gefäße und Drüsen an (C). Eine Basalmembranfärbung konnte nicht gefunden werden.

In der Lunge werden die Wände der Bronchioli und Alveolen mit mAk 4B2 angefärbt (Abb. 27A). Das Bronchialepithel weist in den größeren Bronchien eine mehrreihige und in den kleineren peripheren Ästen eine weniger umfangreiche Schicht aus Zylinderepithel auf. Dieses Epithelgewebe wird von einem kollagenfaserigen subepithelialen Gewebe und glatter Muskulatur gestützt.

Auf Herzschnitten werden Kapillare gefärbt (Abb. 27B). Die Wände von größeren Blutgefäßen, Kapillaren und Venen bestehen aus Intima (Endothel und Subendothel), Media (ringförmig angeordnete glatte Muskelfaser) und Adventitia (Bindegewebe mit elastischen Fasern).

Mit Hilfe der vorliegenden Färbungen auf Kryostat-Schnitten kann zwar nicht unterschieden werden, in welchen Teilen der Kapillar- bzw. Bronchial-Wände AHNAK exprimiert wird, die Expression im Endothelgewebe erscheint jedoch als sehr wahrscheinlich.

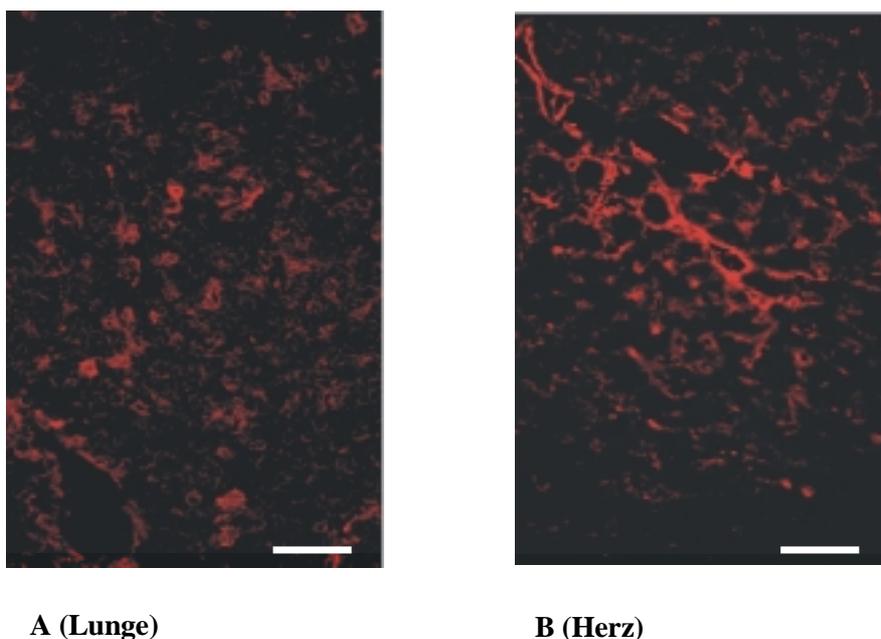


Abb. 27: **Immunfluoreszenz-Färbung zur Lokalisierung von AHNAK in der Lunge (A) und dem Herzen (B) von adulten Mäusen.** Die Balken entsprechen (A) 100 μm sowie (B) 50 μm .

Im Gehirn ist eine hohe Expression des Proteins im Cerebellum zu finden. Es kann eine deutliche Färbung in der dreischichtigen Kleinhirnrinde beobachtet werden (Abb. 28A, B). Diese besteht aus einer äußeren Molekularzellschicht, in der nur wenige Nerven- und Gliazellen liegen, einer kernreichen Körnerzellschicht und einer dazwischen-liegenden Ganglienzellschicht der Purkinje-Zellen. Die Expression von AHNAK kann zum einen in den großen Purkinje-Zellen sowie auch in der gesamten Körnerzellschicht beobachtet werden (Abb. 28B). AHNAK ist zudem in den Gefäßwänden kleiner und größerer Blutgefäße vorhanden (Abb. 28B, C). Abb. 28D zeigt weiterhin die Lokalisation des Proteins in der Großhirnhaut.

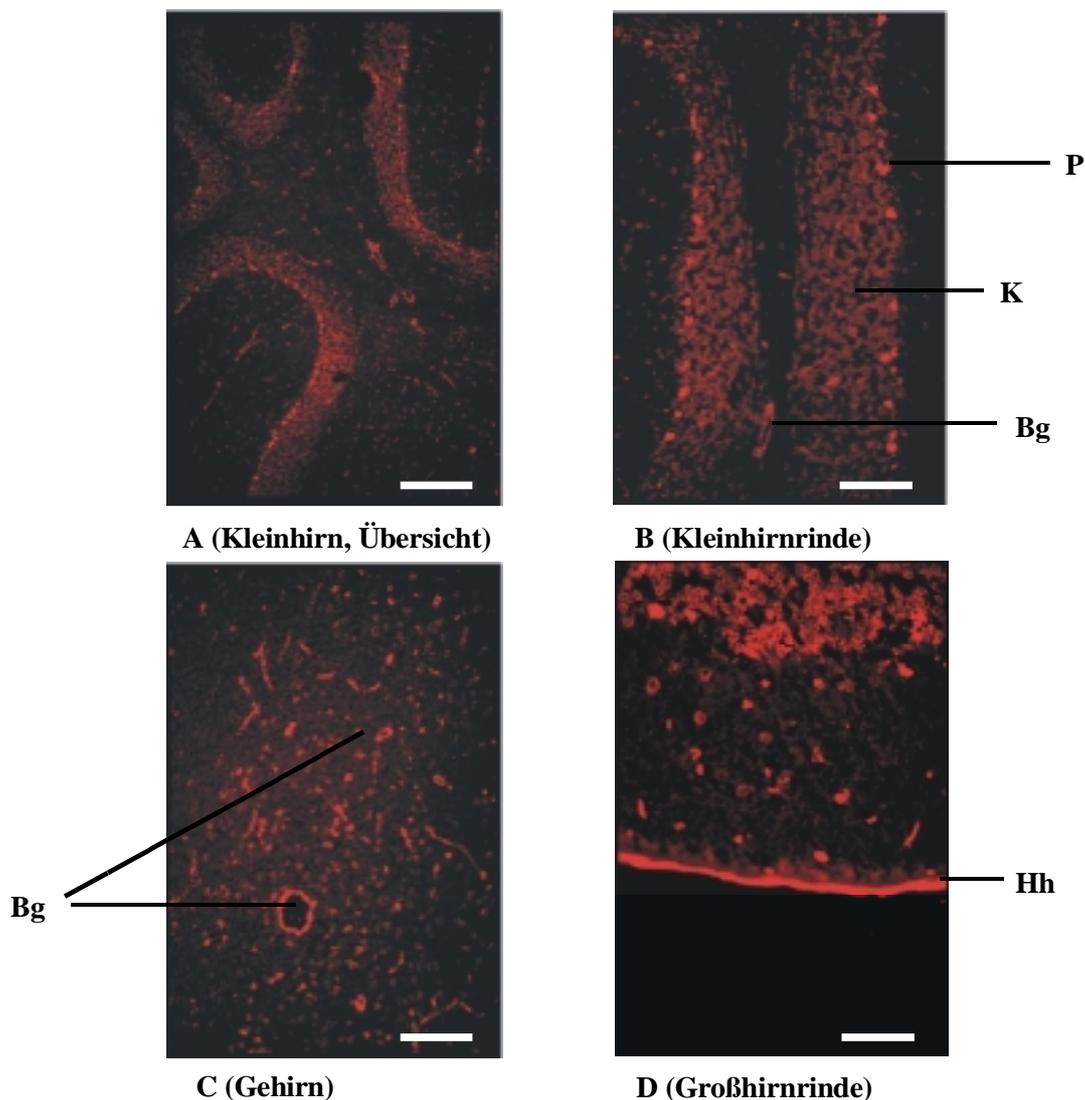


Abb. 28 : **Immunfluoreszenz-Färbung zur Lokalisierung von AHNAK im Gehirn einer adulten Maus.** (A) 5-fache, (B-D) 40-fache Vergrößerung. Purkinjezellen (P), Körnerzellschicht (K), Blutgefäße (Bg), Hirnhaut (Hh). Die Balken entsprechen (A) 400 μ m sowie (B-D) 50 μ m.

In der Skelettmuskulatur ist AHNAK im Bereich des Endomysiums zu finden. Blut- und Lymphgefäße, sowie Nervenfasern verlaufen in diesem Supportgewebe. Neben der starken Färbung von größeren Blutgefäßen (Abb. 29A) ist auch eine breite Verteilung von AHNAK um die Muskelfasern zu finden. Es handelt sich hierbei um eine eher diskontinuierliche Färbung (Abb. 29B).

In der embryonalen Leber (Abb. 29C) ist eine starke Expression von AHNAK zu beobachten. Neben einer Färbung von größeren Blutgefäßen ist weiterhin eine Färbung im gesamten Gewebe zu erkennen. Es handelt sich hierbei sehr wahrscheinlich auch um die endothelialen Gefäßauskleidungen der einzelnen Sinusoide.

Ein Gewebe mit einer sehr hohen AHNAK Konzentration stellt weiterhin das Diaphragma zwischen Leber und Lunge dar (Abb. 29D).

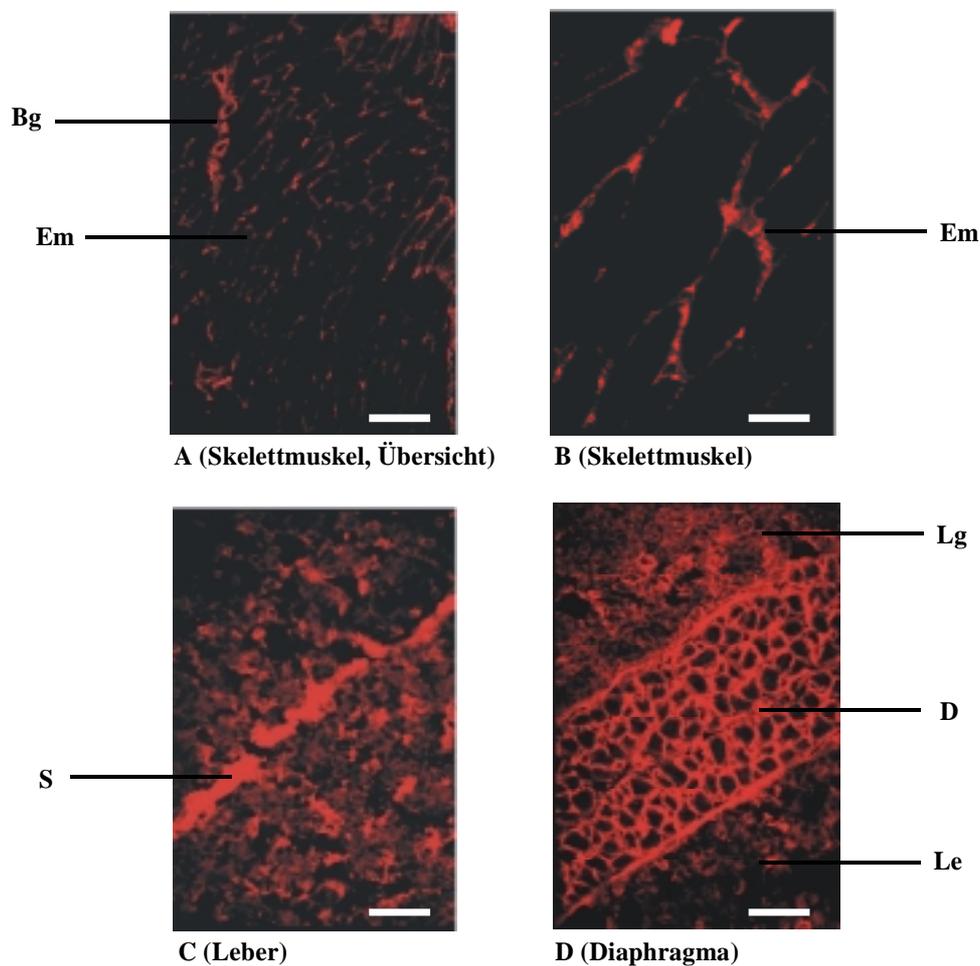


Abb. 29 : Immunfluoreszenz-Färbung zur Lokalisierung von AHNAK im Skelettmuskel einer adulten Maus (A, B), sowie in der Leber (C) und dem Diaphragma (D) eines 16.5 Tage alten Maus-Embryos. Blutgefäße (Bg), Endomysium (Em), Sinusoid (S), Lunge (Lg), Diaphragma (D), Leber (Le). Die Balken entsprechen (A) 400 µm sowie (B-D) 50 µm.

Bei der Betrachtung eines Querschnittes durch die Mundhöhle fällt eine sehr starke Färbung der verschiedenen Speicheldrüsen auf. Hier ist exemplarisch ein Ausschnitt der Färbung in der Glandula submandibularis dargestellt (Abb. 30A). Es handelt sich hierbei um eine gemischt seromuköse Drüse, deren sezernierende Azini überwiegend aus Epithelgewebe bestehen. In diesem epithelialen Gewebe wird AHNAK exprimiert. Es ist deutlich ein gefärbter Ausführungsgang zu erkennen. Auch in der Schilddrüse konnte die Expression von AHNAK im Epithelgewebe nachgewiesen werden (Abb. 30B).

Ein weiteres Gewebe, in dem AHNAK exprimiert wird, stellt der Hoden dar (Abb. 30C). Der Hoden wird von einer Kapsel (Tunica albuginea) umschlossen. Innerhalb der Kapsel befinden sich die einzelnen Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) sowie Blut- und Lymphgefäße. Eine AHNAK Expression kann in den Blutgefäßen, die sich in den Zwischenräumen der Tubuli befinden, sowie wahrscheinlich im Keimepithel, welches die Tubuli auskleidet, beobachtet werden.

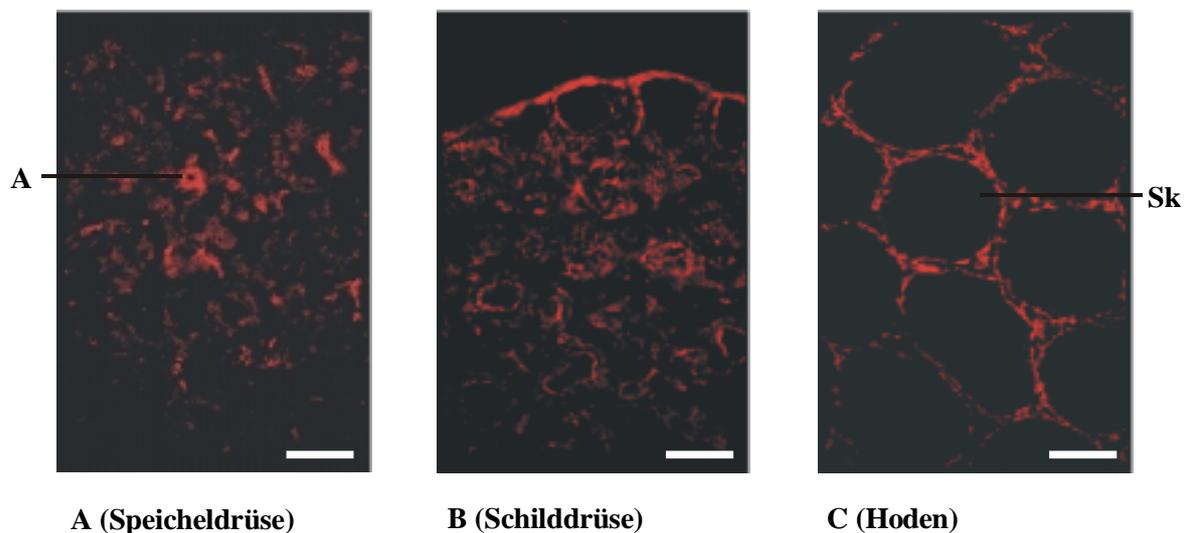


Abb. 30: **Immunfluoreszenz-Färbung zur Lokalisierung von AHNAK in der Speicheldrüse (A), Schilddrüse (B) und Testes (C) einer adulten Maus.** Ausführungsgang (A), Samenkanälchen (Sk). Die jeweiligen Balken (A-C) entsprechen 50 μ m.

Eine deutliche Expression des Proteins konnte auch in den Verdauungsorganen gefunden werden. Dünndarm (Abb. 31A) und Speiseröhre (Abb. 31B, C) weisen mit mAk 4B2 eine starke Färbung im Epithel-Gewebe auf, während die darunterliegenden Schichten nicht gefärbt werden. AHNAK ist hierbei an der epithelialen Zellmembran zu finden (Abb. 31C).

Eine ähnliche Verteilung kann auch in der Zunge beobachtet werden. Im unverhornten Plattenepithel an der Zungenunterseite sowie im verhornten Epithel an der Oberseite befindet sich AHNAK jeweils an der Zellmembran der epithelialen Zellen (Abb. 31D).

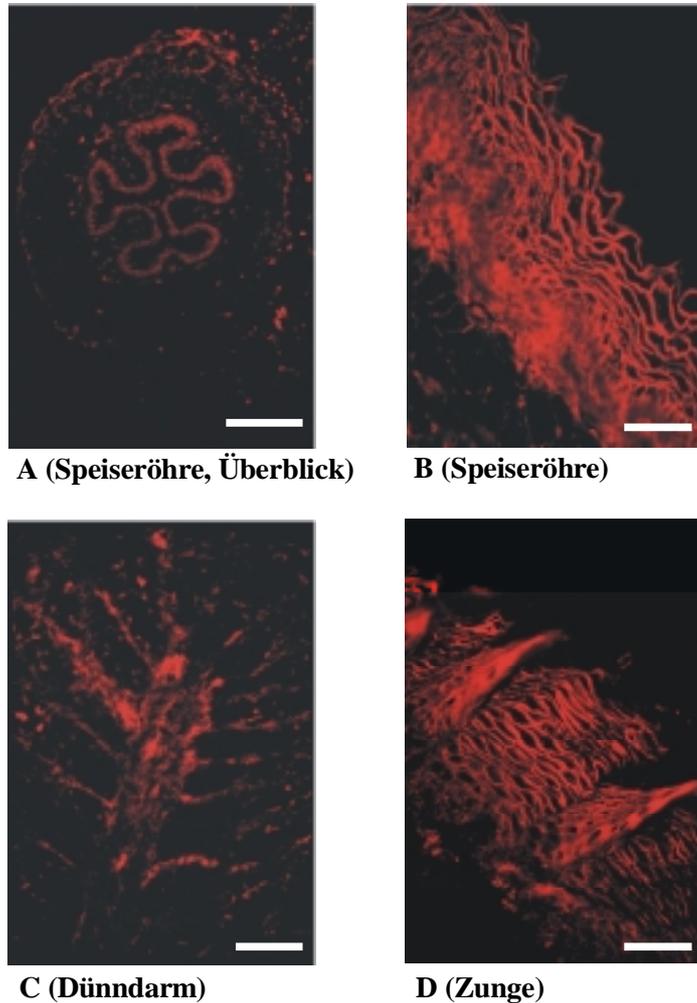


Abb. 31: Immunfluoreszenz-Färbung zur Lokalisierung von AHNAK in der Speiseröhre (A, B), Dünndarm (C) und der Zunge (D) einer adulten Maus. Die Balken entsprechen (A) 200 µm und (B-D) 50 µm.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen kann festgestellt werden, daß AHNAK sowohl in epithelialen als auch endothelialen Zellen unterschiedlicher Gewebe exprimiert wird.

3.5.3 Lokalisierung von AHNAK in adulter humaner Haut

Zur Lokalisierung von AHNAK in humaner Haut wurde eine adulte Hautgewebeprobe untersucht. Während AHNAK in der Haut von neugeborenen Mäusen in der Epidermis als auch der Dermis eine breite Verteilung besitzt (Abb. 26), kommt es in adulter humaner Haut nur in der Epidermis und in Blutgefäßen vor (Abb. 32A, B). In anderen Bereichen der Dermis konnte bei diesen Untersuchungen AHNAK nicht nachgewiesen werden.

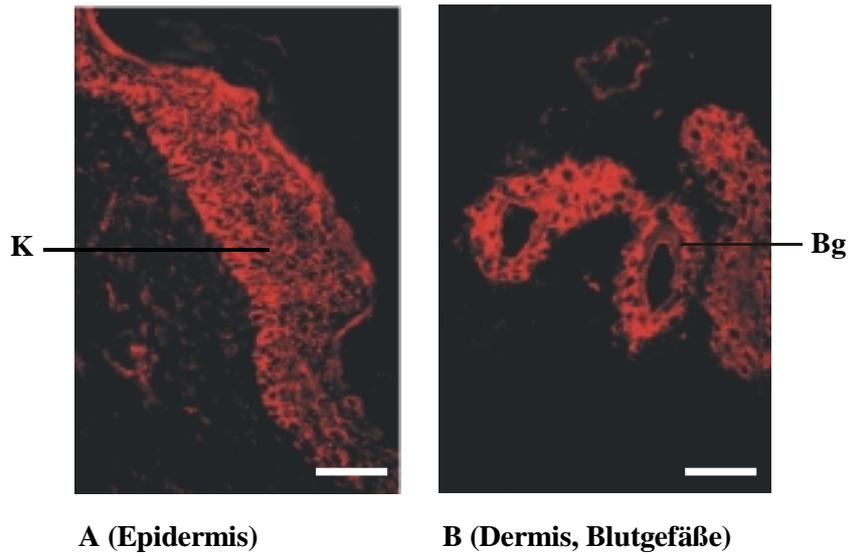


Abb. 32: **AHNAK Expression in adulter humaner Haut.** Ausschnitte aus der Epidermis (A) sowie der Dermis (B). Keratinozyten (K), Blutgefäße (Bg). Der Balken entspricht jeweils 50 μm .

3.5.4 Analyse der endogenen Expression von AHNAK in verschiedenen Zelllinien

Um eine eindeutige Bestimmung der AHNAK produzierenden Zelltypen zu ermöglichen, wurden verschiedene Zelllinien auf ihre endogene Expression von AHNAK untersucht. Hierzu wurden zum einen Zell-Extrakte analysiert sowie auch das Expressionsmuster mittels Immunfluoreszenz-Färbung auf kultivierten Zellen ermittelt.

Western-Blot-Analyse

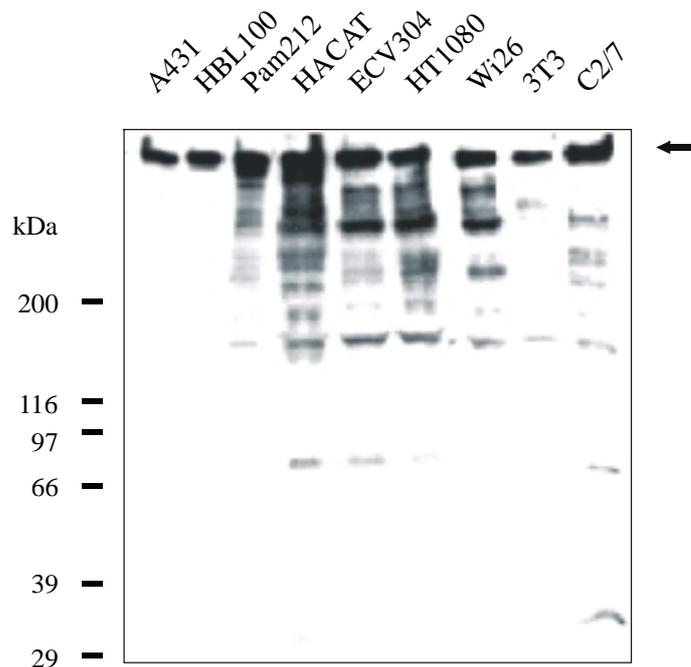


Abb. 33: **Endogene Expression von AHNAK in verschiedenen Zelltypen.** Es wurden jeweils 30 μ l der Extrakte unter reduzierenden Bedingungen im 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und AHNAK mit mAk 4B2 detektiert.

Die Analyse der angefertigten Zell-Extrakte ergibt, daß AHNAK von allen Zelltypen, d.h. epidermoiden Karzinomzellen (A431), Epithelzellen (HBL100), Keratinozyten (Pam212, HACAT) sowie Fibroblasten (Wi26, 3T3), Fibrosarcomzellen (HT1080), Myoblasten (C2/7) und auch Endothelzellen (ECV304), als ca. 700 kDa-Protein endogen exprimiert wird. Weiterhin ist ersichtlich, daß auch bei der Verwendung eines Protease-Inhibitor-Cocktails eine Degradation des Proteins nicht vollständig verhindert werden kann (Banden zwischen 150 und 700 kDa) (Abb. 33).

Diese Ergebnisse bestätigen die immunhistologische Lokalisierung von AHNAK in epithelialen und endothelialen Zellen unterschiedlicher Gewebe. Zusätzlich wurde jedoch auch eine endogene Expression des Proteins in Fibroblasten und Myoblasten nachgewiesen.

Untersuchung mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Um ein genaueres Bild über die Verteilung des Proteins in den verschiedenen Zelltypen zu erhalten, wurden Zellen auf geeigneten Objektträgern ausplattiert. Nach einigen Tagen erfolgte die Untersuchung der konfluenten Zellen mittels Immunfluoreszenz. Die Zellen wurden hierzu vor der Inkubation mit dem Primärantikörper fixiert und permeabilisiert.

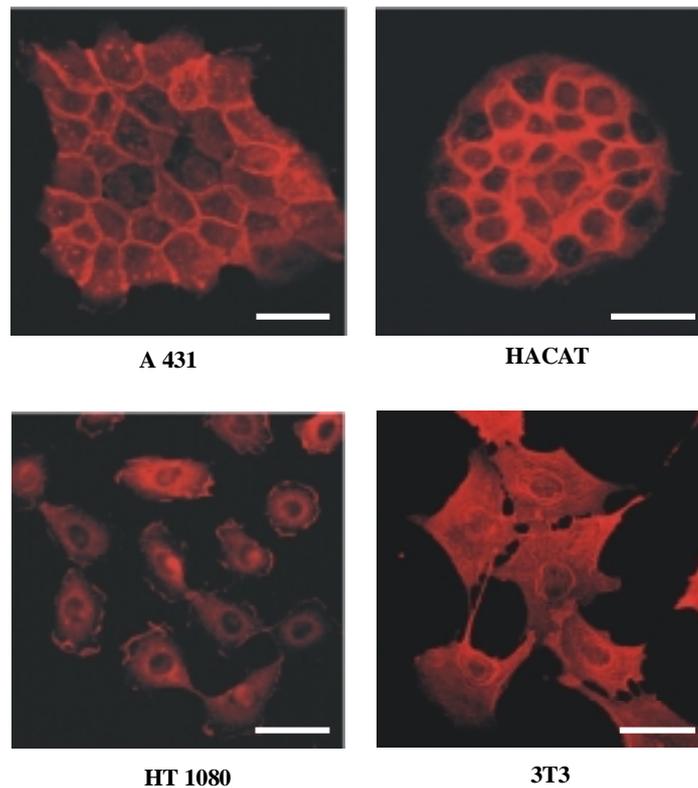


Abb. 34: **Immunfluoreszenz auf verschiedenen Zelltypen.** Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert, mit mAk 4B2 inkubiert und die Signale mit Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper markiert. Humane epidermoide Karzinomzellen (A431), humane Keratinozyten (HACAT), humane Fibrosarcomzellen (HT1080) und Maus-Fibroblasten (3T3) wurden untersucht. Der Balken entspricht jeweils 50 μm .

In allen untersuchten Zelllinien konnte eine endogene Expression des Proteins nachgewiesen werden (Abb. 34). AHNAK zeigt jedoch ein unterschiedliches Expressionsmuster zwischen Epithelzellen und nicht epithelialen Zellen. In epidermoiden Karzinomzellen (A431) und Keratinozyten (HACAT) scheint AHNAK vorrangig mit der Plasmamembran assoziiert vorzuliegen, während Fibroblasten (3T3) eine eher cytoplasmatische Färbung zeigen. Im Fall der humanen Fibrosarcomzellen HT1080 kann eine Färbung im Cytoplasma sowie an der Zellmembran beobachtet werden. Die Betrachtung einzelner Keratinozyten-Inseln zeigt zudem eine verstärkte Färbung im Bereich von Zell-Zell-Kontakten.

3.6 Funktionsstudien von AHNAK

AHNAK weist eine starke Expression in Epithelzellen verschiedener Gewebe sowie in kultivierten Zellen auf. Mit Hilfe der weiteren Experimente sollte die Frage geklärt werden, ob AHNAK in Keratinozyten eine Rolle bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten spielt oder ob das Expressionsmuster mit einer anderen Funktion in Einklang gebracht werden kann.

3.6.1 Doppel-Immunfluoreszenz mit AHNAK und β -Catenin bzw. Cadherin

Um sicherzustellen, daß es sich bei der beobachteten Färbung in Keratinozyten um eine Expression des Proteins an der Plasmamembran handelt, wurden Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen AHNAK, Cadherin und β -Catenin gemacht. Cadherine sind transmembrane Zelloberflächenglykoproteine, die in der Anwesenheit von Calcium Zelladhäsion vermitteln. β -Catenin bindet an den cytoplasmatischen Teil von Cadherin und vermittelt den Kontakt mit dem mikrofilamentären System. Beide Proteine sind gut charakterisiert und somit geeignete Marker für Zell-Zell-Kontakte.

Die Verwendung geeigneter Zweitantikörper, die jeweils mit unterschiedlich fluoreszierenden Gruppen markiert waren (cy3, rot und Alexa488, grün), ermöglicht es, zwei Fluoreszenzsignale parallel zu detektieren. Die räumliche Kollokalisierung von zwei Proteinen zeigt sich in der Überlagerung beider Signale, die in gelber Färbung resultiert.

In den folgenden Abbildungen ist die Lokalisation der Proteine in humanen epidermoiden Karzinomzellen (A431, Abb. 35) bzw. epithelialen Karzinomzellen (CaCo2, Abb. 36) unter normalen Kultivierungsbedingungen dargestellt.

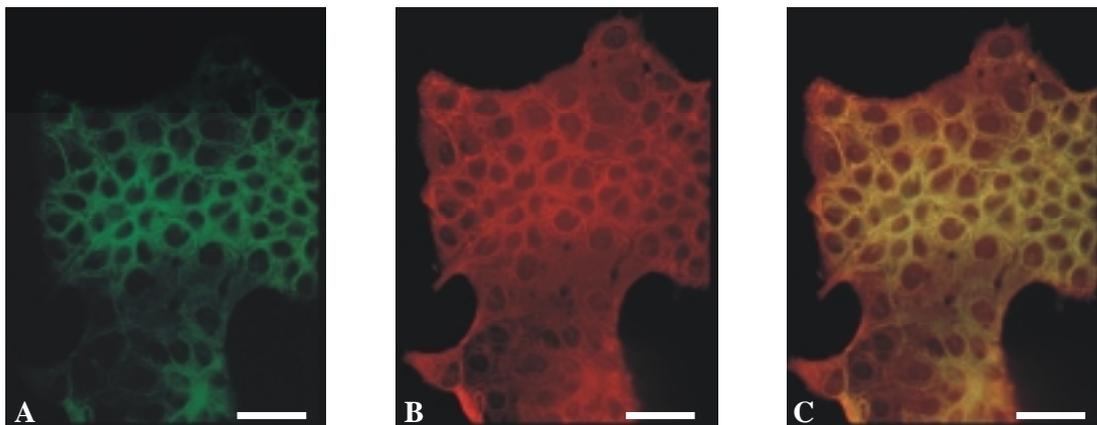


Abb. 35: Immunfluoreszenzfärbung auf epidermoiden Karzinomzellen (A431) mit Antikörpern gegen AHNAK und β -Catenin. β -Catenin (Alexa488, grün) (A), AHNAK (cy3, rot) (B), Doppelimmunfluoreszenz (C). Die Balken entsprechen jeweils 50 μ m.

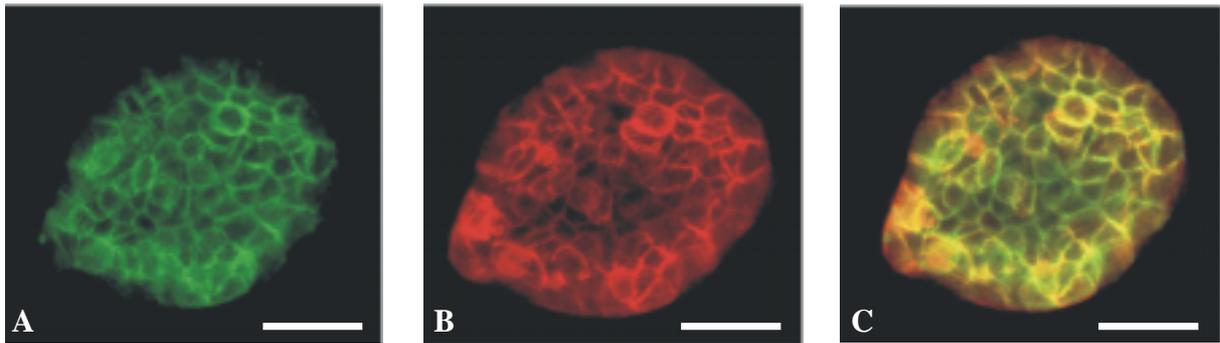


Abb. 36: Immunfluoreszenzfärbung auf epithelialen Karzinomzellen (CaCo2) mit Antikörpern gegen AHNAK und Cadherin. Cadherin (Alexa488, grün) (A), AHNAK (cy3, rot) (B), Doppelimmunfluoreszenz (C). Die Balken entsprechen jeweils 50 μm .

Die Doppelimmunfluoreszenzbilder von AHNAK und β -Catenin bzw. AHNAK und Cadherin zeigen eine Kolokalisation der Proteine in der Zellmembran epithelialer Zellen besonders im Bereich der Zellkontakte. Neben der starken Färbung im Bereich der Zellmembran wurde für beide Proteine jedoch weiterhin eine zusätzliche Verteilung des Proteins im Cytoplasma festgestellt.

3.6.2 Calcium-abhängige Lokalisation

Unter den bisher verwendeten Bedingungen konnte keine ausreichende Vereinzelung der Zellen vorgenommen werden, da diese eine große Neigung zur Aggregation besitzen. Zur Analyse des Expressionsmusters von AHNAK in Keratinozyten, die ohne Kontakt zu anderen Zellen vorliegen, wurden die bisherigen Zellkultur-Bedingungen daher modifiziert. Werden Keratinozyten in Calciumfreiem Medium kultiviert kann die E-Cadherin vermittelte Ausbildung von Zell-Kontakten nicht stattfinden. Die Keratinozyten wachsen weiterhin adhärent, bilden aber keine mehrschichtigen Strukturen mehr aus. Dies ermöglicht das Studium auch an vereinzelt Zellen.

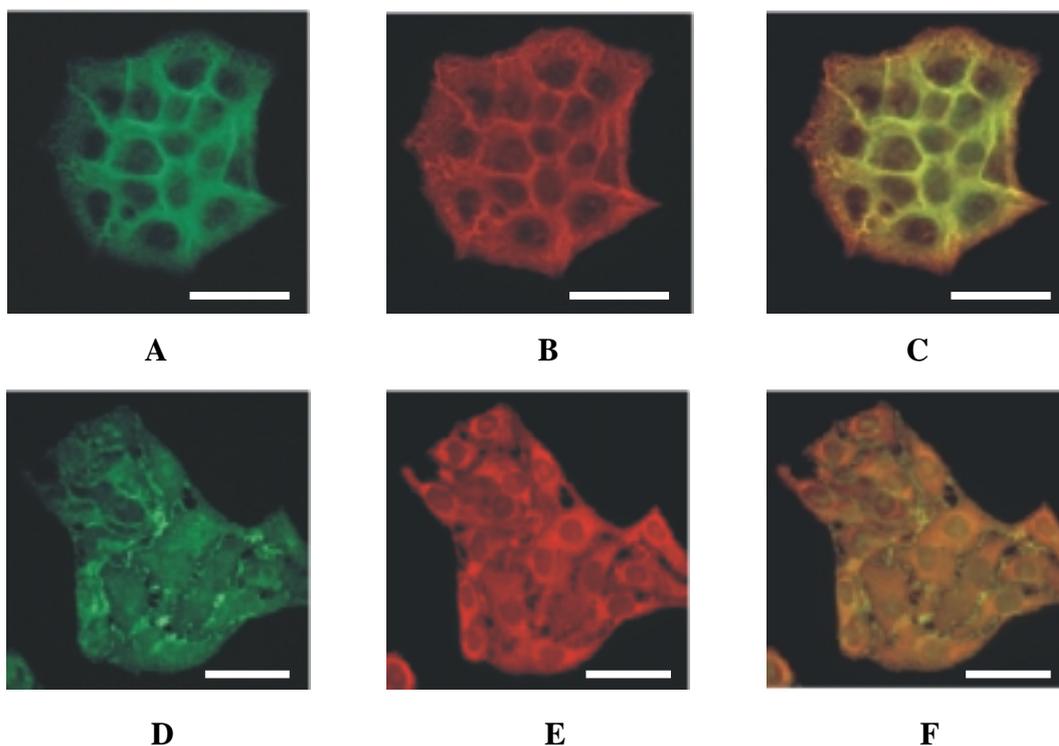


Abb. 37: **Verteilung von AHNAK und β -Catenin in A431-Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen.** Die Zellen wurden entweder mit 1,8 mM Calcium (A-C) oder mit 30 μ M Calcium (D-F) im Medium kultiviert. β -Catenin (Alexa488, grün) (A, D), AHNAK (cy3, rot) (B, E), Doppelimmunfluoreszenz (C, F). Die Balken entsprechen jeweils 50 μ m.

Die Abbildung zeigt, daß sowohl AHNAK als auch β -Catenin unter den veränderten Bedingungen ein komplett anderes Erscheinungsbild zeigen. Werden Zellen, welche in Medium mit normaler Calciumkonzentration (1,8 mM) ausplattiert wurden, für weitere 24-48 h in Medium mit einer minimalen Calciumkonzentration (30 μ M) kultiviert, so besitzen beide Proteine anschließend eine zunehmend cytoplasmatische Verteilung (Abb. 37). Die Translokation dieser Proteine kann durch Zugabe von 1,8 mM Calcium wieder rückgängig gemacht werden (ohne Abb.).

Die Verteilung von AHNAK in epithelialen Zellen ist somit abhängig von den Kultivierungsbedingungen. Das ähnliche Verhalten beider Proteine unter den verschiedenen Bedingungen, d.h. die beobachtete Kolo-kalisation von AHNAK und β -Catenin, könnte darauf hinweisen, daß neben β -Catenin auch AHNAK eine Rolle bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten spielt und eine Interaktion von AHNAK mit β -Catenin vorliegt.

In einem weiteren Experiment wurde getestet, ob sich die Translokation dieser Proteine ungefähr im gleichen zeitlichen Rahmen bewegt. Zur Beobachtung des Verhaltens wurden

wiederum Doppelimmunfluoreszenzen angefertigt. Keratinozyten wurden für ca. 2 Tage in normalem Medium kultiviert und in Medium mit wenig Calcium überführt. Nach 24 h wurde das Medium wieder gegen Calcium-haltiges Medium (1,8 mM) ausgetauscht. Nach bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und analysiert.

Ein Vergleich der Geschwindigkeit der Translokation zwischen AHNAK und β -Catenin zeigt, daß sich beide Proteine schnell auf veränderte Kultivierungsbedingungen einstellen können. Schon 30 min nach Calcium-Zugabe können wieder erste Signale an der Zellmembran beobachtet werden. Diese Translokation vom Cytoplasma zur Zellmembran scheint sich bei β -Catenin jedoch deutlich schneller zu vollziehen, wohingegen die umgekehrte Translokation (d.h. von der Zellmembran ins Cytoplasma) langsamer bzw. nicht so vollständig zu verlaufen scheint (Abb. 38).

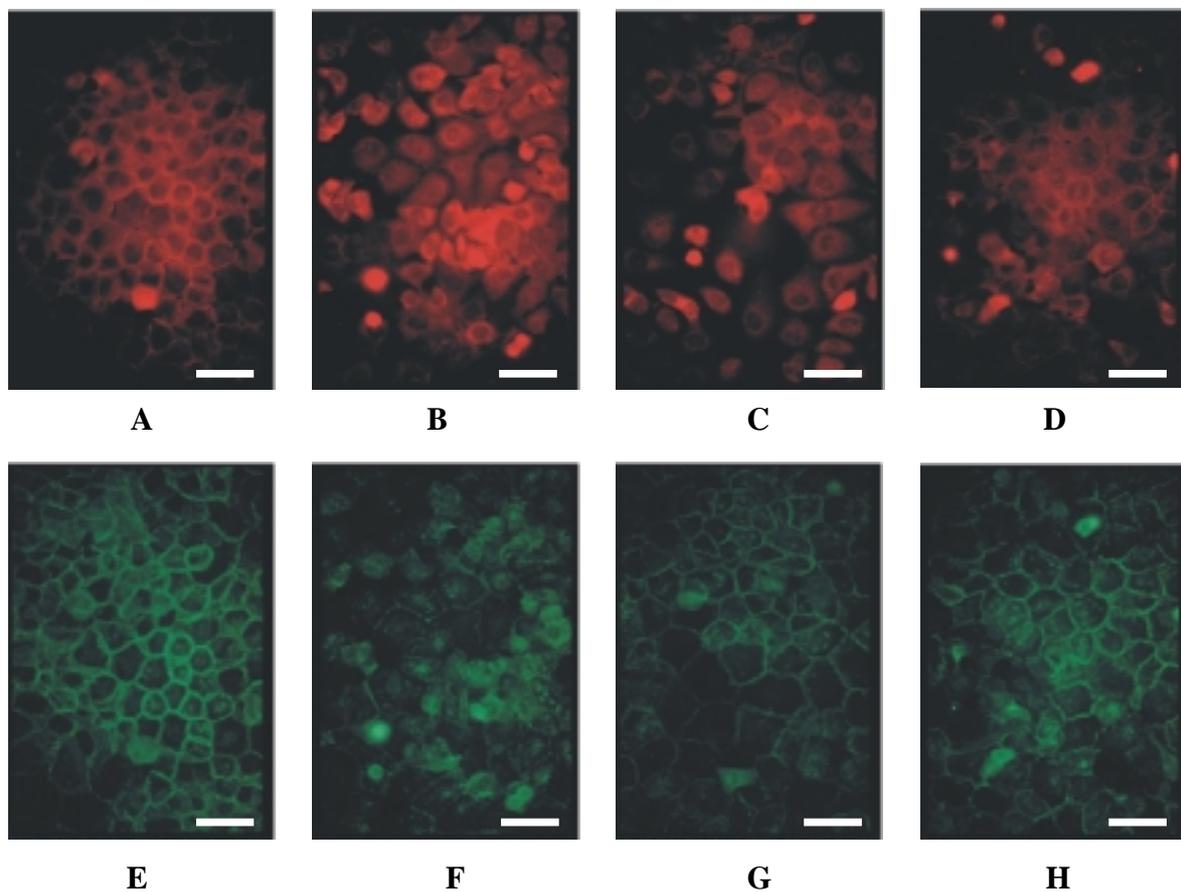


Abb. 38: **Zeitlicher Verlauf der Translokation von AHNAK und β -Catenin.** Epidermoide Karzinomzellen (A431) wurden zunächst bis zur Konfluenz in normalem Calcium-haltigen Medium kultiviert (A, E). Anschließend wurden die Zellen über 24 h ohne Calcium inkubiert (B, F) und nach erneuter Calcium-Zugabe zum Medium nach bestimmten Zeitpunkten analysiert (C, G: nach 30 min; D, H nach 60 min). AHNAK (cy3, rot) und β -Catenin (Alexa488, grün). Die Balken entsprechen jeweils 50 μ m.

3.6.3 Zell-Fraktionierung

Das unterschiedliche Expressionsmuster in Epithelzellen im Vergleich mit Fibroblasten wurde im folgenden eingehender mittels Zell-Fraktionierungs-Experimenten untersucht. Hierzu wurden Zellen konfluenten Kulturen nacheinander mit verschiedenen Puffern extrahiert. Es ist somit möglich, eine Cytoplasma- und eine Membran-Fraktion voneinander zu separieren und getrennt zu analysieren.

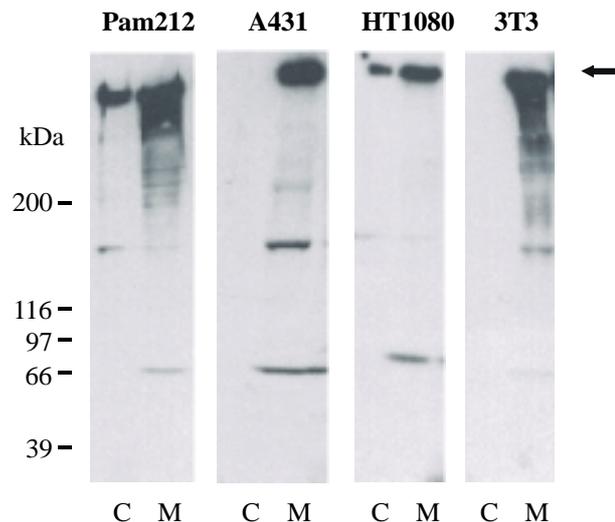


Abb. 39: **Zell-Fraktionierung von epithelialen und nicht-epithelialen Zellen.** Je 30 μ l der verschiedenen Fraktionen wurden unter reduzierenden Bedingungen im 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran überführt und diese mit mAk 4B2 umgesetzt. Cytoplasma-Fraktion (C) sowie Membran-Fraktion (M).

Jeweils gleiche Volumina der verschiedenen Fraktionen wurden im Immunoblot mit mAk 4B2 analysiert. Hierbei wurde deutlich, daß AHNAK in allen untersuchten Zelllinien (epithelialer und nicht-epithelialer Herkunft) hauptsächlich in der Membran-Fraktion enthalten ist (Abb. 39) und somit erst durch die Verwendung eines Detergenz-haltigen Puffers aus den lysierten Zellen herausgelöst werden konnte. Bei einigen Zelllinien (Pam212 und HT1080) konnte AHNAK jedoch auch in der Cytoplasma-Fraktion nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit mAk 4B2 konnte anhand der durchgeführten Zell-Fraktionierungen kein grundsätzlicher Unterschied zwischen dem Erscheinungsbild epithelialer und nicht-epithelialer Zellen gefunden werden. Die membranständige Lokalisierung von AHNAK in Epithelzellen konnte bestätigt werden, während eine vorrangig cytoplasmatische Verteilung von AHNAK in Fibroblasten nicht beobachtet wurde.

Der Vergleich der Verteilungsmuster von AHNAK und β -Catenin zeigt, daß beide Proteine in den analysierten Zellen eine nahezu gleiche Verteilung besitzen (Abb. 39 und 40). Beide Proteine kommen vorrangig in der Membran-Fraktion vor, können aber auch im Cytoplasma nachgewiesen werden.

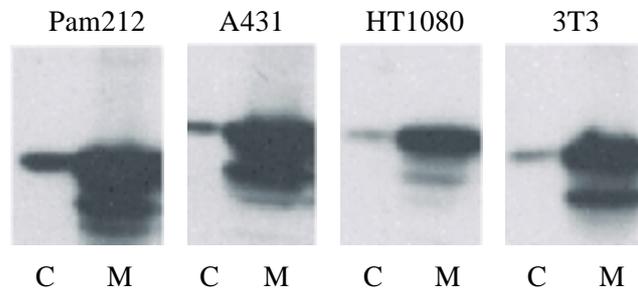


Abb. 40: **Analyse der Zell-Fraktionierung von epithelialen und nicht-epithelialen Zellen.** Immunoblot entwickelt mit Antikörper gegen β -Catenin. Cytoplasma-Fraktion (C) sowie Membran-Fraktion (M).

Auch das Verhalten von AHNAK und β -Catenin in Keratinozyten, die in unterschiedlichen Calciumkonzentrationen kultiviert wurden, wurde im folgenden mit Hilfe von Zell-Fraktionierungs-Studien überprüft. Hierbei zeigte sich, daß AHNAK auch bei Zellen, die in einer niedrigen Calciumkonzentration kultiviert wurden, hauptsächlich in der Membranfraktion enthalten ist. Eine cytoplasmatische Verteilung des Proteins konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden (Abb. 41). Auch die Verteilung von β -Catenin war unter unterschiedlichen Kulturbedingungen unverändert.

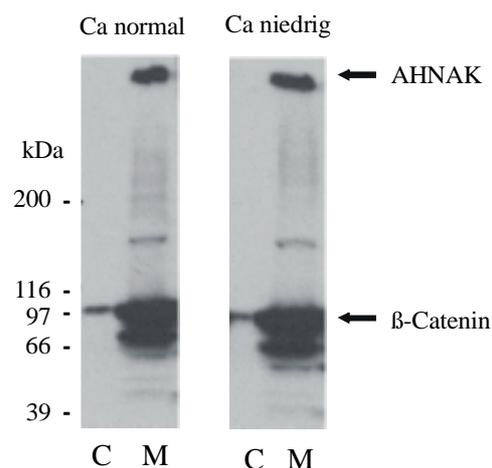


Abb. 41: **Analyse von verschiedenen Zellfraktionen von A431-Zellen, die bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen kultiviert wurden.** Die Zellen wurden entweder in der Anwesenheit von 1,8 mM Calcium (Ca normal) oder 30 μ M Calcium (Ca niedrig) kultiviert. Der Immunoblot wurde parallel mit Antikörpern gegen AHNAK und β -Catenin entwickelt. Cytoplasma- (C) sowie Membran-Fraktion (M).

3.6.4 Suche nach Bindungspartnern - Co-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen β -Catenin

Aufgrund der Co-Lokalisation von AHNAK mit β -Catenin an der Zellmembran von Keratinozyten, dem übereinstimmenden Verhalten in der Zell-Fraktionierung und dem ähnlichen Translokations-Verhalten in Keratinozyten, die unter unterschiedlichen Bedingungen kultiviert wurden, stellte sich die Frage, ob eine direkte Interaktion von AHNAK und β -Catenin vorliegt.

Hierzu wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Protein G-Agarose wurde mit Antikörper gegen β -Catenin und anschließend mit der Cytoplasma-Fraktion von Pam212-Zellen inkubiert. Als Negativkontrollen wurde parallel eine Inkubation ohne Antikörper durchgeführt. Die Detektion erfolgte im Western-Blot mit Antikörpern gegen AHNAK und β -Catenin (Abb. 42).

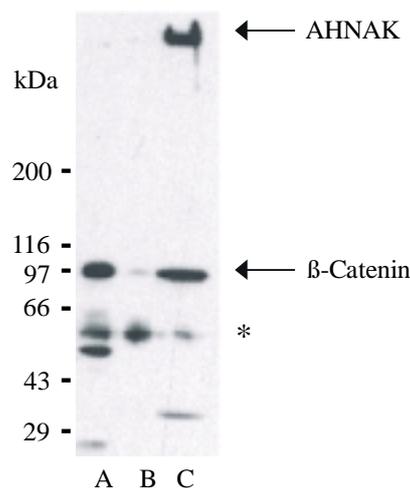


Abb. 42: Co-Immunpräzipitations-Experiment. Protein G Agarose wurde mit Antikörper gegen β -Catenin (Spur A) und anschließend mit der Cytoplasma-Fraktion von Pam 212 inkubiert. Spur B zeigt die Negativkontrolle ohne Antikörper gegen β -Catenin. Die Präzipitate (A, B) wurden im Immunoblot mit Antikörpern gegen 4B2 und β -Catenin analysiert. In Spur C wurden 30 μ l der verwendeten Cytoplasma-Fraktion nach der Präzipitation als Positivkontrolle aufgetragen. Die mit einem * gekennzeichneten Banden sind Keratin-Kreuzreaktivitäten des verwendeten β -Catenin-Antikörpers.

Spur A und B (Abb. 42) zeigen, daß hierbei mit dem Antikörper gegen β -Catenin das korrespondierende Protein, nicht aber AHNAK präzipitiert werden konnte. Spur C belegt eindeutig, daß beide Proteine in der verwendeten Lösung enthalten waren. Die Analyse der entsprechenden Blots läßt den Schluß zu, daß unter diesen Bedingungen keine direkte Wechselwirkung zwischen AHNAK und β -Catenin nachgewiesen werden konnte.

3.7 Aufreinigung und Identifizierung des 8F10-Antigens

Der monoklonale Antikörper 8F10 ist sehr vielseitig einsetzbar. Er erkennt sein Antigen in einer Vielzahl von verschiedenen Experimenten (ELISA, IF, IB und IP) unter nativen und denaturierenden Bedingungen. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse dieser Studien zusammengefasst.

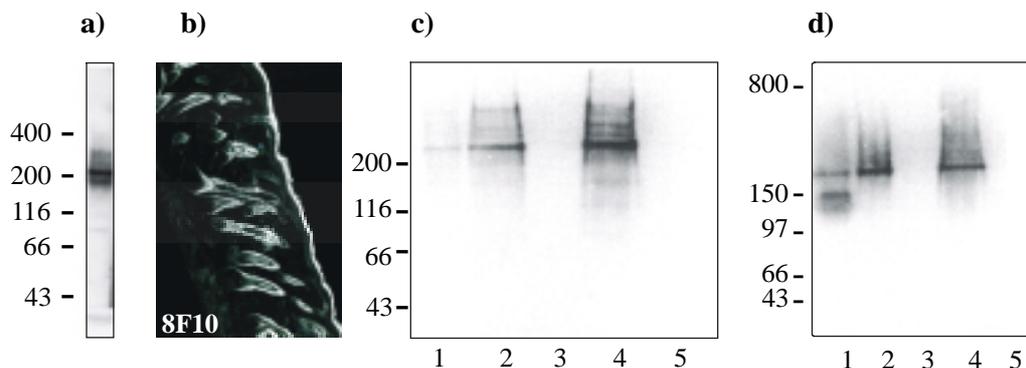


Abb. 43: **Zusammenstellung des Verhaltens von mAk 8F10 im Immunoblot (a), in der Immunfluoreszenz (b) und in der Immunpräzipitation (c, d).** (a) 30 μ l Maus-Haut-Extrakt wurde unter reduzierten Bedingungen in einem 3-15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran überführt und mit mAk 8F10 detektiert; (b) Färbung eines Maus-Haut-Kryostat-Schnittes mit mAk 8F10; (c, d) Analyse einer Immunpräzipitation mit mAk 8F10. Zellkulturüberstand des Klons 8F10 und Maus-Haut-Extrakt wurden mit Protein G Agarose präzipitiert. Das resultierende Pellet wurde gewaschen und unter sauren sowie alkalischen Bedingungen eluiert. Proben der Matrix vor und nach der Elution und die Eluate wurden reduziert (c) und nicht-reduziert (d) in einem 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit mAk 8F10 analysiert. Spur 1: Haut-Extrakt; Spur 2: Matrix vor Elution; Spur 3: Elution pH 2,5; Spur 4: Elution pH 11; Spur 5: Matrix nach Elution.

Der Antikörper detektierte im Immunoblot auf Maus-Haut-Extrakt unter reduzierten und nicht-reduzierten Bedingungen eine Hauptbande bei ca. 220 kDa. Neben dieser definierten Bande wurden weitere höhermolekulare und niedermolekulare Banden gefärbt. Bei der Verwendung des Antigens in einer höheren Konzentration wurde das Signal meist sehr diffus. Unter diesen Umständen ergab sich ein komplexes heterogenes Färbemuster zwischen 100 kDa bis etwa 600 kDa (Abb. 43a, c, d).

Das gleiche Bandenmuster wurde in Immunpräzipitationen erhalten. Das Antigen zu mAk 8F10 konnte hierbei recht schonend unter alkalischen Bedingungen (Abb. 43 c, d Spur 4) von der Matrix eluiert werden.

In der Immunfluoreszenz auf Kryostat-Schnitten von Maus-Haut färbte der Antikörper bestimmte Bereiche um die Haarfollikel.

Das korrespondierende Antigen konnte somit über die Kombination verschiedener chromatographischer Methoden angereichert oder aber auch, da der Ak zur Präzipitation eingesetzt werden kann (Abb. 43), über eine Antikörper-Affinitätssäule abgetrennt werden.

Zur Isolierung des Proteins wurden diverse Verfahren ausprobiert - ausgehend von den verschiedensten Startmaterialien. Keiner dieser Reinigungsversuche verlief jedoch erfolgreich. Ein großes Problem war hierbei die geringe Menge des Antigens in Haut-Extrakten und Zellkulturüberständen sowie das heterogene Verhalten des Proteins.

Antikörper-Affinitäts-Chromatographie ermöglichte zwar die schrittweise Isolierung des Proteins aus komplexen Gewebeextrakten, führte jedoch auch nach mehrmaliger Wiederholung nicht zu Proteinmengen, die für eine Sequenzierung des Proteins ausreichend waren. Auch die Affinitäts-Reinigung aus serumfreiem Zellkulturüberstand einer Maus-Keratinozytenzelllinie (PVDAl-Zellen), die das Antigen ins Medium sekretiert, war nicht erfolgreich.

Das heterogene Verhalten des Proteins erschwerte zudem eine Isolierung mittels eher konventioneller Verfahren. Reinigungen ausgehend von serumfreiem Maus-Keratinozyten-Zellkulturüberstand (PVDAl-Zellen) sowie Maus- und Rinder-Haut-Extrakt wurden unternommen. Es zeigte sich, daß das Protein bei pH 7,4 an eine Anionenaustauscher-Säule gebunden und mit einer erhöhten Salzkonzentration eluiert werden konnte. Die Abtrennung einiger niedermolekularer Bestandteile aus diesen vereinigten Fraktionen gelang mittels anschließender Größenausschlußchromatographie.

Weder die Rechromatographie auf einer Ionenaustauscher-Säule noch hydrophobe Interaktionschromatographie oder andere Affinitätssäulen (wie z.B. Heparin- oder Lectin-Säulen) führten jedoch im nächsten Schritt zu einer ausreichenden Anreicherung des Proteins oder zur Abtrennung anderer Bestandteile.

Die größten Chancen zur Anreicherung des Proteins ergaben sich durch die im folgenden beschriebene Kombination chromatographischer Verfahren.

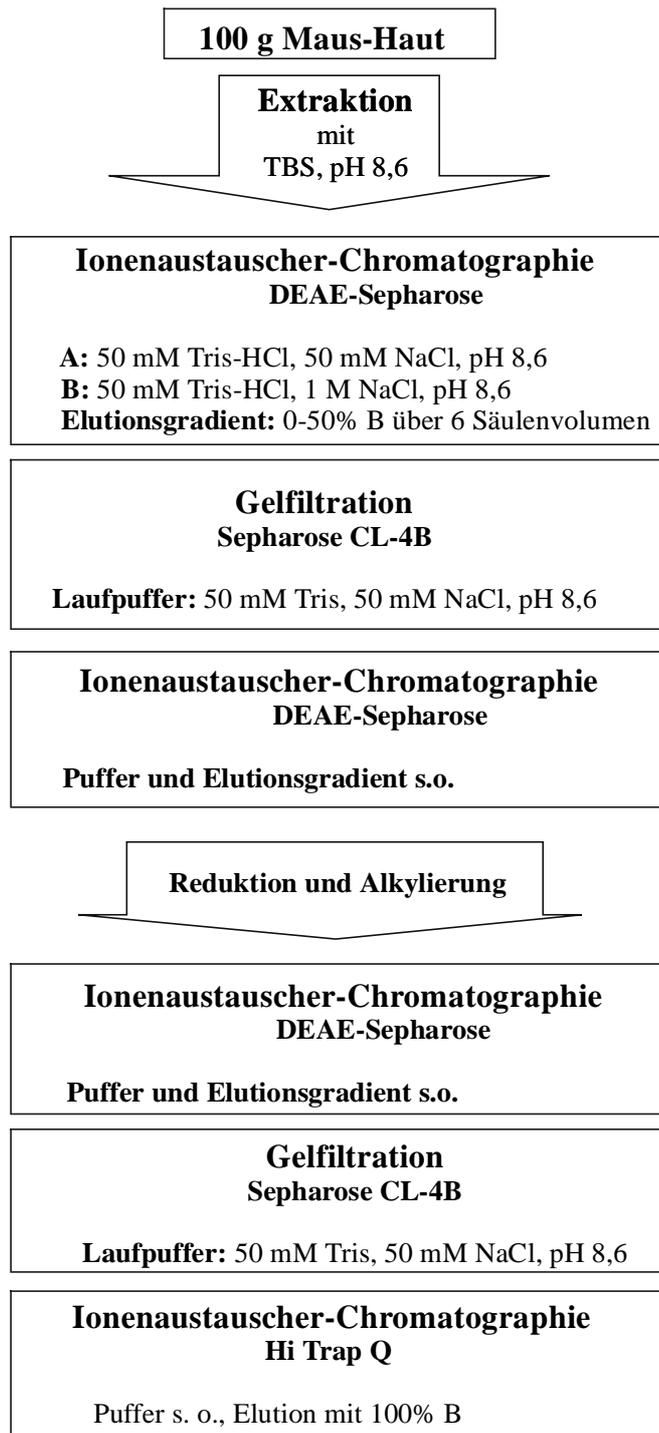


Abb. 44: Flußdiagramm der Chromatographie-Schritte zur Anreicherung des 8F10-Antigens aus Maus-Haut-Extrakt.

Die Haut von neugeborenen Mäusen wurde mit einem isotonischen Puffer, pH 8,6 extrahiert, 1:3 auf eine finale Salzkonzentration von 50 mM verdünnt und auf eine äquilibrierte DEAE-Sepharose Säule aufgetragen. Nach ausgiebigem Waschen der Matrix wurden die Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten von 50-500 mM in 6 Säulenvolumen eluiert. Das 8F10-Antigen eluierte hierbei nicht nur in einzelnen Fraktionen sondern über den gesamten

Gradienten verteilt. Aufgrund einer Überladung der Matrix befand sich das gesuchte Protein zudem im Durchfluß. Eine Wiederholung des Chromatographie-Schrittes mit den im ersten Schritt nicht gebundenen Proteinen ergab ein ähnliches Bild.

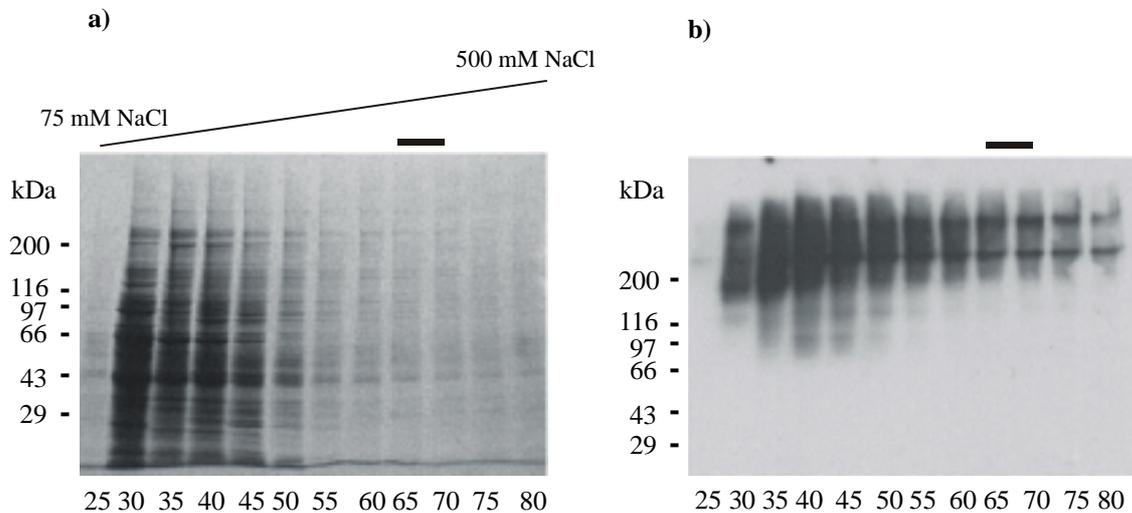
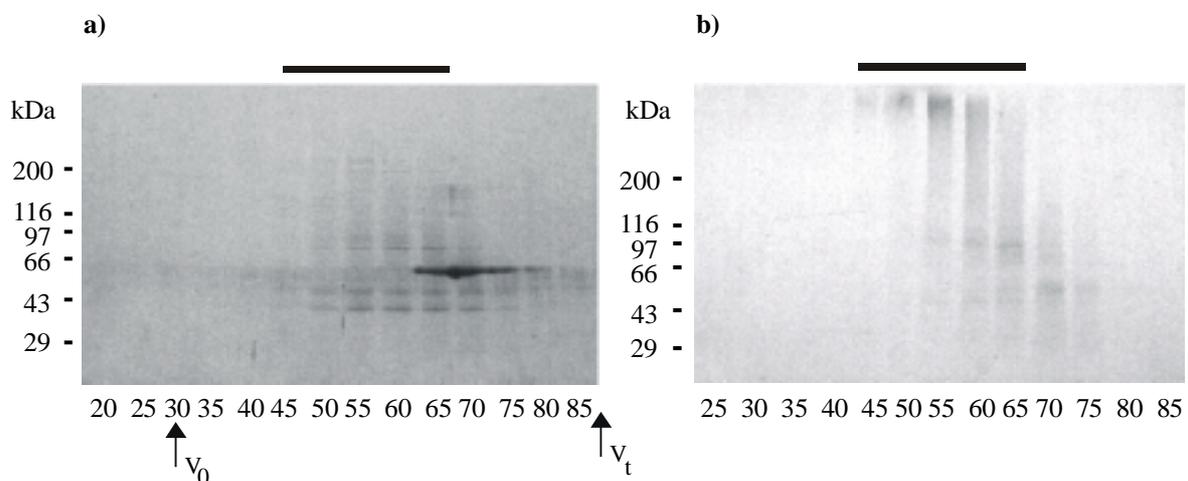


Abb. 45: **Analyse des DEAE-Chromatographie-Schrittes.** Je 30 μ l ausgewählter Fraktionen wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Coomassie Brilliant Blue Färbung des Gels (a), Immunoblot mit mAk 8F10 (b). Fraktionen 65 bis 68, die zur weiteren Reinigung verwendet wurden, sind mit einem Balken gekennzeichnet.

Einzelne Fraktionen der DEAE (65 – 68) wurden im nächsten Schritt auf eine Gelfiltrationssäule (CL-4B) geladen. Die Fraktionen des Gelfiltrationslaufs wurden mittels Coomassie Brilliant Blue Färbung und Immunoblot analysiert (Abb. 46). Das 8F10-Antigen eluierte hierbei nach 225 bis 325 ml (d.h. nach 45-65% des Säulenvolumens) in den Fraktionen 45-65 und zeigte das in Abbildung 42 beschriebene Verhalten.



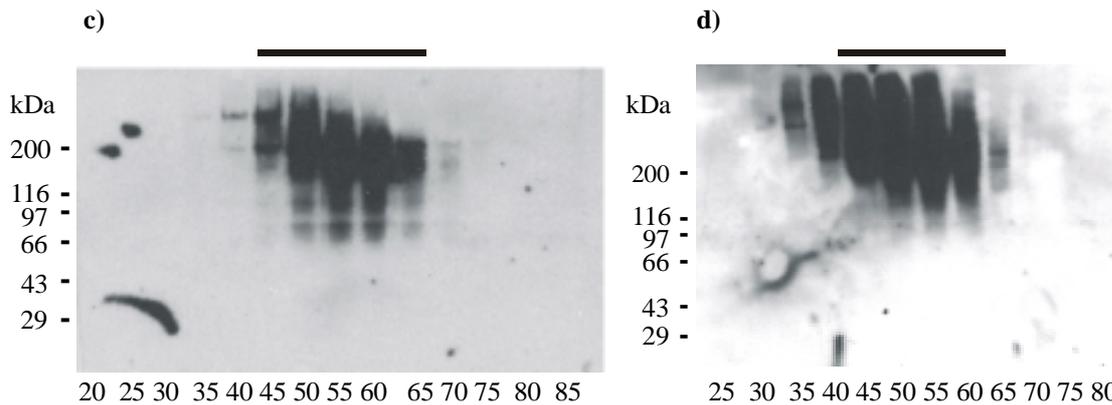


Abb. 46: **Analyse des CL4B-Gelfiltrationslaufes.** Je 30 μ l ausgewählter Fraktionen wurden unter reduzierenden (a, c) und nicht reduzierenden Bedingungen (b, d) im 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Coomassie Brilliant Blue Färbung des Gels (a, b), Immunoblot mit mAk 8F10 (c, d). Fraktionen 45 bis 65, die hohe Konzentrationen des 8F10-Antigens enthalten, sind jeweils mit einem Balken markiert. Das Ausschlußvolumen der Gelfiltrationssäule ist mit V_0 und das Totalvolumen mit V_t bezeichnet.

Zur Aufkonzentrierung und eventuellen weiteren Reinigung der Proben wurden diese vereinigt und auf eine kleinere DEAE-Sepharose-Säule geladen und wieder mit einem Gradienten von 50-500 mM NaCl in 6 Säulenvolumen sowie anschließend 500-1000 mM NaCl in 2 Säulenvolumen eluiert. Hierbei zeigte sich, daß das Protein bei einer sehr geringen Salzkonzentration (ca. 240-320 mM NaCl) von der Säule eluiert und von einigen Verunreinigungen getrennt werden konnte.

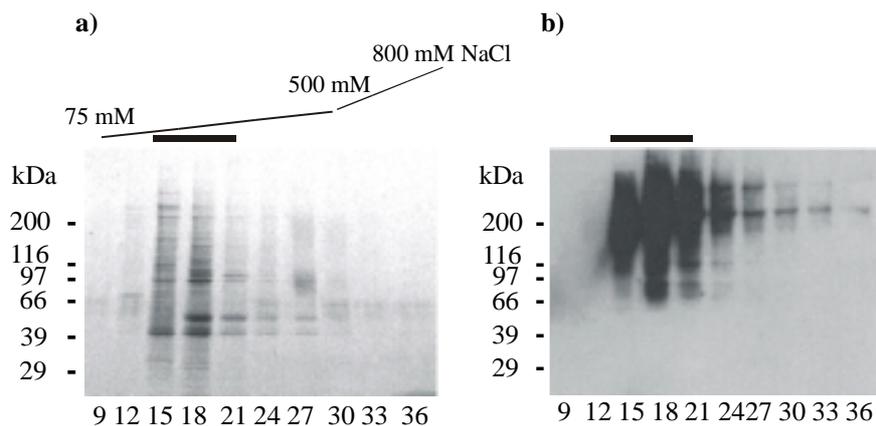


Abb. 47: **Analyse der DEAE-Rechromatographie.** Je 30 μ l ausgewählter Fraktionen wurden reduziert in einem 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Coomassie Brilliant Blue Färbung des Gels (a), Immunoblot mit mAk 8F10 (b). Fraktionen 14 bis 19, die für die weiteren Reinigungsschritte vereinigt wurden, sind mit einem Balken gekennzeichnet.

Die positiven Fraktionen 14-19 wurden erneut vereinigt und anschließend reduziert und alkyliert. Nach einer 1:10-Verdünnung der Probe wurde diese erneut mit der DEAE-Säule und anschließender Gelfiltration der positiven Fraktionen aufgetrennt und abschließend mit einer 1 ml Hi-Trap Q-Säule aufkonzentriert.

Die 8F10-haltige Fraktion wurde mit Ethanol gefällt, auf einem 3-15%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Im Bereich von 220 kDa konnte nun eine Bande sichtbar gemacht werden (Abb. 48). Diese Bande wurde ausgeschnitten, zur Sequenzierung mittels Q-TOF vorbereitet und im Servicelabor, ZMMK, der medizinischen Fakultät Köln untersucht. Die Analyse ist zur Zeit noch nicht abgeschlossen.

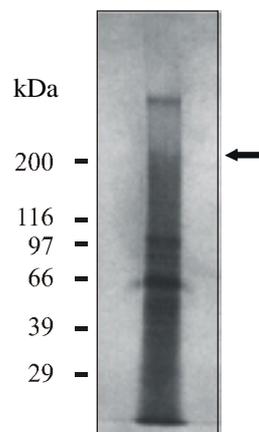


Abb. 48: **SDS-PAGE mit Silber-Färbung zur Ansequenzierung der gefärbten 220 kDa-Bande.** Die Position der ausgeschnittenen Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die dargestellte Prozedur zur Anreicherung des 8F10-Antigens kann, falls die bisherigen Mengen nicht ausreichend waren, in weiteren Experimenten zur Isolierung größerer Mengen des Proteins herangezogen werden.

3.8 Charakterisierung des 8F10-Antigens

Die Expression des Proteins in verschiedenen Mausgeweben wurde anhand von Gewebe-Extrakten und mittels immunhistologischer Untersuchungen bestimmt.

3.8.1 Gewebeverteilung des 8F10-Antigens

Zur Analyse der Gewebeverteilung wurden Kryostat-Schnitte verschiedener adulter Gewebe sowie von 16,5 Tage alten Mausembryonen mit dem mAk 8F10 gefärbt. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper sowie mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers, der die AEC-Färbung (3-Amino-9-ethylcarbazol) katalysiert.

Um einen Überblick über verschiedene Gewebe und Organe zu erhalten, wurden Kryostat-Schnitte von Mausembryonen angefertigt und mit dem mAk 8F10 gefärbt. Hierbei zeigte sich, daß der Antikörper hauptsächlich in der Haut und im Bereich des oberen Verdauungstraktes färbt. Keinerlei Signale konnten in Gehirn, Herz, Lunge, Leber und Skelettmuskulatur festgestellt werden. Die Expression des 8F10-Antigens ist somit auf einige Gewebe im Organismus begrenzt.

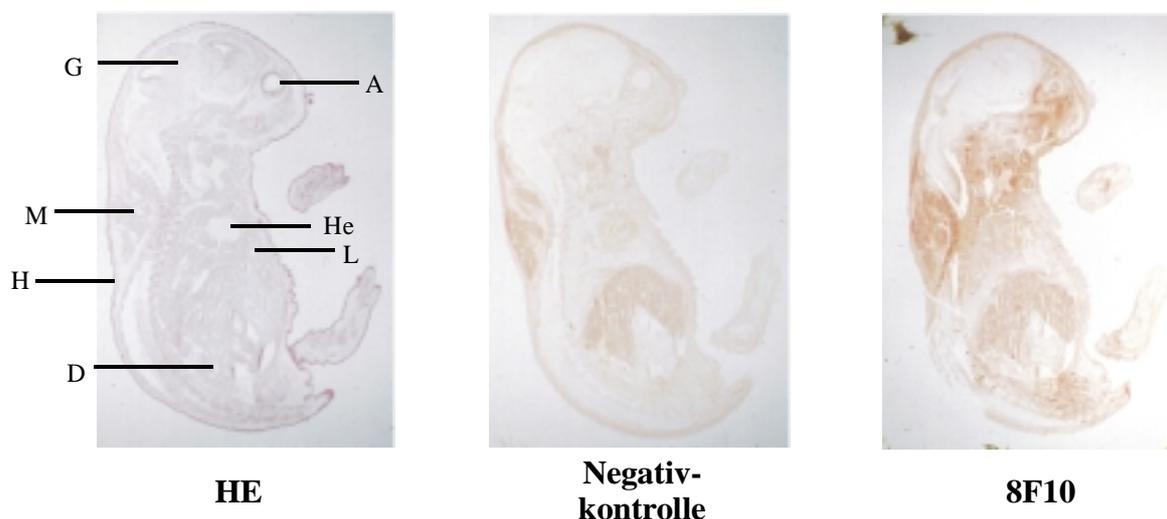


Abb. 49: **Immunhistologische Lokalisierung des 8F10-Antigens in einem 16,5 Tage alten Mausembryo.** Kryostat-Schnitte von 16,5 Tage alten Mausembryonen wurden mit Zellkulturüberstand vom Klon 8F10 inkubiert und die Signale nach Inkubation mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper mit AEC detektiert. Zum Vergleich wurde eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper sowie eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefertigt. Gehirn (G), Auge (A), Herz (He), Lunge (L), Muskeln (M), Haut (H), Därme (D).

Zur genaueren Lokalisierung des Antigens wurden im folgenden einzelne Gewebe präpariert und analysiert.

Zur Bestimmung der Verteilung in Haut wurden Tiere im Alter von 3-4 Tagen verwendet, die restlichen Gewebe wurden aus adulten Tieren entnommen.

Der mAk 8F10 zeigte in der Haut eine starke Färbung um die Haarfollikel und in einzelnen Drüsen. In anderen Bereichen der Dermis konnte das 8F10-Antigen nicht gefunden werden. Zusätzlich konnte eine Färbung in der äußersten Schicht der Epidermis entdeckt werden (Abb. 50).

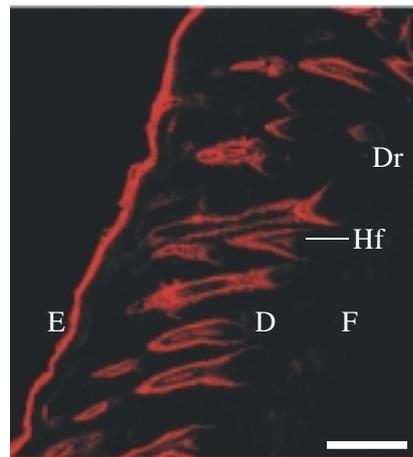


Abb. 50: **Immunfluoreszenz-Färbung zur Lokalisierung des 8F10-Antigens in Haut.** Epidermis (E), Dermis (D), Fettgewebe (F), Haarfollikel (Hf), Drüsen (Dr). Der Balken entspricht 200 µm.

Die Analyse der Gewebeverteilung im Embryo (Abb. 49) zeigte verstärkt Signale im Bereich des Mund- und Rachenraumes. Das gleiche Ergebnis wurde anhand eines Querschnittes durch die Mundhöhle eines adulten Tieres erhalten. In beiden Fällen konnte eine starke Färbung der verschiedenen Speicheldrüsen beobachtet werden. Hier sind exemplarisch Ausschnitte aus zwei verschiedenen Drüsengeweben dargestellt. Abb. 51A zeigt die Färbung in einer Trachealdrüse. In der Luftröhre konnten in keinem anderen Bereich Signale detektiert werden. Ein Drüsengewebe mit hoher 8F10-Antigen Expression ist weiterhin die Glandula submandibularis (Abb. 51B). Es sind mehrere gefärbte Ausführungsgänge zu erkennen.

Die Speiseröhre wies eine starke Färbung im Epithelgewebe auf, während die darunterliegenden Schichten nicht gefärbt wurden. Auch im Thymus konnte die Expression des 8F10-Antigens nachgewiesen werden (Abb. 51D).

Das 8F10-Antigen wird in den untersuchten Geweben von epithelialen Zellen exprimiert.

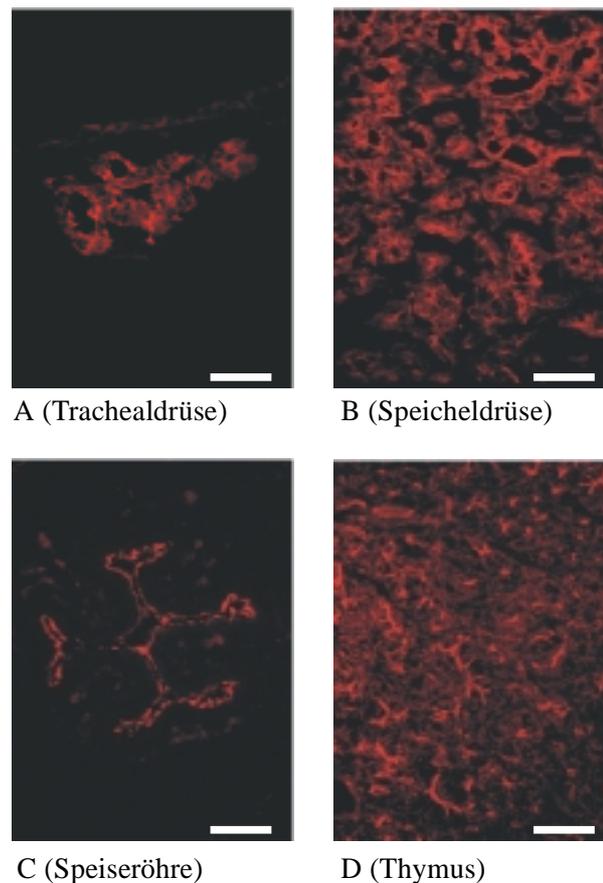


Abb. 51: **Immunfluoreszenz-Färbung zur Lokalisierung des 8F10-Antigens in verschiedenen Geweben.** Die Balken entsprechen jeweils 50 μm .

Ein ähnliches Erscheinungsbild ergab sich bei der Analyse von Gewebe-Extrakten im Immunoblot. Speziell Haut ist ein Gewebe mit einer sehr hohen Expression des Proteins. Aber auch in Extrakten aus der Speise- und Luftröhre kann das 8F10-Antigen nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den immunhistologischen Ergebnissen konnte in Gehirn-, Herz-, Lungen-, Skelettmuskel-, Hoden-, Ovar-, Milz- und Nieren-Extrakten keine Expression des Proteins nachgewiesen werden. Bei der Analyse von Thymus-Gewebe konnte ebenfalls kein 8F10-Antigen detektiert werden, obwohl das Protein mittels Immunfluoreszenz in diesem Gewebe nachgewiesen wurde (Abb. 52).

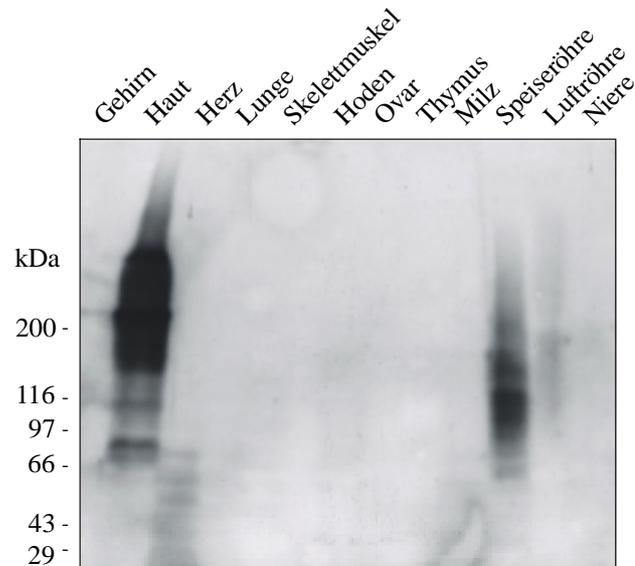


Abb. 52: **Analyse von Gewebe-Extrakten mit mAk 8F10.** Es wurden je 30 μ l der verschiedenen Extrakte unter reduzierenden Bedingungen in einem 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und mit mAk 8F10 umgesetzt.

3.8.2 Endogene Expression des 8F10-Antigens in verschiedenen Zelltypen

Zur genaueren Bestimmung der Zelltypen, die das 8F10-Antigen exprimieren, wurden verschiedene Zellen auf ihre endogene Expression untersucht. Hierzu wurden sowohl Zell-Lysate als auch Zellkulturüberstände analysiert.

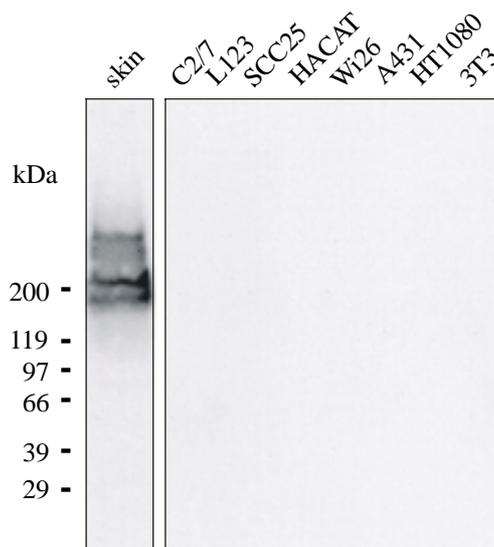


Abb. 53: **Analyse der endogenen Expression des 8F10-Antigens mittels Zell-Lysat epithelialer und nicht-epithelialer Zellen.** Es wurden jeweils gleiche Mengen der Extrakte unter reduzierenden Bedingungen im 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und mit mAk 8F10 detektiert.

In keinem der angefertigten Lysate verschiedener epithelialer Karzinomzellen (SCC25, A431), Keratinozyten (HACAT), Fibrosarcomzellen (HT1080) sowie anderer nicht-epithelialer Zellen (C2/7, L132, Wi26 und 3T3) humaner und muriner Herkunft konnte das 8F10-Antigen nachgewiesen werden (Abb. 53).

Im Gegensatz hierzu zeigte die Analyse serumfreier Zellkulturüberstände dieser Zellen, daß das korrespondierende Antigen zum mAk 8F10 von einigen epithelialen Zellen gebildet und sekretiert wird. Eine hohe Expression konnte vor allem in PVDAI-Zellen (Maus-Keratinozyten) und OVCAR-Zellen (humane epitheliale Karzinomzellen) beobachtet werden. Aber auch in Überständen von HACAT- und Pam212-Zellen wird das Protein in geringem Maße gebildet. Es zeigte sich jedoch auch, daß keine generelle Expression in Epithelzellen vorliegt, da das Protein z.B. in HBL100- und CaCo2-Zellüberständen nicht gefunden wurde (Abb. 54).

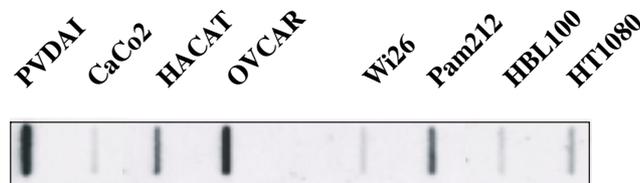


Abb. 54: Analyse der endogenen Expression des 8F10-Antigens mit Zellkulturüberständen verschiedener epithelialer und nicht-epithelialer Zellen. Jeweils 100 μ l serumfreier Zellkulturüberstand wurden auf Nitrocellulose-Membran aufgebracht und mit mAk 8F10 analysiert.

Die Untersuchungen legen die Vermutung nahe, daß es sich bei dem 8F10-Antigen um ein extrazelluläres Protein handelt, welches von einigen epithelialen Zellen exprimiert wird. Die Verteilung des Proteins im Organismus ist auf bestimmte Gewebe beschränkt.

3.8.3 Analyse der Glykosylierung des bovinen 8F10-Antigens

Bei den Reinigungsversuchen des 8F10-Antigens ausgehend von PVDAI-Zellkulturüberständen bzw. Hautextrakten wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt eine unspezifische Bindung des Proteins an Säulenmatrizes sowie ein sehr heterogenes Laufverhalten beobachtet. In Abb. 55 ist das Laufverhalten des 8F10-Antigens aus Rinderhaut während eines Gelfiltrationsschrittes dokumentiert. Das Protein eluierte hierbei in einem großen Volumen in den Fraktionen 44 bis 68 (d.h. nach 45-70% des Säulenvolumens). Im Immunoblot wurden Banden zwischen 100 und 600 kDa detektiert. Diese Heterogenität erschwert zum einen die Reinigung des Proteins und zum anderen die Identifizierung, d.h. die Sequenzierung mittels MALDI-TOF.

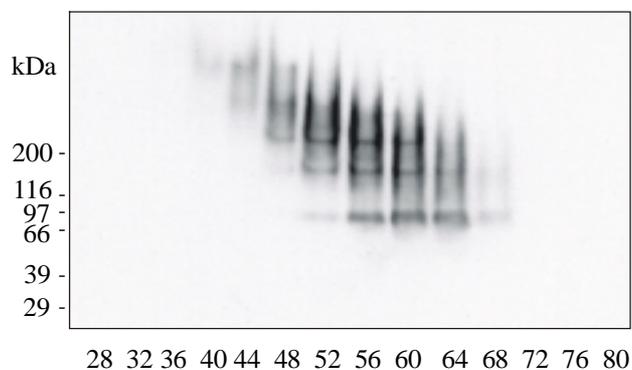


Abb. 55: Analyse des heterogenen Verhaltens des 8F10-Antigens aus Rinderhaut während eines CL4B-Gelfiltrationslaufes. Jeweils 30 μ l ausgewählter Fraktionen wurden reduziert in einem 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und mit mAk 8F10 umgesetzt.

Die beobachtete Heterogenität könnte eine Folge von posttranslationalen Modifikationen sein. Um zu klären, ob N- oder O-verknüpfte Oligosaccharide die Ursache für das diffuse Laufverhalten des Proteins sind, wurden folgende Experimente mit angereicherten Proteinproben aus Rinderhaut durchgeführt. Proben dieser Proteinlösungen wurden mit verschiedenen Enzymen (Chondroitinase, Keratanase, Heparitinase und Neuramidase) behandelt sowie auch ein kompletter Abbau O-verknüpfter Oligosaccharide mittels Ammoniak-Behandlung durchgeführt. Eine Abspaltung N-verknüpfter Zucker erfolgte durch Behandlung der Probe mit N-Glykosidase F. Die im Immunoblot detektierten Bandenmuster unterschieden sich nach den Verdauen mit N-Glykosidase F, Heparitinase, Chondroitinase und Neuramidase nicht von den unbehandelten Proben. Im Gegensatz hierzu führten die enzymatische Behandlung der Probe mit Keratanase sowie die Ammoniak-Behandlung zu

einem deutlich anderen Bandenmuster. In beiden Fällen konnte eine Verminderung bzw. das Verschwinden hochmolekularer Banden beobachtet werden (Abb. 56). Die breite Bande im Bereich von 100 kDa war auch nach dem Verdau noch zu beobachten und stellt vermutlich eine nicht-glykosylierte Form des Proteins dar.

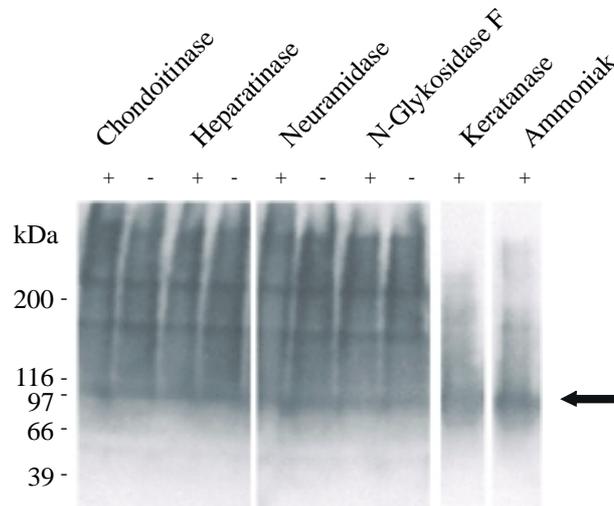


Abb. 56: **Enzymatischer Verdau des 8F10-Antigens aus Rinderhaut mit Chondroitinase, Heparitinase, Neuramidase, N-Glykosidase F und Keratanase sowie chemische Behandlung mit Ammoniak.** Die Proben wurden nach Reduktion in einem 3-15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend geblottet und die Signale mit mAk 8F10 detektiert.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß das bovine 8F10-Antigen O-glykosidisch verknüpfte Keratansulfatketten trägt. Die Abspaltung dieser Oligosaccharide führte zu einer deutlichen Verminderung der Heterogenität des Moleküls. Weitere posttranslationale Modifikationen sind jedoch sehr wahrscheinlich, da die Behandlung nicht zu einer scharf abgegrenzten Bande führte.

IV Diskussion

4.1 Herstellung eines Panels monoklonaler Antikörper gegen Haut-Proteine

Durch die Verwendung von Haut neugeborener Mäuse konnte eine Vielzahl verschiedenster dermalen Bestandteile unter nativen Bedingungen isoliert werden. Es wurde gezeigt, daß bekannte und gut charakterisierte extrazelluläre Matrixproteine unter diesen Bedingungen extrahiert werden können. Die effiziente Proteinextraktion aus der Haut jüngerer Tiere ist sehr wahrscheinlich auf eine geringere Quervernetzung extrazellulärer Proteine untereinander zurückzuführen. Hiermit war ein breites Spektrum gewebspezifischer Proteine in nativer Form zur Herstellung monoklonaler Antikörper gewährleistet.

In zwei unabhängigen Fusionen mit dieser Proteinlösung wurde eine sehr große Anzahl verschiedener monoklonaler Antikörper erhalten.

Zur Charakterisierung der monoklonalen Antikörper wurden diese einer Typisierung unterzogen. Die Kenntnis des Isotyps der produzierten Antikörper ist von essentieller Bedeutung, da unterschiedliche Subklassen in diversen Anwendungsbereichen verschiedene Eigenschaften besitzen. Alle hierbei analysierten Antikörper waren vom Typ IgM.

IgM-Antikörper werden im allgemeinen beim ersten Kontakt eines Organismus mit einem Fremdanigen gebildet, bei weiterer Antigenexposition werden jedoch zusätzlich IgG-Antikörper gebildet, welche eine verbesserte Löslichkeit sowie Stabilität besitzen. IgM-Antikörper besitzen zudem den Nachteil einer möglichen unspezifischen Bindung an alle möglichen Oberflächen. Eine längere Immunisierung der Versuchstiere, d.h. eine erhöhte Zahl an Booster-Injektionen, ist unter diesem Aspekt in zukünftigen Projekten zu empfehlen.

Die entsprechenden antikörperproduzierenden Klone wurden subkloniert und die verschiedenen Antikörper in unterschiedlichen Methoden getestet. Eine Einteilung der monoklonalen Antikörper wurde entsprechend ihrer Reaktivität in ELISA-Style Assays, der Immunfluoreszenz und im Immunoblot vorgenommen.

Eine große Zahl an Antikörpern konnten zur Detektion der korrespondierenden Antigene in immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzt werden, welche unterschiedlichste Färbemuster auf Maushaut ergaben. Ein Vergleich dieser Daten mit immunhistochemischen Informationen aus der Literatur führte zu keinerlei Übereinstimmung mit schon charakterisierten Proteinen. Die Lokalisierung der korrespondierenden Antigene war hierbei

zum einen auf bestimmte Bereiche der Haut, z.B. Epidermis, Dermis oder Subcutis, beschränkt. Zum anderen konnte jedoch auch bei anderen Proteinen eine ubiquitäre Verteilung über alle Hautbereiche beobachtet werden. In zwei Fällen konnte deutlich die Ausbildung extrazellulärer Netzwerke in der Dermis visualisiert werden. Zusätzlich zur Maushaut wurde weiterhin eine Analyse der Lokalisation der Antigene in embryonalen Geweben vorgenommen. Die meisten dieser Antigene zeigten ein komplexes Expressionsmuster im gesamten Organismus. Es scheint sich somit um Bestandteile zu handeln, welche nicht nur in Haut sondern auch in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert werden. Die erhaltenen Informationen über die Gewebeverteilungen der einzelnen Proteine können sowohl zur Identifizierung oder Verifizierung als auch zur Isolierung dieser Komponenten herangezogen werden.

Drei der hergestellten Antikörper (4B2, 4B3 und 8F10) waren zudem reaktiv im Immunoblot, d.h. eine Erkennung und Bindung der antigenen Determinante erfolgte auch unter denaturierenden Bedingungen. Unter diesen Umständen ergibt sich eine große Bandbreite an Einsatzmöglichkeiten der Antikörper. Sie können zum einen zur Durchsichtung von cDNA-Expressionsbibliotheken als auch zur Detektion des Antigens mittels Immunoblot in zahlreichen Reinigungsschritten eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die monoklonalen Antikörper 4B2 und 8F10 zur Durchsichtung einer murinen Haut-cDNA-Expressionsbibliothek verwendet. In beiden Fällen wurden zahlreiche Klone erhalten, die sich jedoch in den weiteren Vereinzlungsschritten als falsch positiv herausstellten.

Die Verwendung einzelner monoklonaler Antikörper bietet den Vorteil eines geringeren Hintergrundes im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern, auf der anderen Seite ist die höhere Spezifität der mAk jedoch auch nachteilig. Monoklonale Antikörper erkennen spezifisch nur ein bestimmtes Epitop. Eine nicht 100%ig korrekte Faltung einzelner Proteinfragmente nach Expression in *E. coli* kann die Erkennung dieses Epitops verhindern oder die Bindungsaffinität stark herabsetzen.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß die antigenen Determinanten nicht in den untersuchten Klonen enthalten waren, da aufgrund der cDNA Synthese mittels Oligo d(T) Primern vorwiegend C-terminale Bereiche der Proteine in der Bibliothek repräsentiert sind.

Es wäre jedoch empfehlenswert, die vorhandene Bibliothek zukünftig erneut mit einer Mischung verschiedener monoklonaler Antikörper zu durchsuchen. Hierzu könnte eine

Vielzahl gereinigter Antikörper – auch diejenigen, die nur unter nativen Bedingungen reaktiv sind – kombiniert und parallel zur chromatographischen Reinigung der korrespondierenden Antigene zur Durchsuchung eingesetzt werden. Auch die Verwendung anderer Expressions-cDNA-Bibliotheken könnte von Vorteil sein. Die größten Chancen bieten hierbei erfahrungsgemäß Bibliotheken, welche mittels „random“ Primern oder einer Mischung von Oligo d(T) und „random“ Primern hergestellt wurden. Desweiteren könnten cDNA-Expressionsbibliotheken anderer Gewebe oder Organe, welche auf der Grundlage der Gewebeverteilung einzelner Antigene ausgewählt werden können, mit den entsprechenden Antikörpern durchsucht werden.

Die monoklonalen Antikörper 4B2 und 8F10 wurden im weiteren Verlauf des Projektes zur Isolierung der korrespondierenden Antigene aus Gewebeextrakten verwendet. Die Antikörper wurden hierbei direkt (Affinitätsreinigungen oder Immunpräzipitationen) oder indirekt (Detektion des Proteins während anderer chromatographischer Verfahren) zur Reinigung eingesetzt.

Auch Antikörper, die ihre korrespondierenden Antigene ausschließlich unter nativen Bedingungen erkennen, können zur Isolierung und Identifizierung der entsprechenden Antigene herangezogen werden. Sie können zur Affinitätsreinigung sowie auch mittels Dot-Blot zur Detektion der Proteine in zahlreichen anderen Reinigungen eingesetzt werden. Aufgrund der Vielfalt monoklonaler Antikörper gegen Hautbestandteile ist die Identifizierung bisher unbekannter Proteine mittels dieser Antikörper sehr wahrscheinlich. Die Identifizierungsmethoden sind hierbei für jeden Antikörper einzeln zu optimieren.

Nach der Isolierung der entsprechenden Antigene besteht die Möglichkeit, diese anhand ihrer Proteinsequenz zu identifizieren. Es kann eine N-terminale Sequenzanalyse oder auch eine massenspektrometrische Sequenzierung durchgeführt werden.

Das größte Problem einer Aminosäuresequenzanalyse nach Edman stellt eine N-terminale Blockierung dar. Etwa 50% aller natürlich vorkommenden Proteine weisen eine solche Modifikation auf. Eine N-terminale Blockierung kann auch unabsichtlich während der Proteinreinigung oder Probenvorbereitung eingeführt werden.

Die massenspektrometrische Analysen mittels MALDI-TOF bzw. Q-TOF, welche in den letzten Jahren extrem weiterentwickelt wurden, erlauben eine Proteinidentifizierung im Bereich von 200 fmol ausgehend von SDS-PAGE-Banden. Diese Methoden sind relativ

unempfindlich gegenüber Verunreinigungen der Proben durch Salze und stellen somit sehr sensitive Methoden zur Identifizierung von Proteinen dar. Zum einen kann hierbei ein durch enzymatischen Verdau entstandenes Peptidgemisch aufgetrennt und das resultierende Peptidmuster analysiert werden (MALDI-TOF). Im günstigsten Fall kann nach Vergleich dieser Informationen mit Datenbanken eine Identifizierung des Proteins erfolgen. Speziesspezifische Variationen einzelner Aminosäuren als auch posttranslationale Modifikationen erschweren jedoch zumeist eine Zuordnung der Peptide anhand der beobachteten Größen. Eine spezifischere Datenbank-Suche kann mit Sequenzinformationen durchgeführt werden. Die de novo Sequenzierung der Peptide erfolgt mittels Q-TOF mit eingebauter Elektronenspray-Technologie. Die hohe Auflösung des Gerätes erlaubt es, aus dem Peptidgemisch einzelne Peptide zu isolieren und getrennt zu fragmentieren. Bei hoher Massen-Genauigkeit und guter Auflösung erhält man hierbei Sequenzen mit einer durchschnittlichen Länge zwischen 5 und 15 Aminosäuren. Die Suche in Datenbanken kann mit der Sequenzinformation alleine oder durch eine Kombination der Aminosäuren mit der entsprechenden Peptidmasse vorgenommen werden.

Aufgrund des geringen Detektionslimits und eventuell vorhandener posttranslatiionaler Modifikationen (z.B. Glykosylierung) wurde im Rahmen dieser Arbeit die Proteinsequenzierung und Identifizierung mittels Q-TOF angewendet.

4.2 Isolierung und Identifizierung von AHNAK

Der monoklonale Antikörper 4B2 ist in der Lage, das korrespondierende Antigen unter nativen und denaturierenden Bedingungen wie auch speziesübergreifend zu erkennen. Erste Informationen konnten somit mittels Immunoblot und Immunhistochemie gesammelt werden. In Immunpräzipitationen konnte dieser Antikörper jedoch nicht erfolgreich eingesetzt werden. Vermutlich liegt in diesem Fall eine zu geringe Affinität des Antikörpers zum Antigen vor. Auch eine Reduktion der Waschschrte sowie der Salz- und Detergenzkonzentration führte nicht zum erwünschten Ergebnis.

Die Isolierung des Antigens wurde aus diesem Grund mittels einer konventionellen Reinigungsstrategie durchgeführt. Der Antikörper wurde hierbei zur Analyse der einzelnen Fraktionen mittels Immunoblot verwendet. Ausgehend von einem nativen TBS-Extrakt aus Rinderlunge wurde in wenigen Schritten ein 220 kDa Protein angereichert. Die massenspektrometrische Sequenzierung dieses Proteins, ausgehend von SDS-PAGE-Banden,

fürhte nach Vergleich der erhaltenen Sequenzinformationen mit Datenbanken zu zwei potentiellen Kandidaten –Talin und AHNAK-.

Der Vergleich, der mit dem monoklonalen Antikörper 4B2 erhaltenen experimentellen Daten (u.a. Gewebeverteilung sowie subzelluläre Lokalisierung) mit Informationen über diese beiden Proteine ergab erste Hinweise, daß es sich um einen Antikörper gegen AHNAK handeln könnte.

Talin, ein ca. 230 kDa großes intrazelluläres Protein (Rees et al., 1990), ist neben Proteinen wie Vinculin, Paxillin und Tensin Bestandteil von Fokalkontakten (Burrige et al., 1988). Diese Proteine koppeln Integrine an die Aktinfasern im Zellinneren. Talin ist ubiquitär im gesamten Organismus verteilt (Ben-Yosef et al., 1999) und ist wesentlich an der Verankerung der Zellen an die extrazelluläre Matrix beteiligt. Außerdem ist Talin eine essentielle Komponente während der Ausbreitung und Migration verschiedener Zelltypen, z.B. Fibroblasten (Nuckolls et al., 1992).

Aufgrund der Tatsache, daß mit dem monoklonalen Antikörper 4B2 in immunhistochemischen Untersuchungen keinerlei Fokalkontakte angefärbt werden konnten und auch keine übereinstimmende Gewebeverteilung beobachtet wurde, konnte Talin als korrespondierendes Antigen ausgeschlossen werden.

AHNAK, ein ca. 680 kDa großes intrazelluläres Protein, wurde vor ca. zehn Jahren von zwei verschiedenen Gruppen entdeckt. Zum einen wurde es als desmosomales Protein in Keratinozyten beschrieben und Desmoyokin genannt (Hieda et al., 1989). In den letzten Jahren wurde jedoch mit Hilfe der Elektronenmikroskopie festgestellt, daß das Protein kein direkter Bestandteil von Desmosomen ist (Masunaga et al., 1995).

Zum anderen wurde es als Produkt eines Gens identifiziert, welches in humanen Neuroblastomen herunterreguliert wird, und aufgrund der enormen Größe des Proteins der Name AHNAK (Hebräisch: sehr groß) vergeben (Shtivelman et al., 1992).

AHNAK besitzt eine breite Verteilung in verschiedenen Zelltypen und zellulären Kompartimenten. Eine nukleäre, aber auch cytoplasmatische und mit der Plasmamembran assoziierte Lokalisation des Proteins wurde beschrieben. In Keratinozyten scheint AHNAK vorwiegend mit der Plasmamembran assoziiert zu sein, während in Fibroblasten eine eher cytoplasmatische und teilweise nukleäre Verteilung vorliegt (Hashimoto et al., 1993). Daher wird vermutet, daß das Protein in epithelialen und nicht-epithelialen Zellen eine unterschiedliche Funktion besitzt (Hashimoto et al., 1993).

4.3 AHNAK ist das Antigen für den monoklonalen Antikörper 4B2

Zur Überprüfung der Hypothese, daß es sich bei dem monoklonalen Antikörper 4B2 um einen Antikörper gegen AHNAK handelt, wurden verschiedene Gewebeextrakte unter Bedingungen, die einen proteolytischen Abbau vermindern, hergestellt und untersucht. Mit dem monoklonalen Antikörper konnte neben mehreren kleineren Fragmenten ein Protein im Bereich von ca. 700 kDa detektiert werden. Die Anreicherung dieses Proteins aus Rinderhaut unter denaturierenden Bedingungen führte nach massenspektrometrischer Sequenzierung zur Identifizierung von AHNAK.

AHNAK zeichnet sich durch eine charakteristische Molekülstruktur aus und scheint phylogenetisch hoch konserviert vorzuliegen (Shtivelman et al., 1992). Aus der genomischen Sequenz kann eine Länge von 5643 Aminosäuren für AHNAK abgeleitet werden. Das Protein kann in drei verschiedene strukturelle Bereiche eingeteilt werden: 251 Aminosäuren N-terminal, gefolgt von einem großen mittleren Bereich mit ca. 4300 Aminosäuren, sowie 1002 Aminosäuren C-terminal. Die zentrale Region des Proteins besteht aus über 30 Wiederholungen mit einer Länge von ungefähr 128 Aminosäuren. Eine Analyse der verschiedenen repetitiven Motive ergibt eine 80%ige Identität untereinander.

Eine Analyse der Proteinsequenz ergab Hinweise auf mögliche Nukleuslokalisierungssignale sowie Phosphorylierungstellen im C-terminalen Bereich (Shivelman et al., 1992).

In der genomischen Sequenz können keine Introns gefunden werden. Dies impliziert, daß es sich bei dem angereicherten 220 kDa-Protein um ein proteolytisches Fragment und nicht um alternativ gespleißte Formen von AHNAK handelt. Diese Vermutung wurde in zahlreichen Untersuchungen mit und ohne Proteaseinhibitoren bestätigt. Eine Lagerung des Proteins bei 37°C führt ebenfalls zu einem schnellen Abbau des Proteins.

Die Lokalisierung der experimentell erhaltenen Sequenzen des 220 kDa-Fragments innerhalb der humanen AHNAK Sequenz zeigt, daß alle diese Sequenzen im mittleren repetitiven Bereich des Proteins vorzufinden sind. Keine der Sequenzen konnte dem N-terminalen oder C-terminalen Bereich zugeordnet werden. Aufgrund der zahlreichen Wiederholungen der Sequenzabschnitte im repetitiven Bereich ist es sehr wahrscheinlich, daß die nach proteolytischem Verdau entstandenen Peptide des N- bzw. C-Terminus im Gegensatz zu Peptiden aus dem mittleren Bereich möglicherweise in der Q-TOF-Analyse nicht detektierbar oder sequenzierbar waren. Es kann somit keine detaillierte Aussage über die Zusammensetzung der 220 kDa-Fragmente gemacht werden. Theoretisch könnte ein Molekulargewicht von 220 kDa, bei einer proteolytischen Spaltung innerhalb des repetitiven Bereichs, einem AHNAK-Fragment mit vollständigem N-Terminus und den ersten 17

repetitiven Einheiten bzw. einem kompletten C-Terminus und zusätzlichen acht Repeats mit einer durchschnittlichen Länge von 128 Aminosäuren entsprechen. Möglich wäre weiterhin die Anwesenheit eines Fragments aus etwa 15 repetitiven Einheiten. Aufgrund der Tatsache, daß seltenere Sequenzstücke jeweils nur in der Nähe des N-Terminus als auch des C-Terminus lokalisiert wurden, ist es wahrscheinlich, daß die 220 kDa Doppelbande, die zur Sequenzierung herangezogen wurde, aus einer Mischung N- und C-terminaler Fragmente bestand. Die Vollständigkeit der terminalen Bereiche ist jedoch fraglich.

4.4 AHNAK wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und von verschiedene Zelltypen produziert.

Die Lokalisation von AHNAK in Mausgewebe wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 4B2 analysiert. Die Expression des Proteins war bisher nur in Haut beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde AHNAK zudem in Gehirn, Herz, Lunge, Skelettmuskel, Ovar, Testis, Speiseröhre, Luftröhre und Leber nachgewiesen. AHNAK zeigt ein komplexes Expressionsmuster sowohl bei Embryos (d16,5 p.c.) als auch bei adulten Mäusen. Am Embryonalentwicklungstag 16,5 p.c. wird AHNAK bereits in allen Geweben exprimiert, in denen das Protein auch in neugeborenen und adulten Geweben lokalisiert ist.

AHNAK wird in Geweben exprimiert, die hauptsächlich durch Endothel- und Epithelzellen aufgebaut werden. Eine genaue Bestimmung der Zelltypen war anhand von Kryostat-Schnitten dieser Gewebe nicht möglich. Eine bessere Auflösung und detailliertere Lokalisierung von AHNAK könnte z.B. mit Hilfe von Paraffinschnitten erzielt werden. Der monoklonale Antikörper 4B2 ist jedoch nicht in der Lage auf Geweben nach Paraffineinbettung und der anschließenden Behandlung dieser Gewebeschnitte sein Antigen zu erkennen.

Um zu überprüfen, welche Zellen in der Lage sind, AHNAK zu produzieren, wurden Zelllinien auf Proteinexpression analysiert. Fibroblasten, Keratinozyten, Epithelzellen, Myoblasten sowie Endothelzellen exprimieren AHNAK als ca. 700 kDa Protein. Neben dieser hochmolekularen Bande werden in den untersuchten Zellysaten meistens zusätzlich Degradationsprodukte beobachtet. Auch die Verwendung einer komplexen Mischung von Proteaseinhibitoren kann eine Degradation des Proteins nicht vollständig verhindern.

Möglicherweise liegt AHNAK in Geweben und in kultivierten Zellen sowohl in voller Länge als auch teilweise fragmentiert vor. Diese Heterogenität könnte Auswirkungen auf die

Affinität von AHNAK zu makromolekularen Liganden haben. So könnte das Protein in verschiedenen Kompartimenten der Zellen unterschiedlich stark fragmentiert vorliegen und möglicherweise unterschiedliche Funktionen erfüllen. Auch eine Aktivierung von AHNAK durch Proteolyse ist vorstellbar.

4.5 AHNAK wird in humaner Haut hauptsächlich in der Epidermis und in Blutgefäßen exprimiert.

Während AHNAK in der Haut von neugeborenen Mäusen sowohl in der Epidermis als auch in der gesamten Dermis exprimiert wird, konnte es in der humanen Haut (Patientenalter über 35 Jahre) hauptsächlich in der Epidermis und in dermalen Blutgefäßen detektiert werden. Die geringere Expression von AHNAK in der humanen Dermis ist möglicherweise auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Haut in Maus und Mensch oder auf Unterschiede, die auf dem Alter des Gewebes beruhen, zurückzuführen.

Während des Alterungsprozesses nimmt die Hautdicke um ca. 20% ab und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix wird stark verändert. Junge Haut enthält mehr Hyaluronsäure und das Mengenverhältnis der Kollagene des Typs III, V, VI zu Kollagen Typ I ist deutlich höher (Lavker et al., 1987). Kollagen- und Elastinfasern werden in diesem Stadium verbunden und die Kollagenfibrillendicke reguliert (Cleary und Gibson, 1983). Eine veränderte Zusammensetzung im extrazellulären Raum mit fortschreitendem Alter kann auch die Expression transmembraner sowie intrazellulärer Proteine, wie AHNAK, beeinflussen.

Es wäre somit vorstellbar, daß im Rahmen eines Wundheilungsprozesses oder in Tumorgewebe eine veränderte Expression und Funktion von AHNAK zu beobachten wäre. Wundheilung ist ein extrem komplexer Vorgang, der unter anderem durch eine Neubildung bzw. Umwandlung extrazellulärer Komponenten sowie eine ständige Kommunikation intra- und extrazellulärer Proteine gekennzeichnet wird.

4.6 AHNAK ist in epithelialen Zellen hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert.

In den AHNAK exprimierenden Geweben wird das Protein vorwiegend im Bereich epithelialer und endothelialer Zellen gefunden.

Es wurden verschiedene Zelllinien (Fibroblasten, Keratinozyten, Epithelzellen, glatte Myoblasten und Endothelzellen) zur subzellulären Lokalisierung von AHNAK mittels Immunfluoreszenz untersucht.

In Epithelzellen ist das Protein vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert, während in Fibroblasten eine Verteilung über die gesamte Zelle beobachtet wurde. Neben der Plasmamembranfärbung in Epithelzellen, welche verstärkt im Bereich von Zell/Zell-Kontakten zu beobachten ist, konnte jedoch auch eine cytoplasmatische und teilweise nukleäre Färbung (Zellkernmembran) nachgewiesen werden.

Eine subzelluläre Fraktionierung mit darauffolgender Analyse von Cytoplasma- und Membran-Fractionen dieser Zellen bestätigte, daß AHNAK in Epithelzellen hauptsächlich in der Membran-Fraktion enthalten ist. Eine zusätzliche Lokalisierung des Proteins im Cytoplasma konnte bei einigen Zelllinien nachgewiesen werden.

Die Analyse der Zellfraktionen nicht-epithelialer Zellen ergab ein ähnliches Ergebnis. Der größte Teil von AHNAK ist auch hier erst durch die Verwendung eines detergenzhaltigen Puffers aus den Zellen herauszulösen und somit in der Membranfraktion enthalten. In Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie wurde zudem auch eine cytoplasmatische Lokalisierung beobachtet. Die Untersuchung dieser Zellen mittels Immunfluoreszenz zeigten im Gegensatz hierzu eine Verteilung des Proteins in der gesamten Zelle. Eine vorrangige Plasmamembranfärbung konnte nicht explizit beobachtet werden. Die Resultate lassen den Schluß zu, daß es sich zum Teil um eine Assoziation des Proteins mit kleineren Vesikeln handeln könnte. Die Frage nach der zellulären Verteilung von AHNAK in Fibroblasten konnte weder anhand der immunhistochemischen Untersuchungen noch der Zell-Fraktionierungsexperimente eindeutig beantwortet werden. Die potentielle Assoziation des Proteins mit Vesikeln könnte im weiteren Verlauf mittels einer Fraktionierung verschiedener Zellorganellen untersucht werden. Eine Trennung verschiedener Organellen sowie eine Abtrennung der Plasmamembran von diesen Bestandteilen kann mittels Ultrazentrifugation erfolgen. Eine Analyse der erhaltenen Fraktionen sowie der Vergleich mit gut charakterisierten Markern (wie z.B. Katalase (Peroxisome), Succinatdehydrogenase (Mitochondrium)) kann eine Zuordnung des Proteins zu bestimmten Zellkompartimenten ermöglichen.

Die Untersuchungen bestätigen, daß AHNAK in Epithelzellen hauptsächlich an der Plasmamembran aber auch im Cytoplasma und möglicherweise an der Kernmembran oder im Kern zu finden ist. Es ist anzunehmen, daß das Protein in verschiedenen Kompartimenten dieser Zellen unterschiedliche Funktionen besitzt.

Die Plasmamembran-Assoziation von AHNAK deutet auf eine mögliche Beteiligung des Proteins im Bereich von Zell-Zell-Kontakten hin. Die cytoplasmatische und nukleäre Verteilung suggeriert eine Funktion in Signaltransduktionsprozessen zwischen der Plasmamembran und dem Zellkern. Letztere Vermutung wird durch die Anwesenheit potentieller Nukleuslokalisierungssignale sowie eines Leuzin-Zipper Motivs im C-terminalen Bereich des Proteins unterstützt. Leuzin-Zipper Motive werden in einer Vielzahl verschiedener Proteine gefunden, welche an der Gen-Regulation beteiligt sind (Busch et al., 1990).

Eine weitere mögliche Funktion von AHNAK im Cytoplasma könnte die Beteiligung an Calciumabhängigen Signalkaskaden sein. In den letzten Jahren wurde nachgewiesen, daß AHNAK in Kardiomyozyten mit L-Typ Calciumkanälen assoziiert vorliegt. In diesen Zellen könnte AHNAK eine Rolle bei adrenerg vermittelten Signaltransduktionen spielen (Haase et al., 1999). Weiterhin konnte die direkte Bindung und Aktivierung von Phospholipase C- γ 1 durch AHNAK charakterisiert werden (Sekiya et al., 1999). Es wurde gezeigt, daß die repetitiven Bereiche von AHNAK an der Bindung der Phospholipase C- γ 1 beteiligt sind. Neueste Ergebnisse haben zudem gezeigt, daß AHNAK in der Anwesenheit von Calcium an S100B bindet (Gentil et al., 2001). S100B, ein Mitglied der S100-Calmodulin-Troponin-Superfamilie, besitzt eine Vielzahl regulativer Funktionen bei intrazellulären Wachstums-, Differenzierungs- und Stoffwechselfvorgängen.

Die Interaktion von AHNAK mit L-Typ Calciumkanälen, Phospholipase C- γ 1 sowie S110B weist auf eine Funktion des Proteins bei der Regulation der Calcium-Homöostase hin. Die Lokalisierung des Proteins in Keratinozyten impliziert zudem eine Beteiligung von AHNAK an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Aufgrund der Größe von AHNAK ist eine Bindung zahlreicher verschiedenen Liganden sowie die Ausbildung von Multiprotein-komplexen wahrscheinlich.

4.7 Die Lokalisierung von AHNAK in Epithelzellen ist von den Kultivierungsbedingungen abhängig.

Das Verhalten kultivierter epithelialer Zellen ist wesentlich von der Calciumkonzentration des Mediums abhängig. Wenn die Ca^{2+} -Konzentration im Kulturmedium abnormal niedrig ist (30 μM), wirken die Ca^{2+} -abhängigen Zell/Zell-Adhäsionssysteme nicht, und die Keratinozyten wachsen als einzellige Schichten, in der teilende und sich differenzierende Zellen vermischt sind. Steigert man nun die Calciumkonzentration, ändert sich nach kurzer

Zeit die räumliche Anordnung der Zellen. Zell/Zell-Kontakte und somit mehrlagige Strukturen werden wieder ausgebildet.

In den letzten Jahren wurden bei verschiedenen Proteinen, z.B. β -Catenin (Ito et al., 1999) und Desmoplakin (Sheu et al., 1989), eine Calcium-abhängige Lokalisierung in epithelialen Zellen festgestellt. Auch AHNAK zeigte in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Hashimoto et al., 1995) unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen eine veränderte Lokalisierung in Keratinozyten. Werden Keratinozyten in Calciumfreiem Medium kultiviert, so wird eine cytoplasmatische Verteilung von AHNAK beobachtet. Die Translokation des Proteins kann durch Zugabe von 1,8 mM Calcium wieder rückgängig gemacht werden. Ein ähnliches Verhalten konnte für β -Catenin nachgewiesen werden.

Die Translokation von AHNAK vom Cytoplasma zur Plasmamembran kann zudem in Calciumfreiem Medium durch die Zugabe eines Proteinkinase-C Aktivators induziert und mittels eines Proteinkinase-C Inhibitors selektiv inhibiert werden (Hashimoto et al., 1995). Proteinkinase-C ist wesentlich an der Proliferation, Differenzierung sowie Zelladhäsion epidermaler Keratinozyten beteiligt (Nagao et al., 1989; Kitajima et al., 1992).

Ein Vergleich der Geschwindigkeiten der Translokationen beider Proteine zeigte, daß β -Catenin deutlich schneller als AHNAK auf eine Erhöhung der Calciumkonzentration reagieren kann. Im Gegensatz hierzu verläuft die Translokation von der Plasmamembran ins Cytoplasma bei einer Erniedrigung der Calciumkonzentration jedoch langsamer als bei AHNAK. Eine möglicher Erklärung für dieses Verhalten könnte eine festere Verankerung von β -Catenin an der Plasmamembran gegenüber AHNAK sein. β -Catenin besitzt eine wesentliche Rolle bei der Verknüpfung von Zell-Adhäsionsmolekülen mit dem Cytoskelett der Zellen sowie in Signaltransduktionsprozessen (Behrens, 1999; Ben-Ze'ev, 1999).

Die übereinstimmende Lokalisierung und aufgrund der Tatsache, daß β -Catenin sowie AHNAK unter veränderten Kultivierungsbedingungen der Zellen eine Translokation aufweisen, legt die Vermutung nahe, daß AHNAK in diesen Prozessen eine Rolle spielen könnte.

Diese Vermutung würde auch durch die beobachtete Änderung der Expressionsrate und des Phosphorylierungszustandes des Proteins in Zellen während einer Differenzierung oder Wachstums unterstützt (Shtivelman et al., 1993).

Eine direkte Bindung von AHNAK an β -Catenin konnte mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen nicht nachgewiesen werden.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß eine Wechselwirkung beider Proteine vorliegt. Es bedarf noch weiterer Untersuchungen, in denen weitere potentielle Bindungspartner oder

Aktivatoren, die bei diesen Vorgängen eine Rolle spielen, charakterisiert werden. So könnte die Bindung von AHNAK an β -Catenin vom Phosphorylierungszustand des Proteins oder der Interaktionspartner sowie auch von der Anwesenheit zweiwertiger Ionen abhängen.

4.8 Das 8F10-Antigen ist in hohem Maße heterogen.

Das 8F10-Antigen läuft unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE in Form mehrerer Banden zwischen 100 kDa und 600 kDa. Aufgrund dieses Laufverhaltens kann eine Disulfidverbrückung zu Oligomeren ausgeschlossen werden. Die Heterogenität des Proteins wurde sowohl nach Extraktion aus Gewebe als auch im Zellkulturüberstand beobachtet. Das diffuse Erscheinungsbild ist weiterhin nicht auf die Spezies Maus beschränkt, sondern kann in ähnlicher Form auch bei bovinen Proben beobachtet werden. Die Heterogenität ist zudem kein Resultat unspezifischer proteolytischer Degradation, da das charakteristische multiple Bandenmuster sofort nach der Extraktion des Proteins aus Gewebe zu beobachten ist und auch nicht durch eine längerer Lagerung des Proteins bei 37°C verstärkt wird. Ein gewebs- oder zellspezifischer Abbau des Antigens oder posttranslationale Modifikationen könnten die Ursache der beobachteten Heterogenität sein. Weiterhin konnte eine unvollständige Denaturierung des Proteins ausgeschlossen werden. Eine Behandlung der Probe mit Harnstoff führte nach elektrophoretischer Auftrennung zum selben Ergebnis.

Zur Identifizierung des 8F10-Antigens wurde wiederholt versucht das Protein aus Gewebeextrakten oder Zellkulturüberständen zu isolieren. Hierzu wurden zum einen Immunpräzipitationen und Affinitätsreinigungen mit dem monoklonalen Antikörper durchgeführt sowie Reinigungsstrategien mittels Ionenaustauscher und Gelfiltration angewendet. Keiner dieser Ansätze führte jedoch bisher zu einer ausreichenden Anreicherung des Proteins. Ein großes Problem ist hierbei die geringe Menge des Antigens in Gewebeextrakten und Zellkulturüberständen sowie das extrem heterogene Verhalten des Proteins. Auch eine mehrfache Wiederholung einzelner Reinigungsschritte oder eine veränderte Kombination verschiedener Methoden führte nicht zu Proteinmengen, die für eine Sequenzierung des Proteins ausreichend sind.

Die Sequenzierung des Proteins könnte sich zudem aufgrund eventueller posttranslationaler Modifikationen als schwierig erweisen. Zur Vermeidung einer solchen Problematik wurde während der Reinigung eine Abspaltung von Glykosaminoglykanketten und anschließende Konzentrierung der Proteinprobe durchgeführt. Einen guten Ansatzpunkt bietet weiterhin die

Reduktion und Alkylierung der Proteinlösung im Laufe der Reinigung. Auch diese Veränderungen führte jedoch nicht zum Ziel.

Zur genaueren Bestimmung eventueller posttranslationaler Modifikationen wurden Proben des bovinen Antigens mit verschiedenen Enzymen behandelt und das Laufverhalten des Proteins mit unbehandelten Proben verglichen. Die Inkubation mit Keratanase führte zu einer deutlichen Verminderung des heterogenen Verhaltens. Im Immunoblot kann nach dem Verdau nur noch eine Bande im Bereich von ca. 100 kDa beobachtet werden. Diese Bande stellt vermutlich eine Keratansulfatfreie Form des Proteins dar. Weitere posttranslationale Modifikationen sind jedoch sehr wahrscheinlich, da die Behandlung nicht zu einer scharf abgegrenzten Bande führte. Eine weitere Anheftung von Glykosaminoglykanen (z.B. Chondroitinsulfat, Heparansulfat) konnte nicht nachgewiesen werden. Auch eine Abspaltung N-verknüpfter Zucker mit N-Glykosidase F führte zu keiner Änderung des Laufverhaltens. Die Anwesenheit O-verknüpfter Zuckerketten wurde zusätzlich durch eine Behandlung des Proteins mit Ammoniak überprüft. Unter diesen Bedingungen werden alle O-verknüpften Zucker abgespalten. Die Behandlung bestätigte die zuvor erhaltenen Resultate.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß das aus Rinderhaut isolierte 8F10-Antigen O-glykosidisch verknüpfte Keratansulfatketten trägt.

Die Glykosylierung des Proteins könnte jedoch in verschiedenen Zellen, Geweben oder Organismen unterschiedlich sein.

Zur Sequenzierung muß das zu untersuchende Protein enzymatisch in kleinere Fragmente zerlegt werden. Zur Spaltung des 8F10-Antigens wurde das Protein im Polyacrylamidgel einem Trypsin-Verdau unterzogen. Trypsin katalysiert die Spaltung von Peptidbindungen C-terminal von Arginin und Lysin. Die geringe Ausbeute der hierbei erhaltenen Peptide erschwerte eine Durchsuchung von Datenbanken mit diesen Informationen sowie die Sequenzierung dieser Peptide. Die geringen Peptidausbeuten könnten zum einen auf eine zu geringe Menge des Antigens oder aber auch auf eine unzureichende proteolytische Spaltung des Proteins aufgrund sterisch anspruchsvoller posttranslationaler Modifizierungen zurückzuführen sein. Es bietet sich allerdings die Möglichkeit, in weiteren Versuchen auf eine Vielzahl anderer Endoproteasen (z.B. ArgC, AspN, LysC, Chymotrypsin) auszuweichen. Auch eine Mischung verschiedener Enzyme könnte hilfreich sein.

4.9 Das 8F10-Antigen wird nur in bestimmten Geweben exprimiert und von epithelialen Zellen exprimiert.

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers wurde die Lokalisation des 8F10-Antigens in Mausegewebe mittels Immunoblot und Immunhistochemie bestimmt. Die Expression des Proteins scheint sich auf einige Gewebe zu beschränken. Signale wurden in Haut und dem oberen Verdauungstrakt nachgewiesen. In diesen Geweben wird das Protein vorwiegend in Bereichen von Zellen epithelialen Ursprungs gefunden, wie z.B. Haarfollikeln und Drüsen. In Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und Testis konnte keine Expression nachgewiesen werden.

Um Aufschluß darüber zu erhalten, welche Zellen das 8F10-Antigen exprimieren, wurden verschiedene Zelllinien (Keratinocyten, Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Myoblasten) auf Proteinexpression untersucht. Nur bei Epithelzellen konnte ein positives Signal im Zellkulturüberstand detektiert werden, alle anderen untersuchten Überstände waren negativ.

Es handelt sich jedoch nicht um eine generelle Expression in epithelialen Zellen, da das Protein nicht in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen wurde. Deshalb ist anzunehmen, daß nur bestimmte Epithelzell-Populationen dieses Protein exprimieren und sekretieren oder daß die Biosynthese dieses Proteins unter Zellkulturbedingungen von der Anwesenheit bestimmter Faktoren abhängt.

Obwohl das Protein von einigen epithelialen Zellen produziert und ins Medium sekretiert wird, konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik keine Signale im Bereich einer perizellulären oder extrazellulären Matrix detektiert werden. Die Abwesenheit des Proteins in diesen Netzwerken ist möglicherweise auf eine andere Funktion des Proteins oder fehlende Bindungspartner unter den gewählten Kultivierungsbedingungen zurückzuführen. Weiterhin wäre es möglich, daß die antigene Determinante durch die Assoziation weiterer makromolekularer Liganden abgeschirmt oder strukturell verändert vorliegt und somit eine Erkennung bzw. Bindung des monoklonalen Antikörpers verhindert wird.

Zudem konnte auch nach Permeabilisierung kein Signal in den Zellen nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis auf einen sehr schnellen Umsatz des Proteins sein.

Auch die Verteilung des Proteins im Gewebe impliziert eine Lokalisation des Proteins im Bereich spezialisierter Epithelzellen. In der Haut kann keine Expression des Proteins in den basalen Keratinocyten der Epidermis beobachtet werden, während eine starke Expression in Haarfollikeln und Drüsen zu erkennen ist. Auch in den verschiedenen Speicheldrüsen ist das

8F10-Antigen vorhanden. Keinerlei Expression wurde jedoch in einer Vielzahl anderer Epithelgewebe (z.B. Bronchialepithel, Keimepithel des Hodens) nachgewiesen.

4.10 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein Panel monoklonaler Antikörper gegen Hautbestandteile hergestellt. Nach einer ersten Charakterisierung wurden zwei monoklonale Antikörper selektiert und zur Identifizierung und Charakterisierung der korrespondierenden Antigene herangezogen.

Es konnte gezeigt werden, daß AHNAK das Antigen für den mAk 4B2 darstellt. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers wurde die Lokalisation des Proteins in murinen Geweben sowie die subzelluläre Verteilung in epithelialen und nicht-epithelialen Zellen analysiert. Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse sind eine Reihe weiterführender Studien denkbar. Bisher liegen zwar erste Studien über Bindungspartner vor, die Hinweise in Bezug auf die Funktionen des Proteins liefern, es ist jedoch anzunehmen, daß aufgrund der komplexen Gewebeverteilung, subzellulären Lokalisierung sowie der Größe von AHNAK eine Reihe weiterer Bindungspartner vorliegen.

Aufschlußreich könnte zudem die Untersuchung der Gewebeverteilung von AHNAK während der Embryonalentwicklung sein. Die Lokalisierung des Proteins in diversen Geweben sowie die potentielle Funktion von AHNAK in Zell-Zell-Kontakten und Signaltransduktionsprozessen impliziert eine komplexe Regulation der Proteinexpression während der Organentwicklung.

Die Anreicherung des 8F10-Antigens gestaltete sich extrem schwierig und führte bisher nicht zu Proteinmengen, die für eine Identifizierung ausreichend waren. Im Laufe zahlreicher verschiedener Reinigungsversuche manifestierte sich jedoch eine Strategie, die in näherer Zukunft zur Isolierung größerer Proteinmengen verwendet werden kann. Größere Proteinmengen und/oder die Verwendung anderer Proteasen sollten die *de novo* Sequenzierung des Antigens ermöglichen.

Aufgrund der Tatsache, daß es sich beim 8F10-Antigen um ein extrazelluläres Protein handelt, welches von Epithelzellen exprimiert wird, können andere extrazelluläre Matrixproteine zur Charakterisierung potentieller Bindungspartner verwendet werden.

Zur präziseren Lokalisierung des Proteins in Geweben könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Gold-markiertem monoklonalem Antikörper durchgeführt werden.

In zukünftigen Projekten könnten zudem weitere dermale Proteine mit Hilfe der hergestellten monoklonalen Antikörper identifiziert sowie charakterisiert werden und somit zum besseren Verständnis des komplexen Zusammenspiels dermalen Proteine in gesunder und verwundeter Haut beitragen.

V Material und Methoden

5.1 Reagenzien, allgemeine Lösungen und Puffer

Alle Chemikalien hatten die Qualität p.a. und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka, Merck, Serva und Sigma bezogen. Zellkulturmedien, Trypsin, Fötale Kälberserum (FCS), Pyruvat und L-Glutamin wurden von GibcoBRL bezogen. Zur Exposition der Chemolumineszenzreaktionen dienten Röntgenfilme des Typs Super RX (Fuji). Soweit von Bedeutung wird auf die Hersteller im Text gesondert hingewiesen.

Lösungen und Reaktionen wurden in hochreinem, deionisiertem Wasser angesetzt (Milli-Q PF Plus System, Millipore). Angaben des pH-Wertes beziehen sich auf Raumtemperatur (~ 25°C). Zur längeren Lagerung wurde den entsprechenden Puffern 0,1% Natriumazid zugefügt.

Azid	10% Natriumazid
PBS, pH 7,4 (Zellkultur)	140 mM NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄
PMSF	500 mM PMSF in Methanol
TBS	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
serumhaltiges Medium:	DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) mit 10% FCS. Pro 500 ml Medium werden außerdem 5 ml Glutamin (200 mM), 5 ml Pyruvat (100mM) und 10 ml P/S (100 mM) zugegeben.
serumfreies Medium:	s.o. ohne Zugabe von FCS
HAT-Medium:	serumhaltiges Medium mit 10 ml / 500 ml steriler HAT-Stammlösung (Sigma)
HT-Medium:	serumhaltiges Medium mit 10 ml / 500 ml steriler HT-Stammlösung (Sigma)
Hybridoma-SFM-Medium:	Zusatz von L-Glutamin, P/S und Pyruvat (s.o.)

5.2 Herstellung eines Protein-Pools zur Immunisierung

Haut von 3-4 Tage alten Mäusen wurde präpariert und zweimal mit PBS gewaschen, um eventuelle Verunreinigungen zu beseitigen. Durch Inkubation mit einer 1 M NaCl-Lösung (12 h, 4°C) wurden Dermis und Epidermis voneinander gelöst und vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette getrennt. Die Proteine der Dermis wurden, nachdem das Gewebe mittels eines Polytrons zerkleinert worden war, bei 4°C mit 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 (TBS) für 2 h extrahiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 15000 g abgetrennt.

Die Anreicherung größerer Proteine aus dem TBS-Extrakt wurde mittels mehrerer hintereinander geschalteter Gelfiltrationsläufe mit einer CL-4B-Sepharose-Matrix (500 ml Säulenvolumen) erreicht. Die Fraktionen mit hochmolekularen Bestandteilen (Elution nach 20-50% des Säulenvolumens) wurden vereint und für die Immunisierung von zwei Ratten verwendet.

5.3 Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk)

5.3.1 Immunisierungsschema

Als Immunogen wurde die Proteinmischung, die wie unter 5.1 hergestellt wurde, verwendet. Die Immunisierung der Ratten erfolgte intraperitoneal. Den Ratten wurde dreimal im Abstand von 3-4 Wochen jeweils 200 µl des Proteinmixes zusammen mit der gleichen Menge Freuds Adjuvants injiziert. 10 bzw. 5 Tage vor der Zellfusion erhielten die Tiere Boosterinjektionen von je 200 µl Proteinmix ohne Adjuvants.

Die Blutentnahmen erfolgten aus der Schwanzvene der Ratten. Das entnommene Blut wurde zur Entfernung der fibrillären und zellulären Fraktionen für 1 h bei RT gelagert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch 30minütige Zentrifugation bei 15000 g entfernt.

Zur Kontrolle der fortschreitenden Immunisierungen wurden mit dem entnommenen Blut mehrfach Titerbestimmungen durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Verdünnungen des Serums in der Immunofluoreszenz auf Maus-Embryo-Schnitten und im ELISA getestet.

5.3.2 Herstellung der Feeder-Layer

Das Wachstum von Hybridomzellen wird zum einen durch die von Makrophagen sezernierten Interleukine und zum anderen durch Zell-Zell-Kontakte gefördert. Die Beschichtung der zur Fusion verwendeten 96-Loch-Platten mit einer Schicht von Peritonealmakrophagen fördert somit die Überlebenschancen der Hybridome.

Zur Isolierung der Makrophagen wird eine Maus mit Ether oder durch Genickbruch getötet, das Bauchfell entfernt und mit einer Spritze, die ca. 10 ml kaltes Medium (DMEM / 20% FCS) enthält, werden mehrere Peritonealspülungen durchgeführt. Die resultierende Zell-Suspension wird gesammelt, die Zellzahl bestimmt und auf 96-Loch-Platten ausplattiert, so daß sich pro Kavität ca. $10^3 - 10^4$ Zellen befinden. Die Platten werden zwei Tage bei 37°C inkubiert, um eine eventuelle Kontamination der Zellen auszuschließen, und anschließend zur Fusion eingesetzt.

5.3.3 Präparation der Milzzellen und Zellfusion

Hybridomzellen wurden durch die Fusion von Milzzellen der immunisierten Ratten mit der Maus-Myeloma-Zelllinie SP2/0 (Shulman et al., 1978) produziert.

Die Milz einer immunisierten Ratte wurde steril entnommen, die Zellen mit serumfreiem Medium herausgespült und über ein Netz gestrichen. Rattenmilzzellen als auch SP2/0-Zellen wurden mit obigem Medium zweimal gewaschen und anschließend die Zellzahl bestimmt. SP2/0 und Milzzellen wurden im Verhältnis 1:10 in einem 50 ml Falconröhrchen gemischt, abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen leicht aufgeschüttelt.

Anschließend wurde tropfenweise über 1 min 1 ml der auf 42°C vorgewärmten PEG-Lösung (5 g Polyethylenglycol gelöst in 7 ml DMEM/10% DMSO) zugegeben. Die chemische Fusion wurde durch die langsame Zugabe von 10 ml 37°C warmem serumhaltigem Medium abgerundet. Hierzu wurden in den ersten 2 Minuten 1 Tropfen / 30 sec, dann 1 Tropfen / 5 sec und zuletzt ca. 200 µl Medium alle 5-10 sec zugegeben. Die Zellen müssen während dieser Prozedur konstant geschüttelt werden. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurden diese in 8 x 7,5 ml serumhaltigem Medium aufgenommen und auf acht 96-Loch-Platten, auf die zuvor Feeder-Zellen ausplattiert wurden (5.2.3), aufgebracht. Dies entsprach in etwa 75 µl der obigen Suspension/Loch. Die Zellen wurden bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert. Nach ungefähr 3 Tagen wurden 50 µl HAT-Medium pro Kavität dazugegeben und 7 Tage nach der Fusion wurde das Medium vorsichtig komplett gegen HAT-Medium ausgewechselt. 10-14 Tage nach der Fusion erschienen die ersten Klone.

5.3.4 Selektion der Hybridomzellen

Da bei der Fusion mit PEG nur ein Teil der Zellen fusioniert, bleibt ein großer Teil der Ausgangspopulation an Milz- und Myelomzellen unfusioniert. Die Lymphozyten sterben nach einiger Zeit in Kultur ab, die schnell wachsenden Myelomzellen könnten die Hybridomzellen jedoch in kurzer Zeit überwuchern.

Um die Hybride leicht selektieren zu können, wird eine mutante Myelomzelllinie verwendet. Diesen Zellen fehlt die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT). Der Zusatz von Hypoxanthin, Aminopterin und Thymin zum Medium (das sogenannte HAT-Medium) führt zum Absterben der nichtfusionierten Myelomzellen. Hybridomzellen dagegen überleben, da sie den neoplastischen Charakter ihrer Myelomelternzelle und die HGPRT-Gene ihrer Milzelternzelle besitzen.

5.3.5 Hybridomanalyse

Sobald die Zellkolonien makroskopisch sichtbar sind, kann der Überstand aus den entsprechenden Kavitäten zum Antikörpertest entnommen werden. Eine erste Analyse der Aktivität der Antikörper wird mittels ELISA-Test durchgeführt. Überstände, welche sich bei dieser Analyse als positiv herausstellten, wurden weiterhin in der Immunfluoreszenz und im Immunoblot getestet.

5.3.6 Klonierung und Reklonierung

Um sicherzustellen, daß die Zellkulturüberstände von nur einem Zellklon produziert werden, also monoklonal sind, wurden die Antikörper-produzierenden Populationen subkloniert. Hierzu wurden die Zellen der positiven Kavitäten in Medium resuspendiert, das mit Interleukin 6 (Strathmann Biotech) (20U/ml) versetzt war, um die Zellen zu stabilisieren. Es wurde eine Verdünnung von 1 Zelle pro 100 µl eingestellt und pro Kavität der Zellkulturplatten 100 µl abgelegt (Einzelzellablage). Im Mikroskop wurde die tatsächliche Anzahl der abgelegten Zellen überprüft. Kavitäten, deren Populationen wirklich nur aus einer einzigen Zelle gewachsen waren (Klone) und in weiteren Analysen (s.o.) positiv reagierten, wurden zur Kultivierung in Kulturflaschen überführt.

Vor jedem Selektionsschritt wurden die Hybridome aliquotiert und ein Teil bei -70°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Auf diese Weise war gewährleistet, daß bei Mißlingen eines Schrittes auf Zellen des vorhergehenden Stadium zurückgegriffen werden konnte.

5.3.7 Kultur der Hybridome

Die subklonierten Zellen wurden zur Gewinnung Antikörper-haltiger Überstände von HAT-haltigem Medium zuerst in HT-haltiges Medium und anschließend in DMEM überführt. Für die Reinigung wird das Medium durch serumfreies Hybridoma-Medium (Hybridoma-SFM) ersetzt. Hierdurch wird zum einen der Anteil endogener Immunglobuline sowie die hohe BSA-Konzentration herabgesetzt, welche die Reinigung der monoklonalen Antikörper aus dem Zellkulturüberstand erschweren. Das Medium wird alle 5 bis 7 Tage gesammelt, abzentrifugiert und bei -20°C bis zur Aufreinigung der Antikörper gelagert.

5.3.8 Typisierung der Antikörper

Die Bestimmung der Subklassen der monoklonalen Antikörper erfolgte mit einem kommerziellen Idiotyping Kit nach Anweisung des Herstellers (ICN) mittels der Ouchterlony Immundiffusionstechnik. Hierbei können IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgA sowie IgM unterschieden werden.

5.3.9 Reinigung monoklonaler Antikörper

Die Aufreinigung der mAk aus den serumfreien Zellüberständen wurde chromatographisch über eine Bakerbond ABx-Matrix (Baker, Gross-Gerau) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Mixed-Bett-Ionenaustauscher auf Silicagelbasis, welcher eine Affinität und Spezifität für alle Immunglobuline besitzt. Auf Grund der hohen Kapazität und Trennleistung des Materials können große Antikörpermengen schnell und effizient gereinigt werden. Die Chromatographie erfolgt bei niedriger Ionenstärke und im physiologischen pH-Bereich.

Eine Säule (70 ml) wurde nach Anleitung des Herstellers gepackt und mit 25 mM 2-Morpholinoethansulfonsäure (MES) pH 5,6 äquilibriert. 500 ml serumfreier Zellüberstand wurden 1:3 mit 25 mM MES pH 4,0 verdünnt. Der pH-Wert sollte nach der Verdünnung bei ungefähr pH 5,6 liegen. Der vorbereitete Zellkulturüberstand wurde mit einer Peristaltik-Pumpe aufgetragen, die Säule mit drei Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer gewaschen und die gebundenen Antikörper durch graduelle Erhöhung der Salzkonzentration und des pH-Wertes (Gradient: 25 mM MES pH 5,6 bis 1 M NaOAc pH 7,0 über 5 Säulenvolumen) eluiert. Die Antikörper werden in Fraktionen von 5 ml gesammelt und ihre Reinheit mittels SDS-PAGE überprüft. Alle Reinigungsschritte werden bei 4°C durchgeführt. Positive Fraktionen wurden vereint, bis zu einer Endkonzentration zwischen 0,1-0,5 mg/ml eingengt, gegen TBS dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.4 Durchmustern einer Haut-cDNA-Expressionsbank

5.4.1 Ausplattieren der Lamda cDNA-Expressions-Bibliothek

Zur Isolierung individueller 4B2- bzw. 8F10-kodierender Klone wurde eine Haut-Expressionsbank murinen Ursprungs der Firma Stratagene durchmustert. Zu diesem Zweck wurden 2×10^6 Plaque-formende Einheiten (PFU) nach Anleitung des Herstellers mit einer eingestellten Menge an Bakterien des Typs XL1 (E.coli) für 15 min bei 37°C inkubiert. Auf acht quadratische LB-Agar Schalen (22 x 22 cm) wurde ein Phagenanteil in je 40 ml erwärmter LB-Soft-Top-Agarose ausgebracht. Nach Erhärten der Oberfläche wurden die Platten zur Ausbildung der Plaques für 4 h bei 42°C inkubiert.

5.4.2 Transfer der Phagenplaques auf Filter

Quadratische Nitrocellulosefilter (20 x 20 cm) wurden zur Herstellung einer Matrize für etwa 10 min in einer 10 mM IPTG-Lösung gebadet, 20 min an der Luft getrocknet, auf die Oberfläche der teil-lysierten Phagenplatten aufgelegt und ihre genaue Position durch Einstiche markiert. Die Platten mit den aufgelegten IPTG-Filtern wurden nun zur Induktion der Proteinexpression für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen abgenommen, mit der Phagenseite nach oben nacheinander gründlich mit TBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit einer 5%igen Milchpulver-Lösung zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert.

5.4.3 Analyse der Bibliothek mittels monoklonaler Antikörper

Die blockierten Filter wurden für 1 h bei RT mit serumhaltigem Zellkulturüberstand der monoklonalen Antikörper inkubiert. Nach 3xigem Waschen mit TBS für eine weitere Stunde folgte die Inkubation mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper. Zur Visualisierung spezifischer Signale wurden die Filter mittels „ECL“ (siehe 5.7.6 Immunoblot) entwickelt.

Röntgenfilme mit positiven Signalen wurden mit den entsprechenden Phagenplatten paßgenau ausgerichtet und die Bereiche um die Signale aus den Phagenplatten mit Hilfe einer Pipettenspitze ausgestochen. Zur Isolierung der Phagen aus den erhaltenen Agar-Stückchen inkubiert man dieses über Nacht bei 4°C in 500 µl SM-Puffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 0.01% Gelatine, pH 7,5) mit einem Zusatz von 20 µl Chloroform. Die so erhaltenen Phagen wurden erneut mehrmals in geringerer Dichte ausplattiert und wie oben beschrieben durchmustert. Dieses Verfahren sollte es ermöglichen, einzelne homogene Phagenkolonien zu erhalten.

5.5 Zellkultur

5.5.1 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Morphologie
3T3	Maus, Embryo	Fibroblasten
Wi26	Human, Lunge	Fibroblasten
L132	Human, Lunge	Fibroblasten
HT1080	Human, Fibrosarcom	Fibrosarcomzellen
C2/7	Maus, Skelettmuskel	Myoblasten
PVDAI	Maus, Haut	Keratinocyten
Pam212	Maus, Haut	Keratinocyten
HACAT	Human, Haut	Keratinocyten
HBL100	Human, Brust	Epithelzellen
A431	Human, Epidermis	epitheliale Karzinomzellen
SCC25	Human, Zunge	epitheliale Karzinomzellen
OVCAR	Human, Ovarien	epitheliale Karzinomzellen
CaCo2	Human, Dickdarm	epitheliale Karzinomzellen
ECV304	Human, Nabelschnur	Endothelzellen

5.5.2 Inkubationsbedingungen und Medium

Die Zellen werden auf Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm, Falcon) bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% - 7,5% CO₂ in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus) kultiviert.

Je nach Dichte der Zellen wurde das verbrauchte Medium etwa alle 2-3 Tage abgesaugt und die Zellen mit 10 ml frischem Medium versorgt.

5.5.3 Vereinzeln

Die kultivierten Zellen wachsen unter den verwendeten Bedingungen adhärent. Zellen konfluent bewachsener Zellkulturschalen werden enzymatisch vom Boden der Schale gelöst und vereinzelt. Dazu wird zuerst das serumhaltige Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gespült, um letzte Mediumreste zu entfernen, und anschließend mit 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung in PBS (10-fach-Stocklösung mit 0,5 g Trypsin / 0,2 g EDTA, Gibco) für ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Die Trypsinaktivität wird durch Zugabe von 10 ml serumhaltigem Medium gestoppt und in Aliquots von z.B. 1 ml (d.h. 1:10) auf neue Schalen mit frischem Medium verteilt.

5.5.4 Lagerung

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden die abgelösten und vereinzelt Zellen einer konfluenten Platte vorsichtig in DMEM mit 20% FCS und 10% DMSO aufgenommen und langsam auf -80°C abgekühlt. Die endgültige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

5.5.5 Ernte

Zur Überprüfung der endogenen Expression einzelner Proteine im Zellkulturüberstand werden die Zellen zuvor serumfrei gesetzt. Hierzu werden Reste des FCS mit PBS gewaschen und die Zellen über 24–48 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die so gewonnenen Überstände wurden abgenommen, mit 1 mM PMSF versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.6 Immunhistologische Arbeiten

5.6.1 Verwendete Antikörper

Zur Detektion spezifischer Signale mit den hergestellten monoklonalen Antikörpern wurden die serumhaltigen Zellkulturüberstände der entsprechenden Klone direkt, d.h. ohne weitere Verdünnung eingesetzt. Vergleichsfärbungen wurden mit den folgenden Antikörpern und angegebenen Verdünnungen angefertigt:

anti Pan-Cadherin (aus Kaninchen, Sigma, Best. Nr.) 1:1000

anti β -Catenin (aus Maus, Transduction Laboratories, Best. Nr.C19220) 1: 50

anti EHS-Laminin (aus Kanninchen) 1:1000.

5.6.2 Immunhistochemie auf Gewebe

Mausorgane bzw. Embryos werden präpariert, in Tissue Tec (Sakura) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe eines Kryostaten werden $7\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte angefertigt und auf Objektträgern plziert. Die Schnitte werden bei RT mehrere Stunden getrocknet, um die Anhaftung des Gewebes an den Objektträger zu erhöhen. Die fertigen Schnitte werden entweder bei -20°C gelagert oder direkt gefärbt.

Die indirekte immunhistologische Färbung wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Schnitte fixieren mit 2% PFA/PBS für 10 min bei RT
- waschen mit TBS, umranden der Schnitte mit Dako Pen

- 1 h mit 1% BSA/TBS unspezifische Bindungsstellen absättigen
- 1 h mit mAK (unverdünnter Zellkulturüberstand) inkubieren
- 3x 10 min mit TBS waschen
- 1 h mit 2.Ak (anti-Ratte-Antikörper, HRP-konjugiert, Dako) in 1:1000-Verdünnung in 1% BSA/TBS inkubieren
- 3x 10 min mit TBS waschen
- zwischen 10 und 30 min färben in der AEC-Lösung
- 2x mit TBS waschen und kurz mit Wasser abspülen
- bei RT trocknen

AEC-Lösung:

1 Tablette 3-Amino-9-Ethylcarbozol (Sigma) wird in 10 ml Dimethylformamid, DMF, gelöst, 10 ml 10-fach Imidazol-Puffer zugeben, auf 100 ml mit Wasser auffüllen. Kurz vor dem Reaktionsstart wird die Lösung mit 20 µl H₂O₂ versetzt.

10x Imidazol-Puffer:

1 M NaCl, 0.2 M Zitronensäure, 1 M Imidazol (1,3-Diaza-2,4-cyclopentadien, Sigma), pH 7,0.

5.6.3 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen und auf Gewebe

Zellen werden auf speziell geeigneten Kunststoff-Objektträgern (plastic chamber slides, Nunc) ausplattiert und nach Erreichen der Konfluenz mit PBS gewaschen. Sie werden mit 2% PFA/PBS für 10 min bei RT oder mit eiskaltem Methanol für 10 min bei -20°C fixiert und gegebenenfalls anschließend für 3 min mit 0,5%igem Nonidet-P40 in PBS permeabilisiert. Kryostat-Gewebeschnitte wurden vor der Entwicklung ebenso mit eiskaltem Methanol fixiert und anschließend hydrophob umrandet. Das weitere Vorgehen ist im folgenden für beide Färbungen (auf Zellen und Gewebe) zusammengefaßt.

Unspezifische Bindungsstellen werden 1 h mit 1% BSA/PBS blockiert und 1 h mit dem primären Antikörper (bei den monoklonalen Antikörpern wird der serumhaltige Zellkulturüberstand ohne Verdünnung eingesetzt; ansonsten werden die Antikörper in Blockierungslösung wie unter 5.6.1 angegeben verdünnt) inkubiert. Es folgt viermaliges Waschen mit TBS und eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (z.B. Cy-3 markiertes anti-Ratten IgG, DAKO, 1:800 in Blockierungslösung). Nach erneutem Waschen (viermal 5 min TBS) wurde zum Schutz vor Ausbleichen mit DAKO Mount eingedeckelt.

Für Co-Immunfluoreszenzfärbung wurden zur Minimierung unspezifischer Kreuzreaktivitäten folgende Sekundärantikörper in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt:

anti AHNAK (mAk 4B2, aus Ratte) / anti β -Catenin (aus Maus):

Alexa488-markiertes anti Maus IgG (Molecular Probes, Best. Nr. A-11029) 1:1000

Alexa546-markiertes anti Ratten IgG (Molecular Probes, Best. Nr. A-11081) 1:1000

anti AHNAK (mAk 4B2, aus Ratte) / anti Pan-Cadherin (aus Kaninchen):

Cy3-markiertes anti Ratten IgG (Dianova, Best. Nr. 711-165-152) 1:800

Alexa488-markiertes anti Kaninchen IgG (Molecular Probes, Best. Nr. A-11034)
1:1000

5.7 Proteinchemische Arbeiten

Um Proteine aus Geweben oder Zellkulturüberständen zu isolieren, können verschiedene chromatographische Verfahren verwendet werden. In Abhängigkeit von Ihren individuellen Eigenschaften wie Ladung, Größe oder Hydrophobizität binden Proteine unterschiedlich stark an die verschiedenen Matrices und können durch eine geeignete Kombination verschiedener Methoden gereinigt bzw. angereichert werden. Die verwendeten Puffer werden zuvor durch 0,22 μ m Filter filtriert und gegebenenfalls entgast.

5.7.1 Ionenaustauscher

Bei der Chromatographie mittels eines Ionenaustauschers können aufgrund der hohen Kapazität und Trennleistung der Säulenmaterialien große Proteinmengen schnell und effizient getrennt werden. Diese Eigenschaften machen Ionenaustauscher zur ersten Wahl, um eine Proteinreinigung zu beginnen.

Die Proteine binden reversibel an die geladenen Gruppen der Säulenmatrix, wobei die Bindungsstärke mit der Nettoladung des Proteins variiert. Durch Erhöhung der Ionenkonzentration im Laufpuffer werden die Proteine von den Bindungsstellen verdrängt und eluiert.

Bei der Reinigung der verschiedenen Proteine wurden folgende Ionenaustauscher nach Anleitung des Herstellers (Pharmacia Biotech) verwendet:

DEAE-Sepharose Fast Flow	(Anionenaustauscher)
Q-Sepharose-HiTrap	(Anionenaustauscher)
CM-Sepharose Fast Flow	(Kationenaustauscher)
SP-Sepharose-HiTrap	(Kationenaustauscher)

Bei der Reinigung des 4B2-Antigens aus Rinderlunge wurde am Anfang eine CM-Sepharose Matrix verwendet. Als Puffer diente 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,4. Die äquilibrierte Säule (200 ml Säulenvolumen) wurde mit 1000 ml Extrakt (1:3 mit 50 mM Tris pH 7,4 verdünnt) beladen (1 ml/min), mit Puffer gewaschen und mit einem Salzgradienten (50 mM – 1 M NaCl über 800 ml) eluiert. Dabei wurden Aliquots von 10 ml aufgefangen. Alle Chromatographieschritte erfolgten bei 4°C.

Zur Reinigung des 4B2-Antigens in voller Länge (700 kDa) aus Rinderhaut wurde im ersten Schritt ebenfalls eine CM-Sepharose-Säule (200 ml Säulenvolumen) verwendet. Die Säule wurde nach Herstellerangaben (Pharmacia) gepackt und mit 7 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8,6 äquilibriert. Anschließend wurde Rinderhautextrakt (200 ml Extrakt verdünnt mit 1400 ml 8 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8,6) auf die Säule geladen (2 ml/min), mit Puffer gewaschen und mit einem Salzgradienten (50 mM – 1 M NaCl über 600 ml) eluiert. Dabei wurden Aliquots von 10 ml aufgefangen.

Nach weiterer Auftrennung der Proteinlösung mittels Gelfiltration wurde zur abschließenden Konzentrierung eine HiTrap SP-Säule (1 ml) verwendet. Die Säule wurde mit 7 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8,6 äquilibriert, die Proteinlösung auf die Säule geladen (0,5 ml/min), gewaschen und in 500 µl-Fractionen eluiert (7 M Harnstoff, 50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8,6). Alle Schritte erfolgten bei 4°C.

Im Falle des 8F10-Antigens wurde zuerst eine DEAE-Sepharose Matrix verwendet. Die Säule (100 ml Säulenvolumen) wurde gepackt und mit Puffer (50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,6) äquilibriert. 100 g Maushaut wurde in obigem Puffer extrahiert (4 ml/g Gewebe) und auf die Säule geladen (1,5 ml/min). Nach ausgiebigem Waschen wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Salzgradienten (50 mM – 500 mM NaCl in 600 ml) eluiert. Es wurden Aliquots von 10 ml aufgefangen. Der Durchfluß dieses Säulenlaufs wurde nach Äquilibrierung der Matrix erneut aufgetragen und unter den gleichen Bedingungen eluiert. Nach einem Gelfiltrationsschritt wurde ein Teil der Proteinlösung wiederum auf eine DEAE-Säule (15 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Zur Elution der Proteine wurde ein linearer

Salzgradient (50 mM – 500 mM NaCl in 6 Säulenvolumen und 500 mM – 1 M NaCl in 2 Säulenvolumen) verwendet. Es wurden Fraktionen von 3 ml aufgefangen. Positive Fraktionen wurden mit 10 mM DTT für 4 h bei RT reduziert und anschließend mit 30 mM Iodacetamid über Nacht bei 4°C alkyliert und unter denselben Bedingungen auf obiger DEAE-Säule rechromatographiert.

Nach erneuter Gelfiltration wurde zur Konzentrierung eine HiTrap Q-Säule (1 ml) verwendet. Die Säule wurde mit 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,6 äquilibriert, die Proteinlösung auf die Säule geladen (0,5 ml/min), gewaschen und in 1 ml-Fraktionen eluiert (50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8,6). Alle Schritte erfolgten bei 4°C.

5.7.2 Gelfiltration

Eine Gelfiltrationssäule trennt Proteine nach ihrer Größe auf. Für die Trennung spielt neben dem Molekulargewicht auch die Form der Proteine eine Rolle. Je kleiner ein Protein ist, desto leichter kann es in die Poren eindringen und um so länger ist seine Verweildauer auf der Säule. Große Moleküle werden zuerst eluiert. Die Qualität der Trennung ist stark von dem Probenvolumen (maximal 5% des Säulenvolumens), der Länge der Säule und von langsamen Flußraten abhängig. Bei der Reinigung der Proteine wurden folgende Säulen nach Angaben des Herstellers (Pharmacia Biotech) verwendet:

CL-4B-Sepharose Fast Flow

CL-6B-Sepharose fast Flow

Die begrenzte Kapazität der Säulen erforderte die mehrfache Wiederholung von Reinigungsschritten, um alle relevanten Fraktionen des vorhergehenden Schrittes aufzuarbeiten.

Im Falle des 4B2-Antigens aus Rinderlunge wurde im zweiten Reinigungsschritt eine CL6B-Sepharose Matrix mit einem Säulenvolumen von ca. 1800 ml verwendet. Als Laufpuffer diente 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,4. Die Flußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min und es wurden Fraktionen von 10 ml gesammelt.

Zur Reinigung des 4B2-Antigens aus Rinderhaut wurde nach erfolgter Ionenaustauscherchromatographie eine CL4B-Sepharose Säule (500 ml) verwendet. Als Laufpuffer diente 7 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8,6. Die Flußgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Es wurden Fraktionen von 10 ml gesammelt.

Positive Fraktionen der 8F10-DEAE-Säulen wurden auf eine CL4B-Sepharose-Säule (500 ml Säulenvolumen) geladen und mit Puffer (50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,6) mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert. Fraktionen von 5 ml wurden gesammelt und analysiert.

5.7.3 Affinitätsreinigung mittels Antikörper

Bei der Affinitätschromatographie wird ein Ligand oder Antikörper des anzureichernden Proteins kovalent an eine inerte poröse Matrix gebunden. Nach Beladen der Affinitäts-Säule mit einem Proteingemisch, kann unter optimalen Bedingungen reines Protein eluiert werden. Die Bindungs-, Wasch- und Elutionsbedingungen müssen für jede Reinigung einzeln variiert werden. Weiterhin ist zu beachten, daß einige Antikörper in diesem Verfahren nicht reaktiv sind und somit nicht verwendet werden können.

Zur Anreicherung des 8F10-Antigens wurde mAk 8F10 kovalent an Sepharose gekoppelt. Hierzu wurden 1,5 ml CNBr-4B-Sepharose mit ca. 50 ml einer 1 mM HCl (pH 2) gewaschen und aktiviert. Anschließend wurden 5 mg gereinigter und gegen Kupplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) dialysierter mAk 8F10 über Nacht bei 4°C an die cyanbromid-aktivierte Sepharose gekoppelt. Die Matrix wurde bei 1000g zentrifugiert und vier Stunden bei RT mit 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 zur Absättigung der freien Bindungsstellen inkubiert. Die Matrix wird in zwei kleine 800 µl-Säulen (Typ Mobicol, Fa. Mo Bi Tec) gegossen und mit jeweils 20 ml der folgenden Puffer gewaschen:

0,1 M NaAc, 0,5 M NaCl, pH 4,0

0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, pH 8,0

10 mM Tris, pH 7,4

Die Proteinlösung wird im Batch-Verfahren mit der fertigen Affinitätsmatrix ü.N. bei 4°C inkubiert oder mehrmals langsam über die Säule gegeben. Durch die lange Inkubationszeit wird die Bindungseffizienz des Antigens erhöht. Danach wurde die Matrix wiederum in die Säulen gegossen und mit 50 ml 10 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4 gewaschen.

Die Elution erfolgt mit 3 M KSCN in TBS, pH 7,4 in 1 ml Portionen. Die ersten Fraktionen, die das eluierte Antigen enthalten, wurden sofort gegen Wasser dialysiert, mittels Speed Vac auf ca. 100 µl eingengt und bei -20°C eingefroren.

5.7.4 Proteinextraktion aus Gewebe

Verschiedene Mausgewebe und -Organe wurden präpariert, mit PBS gewaschen, im Polytron unter Eiskühlung in Extraktionspuffer (5 ml pro g Gewebe) zerkleinert und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 15000g bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und entweder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder mit der entsprechenden Menge 4x Probenpuffer versetzt und im SDS-PAGE analysiert.

Extraktionspuffer: TBS, pH 7,4 mit Proteaseinhibitormix (Boehringer)

5.7.5 Proteinextraktion aus Zellen

Eine konfluente 10 cm-Platte der zu analysierenden Zelllinie wird zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden ca. 200 µl Extraktionspuffer auf die Platte gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppi überführt. Nach ca. 30 min Inkubation auf Eis werden die Zellreste abzentrifugiert (15 min, 15000 g, 4°C), der Überstand abgenommen und entweder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder mit der entsprechenden Menge 4fach Probenpuffer versetzt und im SDS-PAGE analysiert.

Extraktionspuffer: 50 mM Tris, pH 8,0
0,5% NP-40
Proteaseinhibitormix (Boehringer)

5.7.6 Zell-Fraktionierung

Zur Lokalisierung eines Proteins in verschiedenen Zellen wurde eine differentielle Protein-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde je 1 konfluente Platte pro Zelllinie zweimal mit PBS gewaschen, mit 1,5 ml isotonischem Puffer C1 versetzt und 15-30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von der Platte abgeschabt und mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators vollständig aufgeschlossen (ca. 25x). Zur Abtrennung der unter diesen Bedingungen löslichen Proteine (Cytosol-Fraktion) wurde 45 min bei 15000 g zentrifugiert, das resultierende Pellet in 1,5 ml Detergenz-haltigem Puffer M2 resuspendiert und 60 min unter mehrmaligem Vortexen bei RT inkubiert. Die löslichen Bestandteile (Membran-Fraktion) wurden wiederum durch Zentrifugation (30 min, 15000 rpm, 4°C) abgetrennt. Zur Analyse wurden jeweils 30 µl der verschiedenen Fraktionen im Immunoblot untersucht.

Puffer C1: 25 mM NaHCO₃, 340 mM Saccharose, 2 mM EDTA, pH 8,3
Proteaseinhibitormix (EDTA-frei) (Boehringer)

Puffer M2: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM MnCl, 1 % Triton X-100, pH 7,4
Proteaseinhibitormix (EDTA-frei) (Boehringer)

5.7.7 ELISA

Beim ELISA-style Assay wird ein gereinigtes Protein oder Proteingemisch an die Oberfläche einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Maxisorb, Nunc) gebunden. Hierzu wurden 30 µl Proteinlösung (Dermisextrakt) pro Kavität auf die Platte gegeben und 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden unspezifische Bindungsstellen mit einem Blockierungsreagenz (1 % BSA in PBS) für 10 min bei 37°C abgesättigt und für 1 h bei RT mit primärem Antikörper inkubiert (100 µl pro Kavität, bei mAk wurden die serumhaltige Zellkulturüberstände verwendet). Nach ausgiebigem Waschen mit PBS wird anschließend für 1 h bei RT mit einem enzymgekoppelten Zweitantikörper inkubiert (z.B. Peroxidase konjugierter anti-Ratte-IgG Antikörper (DAKO), 1:1000 in Blockierungsreagenz).

Die Reaktion wird über eine Farbreaktion mit einem geeigneten Farbstoff sichtbar gemacht. Die Intensität der Farbreaktion ist ein direktes Maß für die Stärke der Bindung des mAk an die immobilisierten Proteine und wird bei 450 nm im ELISA-Reader (Labsystem Multiscan MS) gemessen. Negativkontrollen, bei denen das immobilisierte Proteingemisch durch Blockierungsmittel ersetzt wird, wurden parallel zu allen Messungen durchgeführt.

Substratlösung:	18 ml ddH ₂ O
	2 ml 1 M NaOAc/Zitronensäure-Puffer, pH 6,0
	125 µl 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin in DMSO (10 mg/ml)
	15 µl 3,5% H ₂ O ₂
Stop-Lösung:	20 % H ₂ SO ₄

5.8 Allgemeine Proteinchemische Verfahren

5.8.1 Proteinfällung mit Ethanol

Die Proteinlösung wird im Verhältnis 1:10 mit eiskaltem 96%igem Ethanol und eventuell mit 50-200 mM NaCl versetzt und über Nacht im Kühlraum inkubiert. Die präzipitierten Proteine werden 15 min bei 4°C mit 20000 g zentrifugiert, mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird an der Luft getrocknet und in Puffer resuspendiert.

5.8.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Proteine werden durch Säuren ausgefällt, da die pH-Verschiebung die Löslichkeit des Proteins beeinflusst. Die Proteinlösung wird mit Triton X-100 (Endkonzentration 0,1%) und ¼ Volumen 50% TCA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine werden 15 min bei 4°C mit 20000 g zentrifugiert, mit eiskaltem Aceton gewaschen und erneut 15 min bei 4°C mit 20000 g zentrifugiert. Das Pellet wird an der Luft getrocknet und in Puffer resuspendiert.

5.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird nach dem Protokoll von Lämmli (1970) durchgeführt. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE durchlaufen die zu trennenden Proteine zuerst ein großporiges Sammelgel (pH 6,8), bevor sie im Trenngel (pH 8,6) nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Das Sammelgel wird in Acrylamidkonzentrationen von 3-4% benutzt. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine. Es wurden Gradientengele mit Acrylamidkonzentrationen im Trenngel von 3-15% verwendet, die einen besonders hohen Trennbereich aufweisen. Nach elektrophoretischer Auftrennung können die Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue oder Silber gefärbt werden.

Elektrophorese-Puffer: 192 mM Glycin, 0,1% SDS, 20 mM Tris

4 fach-Probenpuffer: 8% SDS, 40% Glycerin, 1% Bromphenolblau, 250 mM Tris-HCl, pH 6,8)

Marker: z.B. HMW (High Molecular Weight)-Marker, Boehringer

Myosin	205 kDa
β-Galactosidase	116 kDa
Phosphorylase b	97 kDa
Albumin, bovine	67 kDa
Aldolase	39 kDa

Zusätzlich zu den Markerproteinen werden Laminin-1 (ca. 800 kDa ohne Reduktion, 220 kDa und 400 kDa nach Reduktion) und IgM (ca. 900 kDa ohne Reduktion) verwendet.

5.8.4 Coomassie Brilliant Blue Färbung

Das Gel wird 30 min in frisch angesetzter Färbelösung (0,1% Coomassie Brilliant Blue R250 in 50% Methanol, 5% Essigsäure) geschwenkt, und anschließend in die Entfärbelösung (40% Methanol, 10% Essigsäure) überführt. Diese wird mehrfach gewechselt bis die gewünschte Farbintensität erreicht ist. Zur Lagerung wird das Gel abschließend in 7% Essigsäure überführt. Die Nachweisgrenze der Coomassie Brilliant Blue Färbung liegt bei ca. 0,1 µg Protein/ Bande.

5.8.5 Silber-Färbung

Die Färbung mit Silber erlaubt den Nachweis von 0,1 ng Protein. Sie beruht auf der Reduktion von Silberionen zu metallischem Silber durch schwefelhaltige und basische Aminosäurereste. Alle Silberfärbungen beinhalten eine Fixierung der Proteinbanden im Gel durch Essigsäure, eine Sensibilisierung mit Natriumthiosulfat, der Behandlung mit einer Silbersalzlösung und der Entwicklung unter alkalischen Bedingungen. Da die meisten Protokolle zur Silberfärbung Glutaraldehyd, welches für eine Quervernetzung der Proteine mit Polyacrylamid verantwortlich ist, enthalten, sollte, falls eine MS-Analyse angeschlossen werden soll, ein modifiziertes Protokoll ohne Glutaraldehyd verwendet werden.

5.8.6 Immunoblot

Der Immunoblot ist eine sehr sensitive Methode, um Proteine nach einer SDS-PAGE mit Hilfe spezifischer Antikörper identifizieren zu können. Die Proteine werden elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran NC, Schleicher und Schuell) transferiert. Der Transfer erfolgt in Boratpuffer (50 mM Borat, 10% MeOH, pH 8,5) für ca. 90 min bei 1000 mA bzw. über Nacht bei 200 mA und 4°C. Die Membran wird mit Ponceau S gefärbt und die Position des Proteinmarkers mit einem Bleistift markiert.

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Nitrocellulose-Membran zu verhindern, werden potentielle Bindungsstellen mit einer 5%igen Milchpulverlösung in TBS abgesättigt. Anschließend wird die Membran 1 h bei RT mit dem 1. Ak inkubiert. Hierbei wird eine geeignete Verdünnung des Antikörpers in Blocklösung verwendet. Sollen monoklonale Ak verwendet werden, so können hierbei direkt die serumhaltigen Zellkulturüberstände eingesetzt werden. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS wird 1 h bei RT mit dem zweiten Antikörper (z.B. anti-Ratte-IgG, HRP-konjugiert, 1:1000) inkubiert. Die Detektion des Meerrettich-Peroxidase konjugierten Zweitantikörpers erfolgte mit „ECL“. Hierbei werden die markierten Proteine mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

„ECL“: 10 ml 0,1 M Tris, pH 8,5 + 25 µl 90 mM p-Coumarinsäure (Fluka)
 + 50 µl 250 mM Luminol (Fluka)
 + 3 µl 30% H₂O₂

Neben den hergestellten monoklonalen Antikörpern wurden folgende Antikörper in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt:

anti-EHS-Laminin (aus Kaninchen) 1:1000
anti-Fibronectin (aus Kaninchen) 1:500
anti-BM-40 (aus Kaninchen) 1:500
anti-Pan-Cadherin (aus Kaninchen, Sigma, Best. Nr. C3678) 1:2000
anti-β-Catenin (aus Maus, Transduction Laboratories, Best. Nr. C19220) 1:500

5.8 Protein-Identifizierung

Im Laufe der letzten Jahre entwickelte sich die Massenspektrometrie zu einer Methode, mit der sich Proteine aus einem ein- oder zwei-dimensionalen Gel schnell und sensitiv identifizieren lassen.

Zu den Vorteilen der Massenspektroskopie gegenüber herkömmlichen Methoden zählen unter anderem das extrem geringe Detektionslimit (ca. 2 pmol) und die direkte Verwendung Coomassie Brilliant Blue gefärbter Banden, da der Transfer des Proteins auf eine spezielle Membran vermieden wird. Weiterhin können sehr viele Proben parallel bearbeitet werden als auch mehrere Proben gleichzeitig aus einem Gemisch identifiziert werden.

Nach dem Ausschneiden einer Bande aus einem SDS-PAGE-Gel (Coomassie Brilliant Blue oder Silber gefärbt), wird nach entsprechender Vorbehandlung ein enzymatischer Verdau im Gel durchgeführt. Die entstehenden Peptide können aus dem Gel herausgelöst und mittels MALDI-TOF bzw. LC MS/MS analysiert werden.

5.9.1 Probenvorbereitung

Coomassie Brilliant Blue bzw. Silber gefärbte Banden werden aus einem SDS-Polyacrylamidgel herausgeschnitten, zerkleinert und für 10 min in 500 µl Acetonitril inkubiert, der Überstand danach abgenommen und restliche Flüssigkeit für 2 min in der Speed Vac abgezogen. Die dehydrierten Gelstückchen werden in 100 µl 10 mM DTT aufgenommen

und 1 h bei 55°C reduziert. Die DTT-Lösung wird abgezogen, durch 100 µl 50 mM Iodacetamid ersetzt und diese Mischung zur Alkylierung für 1 h bei 40°C inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen mit einer 100 mM Ammoniumbicarbonatlösung werden die Gelstückchen erneut dehydriert und anschließend mit einer frisch hergestellten Trypsinlösung behandelt. Hierzu fügt man 100 µl Trypsinlösung (20 ng/µl in 50 mM Ammoniumbicarbonat) zu den dehydrierten Gelstückchen, inkubiert 20 min auf Eis, entfernt die überschüssige Lösung und fügt 20 µl 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung hinzu. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht werden die resultierenden Peptide durch Zugabe von 200 µl Extraktionslösung (50% Acetonitril, 5% Ameisensäure) herausgelöst und diese Lösung in der Speed Vac auf etwa 20 µl eingeeengt.

5.9.2 Analyse der Peptide

Ein Teil der Probe (ca. 2%) kann mittels MALDI-TOF analysiert und ein Peptidmuster des Proteins bestimmt und hiermit eine erste Durchsuchung von Datenbanken durchgeführt werden. Eine spezifischere Datenbank-Suche kann erst mit Sequenzinformationen vorgenommen werden. Die Sequenzierung der Peptide erfolgte mittels LC MS/MS. Die hohe Auflösung des Gerätes erlaubte es, aus einem Peptidgemisch einzelne Peptide zu isolieren und somit getrennt zu fragmentieren. Bei hoher Massengenauigkeit und guter Auflösung erhielt man hierbei Sequenzen mit einer durchschnittlichen Länge zwischen 5 und 15 Aminosäuren.

5.9.3 Vergleich mit Datenbanken

Zur Identifizierung eines Proteins können die erhaltenen Daten mit den Informationen aus verschiedenen Datenbanken verglichen werden. Zum einen kann eine Suche mit dem vorliegenden Peptidmuster durchgeführt werden. Konnte eine große Anzahl an Peptiden erhalten und deren Masse bestimmt werden, so kann alleine mit diesen experimentellen Daten eine Identifizierung erfolgen. Eine posttranslationale Modifizierung (z.B. Glykosylierung) erschwert bzw. verhindert jedoch eine Identifizierung des Proteins nach obigem Schema. Kann bei der Analyse einzelner Peptide zusätzlich Sequenzinformationen erhalten werden, so ist eine spezifischere Datenbanksuche möglich. Hierzu werden entweder die Aminosäuresequenzen alleine oder eine Kombination dieser Sequenzen mit den entsprechenden Peptidmassen verwendet. Diese Prozedur wird mit jedem einzelnen Peptid wiederholt und führt im günstigsten Fall zur Identifizierung des Proteins.

Zur Durchsuchung der Datenbanken wurden unter anderem die Programme „MS-Fit“ und „MS-Edman“ (<http://prosector.ucsf.edu/>) verwendet.

5.10 Protein-Charakterisierung

5.10.1 Analyse der Glykosylierung mittels enzymatischem Verdau

30 µl affinitätsgereinigtes Protein werden mittels Speed Vac eingengt, in einem für das Enzym geeigneten Puffer (s.u.) aufgenommen und nach Enzymzugabe für 12-18 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle werden jeweils 30 µl Protein ohne Zugabe von Enzym auf gleiche Weise behandelt. 25 µl Aliquots werden reduziert einer Gelelektrophorese unterzogen, anschließend geblottet und mit mAk 8F10 detektiert.

Die Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen: Chondroitinase (Seikagaku), Keratanase sowie Heparinase I/III (Sigma), N-Glykosidase F und Neuramidase (Boehringer).

Chondroitinase-Verdau	25 mU	50 mM Tris, 60 mM NaAc, 50 mM NaCl, pH 8,0
Keratanase-Verdau	85 mU	50 mM NaAc, pH 5,8
HeparinaseI/III-Verdau	je 1 mU	100 mM NaAc, 0,2 mM CaAc ₂ , pH 7,0
N-Glykosidase-F-Verdau	5U	TBS, pH 7,4
Neuramidase-Verdau	50U	50 mM NaAc, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl ₂ , pH 5,8

5.10.2 Chemische Entfernung aller O-Glykoside

30 µl affinitätsgereinigtes und salzfreies Protein wird mittels Speed Vac bis zur Trockne eingengt, mit 150 µl reinem Ammoniak versetzt und ü.N. bei 42°C inkubiert. Die Probe wird erneut bis zur Trockne eingengt, in 30 µl Wasser aufgenommen und zusammen mit einer unbehandelten Kontrolle unter reduzierenden Bedingungen einer Gelelektrophorese unterzogen, geblottet und mit mAk 8F10 detektiert.

VI Literaturverzeichnis

Adams J.C., Watt F.M. (1990). Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes $\alpha 5 \beta 1$ integrin loss from the cell surface. *Cell* 63:425-435.

Behrens J. (1999). Cadherins and catenin: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 18:15-30.

Ben-Yosef T., Francomano C.A. (1999). Characterization of the human talin gene: Genomic structure, chromosomal localization and expression pattern. *Genomics* 62:316-319.

Ben-Ze'ev A. (1999). The dual role of cytoskeletal anchor proteins in cell adhesion and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci.* 886:37-47.

Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C. (1988). Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:487-525.

Busch S.J., Sassone-Corsi P. (1990). Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genet.* 6:36-42.

Chiquet-Ehrisman R. (1991). Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:800-804.

Cleary E.G., Gibson M.A. (1983). Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. *International Review of Connective Tissue Research*, D.A. Hall and D.J. Jackson (ed.), 97-209, New York Academic Press.

Clark RAF. (1993). Mechanisms in cutaneous wound repair. *Dermatology in general medicine*, McGraw-Hill, New York, 478-486.

Fässler R., Sasaki T., Timpl R., Chu ML., Werner S. (1996) Differential regulation of fibulin, tenascin-C, and nidogen expression during wound healing of normal and glucocorticoid-treated mice. *Exp. Cell Res.* 222: 111-116.

Geiger B., Ayalon O. (1992). Cadherins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 307-332.

Gailit J., Clark R.A.F. (1994). Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:717-725.

Gentil B.J., Delphin C., Ouengue Mbele G., Deloulme J.C., Ferro M., Garin J., Baudier J. (2001). The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium and zinc-binding S100B protein. *J. Biol. Chem.*, in press.

Giltay R., Timpl R., Kostka G. (1999). Sequence, recombinant expression and tissue localisation of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4. *Matrix Biol.* 18:469-480.

Haase H., Podzuweit T., Lutsch G., Hohaus A., Kostka S., Lindschau C., Kott M., Kraft R., Morano I. (1999). Signaling from β -adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK. *FASEB J.* 15: 2161-2172.

Hashimoto T., Amagai M., Parry DA., Dixon TW., Tsukita S., Miki K., Sakai K., Inokuchi Y., Kudoh J. (1993). Desmoyokin, a 680 kDa keratinocyte plasma membrane-associated protein, is homologous to the protein encoded by human gene AHNAK. *J. Cell Sci.* 105: 275-286.

Hashimoto T., Gamou S., Shimizu N., Kitajima Y., Nishikawa T. (1995). Regulation of translocation of the desmoyokin/AHNAK protein to the plasma membrane in keratinocytes by protein kinase C. *Exp. Cell Res.* 217:258-266.

Hassel J.R., Kimura J.H. (1986), Proteoglycan core protein families. *Annu. Rev. Biochem.* 55:539-567.

Hieda Y., Tsukita S., Tsukita S. (1989). A new high molecular mass protein showing unique localization in desmosomal plaque. *J. Cell Biol.* 109:1511-1518.

Hotchin N.A., Kovach N.L., Watt F.M. (1993). Functional down-regulation of $\beta 1$ integrins is reversible but commitment to terminal differentiation is not. *J. Cell Sci.* 106:1131-1138.

Hynes R.O. (1989). *Fibronectins*. New York, Springer Verlag.

Ito K., Okamoto I., Araki N., Kawano Y., Fujiyama S., Tomita K., Mimori T., Saya H. (1999). Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-Cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell-contacts. *Oncogene* 18:7080-7090.

Juliano R.L., Haskill S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 120:577-585.

Kinch M.S., Kilpatrick K.E., Zhong C. (1998). Identification of tyrosine phosphorylated adhesion proteins in human cancer cells. *Hybridoma* 17:227-235.

Kitajima Y., Owaribe K., Nishizawa Y., Jukura Y., Yaoita H. (1992). Phorbol ester- and calcium-induced reorganization of 180-kDa bullous pemphigoid antigen on the ventral surface of cultured human keratinocytes as studied by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Exp. Cell Res.* 203:17-24.

Kivirikko S., McGrath J.A., Baudoin C., Aberdam D., Ciatti S., Dunnill M.G., McMillan J.R., Eady R.A., Ortonne J.P., Meneguzzi G., Uitto J., Christiano AM. (1995). A homozygous nonsense mutation in the $\alpha 3$ chain gene of laminin 5 (LAMA3) in lethal (Herlitz) junctional epiderolysis bullosa. *Hum. Mol. Genet.* 4:959-962.

Latijnhouwers M.A., Bergers M., van Bergen B.H., Spruijt K.I., Andriessen M.P., Schalkwijk J. (1996). Tenascin expression during wound healing in human skin. *J. Pathol.* 178:30-35.

Lavker R.M., Zheng P., Dong G. (1987). Aged skin: a study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 88:44-51.

Lunstrum G.P., Kuo H.J., Rosenbaum L.M., Keene D.R., Glanville R.W., Sakai L.Y., Burgeson R.E. (1987). Anchoring fibrils contain the carboxyl-terminal globular domain of type VII procollagen, but lack the amino-terminal globular domain. *J. Biol. Chem.* 262:13706-13712.

Maekawa S., Endo S., Sakai H (1989). Identification of an intermediate filament associated high molecular weight protein using monoclonal antibodies. *Cell. Struct. Funct.* 14:249-259.

Masunaga T., Shimizu H., Ishiko A., Fujiwara T., Hashimoto T., Nishikawa T. (1995). Desmoyokin/AHNAK protein localizes to the non-desmosomal keratinocyte cell surface of human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 104:941-945.

Miner J.H., Pattom B.L., Lentz S.I., Gilbert D.J., Snider W.D., Jenkins N.A., Copeland N.G., Sanes J.R. (1997). The laminin α chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of α 1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel α 3 isoform. *J. Cell Biol.* 137:685-701.

Nagao S., Kitajima Y., Nagata K., Inoue S., Yaoita H., Nozawa Y. (1989). Correlation between cell-cell contact formation and activation of protein kinase C in a human squamous cell carcinoma cell line. *J. Invest. Dermatol.* 92:175-178.

Nathan C., Sporn M. (1991). Cytokines in context. *J. Cell. Biol.* 113: 981-986.

Nie Z., Ning W., Amagai M., Hashimoto T. (2000). C-Terminus of desmoyokin/AHNAK protein is responsible for its translocation between the nucleus and cytoplasm. *J Invest. Dermatol.* 114:1044-1049.

Nievers M.G., Schaapveld R.Q., Sonnenberg A. (1999). Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol.* 18:5-17.

Nuckolls G.H., Romer L.H., Burridge K. (1992). Microinjection of antibodies against talin inhibits the spreading and migration of fibroblasts. *J. Cell Sci.* 102:753-762.

O'Leary R., Arrowsmith M., Wood E.J. (1997). The use of an in vitro wound healing model, the tri-layered skin equivalent, to study the effects of cytokines on the repopulation of the wound defect by fibroblasts and keratinocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 369.

Ozawa M., Baribault H., Kemler R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8:1711-1717.

Pulkkinen L., Christiano A.M., Gerecke D., Wagman D.W., Burgeson R.E., Pittelkow M.R., Uitto J. (1994a). A homozygous nonsense mutation in the $\beta 3$ chain gene of laminin 5 (LAMB3) in Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Genomics* 24:357-360.

Pulkkinen L., Christiano A.M., Airene T., Haakana H., Tryggvason K., Uitto J. (1994b). Mutations in the $\gamma 2$ chain gene (LAMC2) of kalinin/laminin 5 in the junctional forms of epidermolysis bullosa. *Nat. Gen.* 6:293-298.

Reed M.J., Poulakkainen P., Lane T.F., Dickerson D., Bornstein P., Sage E.H. (1993). Differential expression of SPARC and thrombospondin-1 in wound repair: immunolocalisation and in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 41:1467-1477.

Rees D.J., Ades S.E., Singer S.J., Hynes R.O. (1990). Sequence and domain structure of talin. *Nature* 347:685-689.

Rimm D.L., Koslov E.R., Kebriaei P., Cianci C.D, Morrow J.S. (1995). $\alpha 1(E)$ -catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8813-8817.

Rousselle P., Lunstrum G.P., Keene D.R., Burgeson R.E. (1991). Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. Cell Biol.* 114:567-576.

Ruoslathi E., Yamaguchi A. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64:867-869.

Ruoslathi E. (1988). Structure and biology of proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:229-255.

Sekiya F., Bae Y.S., Jhon D.Y., Hwang SC, Rhee SG (1999). AHNAK, a protein that binds and activates phospholipase C-gamma 1 in the presence of arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* 274: 13900-13907.

Sheu H.M., Kitajima Y., Yaoita H. (1989). Involvement of protein kinase C in translocation of desmoplakins from cytosol to plasma membrane during desmosome formation in human squamous cell carcinoma cells grown in low to normal calcium concentration. *Exp. Cell Res.* 185:176-190.

Shtivelman E., Cohen FE., Bishop JM. (1992). A human gene (AHNAK) encoding an unusually large protein with a 1.2-microns polyionic rod structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5472-5476.

Shtivelman E., Bishop JM. (1993). The human gene AHNAK encodes a large phosphoprotein located primarily in the nucleus. *J. Cell Biol.* 120:625-630.

Shulman M., Wilde C.D., Kohler G (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276:269-270.

Smyth N., Vatansever H.S., Murray P., Meyer M., Frie C., Paulsson M., Edgar D. (1999). Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of ectoderm differentiation. *J. Cell Biol.* 144:151-160.

Tunggal P., Smyth N., Paulsson P., Ott M.C. (2000). Laminins: structure and genetic regulation. *Micro. Res. Techn.* 51:214-227.

Wagener R., Kobbe B., Paulsson M. (1998). Matrilin-4, a new member of the matrilin family of extracellular matrix proteins. *FEBS Letters* 436:123-127.

Watt F.M., Hertle M.D. (1994). Keratinocyte integrins. The Keratinocyte Handbook. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Wilkins M.R., Williams K.L., Appel R.D., Hochstrasser D.F. (1997). Proteome Research: New Frontiers in functional genomics. Springer, Berlin.

Woods A., Couchman J.R. (1994). Syndecan-4 heperan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. Mol. Biol. Cell 5:183-192.

Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaar
H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay,
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin- Zusatz
H ₂ O bidest	doppelt destilliertes Wasser
HRP	Horseradish-Peroxidase
HT	Hypoxanthin, Thymidin-Zusatz
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
IgM	Immunglobulin M
kDa	Kilodalton
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minuten
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PBS	Phosphat gepufferte Saline
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-n-Dodecylphosphat
sek	Sekunden
TBS	Tris gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
ü.N.	über Nacht

Danke

Herrn Prof Dr. Mats Paulsson danke ich sehr für das Angebot und die Überlassung des interessanten Themas, für die umfassende persönliche Betreuung, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und seine wertvollen Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. D. Schomburg danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Lydia Sorokin für die exzellente Einführung in die Welt der monoklonalen Antikörper und die gute Betreuung während meines Aufenthaltes in Erlangen. Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die nette Aufnahme in ihren Kreis, sowie ihre Hilfsbereitschaft innerhalb und außerhalb des Labors.

Ich möchte allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für die freundschaftliche Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft herzlichst danken. Besonders den Gruppenleitern der Biochemie II danke ich für die vielen hilfreichen Diskussionen, konstruktive Kritik, unzählige Anregungen sowie für die Durchsicht des Manuskripts.

Ein Dank geht an Herrn Christian Frie für die Unterstützung und Einweisung bei der Präparation diverser Gewebe und bei der Immunhistologie.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Marcus Macht und bei Herrn Dr. Stefan Müller für die zahlreichen Versuche massenspektrometrischer Sequenzierungen am MALDI-TOF.

Ein großes Danke Schön gilt bei dieser Gelegenheit meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mir diese Arbeit ermöglichten und mich in jeder Weise unterstützt haben.

Und schließlich ein ganz herzliches Danke für Alles an meinen Freund Jan Melichar.

Ich versichere, daß die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken in Wortlaut und Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß die Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie daß ich eine solche Veröffentlichung vor Ablauf des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. M. Paulsson betreut worden.

Keine Teilpublikationen.

Köln, den 08.05.2001

Anja Geiger

Summary

A panel of monoclonal antibodies directed against components of a crude skin extract was established. More than 50 monoclonal antibodies were subcloned and the monoclonal antibodies analysed in immunofluorescence microscopy and western blotting. These monoclonal antibodies can be used to identify and characterise the corresponding antigens.

The 4B2-antigen was purified from bovine lung tissue using a combination of ion exchange chromatography and gelfiltration. Coomassie Blue stained SDS-PAGE bands were excised and digested with trypsin. The resulting peptides were subjected to sequence analysis by LC MS/MS. A search of databases led to the identification of the 4B2-antigen as AHNAK.

AHNAK is a extremely large intracellular protein with a molecular weight of 680 kDa. The monoclonal antibody was used to analyse the protein localisation. AHNAK was found to be an abundant and ubiquitous protein occurring in a variety of tissues (e.g. skin, brain, heart, testis). The strongest expression was observed in epithelial and endothelial tissues, but the protein is expressed in epithelial and non-epithelial cells. Immunofluorescence analysis showed a main localisation at the plasma membrane in epithelial cells (especially at sides of cell-cell contacts), whereas in non-epithelial cells a cytoplasmic staining was observed. Subcellular fractionation of these cells, however, showed that AHNAK is found mainly in the membrane fraction also in fibroblasts. When epithelial cells were kept in low calcium medium AHNAK was mainly found in the cytoplasm but translocated to the plasma membranes with an increase in extracellular calcium. Immunohistochemical analysis showed a colocalisation of AHNAK and β -catenin in epithelial cells cultured under different conditions, but no direct interaction was detected by co-immunoprecipitation.

The second antibody 8F10 detects several bands between 100 and 600 kDa in the SDS-PAGE analysis. For the bovine 8F10-antigen it could be shown that this heterogeneity is partly due to the attachment of keratan sulphate chains.

The protein was enriched from skin extracts using antibody-affinity- and ion-exchange-chromatography. Even with different modifications of those methods the amount of the 8F10-antigen were not sufficient for sequencing.

Some epithelial cells express and secrete the protein into the medium, but the formation of extracellular structures or a cell membrane binding was not observed.

Immunohistochemical analysis with the monoclonal antibody showed a localisation of the protein in skin and in the digestive tract. A strong expression could be detected around hair follicles and glands in the skin and also in several other glands (e.g. submandibular gland and tracheal glands).

Lebenslauf

Personalien:

- Name Anja Geiger
- Adresse 51503 Rösrath, Ahornweg 73
- Geburtsdatum 08.04.1972
- Geburtsort Köln
- Staatsangehörigkeit Deutsch

Schulbildung:

- 1976-1980 Besuch der Gemeinschaftsgrundschule in Rösrath
- 1980-1991 Besuch des Freiherr-von-Stein-Gymnasiums in Rösrath,
Abschluß: Abitur

Hochschulausbildung:

- 1991 Immatrikulation für das Studienfach Chemie (Diplom) an der Universität Dortmund
- 1993 Vordiplom
- 1996 mündliche Diplomprüfungen
- 1996 Diplomarbeit
„Analyse der Struktur-Funktions-Beziehungen des regulatorischen Proteins Rep78 von Adeno-assoziiertem Virus Typ2“
im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. S. Goody,
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund
- 1997-2001 Dissertation
„Identifizierung und Charakterisierung von neuen Proteinen der Haut mittels eines Pools monoklonaler Antikörper“
im Arbeitskreis von Prof. Dr. Mats Paulsson, Institut für Biochemie II, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln