

**Spleißvarianten der Glycinrezeptor- β -Untereinheit in
Zelllinien des Kleinzelligen Bronchialkarzinoms**

Institut für Biochemie
mit Lehrstuhl für Biochemie und Molekulare Medizin
Direktor: Prof. Dr. M. Wegner

Der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades Dr. med.
vorgelegt von

Katharina Lisa Erika Hell

aus
Erlangen

**Als Dissertation genehmigt von der
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

Vorsitzender des Promotionsorgans: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schüttler
Gutachter: Prof. Dr. Cord-Michael Becker
Gutachter: Prof. Dr. Ralf Enz

Tag der mündlichen Prüfung: **03. September 2015**

Gewidmet Dr. Georg Hell

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
1.1 Hintergrund und Ziele.....	1
1.2 Material und Methoden.....	1
1.3 Ergebnisse.....	1
1.4 Schlussfolgerungen.....	2
1. Summary.....	3
1.1 Background and aims.....	3
1.2 Material and methods.....	3
1.3 Results.....	3
1.4 Conclusion.....	4
2. Einleitung.....	5
2.1 Der Glycinrezeptor.....	5
2.1.1 Bedeutung und Funktion.....	5
2.1.2 Membrantopologie.....	6
2.1.3 Untereinheiten.....	7
2.1.4 Spleißvarianten.....	8
2.1.5 Ligandenbindung.....	8
2.2 Gephyrin.....	9
2.2.1 Aufbau.....	9
2.2.2 Aggregationsverhalten.....	10
2.3 Das Kleinzellige Bronchialkarzinom.....	11
2.3.1 Einteilung und Pathogenese.....	11
2.3.2 Therapie.....	12
2.3.3 Paraneoplasien.....	13
2.3.4 Molekular-biologische Veränderungen.....	13
3. Materialien und Geräte.....	14
3.1 Materialien.....	14
3.2 Geräte.....	23
4. Methoden.....	24
4.1 Molekularbiologische Methoden.....	24
4.1.1 Polymerasekettenreaktion.....	24
4.1.2 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	25
4.1.3 Klonierung von DNA in pET-Vektoren.....	26
4.1.4 Restriktionsverdau.....	26

4.1.5 Dephosphorylierung.....	27
4.1.6 Ligationsreaktion.....	27
4.1.7 Transformation.....	28
4.1.8 Minipräparation.....	29
4.1.9 Maxipräparation.....	30
4.1.10 Sequenzierung.....	30
4.1.11 Anlegen von Dauerkulturen.....	31
4.1.12 Topoklonierung.....	31
4.1.13 Isolierung von RNA aus Zellen.....	32
4.1.14 Konzentrationsbestimmung der RNA.....	32
4.1.15 RT-PCR.....	32
4.2 Proteinbiochemische Methoden.....	34
4.2.1 Proteinexpression in <i>E. coli</i>	34
4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
4.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	35
4.2.4 Coomassie-Färbung.....	36
4.2.5 Silbernitrat-Färbung.....	37
4.2.6 Westernblot.....	38
4.2.7 Immunfärbung.....	39
4.2.8 Proteinreinigung mittels Nickel-Nitrilotriacetat-Agarose (Ni-NTA-Agarose).....	39
4.2.9 Proteinreinigung mittels verschiedener Detergenzien.....	42
4.2.10 Proteinreinigung mit Resource Q-Säulen.....	43
4.2.11 Amidoblack-Färbung.....	44
4.2.12 Immunzytochemie.....	44
4.3 Zellkultur.....	45
4.3.1 Astrozytenkultur.....	45
4.3.2 Tumorzelllinien.....	46
4.3.3 Zellernte.....	46
4.3.4 Transfektion von HEK 293-Zellen.....	47
5. Ergebnisse.....	48
5.1 Aufreinigung von humanem Gephyrin.....	48
5.1.1 Klonierung von Gephyrin in pET-Vektoren.....	48
5.1.2 Sequenzierung der Gephyrin / pET-Vektor-Konstrukte.....	50
5.1.3 Aufreinigung von Gephyrin / pET 30a mittels Ni-NTA-Agarose.....	53
5.1.4 Auftrennung der Lysate mittels FPLC.....	56

5.1.5 Aufreinigung mittels verschiedener Detergenzien.....	58
5.1.6 Proteinreinigung mit ResourceQ-Säulen.....	60
5.2: Expression von Glycinrezeptor β -Transkripten in Zelllinien.....	66
5.2.1 Verwendete Zelllinien.....	66
5.2.2 Nachweis verschiedener mRNAs in den Zelllinien.....	69
5.2.3 Sequenzierung der unterschiedlichen PCR-Banden der GlyR β -Untereinheit..	74
5.3 Charakterisierung der Untereinheit $\beta\Delta 8$	79
5.3.1 Klonierung von $\beta\Delta 8$ in Sp-myc / pRK7.....	79
5.3.2 Expressionsstudien an $\beta\Delta 8$	82
6. Diskussion und Ausblick.....	86
6.1 Diskussion.....	86
6.2 Ausblick.....	91
7. Literaturverzeichnis.....	92
8. Abkürzungsverzeichnis.....	102
9. Anhang.....	104
10. Danksagung.....	106
11. Erklärung.....	107
12. Lebenslauf.....	108

1. Zusammenfassung

1.1 Hintergrund und Ziele

Der Glycinrezeptor spielt im Zentralen Nervensystem eine essentielle Rolle bei der Vermittlung inhibitorischer Übertragung und damit bei der Hemmung neuronaler Aktivität. Der funktionale Rezeptor setzt sich aus insgesamt fünf α - und β -Untereinheiten zusammen und bindet postsynaptisch an das Protein Gephyrin. Die Untereinheiten des Rezeptors existieren in verschiedenen Spleißvarianten. Neben dem Vorliegen des klassischen Rezeptors im ZNS konnte u.a. die Spleißvariante $\beta\Delta 8$ auf RNA-Ebene in Zelllinien des Kleinzelligen Bronchialkarzinoms nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Gephyrin-Konstrukte für weiterführende Fishing-Experimente geschaffen sowie die Spleißvariante $\beta\Delta 8$ biochemisch charakterisiert.

1.2 Material und Methoden

Für weiterführende Experimente mit Gephyrin war das Vorliegen des Proteins in gereinigter Form nötig. Dafür wurde ein 6 x His-Tag an Gephyrin kloniert und das erhaltene Konstrukt über hintereinander geschaltete Reinigungsschritte säulenchromatographischer Methoden in Batch- und Durchflussverfahren aufgereinigt. Ein analoges Vorgehen hatte sich bereits in vorausgehenden Arbeiten bewährt. Parallel dazu wurden Tumorzelllinien aus Kleinzelligen Bronchialkarzinomen kultiviert und deren RNA auf das Vorliegen von Glycinrezeptor-Sequenzen untersucht. Die u.a. vorliegende Spleißvariante $\beta\Delta 8$ wurde in HEK 293-Zellen transfiziert und mittels Immunfixation weitergehend charakterisiert.

1.3 Ergebnisse

Das Konstrukt pET 30 a / Gephyrin wurde in kompetenten *E. coli*-Stämmen exprimiert und das erhaltene Protein in einem ersten Schritt über eine Ni-NTA-Agarose-Säule gereinigt. Dabei lag eine gute Ausbeute im Vergleich zur eingesetzten Menge vor, aber auch eine Verunreinigung durch bakterielle Proteine. Um einen höheren Reinheitsgrad zu erzielen wurden als weitere Verfahren Detergenzien und Resource Q-Säulen angewendet.

Während der Einsatz von Detergenzien zu keiner weiteren Verbesserung der Reinheit führte, konnte diese in geringem Maß durch die zweite Säulenreinigung erreicht werden. Sie war jedoch mit erheblichem Verlust und Degeneration des Proteins verbunden.

Die aus den kultivierten Tumorzelllinien erhaltene RNA wurde auf das Vorliegen von Transkripten der Glycinrezeptor- β -Untereinheit untersucht. Neben dem zu erwartenden Transkript fand sich eine Transkriptvariante mit geringerer Größe. In der Sequenzierung zeigte sich, dass zusätzlich zur normalen Variante der β -Untereinheit die Spleißvariante $\beta\Delta 8$ vorlag, die über ein Stopp-Codon in der Transmembran-Domäne 2 einen vorzeitigen Kettenabbruch aufweist. Zur genaueren biochemischen Klassifizierung wurde die cDNA der Untereinheit $\beta\Delta 8$ mit einem myc-Tag versehen und in HEK293-Zellen transfiziert. Über Immunfixation konnte gezeigt werden, dass $\beta\Delta 8$ *in vitro* exprimiert werden kann und als Protein in der Zellmembran vorliegt.

1.4 Schlussfolgerungen

Zur Untersuchung der Funktion der β -Untereinheit des Glycinrezeptors in Kleinzelligen Bronchialkarzinomen über Fishing-Experimente ist ein ausreichend gereinigtes Gephyrin-Konstrukt nötig, das über ein mindestens zweischrittiges Verfahren erhalten werden kann. Neben der Volllängenform der Untereinheit muss dabei auch die Spleißvariante $\beta\Delta 8$ berücksichtigt werden. Da diese Untereinheit nicht mehr über die Gephyrinbindestelle verfügt, ist dafür eine andere Vorgehensweise erforderlich.

1. Summary

1.1 Background and aims

Glycine receptors play an essential role in the central nervous system as mediator of inhibitory transmission and in this way in inhibition of neuronal activity. The functional receptor consists of five subunits α and β and binds to the postsynaptic protein gephyrin. Subunits exist in different splice variants. Beside the classical receptor located in the central nervous system, the subunit $\beta\Delta 8$ could be found in cell lines of small cell lung cancer. In the following thesis, constructs of gephyrin were created for further fishing experiments and the $\beta\Delta 8$ subunit was characterized biochemically.

1.2 Material and methods

For experiments concerning interactions of glycine receptors and gephyrin the existence of a purified version of gephyrin is necessary to minimize background binding. Therefore, a 6 x His tag was cloned into gephyrin and the construct was purified by sequential steps of batch and discharge flow-through chromatographic methods. A similar procedure had successfully been used in recent works. Simultaneously tumor cells from cell lines of small cell lung cancer were cultivated and their RNA was examined for the existence of sequences of glycine receptors. Amongst others the splice variant $\beta\Delta 8$ was found and transfected into HEK 293 cells. It was further characterized by cytochemical experiments for subcellular localization.

1.3 Results

pET 30 a / gephyrin was expressed in competent *E. coli* bacteria and, in a first step, the resulting protein was purified by a column of Ni-NTA agarose. In comparison to the utilised amount of protein the procedure showed a good efficiency but also pollution by bacterial proteins. Therefore, further techniques as purification by detergents and columns of Q-sepharose were applied to improve the level of purity. While the strategies using detergents did not reduce the pollution rate, it could be reached marginally by the second column. However, this method was associated with a considerable loss and degeneration of gephyrin.

The RNA obtained from the cultivated tumor cell lines was screened for transcripts of glycine receptor β subunits. Besides the expected β subunit transcript an alternative transcript was found of smaller size. Sequencing of these subunits proofed it to be the splice variant $\beta\Delta 8$, which results in a stop codon in transmembrane domain 2 leading to an abnormal chain termination. To analyse the subunit its cDNA was marked with a myc-tag and transfected into HEK293 cells. It was possible to show by immunofixation that $\beta\Delta 8$ can be expressed *in vitro* and is located in the cell membrane as a protein.

1.4 Conclusion

To examine the function of β subunits of glycine receptors in small cell lung cancer by fishing experiments, it is necessary to dispose a sufficiently purified construct of gephyrin. This can be obtained by at least a two-stage process of column purification. Because of $\beta\Delta 8$ being a truncated subunit lacking the binding site of gephyrin a different strategy is essential for this variant.

2. Einleitung

2.1 Der Glycinrezeptor

2.1.1 Bedeutung und Funktion

Schnelle inhibitorische Übertragung wird im ZNS durch Chloridströme über GABA_{A/C}- und Glycinrezeptoren vermittelt. Der Glycinrezeptor kommt bei Menschen und Nagern hauptsächlich an den Postsynapsen in Rückenmark und Hirnstamm vor [51], wo er u.a. die Renshaw-Hemmung an inhibitorischen Interneuronen [4] und an α -Motoneuronen [8] vermittelt. Extraneuronal wurde er in den Kupffer-Sternzellen der Leber [36] entdeckt, in Spermien [76] und in Form von Transkripten einzelner Untereinheiten in Gliazellen [44]. Eine Aktivierung des Rezeptors führt zu einem Einstrom von Chlorid-Ionen und darüber zu einer Hypopolarisation der synaptischen Membran. Dieses negativere Potential bewirkt eine Verminderung der neuronalen Aktionspotentiale und besitzt somit eine hemmende Wirkung.

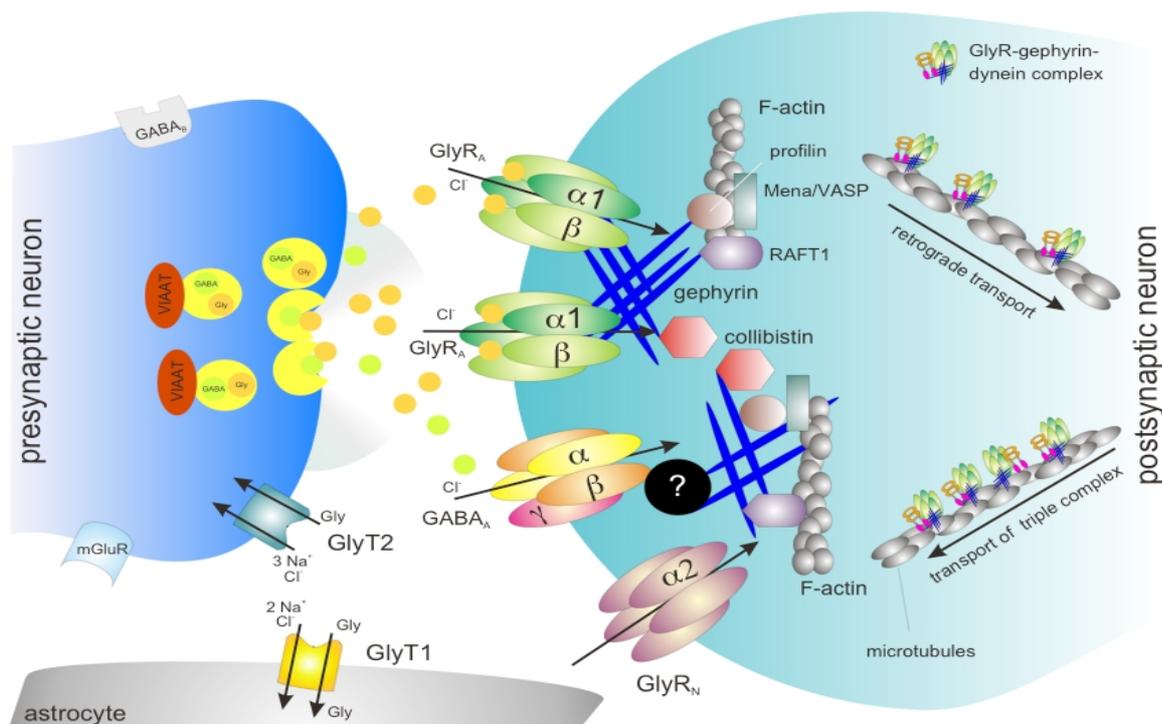


Abb. 2.1: Übersicht über die inhibitorische Synapse. An der Postsynapse sind die adulte ($\alpha 1\beta$) und die neonatale ($\alpha 2$) Form des Glycinrezeptors sowie der GABA_A-Rezeptor eingezeichnet. Die Wiederaufnahme des Glycins aus dem synaptischen Spalt erfolgt über die Glycintransporter GlyT1 und GlyT2 zurück in die Präsynapse oder in Astrozyten. [94]

2.1.2 Membrantopologie

Der Glycinrezeptor gehört gemeinsam mit dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor, dem GABA_A- und GABA_C-Rezeptor und dem 5HT₃-Rezeptor zur Superfamilie der Cys-Loop-Rezeptoren [5, 57]. Diese Familie zeichnet sich durch ihre gemeinsame Membrantopologie aus. Der lange N-Terminus enthält die namensgebende Cystein-Brücke zwischen den beiden Cystein-Aminosäureresten C138 und C152 und liegt wie der kurze C-Terminus extrazellulär. Die vier α -helikalen Transmembrandomänen (TMs) werden durch dazwischenliegende Schleifen (Loops) verbunden. Das Innere des Ionenkanals wird von der Transmembrandomäne 2 gebildet, die sich auch in Zusammenhang mit dem sogenannten „Gate“ befindet [65, 34]. Darunter versteht man die Region, die die Öffnungszustände des Kanals reguliert, also über offen, geschlossen und inaktivierbar entscheidet. Der N-Terminus ist für die Assemblierung der einzelnen Rezeptor-Untereinheiten und die Ligandenbindung wichtig. Die Bindestelle für die Ankerproteine befindet sich in der intrazellulären TM3-4 – Loop der β -Untereinheit des Rezeptor-Komplexes.

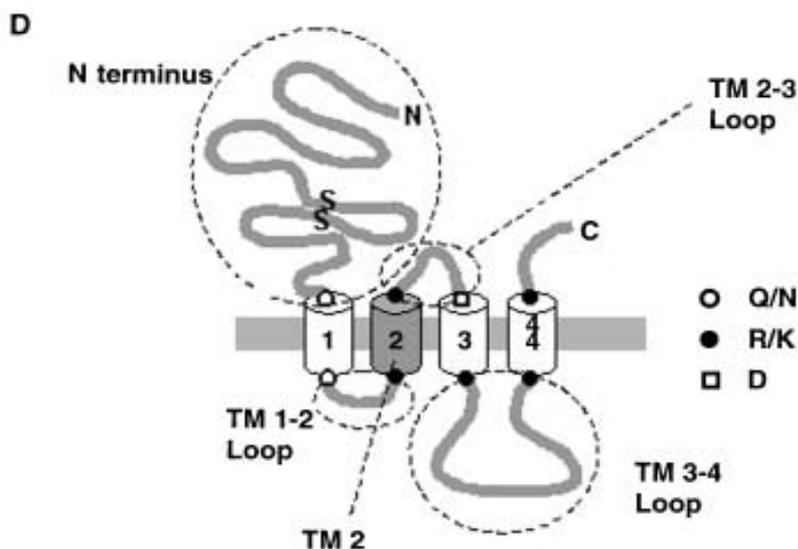


Abb. 2.2: Skizze der Membrantopologie einer einzelnen Glycinrezeptor-Untereinheit. Im N-Terminus ist die Cystein-Brücke eingezeichnet. Während die Transmembrandomänen als α -Helices vorliegen, überwiegen N-terminal β -Faltblätter. Abbildung übernommen aus [10]

2.1.3 Untereinheiten

Adulte Glycinrezeptoren setzen sich aus der 48 kDa großen α - und der 58 kDa großen β -Untereinheit zusammen und bestehen in ihrer adulten humanen Form aus zwei α - und drei β -Untereinheiten [30]. Homomere Pentamere aus α -Rezeptoren bilden funktionelle Kanäle, während reine β -Komplexe nicht funktional sind. Im menschlichen Organismus sind drei verschiedene Gene für die α -Untereinheit (*GLRA1-3*) bekannt, aber nur ein Gen für die β -Untereinheit (*GLRB*).

Einen Überblick über die verschiedenen Rezeptoren und deren Vorkommen gibt die folgende Tabelle.

Rezeptor	Vorkommen	Quelle
Homomere $\alpha 2$ -Rezeptor	Embryonales Nervensystem	[3]
Homomere $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -Rezeptoren	Vermutlich <i>in vivo</i> nicht exprimiert	[58]
$\alpha 1\beta$ -Rezeptoren	Rückenmark, Hirnstamm und Hirnnervenkerne, Retina	[60, 75, 28]
$\alpha 2\beta$ -Rezeptoren	Amakrine Zellen der Retina	[93]
$\alpha 3\beta$ -Rezeptoren	Hippocampus	[62]
	Retina	[33]
	Nozizeptive Neurone im Hinterhorn	[32]

Abb. 2.3: Tabellarische Übersicht über die verschiedenen Glycinrezeptorpolymere. Tabelle aus [58]

Die neonatale Form des Rezeptors (GlyR_N) besteht aus fünf $\alpha 2$ -Untereinheiten, die im Mausmodell postnatal im Zeitraum zwischen P8 und P21 durch die adulte Form des Rezeptors ersetzt wird [3]. $\alpha 2$ -Knockout-Mäuse zeigen trotzdem keinen auffälligen Phänotyp, obwohl sie eine reduzierte Anzahl an retinalen Stäbchen aufweisen und die Neuronen nicht mehr auf Glycin reagieren [99, 100]. Für das Vorliegen homomere $\alpha 1$ - oder $\alpha 3$ -Rezeptoren gibt es bisher keine Beweise. Eventuell existieren sie an der Präsynapse und sind an der Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt [91].

Im adulten Nervensystem sind überwiegend $\alpha 1\beta$ -Heteromere vorhanden, die die inhibitorischen Potentiale in Hirnstamm, Rückenmark und Retina vermitteln. $\alpha 2\beta$ -Rezeptoren fanden sich in amakrinen Zellen mit großen rezeptiven Feldern [93]. $\alpha 3\beta$ -

Komplexe wurden in verschiedenen Hirnregionen, u.a. dem Hippocampus [62], und in nozizeptiven Neuronen der Laminae I und II des Rückenmarks entdeckt. Sie konnten sowohl in der Retina [33] als auch im Corti-Organ des Innenohrs [18] nachgewiesen werden.

β -Untereinheiten liegen bei Mäusen erstmals um den 14. Embryonaltag vor [29] und sind im ZNS weit verbreitet. Sie binden an ihrer TM3-4-Loop das Ankerprotein Gephyrin und sind somit für das Clustering der Glycinrezeptoren an der Postsynapse unerlässlich. Daraus ergibt sich, dass sich dort vor allem $\alpha\beta$ -Heteromere befinden. Die β -Untereinheit spielt eine wichtige Rolle für den intrazellulären Transport des Rezeptors und ändert die Kanalleitfähigkeiten im Vergleich zu reinen α -Homomeren [7, 72]. Aus der Stöchiometrie von $2\alpha:3\beta$ ergibt sich, dass mindestens einmal zwei β -Untereinheiten nebeneinander liegen müssen (β - β -Interface). Ob und was das für die Funktion des Rezeptors bedeutet, ist noch unklar.

2.1.4 Spleißvarianten

Alternatives Spleißen konnte für alle Untereinheiten nachgewiesen werden. Während die Spleißvarianten von $\alpha1$ und $\alpha2$ keine funktionellen Unterschiede aufweisen [59, 50], bewirkt das Spleiß-Insert von $\alpha3$ Veränderungen der Rezeptor-Desensibilisierung [70]. Für die murine β -Untereinheit wurde eine Spleißvariante gefunden, der das Exon 7 fehlt ($\beta\Delta7$) und darüber eine Änderung der Topologie mit einem Verlust der TM1 und TM2 bewirkt. Sie kommt nicht nur im Cortex des ZNS vor, sondern auch in extraneuronalen Geweben wie Herz und Leber. $\beta\Delta7$ -Untereinheiten können Rezeptor-Komplexe mit $\alpha1$ und Gephyrin bilden und eventuell noch bisher unbekannte zusätzliche Funktionen besitzen [71]. Außerdem sind verschiedene aberrante Spleißvarianten bekannt, z.B. bei der Mausmutante *spastic* [42, 66]. Ähnliche Spleißmutationen wurden auch in Patienten identifiziert, die an Hyperekplexie leiden [73].

2.1.5 Ligandenbindung

Die Ligandenbindestelle für Glycin wird von zwei benachbarten Untereinheiten gebildet [12], [92] und entsteht an der Kontaktstelle von α - und β - Untereinheiten [30]. Daneben löst auch die Bindung von Taurin und β -Alanin eine Öffnung des Kanals aus [52], zudem

wirken β -Aminosäuren als partielle Agonisten [77]. Strychnin ist ein selektiver Glycinrezeptor-Antagonist, ebenso wie Derivate der Quinolin-Säure [78]. Das bekannteste Kanal-blockierende Agens ist das Picrotoxinin, das besonders auf $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -Homomere wirkt [72].

Zn^{2+} -Ionen haben einen modulatorischen Effekt auf den Rezeptor [35]. Außerdem scheint Glutamat über eine allosterische Bindung die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals zu erhöhen und damit eine Potenzierung des Chloridstroms auszulösen [54].

2.2 Gephyrin

2.2.1 Aufbau

Gephyrin ist das intrazelluläre Ankerprotein von Glycin- und $GABA_A$ -Rezeptoren an der postsynaptischen Membran [56, 45]. Es kommt auch als Enzym in der Molybdän-Kofaktor-Synthese (Moco) bei Bakterien vor [86] und hat eine hoch-konservierte Struktur [20]. Ob diese beiden Funktionen miteinander in Zusammenhang stehen, ist bisher noch unbekannt [22].

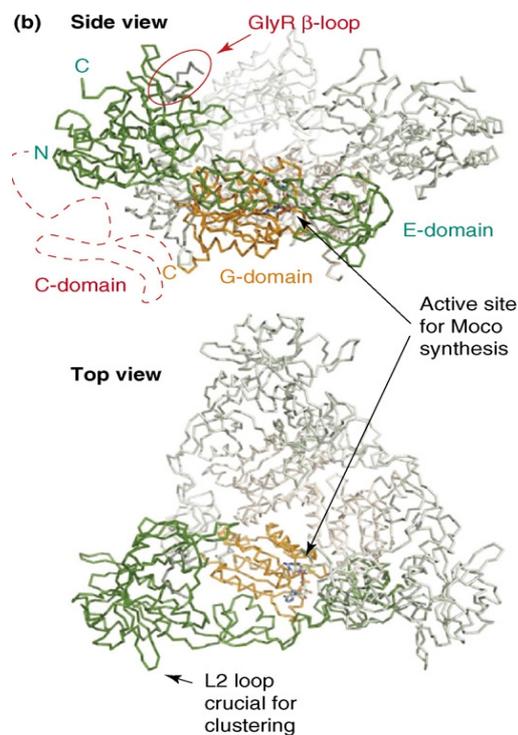


Abb. 2.4: Hexagonale Struktur eines Gephyrin-Trimers. Zusätzlich sind die einzelnen Domänen und die Elemente für die Moco-Synthese eingetragen. Abbildung aus [22].

Gephyrin ist aus drei Domänen aufgebaut (Abbildung 2.4). Die N-terminale G-Domäne ist 20 kDa groß und wird über die dazwischenliegende zentrale C-Domäne (18-21 kDa) mit der C-terminalen 43 kDa großen E-Domäne verbunden. Die G- und E-Domäne sind nach den Moco-synthetisierenden bakteriellen Enzymen MogA und MoeA (vgl. [81]) benannt, die eine ähnliche Sequenz besitzen. Das Gephyrin-Gen weist diverse Exons und Spleißstellen auf, so dass über alternatives Spleißen mehrere Isoformen existieren. Die C-Domäne scheint eine wichtige Rolle bei der Protein-Protein-Interaktion und der Bindung an intrazelluläre Proteine wie Pin1, die Dynein-Leichtketten 1 und 2 und Collybistin zu spielen [22]. Die isolierte G-Domäne ist in der Lage Trimere zu bilden. Die E-Domäne hat eine hochaffine Bindestelle für die TM3-4 – Loop der β -Untereinheit des Glycinrezeptors und bildet isoliert Dimere aus [98].

2.2.2 Aggregationsverhalten

Gephyrin aggregiert selbst (Auto-Aggregation) und erzeugt intrazelluläre Oligomere. Es benötigt dazu keine spezielle PDZ-Domäne, die sonst bei vielen netzbildenden Proteinen gefunden wird [47]. Aus dem Einzelverhalten der isolierten Domänen leitet sich das Modell der „Salatkopf-Struktur“ (lattice structure) ab, bei dem jeweils drei Gephyrinmoleküle ein sechseckiges Trimer bilden [84, 74].

Für die Lokalisation von Gephyrin an der Postsynapse scheinen zusätzliche Interaktionen von Bedeutung zu sein. So ist bekannt, dass bestimmte GABA_A-Rezeptoruntereinheiten nötig sind, um postsynaptische Gephyrin-Cluster zu bilden [48, 87] und die Aktivierung von Glycinrezeptoren über den Einstrom von Ca²⁺-Ionen die Bildung von Rezeptor-Clustern fördert [46]. Das Ausbilden der Cluster besteht aus zwei Einzelschritten: Im ersten Schritt bilden sich unabhängig von Gephyrin intrazelluläre Rezeptor-Cluster, die in einem zweiten Schritt über Gephyrin an der Postsynapse verankert werden [61]. Von Collybistin ist bekannt, dass es die Oligomerisierung von Gephyrin vermittelt [43] und das Gephyrin an die Zellmembran transloziert [32].

2.3 Das Kleinzellige Bronchialkarzinom

2.3.1 Einteilung und Pathogenese

Bronchialkarzinome stellen sowohl bei Männern als auch bei Frauen den zweithäufigsten Tumor dar und verursachen die höchste Mortalität unter den Tumoren. Sie lassen sich in das Kleinzellige Bronchialkarzinom (small-cell lung cancer, SCLC), das ca. 15% der Fälle ausmacht, und nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (85%) gliedern [9]. Nach der WHO-Klassifikation ist ein Kleinzelliges Bronchialkarzinom ein maligner epithelialer Tumor der Bronchien, dessen Zellen klein und unscharf begrenzt sind und sich durch einen schmalen Zytoplasmasaum, eine feine Chromatinstruktur und das Fehlen prominenter Nukleolen auszeichnen [90]. Während das Kleinzellige Bronchialkarzinom eine eigene histologische Entität darstellt, lassen sich nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome weiter in Adenokarzinome, großzellige Karzinome, Plattenepithelkarzinome, nicht näher spezifizierte nicht-kleinzellige Karzinome und andere Untergruppen unterteilen [67]. Pathogenetisch spielt häufig Zigarettenrauch eine zentrale Rolle. Man nimmt an, dass Tabak für ca. 85%-90% der SCLC-Fälle verantwortlich ist [14, 40]. Das Risiko zu erkranken steigt dabei kontinuierlich mit der Schadstoff-Exposition an [17]. Diesen Zusammenhang belegen auch Daten, nach denen der Rückgang des Zigarettenkonsums mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit assoziiert ist, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken [97]. Darüber hinaus ist auch Passivrauchen mit einer erhöhten Bronchialkarzinom-Inzidenz assoziiert [31].

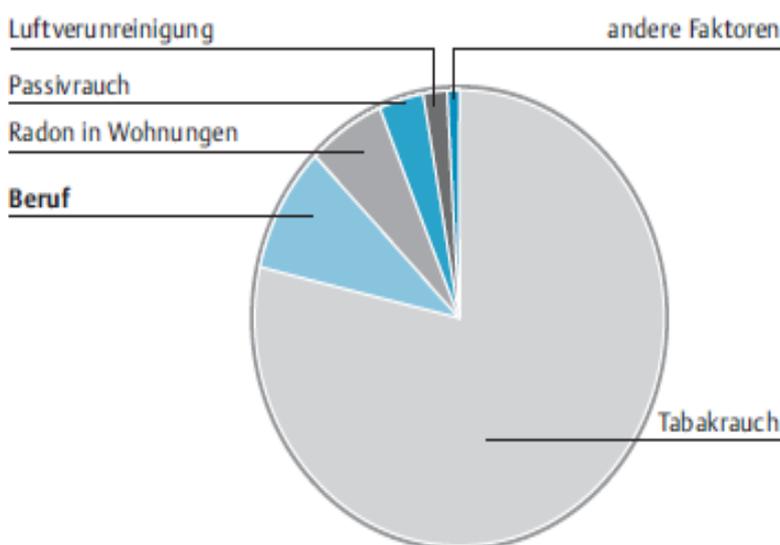


Abb. 2.5: Bedeutung der einzelnen Risikofaktoren für die Entstehung aller Bronchialkarzinome [26].

Neben Tabakrauch sind weitere Umweltfaktoren von Bedeutung, wie Asbest, Arsen, verschiedene Metalle (z.B. Cadmium, Chrom, Nickel), Acrylnitril und andere. Besonders interessant dabei sind ionisierende Strahlung (z.B. verursacht durch Radon-222) und Chlormethylether, die vor allem die Wahrscheinlichkeit für Kleinzellige Bronchialkarzinome erhöhen [26, 95]. Eine genetische Prädisposition wird überwiegend bei Patienten unter 60 Jahren als ursächlich angesehen und ihr Einfluss wird mit steigendem Erkrankungsalter geringer [83].

Wegen der initial unspezifischen Symptome, wie beispielsweise Husten, Dyspnoe, Brustschmerzen oder Hämoptysen, werden Kleinzellige Bronchialkarzinome häufig erst spät diagnostiziert [85]. Der rasche Krankheitsverlauf resultiert unter anderem aus den geringen Tumorverdoppelungszeiten zwischen 10 und 50 Tagen. Zusätzlich wächst der Tumor frühzeitig lokal aggressiv in benachbarte Strukturen wie Vena cava sup., Ösophagus oder Nerven ein und bildet Lymphknotenmetastasen [38]. Fernmetastasen treten typischer Weise in Leber, Skelett, Nebennieren und Hirn auf [39].

Die Stadieneinteilung für Kleinzellige Bronchialkarzinome erfolgt in „limited“ und „extensive disease“. Unter „limited disease“ versteht man eine Tumorerkrankung, die auf einen Hemithorax begrenzt ist, mit oder ohne Befall der regionalen Lymphknoten (d.h. mediastinale, ipsilaterale supraklavikuläre sowie ipsi- oder kontralaterale hiläre Lymphknoten) und mit oder ohne Pleuraerguss. Dieses Stadium liegt bei ca. 30% der Erkrankten vor. Eine „extensive disease“ ist jeder Tumor, der über eine „limited disease“ hinausgeht [64]. Daneben setzt sich mehr und mehr die Einteilung nach dem TNM-System durch.

2.3.2 Therapie

Das Therapiekonzept beruht auf einer Kombinationschemotherapie, die durch Bestrahlung oder wenn möglich durch Operation ergänzt werden kann [55, 27, 27]. Kleinzellige Bronchialkarzinome sind im Allgemeinen gut chemosensibel, rezidivieren aber häufig. Als Chemotherapie der 1. Wahl hat sich die Kombination aus Cisplatin und Etoposid etabliert [15, 68]. Die mittlere Überlebenszeit über alle Stadien liegt bei 10-13 Monaten und hat sich in den letzten zwanzig Jahren nur wenig verbessert [37].

2.3.3 Paraneoplasien

Charakteristisch für Kleinzellige Bronchialkarzinome ist das Auftreten paraneoplastischer Syndrome. Darunter versteht man Symptomkomplexe, die nicht auf das direkte lokale oder infiltrative Wachstum des Tumors zurückzuführen sind, sondern durch Hormon- oder Antikörperproduktion ausgelöst werden [23]. Typisch ist beispielsweise das Schwartz-Bartter-Syndrom (Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion), bei dem eine vermehrte ADH- oder ANP-Sekretion vorliegt, die zu Hyponatriämien führt [82, 19]. Beim Cushing-Syndrom, das durch eine ektope ACTH-Produktion gekennzeichnet ist, handelt es sich um die häufigste Paraneoplasie bei Kleinzelligen Bronchialkarzinomen [88]. Im Gegensatz dazu löst die Antikörperproduktion eines Kleinzelligen Bronchialkarzinoms ca. die Hälfte aller Fälle des Lambert-Eaton-Syndroms [24] und einen kleinen Anteil der Dermatomyositiden aus [53]. Symptome, die durch eine Paraneoplasie verursacht werden, können noch vor den pulmonalen Symptomen auftreten und zur Diagnose führen.

2.3.4 Molekular-biologische Veränderungen

Das Kleinzellige Bronchialkarzinom zeichnet sich durch einige charakteristische molekulare-biologische Veränderungen aus, die v.a. Tumorsuppressorgene und Protoonkogene betreffen. In fast allen Kleinzelligen Bronchialkarzinomen findet sich die Deletion 3p(14-23) - einer Region, die das Tumorsuppressorgen FHIT beinhaltet [21]. Ähnlich häufig ist der Verlust des Retinoblastomgens RB1. Verluste von Tumorsuppressorgenen verhindern die Apoptose der Tumorzellen und begünstigen ein invasives Wachstum.

Beim Kleinzelligen Bronchialkarzinom handelt es sich um einen Tumor, der Ähnlichkeiten mit neuroendokrinen Zellen aufweist und vermutlich von den APUD-Zellen ausgeht [63]. Neuroendokrine Marker wie Chromogranin, Synaptophysin A und CD56 können daher für die immunhistochemische Diagnostik verwendet werden [40]. Weniger als 10% aller Kleinzelligen Bronchialkarzinome sind vollständig negativ für alle diese Marker. Als Tumormarker wird u.a. die Neuronenspezifische E nolase (NSE) eingesetzt [13].

In SCLC-Zelllinien fanden sich auf mRNA-Ebene Abschriften von Glycinrezeptoren, die in Zusammenhang mit dem neuroendokrinen Ursprung des Kleinzelligen Bronchialkarzinoms stehen könnten. Normalerweise verhindert die Bindung des „neuron-restrictive silencer factor“ (NRSF/repressor element-1 binding transcription factor, REST) an das „neuron-

restrictive silencer element“ (NRSE) die Transkription neuronaler Gene in extra-neuronalen Geweben [79]. NRSF/REST selbst verhält sich wie ein klassisches Tumorsuppressorgen und der Verlust der NRSF/REST-Expression begünstigt die maligne Progression des Tumors [49]. Ein Konsensus-Motiv für NRSE befindet sich auch vor *GLRA1* und *GLRA3*, nicht aber vor *GLRB*, was die weite Verbreitung von GlyR β -Transkripten erklärt. In zwei Zelllinien (H82 und H69), in denen NRSF/REST nicht funktional war, wurde *GLRA1* transkribiert. Die genauere Analyse der GlyR β -Transkripte zeigte das Vorliegen von GlyR $\beta\Delta 8$ – einer Spleißvariante, der das Exon 8 fehlt [69]. Die Bedeutung dieser Glycinrezeptor-Transkripte ist unklar, eventuell könnten sie in Zusammenhang mit der Ausbildung eines paraneoplastischen Syndroms stehen.

Cell line/ tissue	Type	NRSF	2- $\Delta\Delta$ ct	sNRSF	L1	SYP	GLRB	SYN	NCAM	NG2	GLRA1
H128	SCLC	+++	2,09	+	-	+	-	-/+	-	+	-
Lung (normal)	Lung RNA	+++	1,00	-	-	++	-	-/+	+	-	-
H446	SCLC	++	1,65	+++	+	++	++	+	++	-/+	-
HCC44	NSCLC	++	5,17	-/+	+	-/+	-	-	-	-	-
PIDF	Lung Cell Line	++	1,97	-	+	-	+++	-	-/+	-	-
OH3	SCLC	+	0,17	+	+	+++	++	+++	++	+++	-
CRL2195	SCLC	-/+	0,02	++	+	++	++	++	+++	+	-
H82	SCLC	-/+	0,05	++	++	+++	++	++	+	++	+
SW2	SCLC	-/+	0,06	+	++	+++	+	+++	+++	-/+	-
OH1	SCLC	-	0,01	++	+	++	+	+++	+++	++	-
H209	SCLC	-	0,02	+	++	++	+	+++	+++	++	-
H146	SCLC	-	0,01	-/+	+	++	+	+++	+++	++	-
H69	SCLC	-	0,01	-	++	++	+++	++	+++	+++	+++

Abb. 2.6: Tabelle über der Vorliegen neuronaler Gene in verschiedenen Tumorzelllinien [49].

3. Materialien und Geräte

3.1 Materialien

Chemikalien

Soweit nicht anders bezeichnet, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Bio-Rad (München), GE (Freiburg), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostic (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Verbrauchsmaterialien

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
CHAPS	Sigma Aldrich, München
Coloured Protein Marker	New England Biolabs, Frankfurt
DNA-Größenstandards - pRK7, verdaut mit <i>Hinf</i> I - TriDye 1kb DNA-Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
dNTPs	Stratagen Europe, Amsterdam
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Glaspipetten	WPI, Berlin
Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
n-Octyl β -D-Maltosid	Sigma Aldrich, München
NiNTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nitrocellulosemembranen	Schleicher & Schüll, Dassel
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg Invitrogen, Karlsruhe
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden TPP, Trasadingen, Schweiz
Prestained Protein Marker	New England Biolabs, Frankfurt
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail Complete, EDTA free	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Rinderserumalbumin, Fraktion V (BSA)	AppliChem, Heidelberg
SDOCS	Sigma Aldrich, München
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Sigma Aldrich, München
Undecyl β -D-Maltosid	Sigma Aldrich, München

Enzyme

Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt Promega, Mannheim
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
T4-Ligase	Promega, Mannheim
Alkalische Phosphatase	Antarctic Phosphatase, New England Biolabs, Frankfurt
RNAse A	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin	Promega, Mannheim
Reverse Transkriptase	New England Biolabs, Frankfurt
GoTaq Flexi DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

Primer

Primer wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Nummer	Name	Sequenz	Verwendung
# 20	mmb-S6-632	TTGGATATACAACCG ATGATTT	sense Beta-Primer für Sequenzierung
# 49	mmb-A9-1198	TTGCATCTGGTCTCA CCAAC	anti-sense Beta-Primer
# 127	hsbact-S3-391	TGAGACCTTCAACAC CCCAG	beta-Aktin-Primer
# 128	hsbact-A5-1046	CATCTGCTGGAAGGT GGACA	beta-Aktin-Primer
# 153	hsb-S5-550	GTTATCTATTACTCTT TCATGCC	sense Beta-Primer
# 274	rngeph-S-1203	CAAGGTGGCTAGAA GACATC	sense-Primer Gephyrin

# 275	rngeph-A-1753	ACCACTGGAACTTA TTAACTTC	anti-sense Primer Gephyrin
# 384	pRK-Cis3'	AACCATTATAAGCTG CAATAAAC	sense Sequenzierprimer für pRK
# 385	pRK-SP6	TAGGTGACACTATAG AATAACATC	anti-sense Sequenzierprimer für pRK
# 795	M13- AS	CAGGAAACAGCTATG AC	anti-sense Primer M13 Topovektor
# 807	M13-FOR(-20)	GTAAAAGGACGGCC AG	sense Primer M13 Topovektor
# 923	Pet30A-S-392	CCCCTCTAGAAATAA TTTTGTT	sense Primer für Sequenzierung (Pet30a)
# 924	Pet30A-AS-32	CCCCTCAAGACCCG TTTAGAG	anti-sense Primer für Sequenzierung (Pet30a)
# 1161	gephpET-S- HindIII	CGACAAGCTTGCATG GCGACCGAGGGAAT	Umklonieren von Gephyrin- DNA in Vektor pET 21a und pET 30a
# 1162	gephpET-AS-XhoI	GGTGCTCGAGTCATA GCCGTCCAATGA	Umklonieren von Gephyrin- DNA in Vektor pET 21a und pET 30a
# 2447	385 long	CACATACGATTTAGG TGACACTATAGAATAA CATC	Umklonierung # 237 in pRK7- sp-myc / $\beta\Delta 9$, sense
# 2448	Mmbdelta9_ Cla1	CCATCGATTCACCAG CCCAGAGGTACTIONCTG GCAGCACT	Umklonierung # 237 in pRK7- sp-myc / $\beta\Delta 9$, anti-sense

Abkürzungen zur Primer-Tabelle:

- mm = mus musculus
- hs = homo sapiens
- rn = rattus norvegicus

DNA

Interne Nummer	Beschreibung
# 222	humaner Glycinrezeptor α 1-Untereinheit
# 236	humaner Glycinrezeptor β Δ 7-Untereinheit
# 237	humaner Glycinrezeptor β -Untereinheit
# 241	humanes Gephyrin
# 260	pET 30a, His-tag, Kanamycin-Resistenz
# 389	pET 21a, T7-tag, Ampicillin-Resistenz
# 512	pDS-Red-Mem
# 560	α 1-GFP
# 565	β -Transmembrandomäne 3-4 GFP in pRK7

Antikörper

Alexa488-konjugierter F(ab)2 Ziege Anti-Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe
Cy3-konjugierter F(ab)2 Ziege Anti-Maus-IgG	Dianova, Hamburg
Cy5-konjugierter F(ab)2 Ziege Anti-Maus-IgG (H+L)	Dianova, Hamburg
Kaninchen Anti-Myc	Polyklonaler Antikörper, Santa Cruz, Heidelberg
Maus Anti-Myc	Monoklonaler Antikörper, Santa Cruz, Heidelberg
Maus-Anti-Gephyrin	BD Biosciences, Heidelberg
Maus-Anti-GlyR α 1 (Klon Mab2b)	Prof. Betz, MPI, Frankfurt
Maus-Anti-His-tag	Qiagen, Hilden

Kommerzielle Kits

DNA-Gel Extraktion	Macherey & Nagel, Düren
Plasmid Maxi Präparation	Jet Star 2.0, Genomed, Löhne
Plasmid Mini Präparation	Macherey & Nagel, Düren
RNA-Extraktion PEQ-Gold	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
StrataClone PCR Cloning Kit	Stratagene, Waldbronn

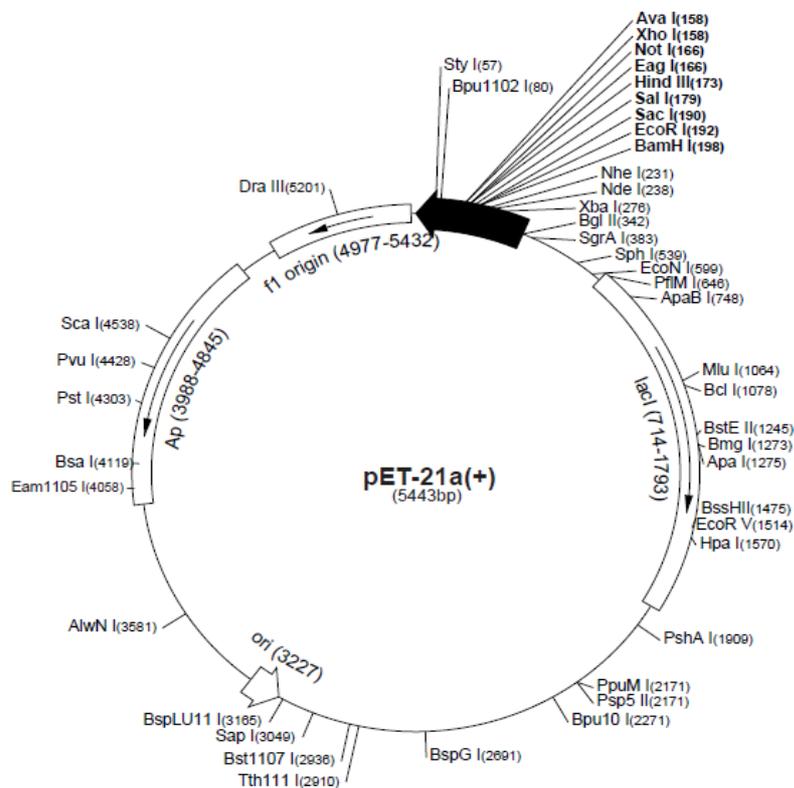
Bakterien

Für die Proteinexpression in pET-Vektoren wurden die folgenden *E. coli*-Stämme genutzt:

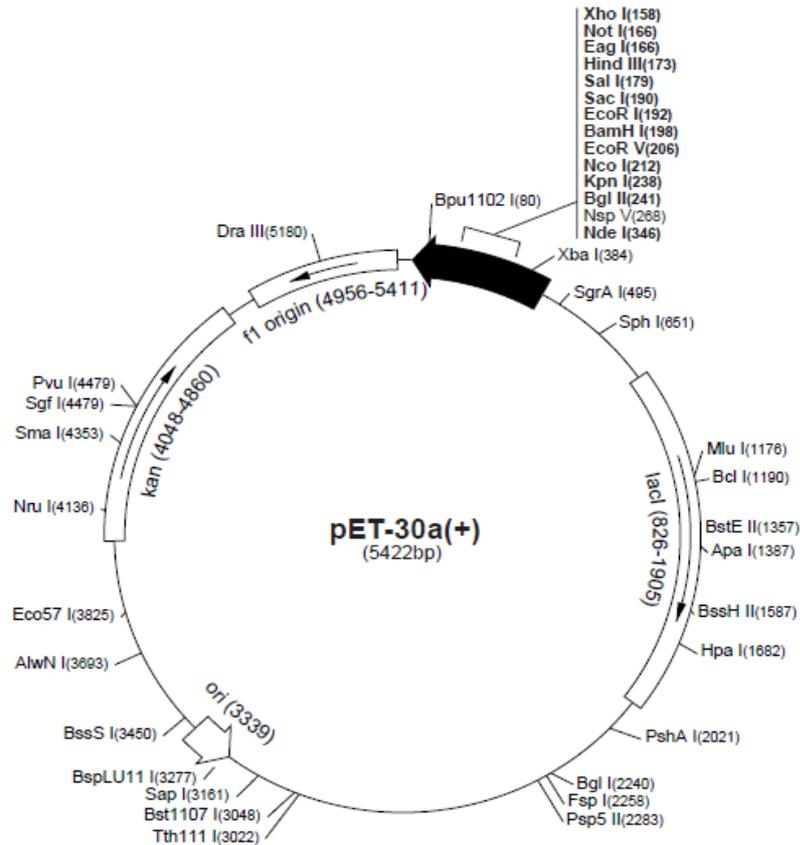
- DH5 α C2987H: *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)*U169 phoA glnV44* ϕ 80 Δ (*lacZ*)*M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* (New England Biolabs, Frankfurt)
- BL21 (DE3): F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (Novagen, Darmstadt)
- Rosetta(DE3): F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam^R)* (Novagen, Darmstadt)

Vektoren

pET21a-Vektor (Novagen, Darmstadt)



pET30a-Vektor (Novagen, Darmstadt)



Tumorzelllinien

Die verwendeten Tumorzelllinien stammten von SCLCs ab und bestanden im Detail aus

- H 82: aus Pleuraerguss
- SW 2: aus Knochenmetastasen

American Type Culture Collection (ATCC) SCLC-Zelllinien:

- H 69
- H 128
- H 146
- CRL 2195

Sonstige Zellen

Weitere Zellen, mit denen gearbeitet wurde, waren HEK293-Zellen (Human embryonic kidney cells, ATCC), sowie Astrozyten neonataler Mäuse und Neurone embryonaler Ratten.

Mäuse

Als Mausstamm wurden C57BL6J-Wildtyp Mäuse ausgewählt.

Nährmedien

Für Zellkultur:

MEM

DMEM

RPMI

(alle von Invitrogen, Karlsruhe)

Für Bakterienkultur:

LB-Medium (Lysogeny Broth)

10 g / l Trypton

5 g / l Hefeextrakt

5 g / l NaCl

2xYT-Medium (Yeast extract and Trypton), pH 7,4

16 g / l Trypton

10 g / l Hefeextrakt

5 g / l NaCl

Standard-Pufferlösungen

DNA-Puffer:

1 l 10 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA)

108 g Tris / HCl

55 g Borsäure

40 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) (Ethylendiamintetraacetat)

TE-Puffer (Tris-EDTA)

10 mM Tris / HCl

1 mM EDTA, pH7,4

2x Frontmarker

40% (v / v) Glycerin

0,25% (w / v) Bromphenolblau

Western-Blot:

Anodenpuffer

- 10% (v / v) Methanol
- 50 mM Borsäure pH 9,0
- 0,02% SDS (Natriumdodecylsulfat)

Kathodenpuffer

- 5% (v / v) Methanol
- 50 mM Borsäure
- 0,02% SDS

10 x TBS-Puffer (Tris-Buffered Saline)

- 500 mM Tris / HCl pH 8,0
- 1,5 M NaCl

10 x TWS-Puffer

- 500 mM Tris/HCl pH 8,0
- 1,5 M NaCl
- 5% Triton X-100

1 x TBB

- 50 mM Tris/HCl pH 8,0
- 150 mM NaCl
- 0,5% Triton X-100
- 3% BSA, Fraction V

3.2 Geräte

DNA-Gel Dokumentation	BioDoc Analyse, Biometra, Göttingen
Fluoroimager Storm 860	GE, Freiburg
FPLC-Anlage Biologic HR Fraktionssammler fraction collector 2128	BioRad, München
Homogenisator Ultraturrax T25	Jauke & Klunkel, Staufen
PCR-Maschine	Perkin Elmer, Überlingen
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Photometer Ultrospec 3000	GE Healthcare, München
Ultraschall Sonifire B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut , USA
UV-Detektor	Knauer, Berlin
Western-Blot-Kammern	Biometra, Göttingen
Zentrifugen - Kühlzentrifuge KR22i - Megafuge 2.0 R - Micro UZ CS150GX	Jouan, Unterhaching Heraeus Instruments, Hanau Hitachi Medical Systems, Wiesbaden

4. Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) ist ein Verfahren zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten.

Das grundlegende Prinzip kann in drei Einzelschritte unterteilt werden:

- Trennung der Doppelstrang-Matrix-DNA in Einzelstränge
- Anlagern von oligomeren Primern als Start für den Folgestrang
- Vervollständigen des Folgestrangs

Die Trennung der Doppelstrang-DNA (Denaturierung) erfolgt durch hohe Temperaturen. Diese Schmelztemperaturen liegen üblicherweise bei ca. 95 °C und hängen im Einzelnen von der Basenzusammensetzung der DNA ab. Ein hoher Guanin- und Cytosingehalt erfordert wegen der dreifachen Wasserstoffbrückenbindung eine höhere Temperatur als ein hoher Anteil an Adenin und Thymin, die zwischen sich nur zwei Brücken ausbilden. Außerdem müssen sämtliche Reaktionspartner – insbesondere die beteiligten Enzyme – diese Temperaturen in ihrer Nativstruktur überstehen können. Das gelingt durch den Einsatz hitzebeständiger Polymerasen aus thermophilen Bakterien, deren natürliches Vorkommen in heißen Quellen liegt.

Für das Anlagern der oligomeren Primer für den Folgestrang sind niedrigere Temperaturen (ca. 55 °C) erforderlich, die sich je nach Kettenlänge und Zusammensetzung der Primer unterscheiden. Da die DNA immer vom 5'- zum 3'-Ende synthetisiert wird, wird je ein Primer an Anfang und Ende des zu amplifizierenden Bereichs der DNA benötigt.

Für die Vervollständigung des Folgestrangs werden *Thermophilus aquaticus*-DNA-Polymerasen (Taq-Polymerasen) eingesetzt, die auch bei hohen Temperaturen nicht denaturieren. Sie erweitern den Strang am 3'-OH-Ende mit den in Überschuss

zugegebenen Desoxyribo-Nucleinsäure-Triphosphaten. Das Temperaturoptimum der Polymerasen liegt bei ungefähr 72 °C.

Ausgehend von der neu entstandenen Doppelstrang-DNA kann wieder mit der Denaturierung begonnen werden usw. Damit ergibt sich für jeden PCR-Zyklus eine Verdoppelung der DNA-Menge und somit eine exponentielle Zunahme.

Typisches Beispiel für einen PCR-Ansatz:

- 1 µl DNA (100 ng / µl)
- 1 µl Primer 1 (5 pmol / µl)
- 1 µl Primer 2 (5 pmol / µl)
- 2 µl dNTPs (10 mM)
- 10 µl 10x Polymerase-Puffer
- 0,5 µl Taq-Polymerase (1 U / µl)
- ad 100 µl H₂O

Die Temperatur betrug in den hier durchgeführten Reaktionen am Anfang 95 °C für 5 min zur Denaturierung, dann über 28 Zyklen jeweils 95 °C für 1 min zur Denaturierung, 55 °C für 2 min zur Anlagerung der Primer und 72 °C für 3 min für die Verlängerung durch die Polymerase. Zum Schluss wurde die Temperatur für 10 min bei 72 °C gehalten, was einen letzten Syntheseschritt darstellt, und anschließend auf 10 °C abgekühlt.

4.1.2 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Um z.B. Amplimere oder Restriktionsfragmente zu kontrollieren, wurde eine Gelelektrophorese mit 1% bzw. 0,7% Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen verwendet. Die Herstellung der Gele erfolgt durch Versetzen von 0,7 g bzw. 1 g Agarose mit 100 g 1xTBS (Tris-buffered saline) und Erhitzen der Suspension, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Dann wird die Lösung mit 0,01% Ethidiumbromid versetzt, in die vorbereiteten Gelkammern gegossen und abgekühlt.

Zur Analyse wird das DNA-Fragment zusammen mit einem interkalierenden Farbstoff im Verhältnis 2:1 und Glycerin zum Beschweren der Probe in die Taschen des Gels gegeben und bis zur entsprechenden Auftrennung in 1xTBS bei 130 V Gleichspannung in

Gelelektrophoresekammern laufen gelassen. Als Größenmarker wird z.B. TriDye-Größenmarker (New England Biolabs, Frankfurt) verwendet. Die DNA-Fragmente werden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert. Sollen die Proben für Klonierungen oder Sequenzierungen gereinigt und weiter verwendet werden, werden mehrere Spuren aufgetragen und nur eine Spur als Vergleich fotografiert, um die anderen Banden vor eventuellen DNA-Schäden durch das UV-Licht zu schützen. Diese Banden werden dann mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschnitten und mit dem HighYield Gelextraktions-Kit gemäß den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

4.1.3 Klonierung von DNA in pET-Vektoren

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in bestimmte Vektoren muss das entsprechende Fragment über die gleichen Enden wie die Vektor-DNA verfügen. Nur so können sich die Enden aneinander lagern und eine Ligation stattfinden. Die Enden können entweder durch die Verwendung entsprechender Primer bei der PCR erzeugt werden oder durch Schneiden der DNA an schon vorhandenen Schnittstellen mit einem entsprechenden Restriktionsenzym. Überstehende Phosphatreste werden anschließend durch Behandlung der Probe mit einer alkalischen Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt) beseitigt und Vektor- und Ziel-DNA miteinander ligiert. Zur Ligation wird eine T4-Ligase (Promega, Mannheim) genutzt. Das Produkt dieser Ligation wird in kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert, die positiven Bakterienkulturen vermehrt und die Sequenz der daraus erhaltenen DNA durch Sequenzierung überprüft. Von den richtigen Klonen werden Dauerkulturen angelegt (s.u.).

4.1.4 Restriktionsverdau

Beim Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen spaltet das Enzym die DNA an vorgegebenen Palindromschnittstellen, die für das jeweilige Restriktionsenzym spezifisch sind. Die Reaktion wird sowohl bei der einzubauenden DNA als auch bei der Vektor-DNA durchgeführt, damit die gleichen Enden entstehen. Dabei ist zu beachten, dass jeweils zwei verschiedene Enzyme benutzt werden müssen, damit an jedem Polymer zwei verschiedene Enden entstehen. Nur so ist gewährleistet, dass die DNA schließlich auch in der richtigen Orientierung in den Vektor eingebaut wird.

Beispiel für einen Restriktionsverdau-Ansatz:

- 1 µl Vektor-DNA bzw. 5 µl DNA-Fragment (ca. 1 µg)
- 1 µl Verdau-Puffer (10x)
- 1 µl BSA (10x)
- 0,5 µl Restriktionsendonuklease 1
- 0,5 µl Restriktionsendonuklease 2
- ad 10 µl H₂O

Der Verdau-Puffer wird so ausgewählt, dass er möglichst optimale Reaktionsbedingungen für beide Enzyme bietet. Die Reaktion wird bei 37 °C für 30 min inkubiert, die entstandenen Fragmente anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt.

4.1.5 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung wird verwendet um die 5'-Phosphatreste der Vektor-DNA zu entfernen. Die Vektor-DNA liegt nach dem Restriktionsverdau in linearisierter Form vor. Um eine erneute Ringschließung bzw. Autoligation zu verhindern, werden die freien 5'-Phosphatenden abgespalten. Damit ist eine Ligation ohne weitere Reaktionspartner nicht mehr möglich, was den Anteil an selbst-ligierter Vektor-DNA vermindert.

Die Ansätze werden für 45 min bei 37 °C inkubiert und danach die alkalische Phosphatase bei 72 °C über 10 min vollständig inaktiviert.

Beispielhafter Ansatz:

- 8 µl Vektor-DNA (aus Gelextraktion)
- 1 µl 10x Dephosphorylierungs-Puffer
- 1 µl Antarctic Phosphatase (5 U / µl)
- ad 10 µl

4.1.6 Ligationsreaktion

Die Ligation stellt den wesentlichen Schritt der Klonierung dar. Hier werden die beiden jeweils analogen Enden von Vektor- und Insertions-DNA miteinander verbunden und so die DNA in den Vektor eingebaut. Das Verhältnis von Vektor zu Insert-DNA variiert und ist abhängig von Größe und Konzentration des jeweiligen Fragments.

Beispiel-Ansatz für die Ligationsreaktion:

0,5 µl Vektor-DNA
1 µl 10x Ligations-Puffer
1 µl T4-Ligase
7,5 µl Insertions-DNA
ad 10 µl

Der Ansatz wird über Nacht bei 16 °C zum Ligieren inkubiert; am nächsten Tag kann dann mit der Transformation fortgefahren werden.

4.1.7 Transformation

Nach der Ligation muss die DNA der nun positiven Vektoren, die das neue DNA-Fragment enthalten, vervielfältigt werden. Dazu nutzt man die Eigenschaft bestimmter *E. coli*-Stämme, extrazellulär vorliegende Plasmide aufzunehmen und deren DNA zu reproduzieren.

50 µl DH5α kompetente *E. coli* werden bei Raumtemperatur auf Eis aufgetaut und für 30 min mit 2 µl des Ligationsansatzes versetzt. Dabei wird die Temperatur möglichst unter dem Gefrierpunkt gehalten, um die Transformationseffizienz nicht zu verringern. Dann erfolgt für 30 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C, bei dem die Bakterien die Plasmid-DNA internalisieren. Zu beachten ist, dass sich Zeit- und Temperaturoptimum je nach Stamm und Reaktionsgefäß ändern können. Die Bakterien werden mit 200 µl warmem LB-Medium gefüttert und auf dem Heizblock bei 37 °C mindestens 1 Stunde geschüttelt.

Um die Bakterien mit aufgenommenem Vektor herauszufinden, nutzt man die Antibiotika-Resistenzen der Vektoren. Die Bakterien werden auf LB-Agar-Platten, die das Antibiotikum enthalten, dessen Resistenz der Vektor vermittelt, ausplattiert und über Nacht im

Brutschrank bei 37 °C wachsen gelassen. Bakterienkolonien können nur wachsen, wenn sie das Resistenzgen auf dem Vektor enthalten.

4.1.8 Minipräparation

Von einer Agarplatte werden möglichst einzeln stehende Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze abgenommen und in ein Reagenzglas mit 2 ml YT-Medium (Yeast extract and Trypton) gegeben, sowie das entsprechende Antibiotikum zugegeben (Verhältnis 1:500 für Ampicillin bzw. 1:1000 für Kanamycin). Die Bakterien werden über Nacht bei 37 °C im Schüttler im Wärmerraum inkubiert. Am nächsten Morgen werden ca. 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß gegeben und die Bakterien bei 14000 x g abzentrifugiert. Der Rest wird bei 4 °C im Kühlschrank aufgehoben, damit davon später weitere Kulturen angesetzt werden können.

Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 200 µl eiskaltem Puffer P1 und RNase (End-Konzentration 2%) resuspendiert. Die Suspension wird 5 min auf dem Schüttler resuspendiert und 5 min auf Eis gekühlt. Dann werden nacheinander 400 µl Puffer P2 für die Zellyse und 300 µl eiskalter Puffer P3 zur Neutralisation der vorherigen Puffer zugegeben und die Proben möglichst in der Kühlzentrifuge bei 14000 x g abzentrifugiert. Zwischen jedem Einzelschritt werden die Proben jeweils für 5 min auf Eis kühl gehalten.

Die weißen Flocken enthalten die Proteine der Bakterien und werden verworfen, 800 µl des klaren Überstands werden in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 800 µl Isopropanol die Plasmid-DNA ausgefällt. Die Proben werden gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 5 min bei 14000 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 300 µl 70% Alkohol gereinigt, bevor es nochmals 3 min unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert wird. Der Alkohol wird abgenommen und das Pellet bei 37 °C auf dem Heizblock oder in der Speed-Vakuum-Zentrifuge getrocknet.

Zum Schluss wird die Plasmid-DNA in 40 µl TE-Puffer gelöst und 5 µl davon für einen Kontrollverdau eingesetzt.

Zusammensetzung der benötigten Pufferlösungen:

Puffer P1

50 mM Glucose

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl pH 8,0

Puffer P2

200 mM NaOH

1% SDS

Puffer P3

3 M Kalium-Acetat

11,5% Eisessig

Alle Puffer werden mit destilliertem H₂O angesetzt.

4.1.9 Maxipräparation

Die Maxipräparation dient zur Darstellung größerer Mengen DNA. Die Bakterien werden dafür in 100 ml YT-Medium mit der jeweiligen Antibiotikum-Konzentration angesetzt. Die einzelnen Schritte entsprechen denen der Minipräparation und wurden mit dem Jet Star 2.0-Kit der Firma Genomed gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.1.10 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde das sogenannte Cycle-Sequencing verwendet, das eine abgewandelte Form der Kettenabbruch-Methode darstellt. Es bedient sich der Dye-Terminator-Methode, bei der Dye-Terminatoren, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs), einen Kettenabbruch verursachen. ddNTPs besitzen an der 2'- und 3'-Position keine OH-Gruppe, die aber für die weitere Verlängerung der Kette benötigt wird. Im nächsten Zyklus kann deshalb an dieser Stelle kein Nukleotid mehr angelagert werden und die Kette bricht ab. Durch ein entsprechendes Verhältnis von ddNTPs und normalen dNTPs (Desoxynukleotiden), die den Grundbaustein der Kette darstellen, werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide aller Längen erzeugt. Die ddNTPs sind je nach

organischer Base mit einem anderen Fluoreszenzmarker gekoppelt, so dass deren Einbau jeweils ein anderes Absorptionsmaximum aufweist. So können die PCR-Produkte auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, mittels Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und dann über ein Laser-Scan-Verfahren analysiert werden.

Ein Sequenzier-Mix aus ddNTPs und dNTPs wurde fertig bezogen.

Für die Sequenzierungs-PCR wurde der folgende Ansatz verwendet:

- 1 µl DNA (aus Gelextraktion)
- 1 µl Primer (5 pmol / µl)
- 2 µl Sequenzier-Mix
- ad 10 µl H₂O

Es wurden 25 PCR-Zyklen durchgeführt:

- 95 °C 30 s
- 50 °C 15 s
- 60 °C 60 s

Im Anschluss werden die PCR-Produkte zu 2 µl 1,5 M NaAc / 250 mM EDTA-Puffer gegeben, mit 60 µl 100% Ethanol ausgefällt und 15 min auf Eis gestellt. Dann wird der Ansatz 30 min bei 14000 x g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren (5 min unter den gleichen Bedingungen) wird der Alkohol abgenommen, das Pellet wie oben beschrieben getrocknet und bis zum Auftragen auf das Analysegel bei -20 °C gelagert.

4.1.11 Anlegen von Dauerkulturen

Bakterienkolonien, bei denen das richtige Insert durch Sequenzierung bestätigt wurde, werden als Bakterien-Stocks angelegt. Dazu werden 800 µl der Bakterienkultur in 200 µg Glycerin aufgenommen, das wegen der hohen Viskosität abgewogen werden muss, und bei – 80 °C weggefroren. Pro positivem Klon wurden zwei Dauerkulturen angelegt.

4.1.12 Topoklonierung

Die Topoklonierung hat ihren Namen von den Topoisomerasen, die den dafür vorgesehenen Topo-Vektor hinter der Sequenz CCCTT spalten können. Dabei produzieren sie an beiden Enden einen Poly-U-Überhang. Taq-Polymerasen besitzen eine Poly-U-Bindestelle und erzeugen so an PCR-Produkten einen 3'-Poly-A-Rest. Dieser kann an die Schnittstelle im Vektor über A-U-Basenpaarung binden und dadurch das PCR-Produkt in den Vektor kloniert werden. Der Vektor beinhaltet ein Resistenzgen gegen Ampicillin und Kanamycin und eine *lacZ*-Kassette, die eine Blau-Weiß-Selektion mit X-Gal ermöglicht. Die vorhandenen Bindestellen für M13- und T7-Primer erlauben eine Sequenzierung des zwischen ihnen eingebauten PCR-Produkts. Die Klonierung wurde mit StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene, Waldbronn) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.1.13 Isolierung von RNA aus Zellen

Zur Isolierung von RNA aus Tumorzellen oder HEK 293-Zellen wurde die Phenol-Chloroform-Methode verwendet. Die Zellen waren meist bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren, werden auf Eis langsam aufgetaut und pro ursprünglich abzentrifugierter 10 cm Zellkulturschale mit 1 ml PeqGold RNA Pure-Lösung versetzt. Dann werden sie mit Glas-Homogenisatoren kräftig zerstoßen und in 1 ml-Portionen aliquotiert. Die Suspension wird mit je 200 μl Chloroform versetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12000 \times g$), um die unterschiedlichen Phasen voneinander zu trennen. Die wässrige Phase (ca. 500-600 μl) wird abgenommen und mit 500 μl Isopropanol gefällt. Anschließend wird der Überstand abzentrifugiert (10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12000 \times g$) und verworfen. Das Pellet wird mit 500 μl 70% Ethanol gereinigt, bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und in 30-50 μl 0,1x TE aufgenommen.

4.1.14 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der in 0,1x TE gelösten RNA wurde photometrisch gemessen. Dazu wird die RNA je 1:50 und 1:100 verdünnt und mit einem Photometer die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 320 nm bestimmt. Das Gerät errechnet die Konzentrationen mit dem Multiplikationsfaktor 40 für RNA und 50 für DNA. Um die eigentliche Konzentration zu bestimmen, wird am Ende noch mit der eingesetzten Verdünnung multipliziert.

4.1.15 RT-PCR

Die Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nutzt das gleiche Prinzip wie die normale PCR, verwendet als Vorlage aber mRNA, die dann in DNA zurück geschrieben wird. Die verwendete RT-DNA-Polymerase kommt *in vivo* als Enzym bei Retroviren vor. Es entsteht eine DNA, die nur noch aus der Exonsequenz besteht (cDNA) und sich deshalb besonders zur Proteinexpression und -analyse *in vitro* eignet, weil so das Spleißen umgangen wird. Das Verfahren erlaubt außerdem Rückschlüsse auf die in der Zelle vorkommende gespleißte mRNA und somit die transkribierten Genomabschnitte.

Wegen der thermischen Instabilität von RNA müssen geringere Temperaturen als bei der herkömmlichen PCR verwendet werden. Es wird die gesamte aus den Zellen isolierte mRNA eingesetzt und zufällig erzeugte Oligonukleotide, sogenannte random hexamers, dienen als Primer, die stochastisch die komplette RNA-Sequenz abdecken. Zur weiteren Verlängerung werden wieder dNTPs zugesetzt.

Vorgehensschema:

1 µl Random hexamers (entspricht 200ng)

5 µg RNA

ad 14 µl Nuklease-freies H₂O (NF-H₂O)

70 °C 10 min zur Anlagerung der Hexamere an die RNA

5 min auf Eis

Zugabe von

2,5 µl 10x RT-Puffer

1 µl 10 mM dNTPs

0,3 µl MMLV Reverse Transkriptase

ad 25 µl NF-H₂O

10 min bei Raumtemperatur inkubieren

50 min bei 42 °C zur enzymatischen Reaktion

10 min bei 70 °C zur Enzymdegradierung

Anschließend werden aus der cDNA, die die transkribierten Abschnitte widerspiegelt, durch PCR die nachzuweisenden DNA-Abschnitte amplifiziert. Als Positivkontrolle der RT-PCR dient hierbei der Nachweis von β -Aktin, das als Strukturprotein in allen Zellen in gleicher Ausprägung vorhanden ist.

Vektor-DNA, in die das gesuchte Gen kloniert worden ist, wird als weitere Positivkontrolle verwendet:

- 5 μ l RT-PCR-Produkt bzw. 1 μ l Vektor-DNA
- 1 μ l je Primer (5 pmol / μ l)
- 1,5 μ l 25 mM $MgCl_2$
- 5 μ l Taq-Puffer (5x)
- 0,5 μ l Taq-Gold-Polymerase (1 U / μ l)
- 1 μ l 10 mM dNTPs
- ad 25 μ l H_2O

Analysiert wurden die Proben auf 1% Agarose-Gelen. Der Frontmarker ist im Taq-Puffer bereits enthalten.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Proteinexpression in *E. coli*

Zur Proteinexpression in *E. coli* wurden induzierbare BL-21-Stämme verwendet, in die die DNA transformiert wurde. Von den über Nacht ausplattierten Bakterien werden am ersten Tag Vorkulturen und mit diesen am nächsten Tag Hauptkulturen angeimpft. Nach einer Stunde Wachstum der Hauptkultur wird 1 M IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) in einer Konzentration von 0,1% zugesetzt und die Kultur weitere 4 Stunden inkubiert. Die erhaltenen Zellen werden abzentrifugiert (20 min bei Raumtemperatur, 4000 x g) und anschließend bei -80 °C eingefroren oder direkt aufgeschlossen.

Zur Zelllyse werden die Zellen, falls nötig, auf Eis aufgetaut, mit 2 ml Lyse-Puffer versetzt und in 1 ml Portionen aliquotiert. Mit der Ultraschallsonde auf höchster Stufe werden 15 bis 20 Mal jeweils Pulse von 5 s gegeben mit anschließenden Pausen zum Abkühlen auf Eis. Der Proteinüberstand wird von den nicht-löslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation getrennt (30 min, 4 °C, 20000 x g) und die Proteine mittels Polyacrylamid-Gel-elektrophorese aufgetrennt.

Lyse-Puffer

50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0

300 mM NaCl

4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde Bradfordreagenz verwendet, das Coomassie brilliant blue G-250 enthält. Bei dessen Bindung an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm im ungebundenen Zustand auf 595 nm. Dadurch kann die gebundene Proteinmenge bei bekannter Eichkurve errechnet werden.

Bradford-Reagenz

0,01% Coomassie brilliant blue G-250

4,75% Ethanol

8,5% Phosphorsäure

4.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von Proteinfractionen erfolgte durch die diskontinuierliche Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Gele setzen sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Es wurden 4%ige Sammelgele und 9%ige Trenngele verwendet.

4%iges Sammelgel

- 3,06 ml H₂O
- 0,66 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid
- 0,2 ml 2,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- 20 µl 20% SDS
- 40 µl 10% APS (Ammonium-Persulfat)
- 4 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin)

15%iges Trenngel

- 1,16 ml H₂O
- 5,26 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid
- 3,94 ml 2,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- 53 µl 20% SDS
- 53 µl 10% APS
- 8 µl TEMED

SDS ist Bestandteil des Auftragspuffers und stark negativ geladen. Es bindet an Proteine und denaturiert nach Erhitzen die Tertiärstrukturen. Im elektrischen Feld wandern die SDS-Proteinkomplexe in Richtung Anode und werden im Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, das direkt in Zusammenhang mit dem gebundenen SDS steht. Die negative Eigenladung der Proteine ist aufgrund des geringen Anteils an der Gesamtladung vernachlässigbar. Die Proben (ca. 30 µg Protein pro Spur) werden mit dem 2x Auftragspuffer gemischt, bei 95 °C 10 min zum Denaturieren gekocht und auf die Laufspuren aufgetragen. PPM (Prestained Protein Marker, NEB) und CPM (ColorPlus Prestained Protein Marker, NEB) dienen als Größenstandards. Das Einlaufen zum Sammeln der Proben erfolgt bei 100-120 V, die Auftrennung der Proben bei 170 V.

Auftragspuffer

- 0,09 M Tris/HCl, pH 6,8
- 20% Glycerin
- 2% SDS
- 0,02% Bromphenolblau
- 0,1 M DTT (Dithiothreitol)

4.2.4 Coomassie-Färbung

Nach der SDS-PAGE werden die Gele mit Coomassie-Lösung gefärbt. Da das Coomassie sich wieder an die Proteine anlagert, lässt sich dadurch ein Überblick über die aufgetrennten Proteinbanden erhalten.

Die Gele werden zunächst 10 min in Entfärbelösung gelegt, was den Kontrast zwischen Banden und Hintergrund verbessert. Dann werden sie mindestens 90 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und für 2 Stunden oder über Nacht in Entfärbelösung gelegt, um den Hintergrund wieder zu entfärben.

Coomassie-Blau-Färbelösung

0,25% (w/v) Coomassie Brillant Blue R-250

25% Ethanol

8% Essigsäure

Entfärbelösung

25% Ethanol

8% Essigsäure

4.2.5 Silbernitrat-Färbung

Die Silberfärbung nach Rabilloud stellt ein sehr sensitives Verfahren zur Darstellung von Proteinbanden auf Polyacrylamidgelen dar. Der eigentliche Färbeprozess ähnelt dabei der Entwicklung von Schwarz-Weiß-Photographien. Die einzelnen Wasch- und Inkubationsschritte werden alle bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt.

Die Proteine werden zunächst über mehrere Stunden mit Ethanol und Essigsäure denaturiert. Dadurch fallen sie aus und werden fixiert. Nach dreimaligem Waschen, zunächst mit 50%igem Ethanol, anschließend mit destilliertem Wasser, werden die Gele zur Vorbehandlung für 15 s mit einer 0,02%igen Natriumdithionit-Lösung behandelt. Nach erneutem Waschen mit Wasser erfolgt der Färbeprozess mit Silbernitrat für 20 min im Dunklen, wo sich die positiv geladenen Silberionen an die Proteine anlagern. Die Entwicklung erfolgt mit alkalischer Formaldehyd, die Silberionen zu Silber reduziert, unter ständiger Kontrolle, damit die Gele nicht zu dunkel werden. Die Gele werden

nochmals gewaschen und die Reaktion schließlich mit einer Ethanol-Essigsäure-Lösung gestoppt.

Fixierlösung

49,95% Ethanol
38% dest. H₂O
12% Essigsäure
0,05% Formaldehyd

Vorbehandlungslösung

0,02% (w/v) Na₂S₂O₃ x 5H₂O
99,98% dest. H₂O

Färbelösung

0,2% (w/v) AgNO₃
0,75% Formaldehyd
99,05% dest. H₂O

Entwickler

6% (w/v) Na₂CO₃
0,0125% Formaldehyd
0,0001% (w/v) Na₂S₂O₃ x 5H₂O
94% dest. H₂O

Stopp-Lösung

12% Essigsäure
44% Ethanol
44% dest. H₂O

4.2.6 Westernblot

Nach dem Auftrennen der Proteine auf Polyacrylamidgelen werden die Banden zur spezifischeren Immunfärbung auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Dazu wurde die Semidry-Blottechnik verwendet, bei der nur das Filterpapier mit Pufferlösung getränkt ist.

Durch ein elektrisches Feld, das senkrecht zur Laufrichtung der Banden und zur Schichtung der Gele und der Membran gerichtet ist, binden die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen an der Nitrocellulose. Die Auftrennung der Banden bleibt dabei erhalten. Beim Einschichten in die Blotkammer werden drei Lagen Filterpapier, in Anodenpuffer getränkt, als erstes auf die Anode gelegt, dann folgen die Nitrocellulose-Membran, das Gel und wieder drei Lagen Filterpapier mit Kathodenpuffer. Es ist darauf zu achten, dass überschüssiger Puffer am Ende abgenommen wird und keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten eingeschlossen sind. Der eigentliche Blotvorgang wurde bei 4 °C mit 150 mA, 30 V und 10 W über 60 min durchgeführt.

Anschließend werden die Membranen einige Minuten lang in Ponceau S geschwenkt, um die Übertragung zu kontrollieren. Ponceau S ist das Natriumsalz eines Azofarbstoffs, das sich reversibel an Proteine anlagert und sie dadurch sichtbar macht. Mit einem Bleistift werden die Spuren und die Banden des Größenmarkers angezeichnet.

10 x Ponceau S

2% w/v Ponceau S

30% w/v TCA (Trichloracetat) als Pulver

4.2.7 Immunfärbung

Nach der Färbung der Membran mit Ponceau S, wird der Farbstoff mit Wasser wieder ausgespült. Alle weiteren Schritte erfolgten auf der Schwenkwippe. Um später eine spezifische Bindung des Antikörpers an das gesuchte Protein sicher zu stellen, wird der Blot für 60 min mit TBB blockiert. Das im TBB enthaltene BSA kann so die unspezifischen Bindungsstellen besetzen. Danach folgte das Auftragen des verdünnten spezifischen Primär-Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Die anschließenden jeweils 10 minütigen Waschschrte mit TBS, TWS und TBB dienen zur Entfernung von Antikörper-Rückständen auf der Membran und unspezifisch gebundenem Antikörper. Der Blot wird schließlich 30 min mit einem Sekundär-Antikörper inkubiert, der gegen IgG-Antikörper des Tiers gerichtet ist, von dem der Primär-Antikörpers abstammt. Bevor die Banden mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden können, wird zur Verbesserung des Signal / Hintergrund-Verhältnisses der Blot mit TBS, TWS und nochmals TBS für je 5 min gewaschen.

Der vorwiegend verwendete Sekundär-Antikörper Cy5 Ziege-anti-Maus bindet mit einer breiten Spezifität an Mausantigene. Er gehört zu den rot-fluoreszierenden Cyano-Farbstoffen, kann mit einer Wellenlänge von 649 nm angeregt werden und emittiert Licht von 670 nm. Diese Fluoreszenzen können mit einem Fluoroimager (Storm 860, GE) detektiert und aufgezeichnet werden.

4.2.8 Proteinreinigung mittels Nickel-Nitrilotriacetat-Agarose (Ni-NTA-Agarose)

Für die Aufreinigung von Gephyrin wurde ein mehrschrittiges Vorgehen gewählt, das in ähnlicher Weise auch von Schrader et al. 2004 verwendet wurde [80].

pET 30a-Vektoren besitzen vor den Palindromsequenzen zur Einklonierung einen Abschnitt, der für sechs Histidine im Protein kodiert. Dieses sogenannte 6 x His-Tag kann zur Trennung und damit zur Aufreinigung des klonierten Proteins von bakteriellen Proteinen verwendet werden. Histidine beinhalten einen Imidazolring, dessen einer Stickstoffrest als Elektronenpaar-Donator wirken und eine koordinative Bindung mit dem Zentralion eines Chelatbildners eingehen kann. Ni-NTA-Agarose setzt sich aus an Sepharose gebundenen Nitrilotriacetat-Molekülen (NTA) und Ni^{2+} -Ionen zusammen. Ni^{2+} -Ionen sind in der Lage sechszählige Chelatkomplexe zu bilden, wobei NTA vier Bindungen eingeht und somit noch zwei Histidine gebunden werden können. Die folgende Abbildung 4.1 veranschaulicht diesen Vorgang noch einmal schematisch:

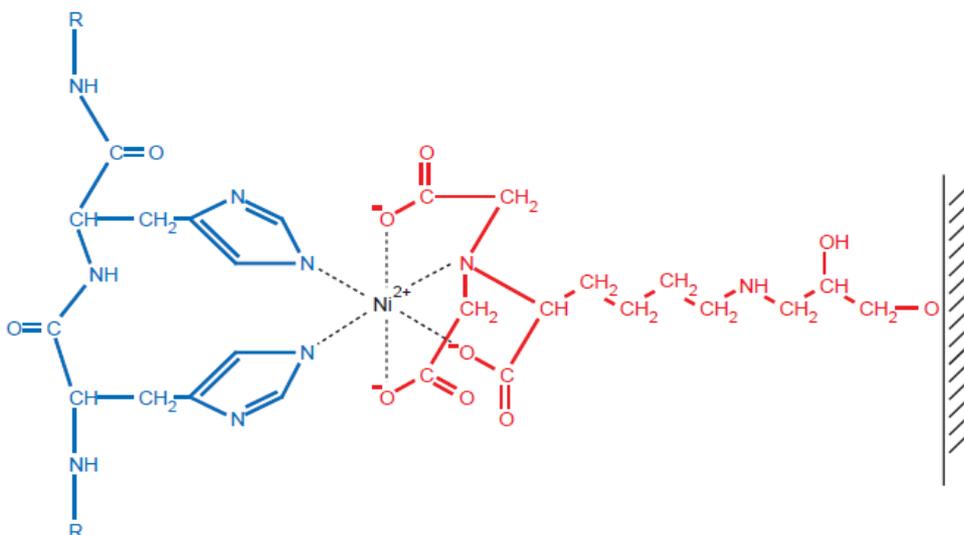


Abb. 4.1. Schematische Darstellung der Komplexbildung von zwei Histidinresten mit Ni-NTA. Abbildung übernommen aus [1]

Ni-NTA-Komplexe sind sehr stabil und deshalb gut zur Reinigung von His-markierten Proteinen geeignet.

Die Reinigung der Proteine erfolgte zu Beginn im Batch-Säulen-Verfahren, bei dem die Einzelschritte in einem Falcon durchgeführt werden, und später an einer Durchlaufsäule. Das Säulenmaterial besteht aus Ni-NTA-Agarose-Beads, die abzentrifugiert (bei Raumtemperatur, 1 min, 2000 rpm) und dreimal mit der dreifachen Menge an PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen wurden. Die weiteren Schritte werden bei 4 °C durchgeführt. Zwischen den einzelnen Schritten werden die Beads abzentrifugiert (4 °C, 4000 rpm, 2 min) und die Überstände aufgehoben. Die Bindung der Proteine an die Säule erfolgt beim Batchverfahren durch Zugeben einer Suspension mit lysierten Zellen und Schwenken über Nacht. Am nächsten Tag werden die beladenen Beads nacheinander jeweils 10 min mit der dreifachen Menge an Waschpuffer 1 und 2 gewaschen und die Proteine in einem ersten Elutionsschritt mit Elutionspuffer 1 während 30 - 60 min wieder aus dem Komplex gelöst. Ein zweiter Elutionsschritt mit Elutionspuffer 2 erfolgt wieder über Nacht.

Bei Verwendung einer Durchlaufsäule werden die Beads in die Säule gepackt und dort vorbereitet, bevor die jeweiligen Lösungen und Suspensionen darüber laufen und in verschiedenen Fraktionen unten gesammelt werden.

Analysiert werden die erhaltenen Überstände und Fraktionen auf Polyacrylamidgelen mittels Coomassie-Färbung und Western-Blot.

Lysispuffer

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

Waschpuffer 1

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

Waschpuffer 2

50 mM NaH₂PO₄
500 mM NaCl
20 mM Imidazol

Elutionspuffer 1

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
250 mM Imidazol

Elutionspuffer 2

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
500 mM Imidazol

Alle Puffer werden mit NaOH bzw. KOH auf pH 8,0 eingestellt.

4.2.9 Proteinreinigung mittels verschiedener Detergenzien

Um zu testen, inwiefern sich zusätzlich an die Ni-NTA-Agarose-Beads gebundene Proteine durch verschiedene Detergenzien abtrennen lassen, wurden die Detergenzien in Waschpuffer 1 in folgenden Konzentrationen gelöst:

Triton-X100	0,1% (V / V)
Triton-X100	0,5%
TWEEN-20	0,1%
TWEEN-20	0,5%
SDOCS	3 mM
SDOCS	10 mM
CHAPS	8mM
n-Octyl β-D-Maltosid	10 mM
Undecyl β-D-Maltosid	10 mM

Die Beads wurden mit Waschpuffer 2 gewaschen und 1 min bei 1000 rpm unter Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Pufferüberstand wurde abgenommen und je 200 µl der Beads mit 1 ml der Detergenzienlösung versetzt. Die Suspension wurde 20 min bei 4 °C invertiert, dann wieder zentrifugiert (1 min, 1000 rpm, Raumtemperatur) und der Überstand abgenommen. Diese Schritte wurden auch mit zwei KCl-Puffern in verschiedenen Konzentrationen insgesamt dreimal durchgeführt.

KCl-Waschpuffer 1

50 mM NaH₂PO₄

500 mM KCl

20 mM Imidazol

KCl-Waschpuffer 2

50 mM NaH₂PO₄

1 M KCl

20 mM Imidazol

4.2.10 Proteinreinigung mit Resource Q-Säulen

Bei der Proteinreinigung mittels Resource Q-Säulen handelt es sich um eine Ionenaustausch-Chromatographie. Die Grundlage bilden ionische Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten der Proteine und dem Material der Säule. Die isoelektrischen Punkte der Proteine eines Proteingemischs sind verschieden. Eine Veränderung des pH-Wertes der Pufferlösung bewirkt eine Verschiebung der Ladungen der Proteine, so dass der pH-Wert das Bindevverhalten der Proteine an das Säulenmaterial beeinflusst. Die Elution der Proteine von der Säule ist möglich durch eine Änderung der Ionenstärke des Puffers, indem z.B. der NaCl-Gehalt des Puffers geändert wird. Bei Trennung von Proteingemischen unbekannter Zusammensetzung wird ein Gradientenverfahren angewendet, bei dem allmählich von einem Puffer mit niedrigem Salzgehalt zu einem Puffer mit hohem Salzgehalt (Hochsalzpuffer) übergegangen wird.

Um kleinere Verunreinigungen und Luftblasen zu entfernen, werden die Puffer filtriert und im Ultraschall-Wasserbad 10 min lang entgast. Da Tris-haltige Puffer ihren pH-Wert abhängig von der Temperatur ändern, muss dieser jedes Mal neu kontrolliert und

eingestellt werden. Die nach der Trennung mit Ni-NTA-Agarose erhaltenen Protein-Fractionen werden in Dialyse-Kassetten mit einem Molekulargewicht Cut-Off von 10 000 Da über Nacht bei 4 °C mit Niedrigsalz-Puffer dialysiert.

Zum Durchpumpen der Pufferlösungen und Probenfraktionen diene ein FPLC-Gerät (Fast Protein Liquid Chromatography), das die Aufzeichnung der Absorptionen mittels einer optischen Einheit erlaubt. Es wurden je nach zu bindendem Volumen Resource Q-Säulen mit 1 ml und 6 ml Volumen genutzt, die vor der Verwendung mit dem fünffachen Säulenvolumen an Niedrigsalzpuffer äquilibriert wurden. Bei den Einstellungen des FPLC-Geräts muss auf den zulässigen Maximaldruck der Säule geachtet werden.

Niedrigsalzpuffer

20 mM Tris/HCl

50 mM NaCl

Hochsalzpuffer

20 mM Tris/HCl

1 M NaCl

4.2.11 Amidoblack-Färbung

Die Amidoblack-Färbung wird zum Nachweis von Protein in einer Lösung verwendet. Es wird von jeder Proteinprobe 1-2 µl auf eine Nitrocellulosemembran aufgetropft und einziehen gelassen. Die Inkubation in Amidoblack-Lösung erfolgt danach für einige Minuten, wobei die Membran geschwenkt wird. Anschließend wird die Nitrocellulose vorsichtig mit Entfärbelösung behandelt. Wenn in der Probenlösung Proteine vorhanden sind, erscheint ein dunkelblauer Punkt auf der Membran.

Entfärbelösung

10% Essigsäure

20% 2-Propanol

4.2.12 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie erlaubt durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper die Lokalisation von Proteinen einer Zelle und bei Einsatz verschieden fluoreszierender Antikörper auch die Kolokalisation mehrerer Strukturen.

Die auf einem Deckgläschen transfizierten HEK 293-Zellen werden 24 h nach Transfektion jeweils in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte überführt und mit 500 µl 4% PAFA (Paraformaldehyd) für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Das wiederholte Waschen mit 1 x PBS spült die Überstände des PAFA wieder ab und die Zugabe von 5% Serum, das nicht aus der gleichen Species wie der Primär-Antikörper stammen sollte, blockiert freie Bindungsstellen. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wird 0,1% Triton-X100 verwendet, bevor der in PBS verdünnte Primär-Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur zugegeben wird. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen mit dem Sekundär-Antikörper ebenfalls 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Auf das nochmalige Waschen folgt die Fixierung auf dem Objektträger durch Eintauchen in Wasser und Auftragen eines Tropfens Mowiol. Die fertigen Präparate härten über Nacht bei 4 °C aus und können am nächsten Tag unter dem konfokalen Mikroskop angesehen werden.

4% PAFA

70 g erwärmtes H₂O

4 g Paraformaldehyd

ad 100 ml 1 x PBS (ca. 65 °C)

zum Lösen 0,02% 10 M NaOH (ca. 2 Tropfen)

4.3 Zellkultur

4.3.1 Astrozytenkultur

Zur Anlage von zerebralen Astrozytenkulturen werden vier bis sechs Tage alte C57BL6J-Wildtypmäuse mit einem Schnitt durch den Hals dekapitiert. Mit einer Schere wird die Kopfhaut der Länge nach aufgeschnitten, die Kalotte frei präpariert und das Kopffell

vollständig abgezogen. Dann wird die Kalotte über der Sutura sagittalis aufgespalten, die beiden knöchernen Hälften auseinander gezogen und von den darunter liegenden Meningen getrennt. Mit einer gebogenen Pinzette wird das Hirn von dorsal nach ventral an der Basis umfasst und heraus gehoben. Die Hirne werden in kaltem PBS bis zu ihrer weiteren Präparation gesammelt. Um die Fibroblasten enthaltenden Meningen von der Hirnoberfläche zu entfernen, werden die beiden Cortices unter dem Stereomikroskop von Hirnstamm und Thalamus mit einem feinen Präpariermesser abgesetzt und die Meningen mit einer Pinzette vorsichtig abgezogen. Dabei ist darauf zu achten, den Cortex möglichst im Ganzen zu erhalten, die Blutgefäße mit zu entfernen und keine sichtbaren Anteile der Hirnhäute stehen zu lassen.

Die Cortices von je zwei Mäusen werden in eine Zellkulturschale mit 5 ml 4 °C kaltem 1 x DMEM zur Dissoziation gegeben. Die Cortices werden einmal mit DMEM gewaschen, bevor unter der Hood weitergearbeitet wird. Mit einer Schere werden die Hirnanteile in möglichst kleine Stücke zerschnitten und in ein 50 ml Falcon überführt. Die Gewebestücke werden in 8 ml DMEM resuspendiert, 2 ml Trypsin zum Andauen zugefügt und bei 37 °C im Wasserbad 15 min inkubiert. Die Reaktion wird mit FCS gestoppt und zur Entfernung des Trypsins dreimal mit 3 ml DMEM gewaschen. Das Gewebe wird zuerst mit einer blauen Pipettenspitze, dann mit einer gelben und schließlich mit einer Pasteurpipette trituriert um es zu homogenisieren und in die einzelnen Zellen aufzutrennen. Das Medium wird bei 700 rpm in 10 min abzentrifugiert und das Zelllysat vom Cortex einer Maus mit 4 ml DMEM-Vollmedium in eine Zellkultur-Schale von 6 cm Durchmesser gegeben. Die Zellen werden im Wärmeschrank bei 37 °C gehalten und das Medium nach 1,5 h und 24 h gewechselt.

DMEM-Vollmedium

1 Flasche DMEM (500 ml)

4% FCS

2 mM L-Gln

10 ml 1 x Penicillin-Streptomycin

Alle anderen Vollmedien enthielten eine analoge Zusammensetzung.

4.3.2 Tumorzelllinien

Die verwendeten Tumorzelllinien stammen alle von Kleinzelligen Bronchialkarzinomen ab. H82 stammte aus Zellen, die aus einem Pleuraerguss gewonnen wurden und SW2 aus Knochenmetastasen. Die Linien H69, H128, H146 und CRL2195 wurden kommerziell von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen.

Die Zellen wuchsen in RPMI-Vollmedium bei 37 °C und 3% CO₂ und wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen alle 3 bis 7 Tage auf neue Schalen aufgeteilt.

4.3.3 Zellernte

Beim Ernten der Zellen muss für die unterschiedlichen Zelltypen ein unterschiedliches Vorgehen gewählt werden. Bei den adhärenenten HEK 293-Zellen wird das Medium mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS und einem Gummischaber von der Schale abgelöst. Die sehr fest anhaftenden Astrozyten werden vor dem Lösen von der Platte für einige Minuten mit Trypsin beschichtet, die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von DMEM-Vollmedium wieder gestoppt.

Die gelösten Zellen werden ebenso wie die nicht-anhaftenden Zellen der Tumorzelllinien bei 1000 rpm über 10 min abzentrifugiert, das Medium abgesaugt und die Zellen bei - 20 °C zur weiteren Lagerung weggefroren.

4.3.4 Transfektion von HEK 293-Zellen

Für die Transfektion von HEK 293-Zellen werden 3 x 10⁶ Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase auf eine 10 cm Schale bzw. für Analysen mittels Immunzytochemie 200 000 Zellen auf eine 3 cm Schale mit Deckgläschen ausplattiert. Die Zellen wachsen zunächst über Nacht bei 37 °C und 3% CO₂ im Brutschrank weiter. Die Lösung für die Transfektion der Zellen einer 10 cm Schale setzte sich folgendermaßen zusammen:

10 µl DNA (1 µg / µl)

440 µl 0,1 x TE

50 µl 2,5 M CaCl₂

500 µl 2 x HBS

Da 3 cm Schalen ein entsprechend geringeres Volumens fassen, wird dafür nur ein Zehntel der Mengen eingesetzt. Um die Effizienz zu überprüfen wird jeweils ein Ansatz mit GFP-DNA (Green Fluorescent Protein) mitgeführt. Die über Nacht gewachsenen Zellen werden am nächsten Tag mit 1 ml der Transfektionslösung betropft, die Präzipitatbildung unter dem Mikroskop kontrolliert und die Zellen erneut eine Nacht weiter bebrütet. Am nächsten Tag werden die Zellen einmalig mit MEM-Vollmedium (das Vollmedium wird analog wie oben beschrieben hergestellt) gewaschen und nochmals mindestens 12 h im Brutschrank inkubiert, bevor sie geerntet und für weitere Experimente verwendet werden.

2 x HBS-Puffer

50 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure)

12 mM Dextrose

10 mM KCl

280 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

Einstellen des pH-Werts auf 6,95 mit 1 M NaOH

5. Ergebnisse

5.1 Aufreinigung von humanem Gephyrin

5.1.1 Klonierung von Gephyrin in pET-Vektoren

Zu Beginn wurde die DNA von humanem Gephyrin in pET-Vektoren kloniert. Es wurde parallel mit zwei verschiedenen Vektoren gearbeitet, die sich in ihrem Tag und ihrer Antibiotika-Resistenz unterschieden. Das ermöglichte später ein weiteres Spektrum an Möglichkeiten für die Aufreinigung des Proteins.

Die Vektoren waren im Einzelnen:

- #260: pET 30a, His-tagged, Kanamycinresistenz (Novagen, Darmstadt)
- #389: pET 21a, T7-tagged, Ampicillinresistenz (Novagen, Darmstadt)

Zunächst wurde die Gephyrin-DNA durch die Primer #1161 und #1162 mittels PCR aus einem vorhandenen Plasmid für eukaryotische Expression amplifiziert. Die erwartete Größe der PCR-Produkte von 2210 bp wurde auf Agarose-Gelen elektrophoretisch kontrolliert (Abb. 5.1):

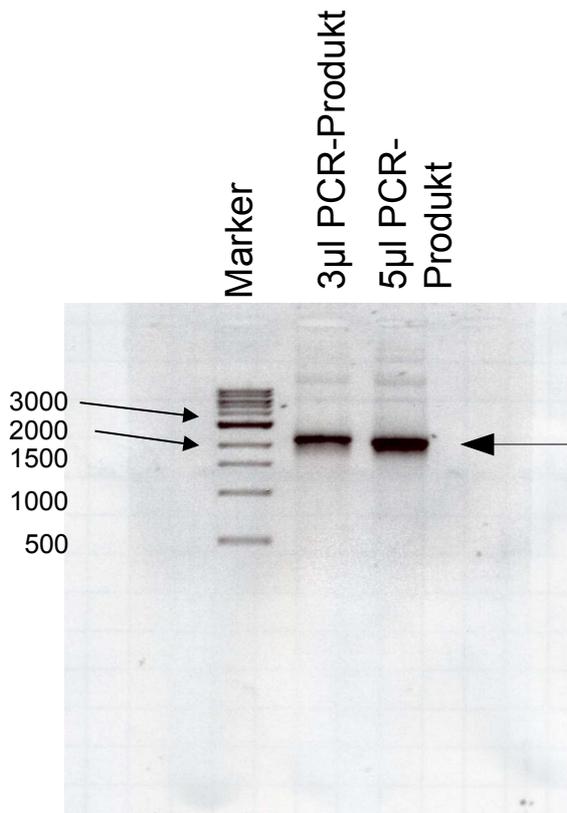


Abb. 5.1: Gelelektrophoretische Kontrolle der amplifizierten Gephyrin-DNA. Die erhaltenen Banden liegen auf der erwarteten Höhe von 2210 bp (Pfeil).

Im nächsten Schritt erfolgte die Extraktion der erhaltenen PCR-Produkte aus dem Gel. Der Verdau mit der Enzymkombination Hind III / Xho I wurde sowohl mit den PCR-Produkten als auch mit der Vektor-DNA durchgeführt. Die verdauten Banden wurden ebenfalls gelelektrophoretisch getrennt und aus dem Gel extrahiert. Schließlich wurde die Vektor-DNA noch dephosphoryliert, bevor die Ligation durchgeführt werden konnte.

Zur Vervielfältigung der klonierten DNA wurden DH5 α -kompetente *E. coli*-Bakterien mit 2 μ l der Ligationsreaktion transformiert und auf mit Antibiotika versetzten Agar-Platten ausplattiert, entsprechend der Vektor-vermittelten Resistenz.

Von positiven Klonen wurde eine DNA-Minipräparation angefertigt und die DNA des Klons durch Verdau verifiziert (Abb. 5.2).

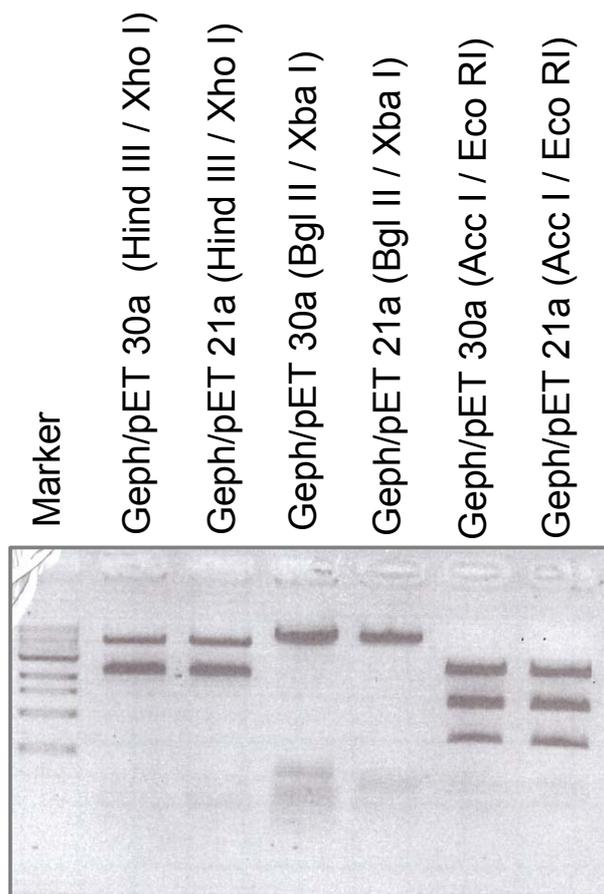


Abb. 5.2. Gelelektrophoretische Kontrolle der Gephyrin / pET-Vektor-Konstrukte. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Klammern hinter dem jeweiligen Konstrukt angegeben.

Der Kontrollverdau zeigt für die Enzymkombination Hind III / Xho I die bei beiden Klonen erwarteten Banden bei 2210 und 5422 bp. Für Acc I / Eco RI wurden Banden der Größe 690, 1356, 2743 und 2850 bp für pET 21a / Gephyrin bzw. 690, 1356, 2717 und 2855 bp für pET 30a / Gephyrin vorhergesagt. Dass hier im Verdau nur drei Banden der richtigen Größen zu erkennen sind, lässt sich mit der geringen Differenz der beiden größeren Fragmente erklären. Für die Kombination Bgl II / Xba I waren die Größen 128, 264, 1948, 2065 und 3234 bp bei pET 21 a / Gephyrin sowie 264, 332, 1856 und 5166 bei pET 30 a / Gephyrin nur teilweise vorhanden. Vermutlich wurden nicht alle Schnittstellen vollständig geschnitten.

5.1.2 Sequenzierung der Gephyrin / pET-Vektor-Konstrukte

Um eine endgültige Bestätigung für das Vorliegen der Gephyrin-DNA im entsprechenden pET-Vektor zu bekommen, wurde die aus einer zusätzlich durchgeführten DNA-Maxipräparation gewonnene Plasmid-DNA für eine Sequenzierung eingesetzt. Als Primer dienten für beide Vektoren #923 und #924 (Sequenz siehe Materialien) in je einem Ansatz. Die Abbildung 5.3 zeigt die Sequenzierung des Konstrukts Gephyrin / pET 30a, die Abbildung 5.4 die Sequenzierung von Gephyrin / pET 21a.

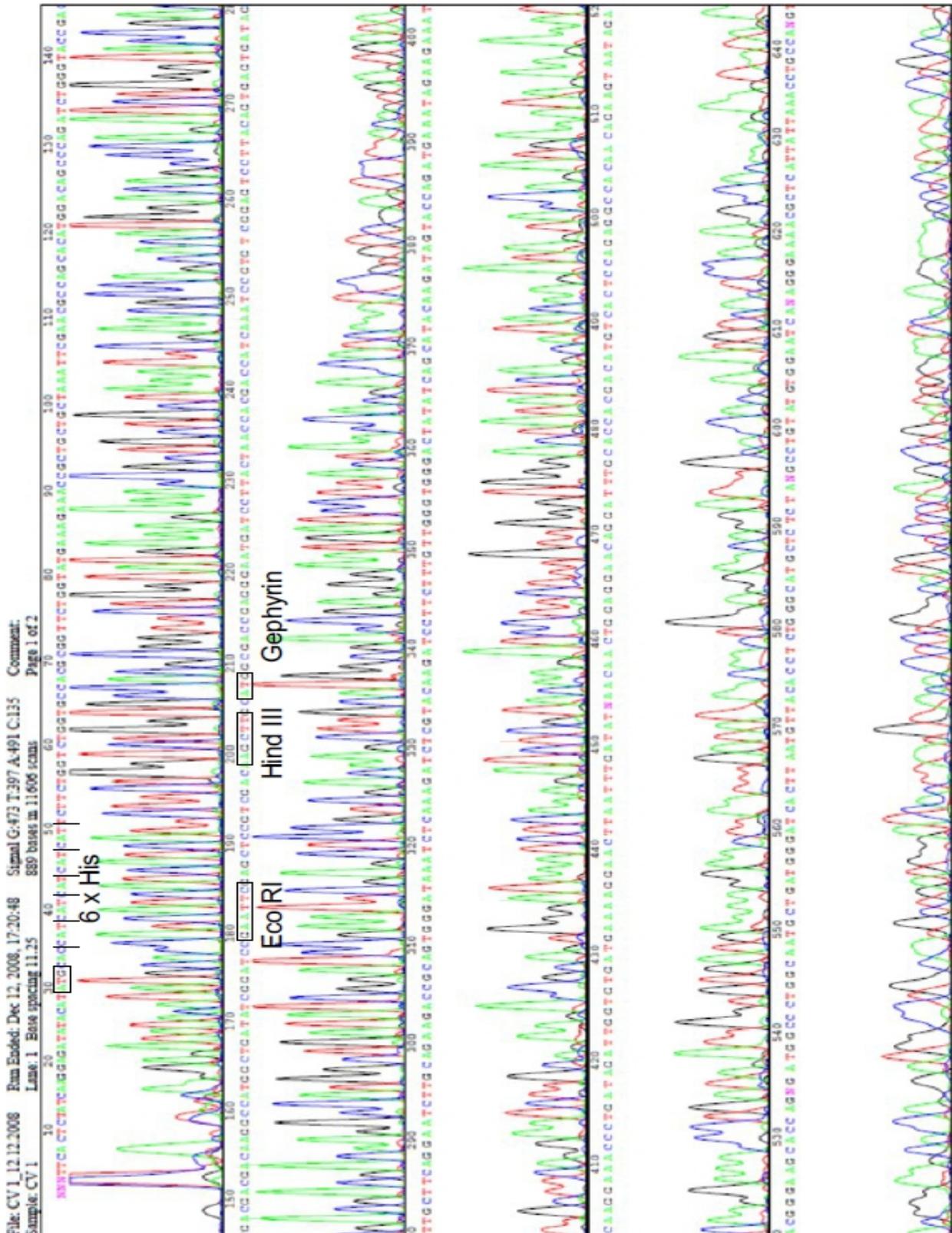


Abb. 5.3. Sequenz von Gephyrin / pET30a mit dem Sense-Primer #923. Die DNA stammte aus dem für die Maxipräparation eingesetzten (Mini-)Klon Nr. 10. Markiert ist der Vektor-spezifische Abschnitt 6 x His und verschiedene Restriktionsschnittstellen. Nach Hind III, der Schnittstelle an der die Ligation erfolgte, ist von der Gephyrin-DNA das Startcodon „ATG“ eingezeichnet (Gephyrin-Sequenz siehe Anhang).

5.1.3 Aufreinigung von Gephyrin / pET 30a mittels Ni-NTA-Agarose

Für die Proteinexpression wurde mit dem Fokus auf dem Konstrukt Gephyrin / pET 30a weitergearbeitet. Es enthält im Vektor ein His-Tag aus sechs Histidinresten, das an Ni-NTA-Agarose binden und dadurch von anderen Proteinen getrennt werden kann.

Die DNA wurde in BL21 (DE3) kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert und mit IPTG die Proteinexpression stimuliert. Nach 240 min wurden die Bakterien abzentrifugiert, die Zellwände durch Ultraschallwellen zerstört und die Proteine freigesetzt.

Um die Expression zu testen und die Funktionsfähigkeit der Tags nachzuweisen, wurden die Zellysate durch Westernblot auf einer Nitrocellulose-Membran fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt (Abb. 5.5):

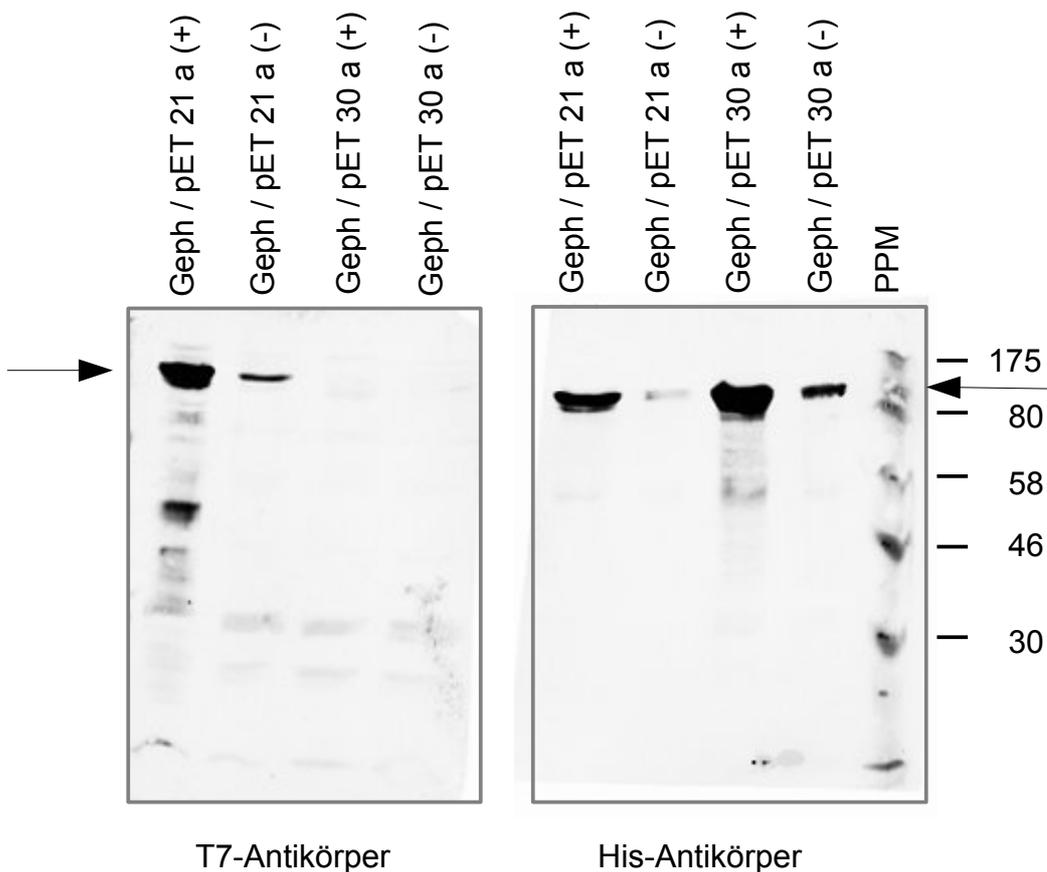


Abb. 5.5. Westernblots der Zellysate aus mit Geph / pET 21 a und Geph / pET 30 a transformierten *E. coli*. Die erwartete Gephyringröße von 93 kDa ist mit einem Pfeil markiert. Mit IPTG induzierte Bakterienlysate sind mit „+“, nicht-induzierte mit „-“ gekennzeichnet. Der monoklonale Primärantikörper gegen das T7-Epitop wurde 1:10000, der gegen das 6 x His-Epitop 1:500 verdünnt. Die Verdünnung des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (gam-Cy5) betrug 1:200.

Für die Aufreinigung wurde zunächst eine Säule für das Batch-Verfahren mit Ni-NTA-Beads gepackt und äquilibriert. Danach wurde das Protein-Lysat zugegeben und die Proteine im Überkopfschüttler an die Matrix gebunden. Der Überstand (Flowthrough, FT) wurde abzentrifugiert. Danach erfolgten je zwei Wasch- (W1, W2) und Elutionsschritte (E1, E2).

Für die Analyse wurden 2 µl des Protein-Lysats und je 20 µl der abzentrifugierten Einzelschritte der Säulenreinigung auf 9% PAA-Gele aufgetragen. Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung gefärbt. Die folgende Abbildung 5.6 zeigt die Aufreinigung von Gephyrin / pET 30a im Vergleich von induzierten und nicht-induzierten Kulturen.

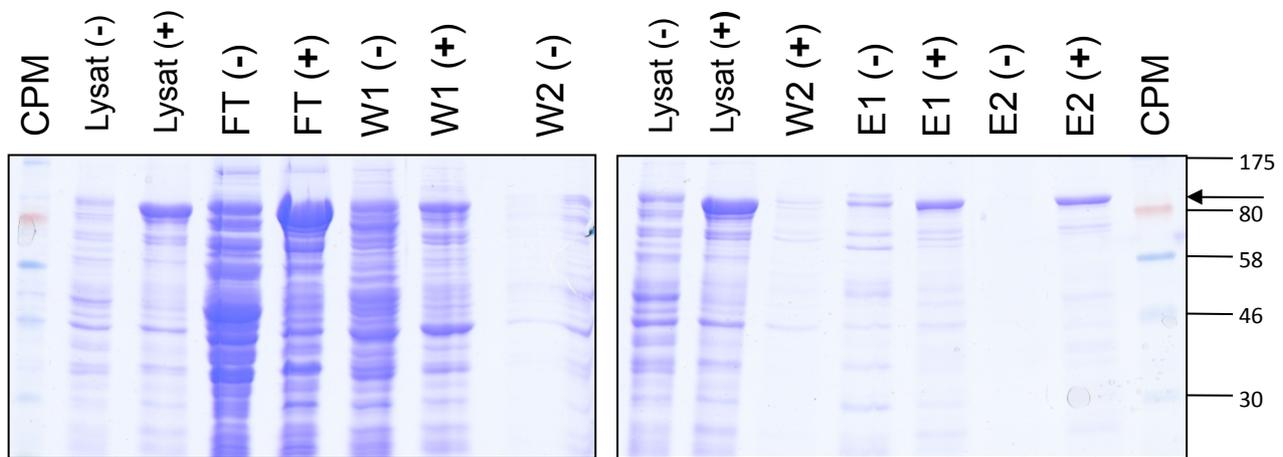


Abb. 5.6. Aufreinigung von Gephyrin / pET 30a mittels Ni-NTA-Agarose im Batch-Verfahren, PAA-Gele mit Coomassie gefärbt. Legende: (-): nicht-induzierter Klon, (+): induzierter Klon, FT: Flowthrough, W1 / 2: Waschschrift 1 / 2, E1 / 2: Elutionsschritt 1 / 2.

Als Kontrolle wurde der gleiche Versuch noch mit Gephyrin / pET 21a durchgeführt, das zusätzlich einen T7-Tag beinhaltet (Abb. 5.7).

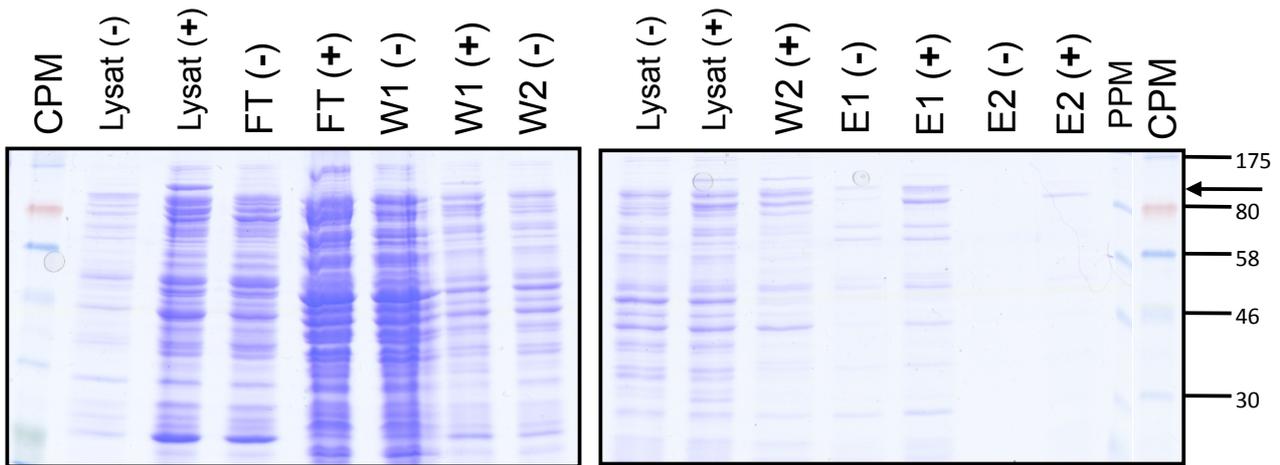


Abb. 5.7. Aufreinigung von Gephyrin / pET 21a mittels Ni-NTA-Agarose im Batch-Verfahren, PAA-Gele nach PAGE mit Coomassie gefärbt. Legende: (-): nicht-induzierter Klon, (+): induzierter Klon, FT: Flowthrough, W1 / 2: Waschschrift 1 / 2, E1 / 2: Elutionsschrift 1 / 2.

Um eine Bestätigung für das tatsächliche Vorliegen von Gephyrin zu bekommen, wurden diese Gele ebenfalls geblottet und mit einem monoklonalen Maus-Anti-Gephyrin-Antikörper und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (gam-Cy5) sichtbar gemacht (Abb. 5.8).

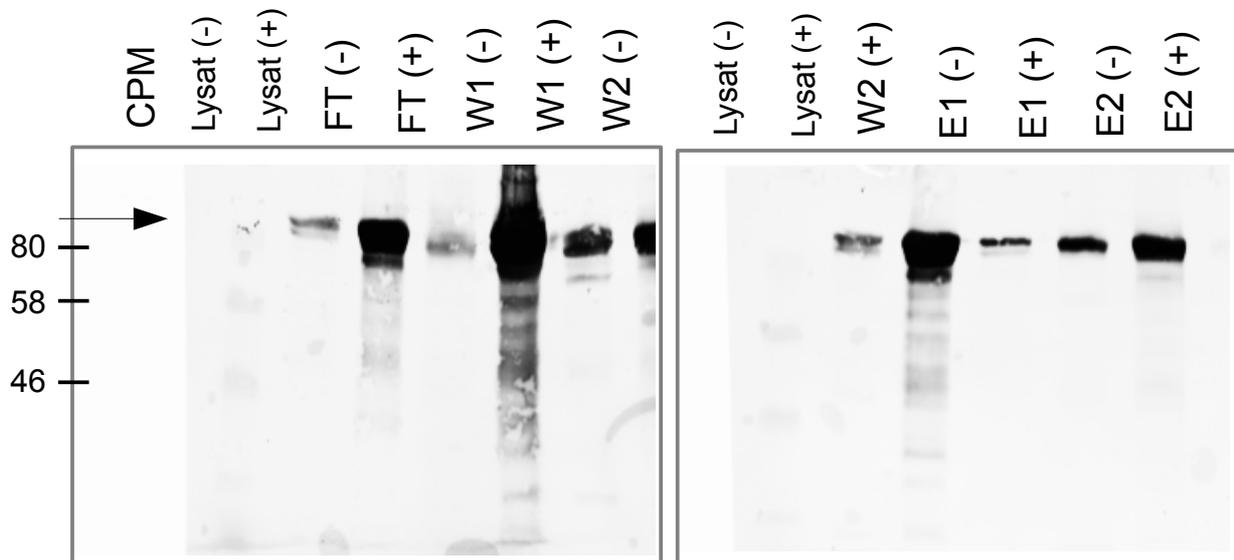


Abb. 5.8. Westernblot von Gephyrin / pET 30a, Primärantikörper Maus-Anti-Gephyrin (1:200), als Sekundärantikörper wurde mit gam-Cy5 gearbeitet. Der Pfeil deutet auf die zu erwartende Bande des Gephyrins bei 93 kDa. Legende: (-): nicht-induzierter Klon, (+): induzierter Klon, FT: Flowthrough, W1 / 2: Waschschrift 1 / 2, E1 / 2: Elutionsschrift 1 / 2. Auffällig ist die dicke Bande im Flowthrough, was für eine Überschreitung der Bindekapazität der Beads spricht.

Das Protein aus dem pET 21a / Gephyrin-Konstrukt wurde ebenfalls mit der NiNTA-Agarose-Batch-Säule nach dem gleichen Verfahren aufgetrennt und wie oben beschrieben geblottet und markiert (Abb. 5.9).

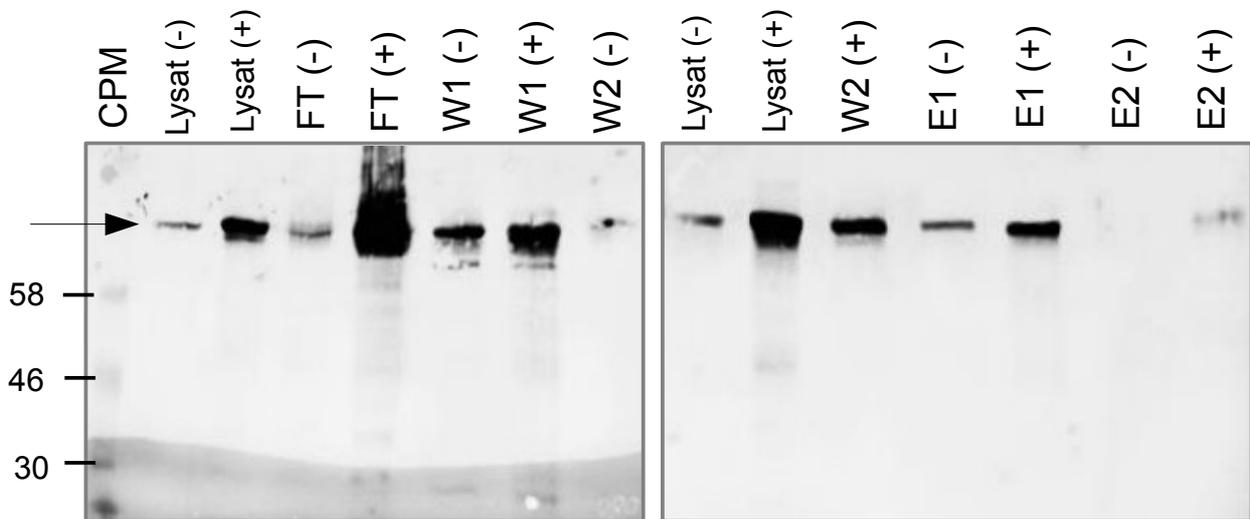


Abb. 5.9. Westernblot von Gephyrin / pET 21 a. Die Antikörper sind, analog zur Abbildung 5.8, Maus-Anti-Gephyrin als Primär-, und gam Cy5 als Sekundärantikörper (beides 1:200 verdünnt). Der Pfeil markiert die Bande von Gephyrin bei 93 kDa. Legende: (-): nicht-induzierter Klon, (+): induzierter Klon, FT: Flowthrough, W1 / 2: Waschschrift 1 / 2, E1 / 2: Elutionsschrift 1 / 2.

5.1.4 Auftrennung der Lysate mittels FPLC

Für die Auftrennung mittels Durchfluss-Chromatographie wurde die Ni-NTA-Agarose-Säule an das FPLC-Gerät angeschlossen. Die gleichzeitige Aufzeichnung eines Absorptionsdiagramms erlaubt eine zusätzliche Unterteilung einzelner Phasen der Elution (Abb. 5.10).

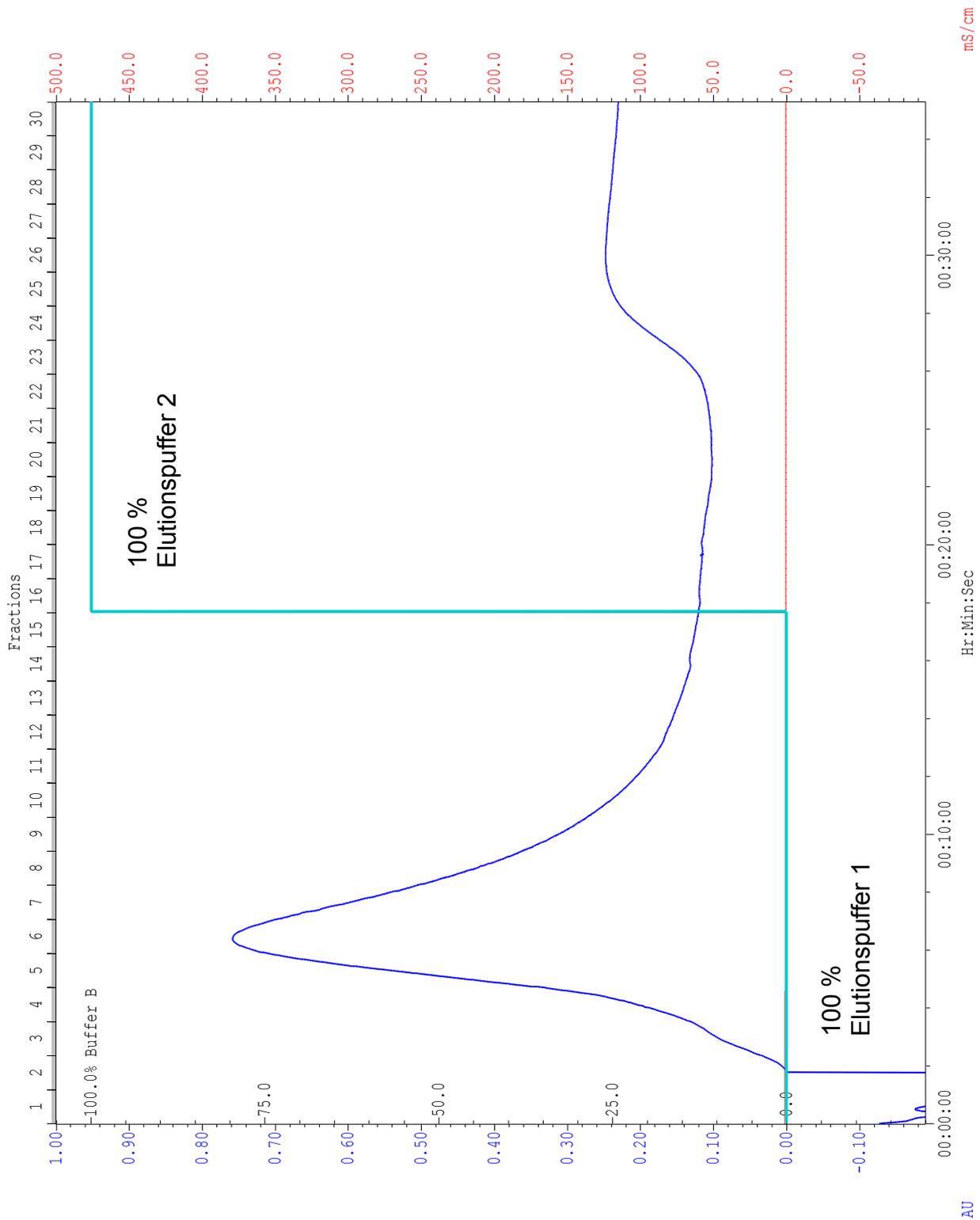


Abb. 5.10. Absorptionsdiagramm einer Elution von an Ni-NTA-Agarose gebundenem Gephyrin / pET 30a. Als hellblaue Stufe ist in das Diagramm die Konzentration des Elutionspuffers 2 eingezeichnet, der reziprok zum Elutionspuffer 1 vorlag. Die blaue Kurve entspricht der gemessenen Absorption der eluierten Lösung und damit dem Anteil an enthaltenem Protein.

Die Abbildung 5.10 zeigt, dass ein Wechsel des Elutionspuffers zu keinem erneuten Anstieg der Absorption führt. Dieses Ergebnis ist kongruent zum Resultat der Abbildungen 5.8 und 5.9, die in den Spuren des zweiten Elutionsschritts keine deutliche Bande für Gephyrin mehr erkennen lassen. Deshalb wurden im Folgenden auch nur die gesammelten Fraktionen mit Absorptionsanstieg im Elutionsdiagramm auf PAA-Gele aufgetragen und getrennt. Die Coomassie-Färbung brachte folgendes Ergebnis (Abb. 5.11):

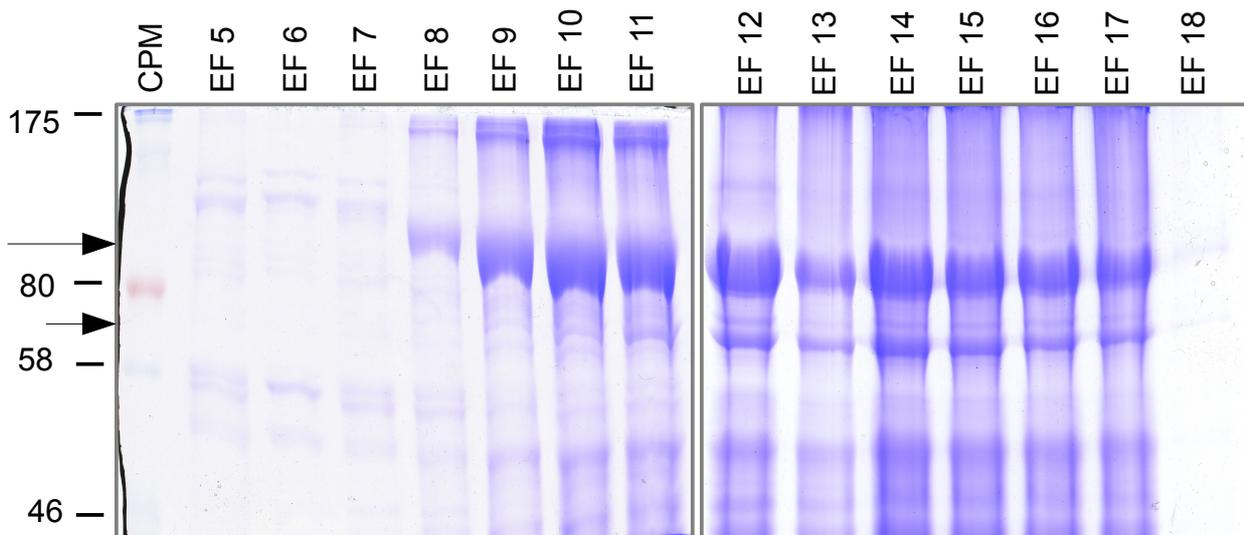


Abb 5.11. Auftrennung der eluierten Fraktionen aus dem FPLC-Lauf. Man sieht eine deutliche Bande bei der für Gephyrin erwarteten Höhe von 93 kDa in den Fraktionen EF 8 bis EF 17 (oberer, langer Pfeil). Das Maximum der Intensität findet sich in EF 12. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Fraktionsnummern im Elutionsdiagramm nicht mit den Nummern der gesammelten Fraktionen übereinstimmen. Diese „Verschiebung“ lässt sich mit den in den Schläuchen der Anlage enthaltenen Volumina erklären. Außerdem ist eine zweite deutliche Bande bei ca. 70 kDa zu sehen. EF: Elutionsfraktion.

5.1.5 Aufreinigung mittels verschiedener Detergenzien

Die bisherigen Versuche konnten zeigen, dass die klonierten Konstrukte die Gephyrin-DNA zwar gut exprimieren, eine einfache Chromatographie über NiNTA-Agarose aber keine ausreichende Aufreinigung bietet. Deshalb wurde versucht, die Reinheit des Proteins durch Waschen mit verschiedenen konzentrierten KCl-Puffern oder mittels Detergenzien zu erhöhen.

KCl-Puffer wurden in den Konzentrationen 0,5 M und 1 M verwendet. Durch wiederholtes Zugeben von Puffer und Abzentrifugieren wurden die mit Protein beladenen Beads ge-

waschen. Dann wurden je 10 µl der Beads und 20 µl der Waschüberstände auf 9%-PAA-Gele aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (Abb. 5.12):

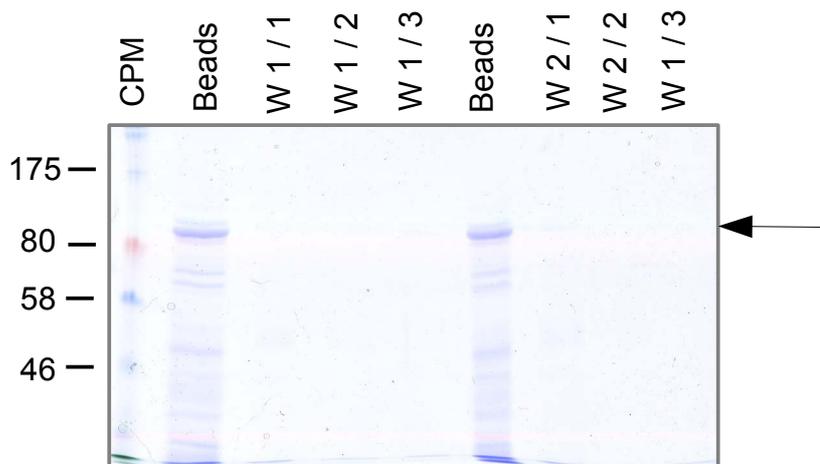


Abb. 5.12. Aufgetragen sind links die Schritte mit 0,5 M (Spur 2-5) und rechts mit 1 M KCl-Puffer (Spur 6-9). Die abgebildeten Beads wurden ebenfalls mitgewaschen und dann aufgetragen. Die Gephyrin-Bande ist an den Beads weiterhin gut zu erkennen (Pfeil), ein wesentlicher Effekt der Waschschrirte konnte nicht nachgewiesen werden.

Für die Aufreinigung mit Detergenzien wurde mit verschiedenen Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen experimentiert. Von den nach dreimaligem Waschen in Detergenzienlösung erhaltenen Beads wurden je 10 µl zum Vergleich nebeneinander auf 9%ige PAA-Gele aufgetragen und mit Coomassie gefärbt (Abb. 5.13):

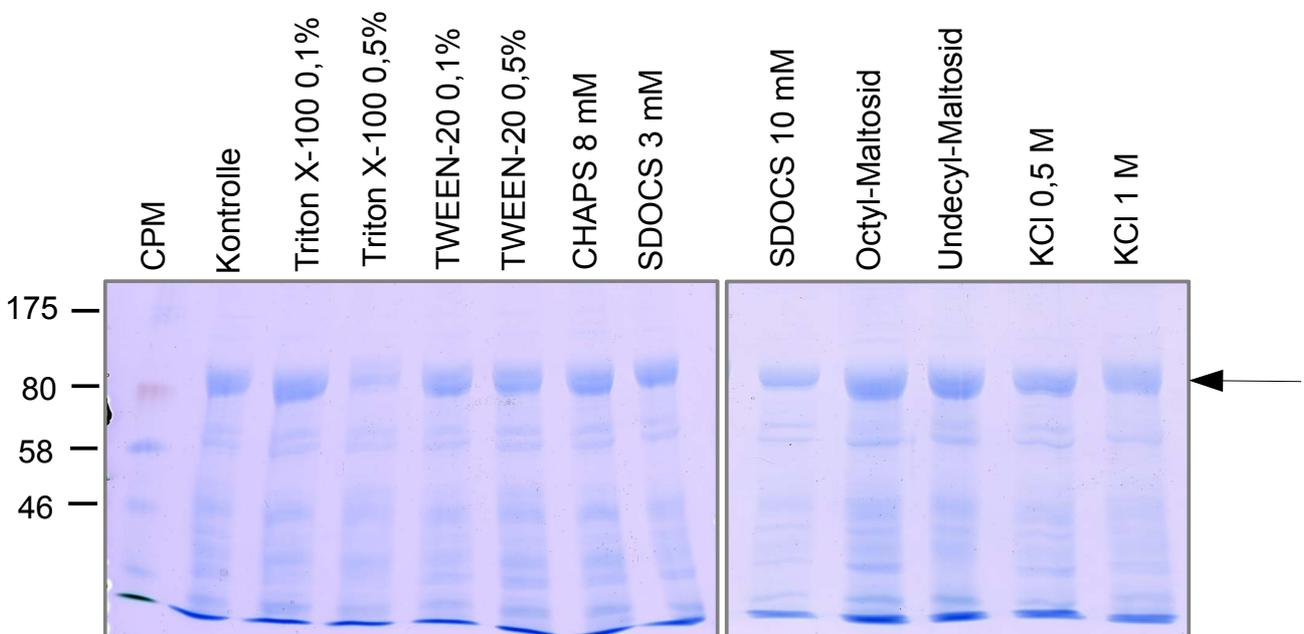


Abb. 5.12. Die Beads sind nach Waschen mit verschiedenen Detergenzien dargestellt. Die Kontrolle (Spur 2) besteht aus mit Waschlösung 1 gewaschenen Beads. Neben der dicken Bande für Gephyrin (Pfeil) sind in allen Spuren in ihrer Größe ähnliche, kleinere Banden zu sehen.

Insgesamt ist auch bei diesem Versuch kein klarer Effekt durch die zusätzlichen Waschschriffe zu erkennen. Die schwächer kontrastierten Spuren bei Triton X-100 0,5% und SDOCS 10 mM sind vermutlich auf Gesamtverluste beim Waschen zurückzuführen.

5.1.6 Proteinreinigung mit ResourceQ-Säulen

Für die weitere Aufreinigung des Gephyrins wurde die Ionenaustausch-Chromatographie mit Q-Sepharose verwendet. Für kleine Probenmengen wurde eine 1 ml-Säule und für größere Mengen eine 6 ml-Säule verwendet.

Die hier eingesetzten Puffer unterschieden sich in ihrem Salzgehalt. Während der Niedrigsalzpuffer 50 mM NaCl enthielt, war im Hochsalzpuffer 1 M NaCl vorhanden. Die damit verbundene Änderung der Ionenstärke des Puffers führt zur Konkurrenz zwischen Protein- und Pufferionen um die Bindungsstellen des Säulenmaterials und damit zur Abtrennung der gebundenen Proteine. Allmähliches Steigern des Ionengradienten ermöglicht die fraktionierte Auftrennung des gebundenen Proteingemischs.

Als Ausgangssubstanz wurden die Protein-Fractionen an die ResourceQ-Säule gebunden, die zuvor via Ni-NTA-Agarose getrennt und mit dem Elutionspuffer 1 eluiert worden waren. An der HPLC wurde die Säule zunächst über 5 min mit Niedrigsalzpuffer gespült, um unspezifisch gebundene Protein-Verunreinigungen zu minimieren. Der Hochsalzpuffer wurde kontinuierlich über 10 min auf 50% der Gesamtpuffermenge angehoben. Anschließend wurde die Konzentration des Hochsalzpuffers auf 100% angehoben und damit über 3 min weitergearbeitet. Das zugehörige Elutionsdiagramm ist nachfolgend dargestellt (Abb. 5.13).



Abb. 5.13. Elutionsdiagramm für eine ResourceQ-Säule mit 1 ml Volumen an der HPLC. Die grüne Linie gibt den Anteil des Hochsalzpuffers an der Gesamtpuffermenge an. Fraktionen wurden jeweils über 1 min gesammelt, beginnend nach 5 min (entspricht dem Beginn des Gradienten). Zu erkennen sind verschiedene Absorptionsspitzen im Verlauf des Puffergradienten.

Der von den gesammelten Fraktionen durchgeführte Westernblot als auch die Coomassie-Färbung zeigten nur schwache Banden (hier nicht abgebildet), weshalb eine sensitivere AgNO₃-Färbung durchgeführt wurde (Abb. 5.14).

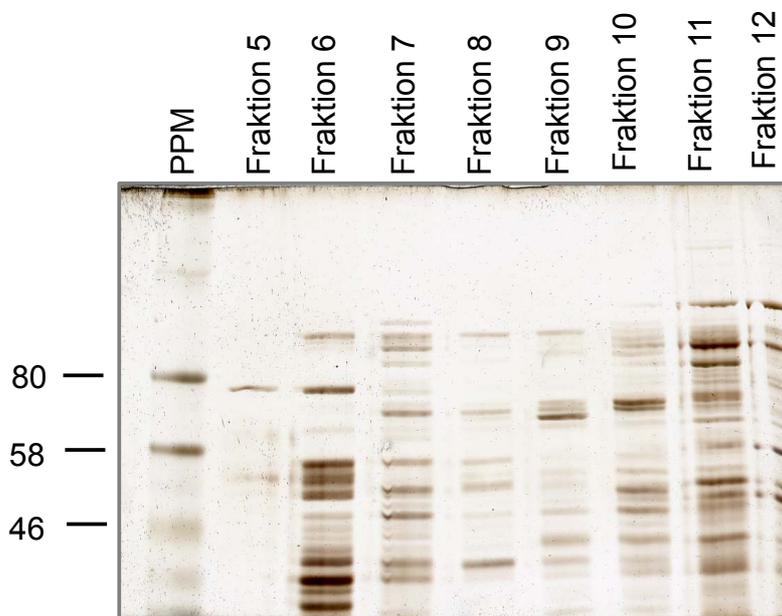


Abb. 5.14. Silberfärbung der aus dem HPLC-Lauf gewonnenen Fraktionen. Statt einer deutlichen Bande sind viele kleine zu beobachten, die sich je nach Fraktion unterscheiden. Das überexprimierte Gephyrin ist während der Säulenreinigung verloren gegangen. Die diversen zusätzlichen Banden könnten ein Hinweis auf die Degradation des Proteins sein.

Um mögliche Materialprobleme oder eine zu geringe Proteinmenge auszuschließen, wurde der Versuch mit einer 6 ml ResourceQ-Säule an der FPLC wiederholt. Die Abbildung 5.15 zeigt das dazugehörige Elutionsdiagramm.

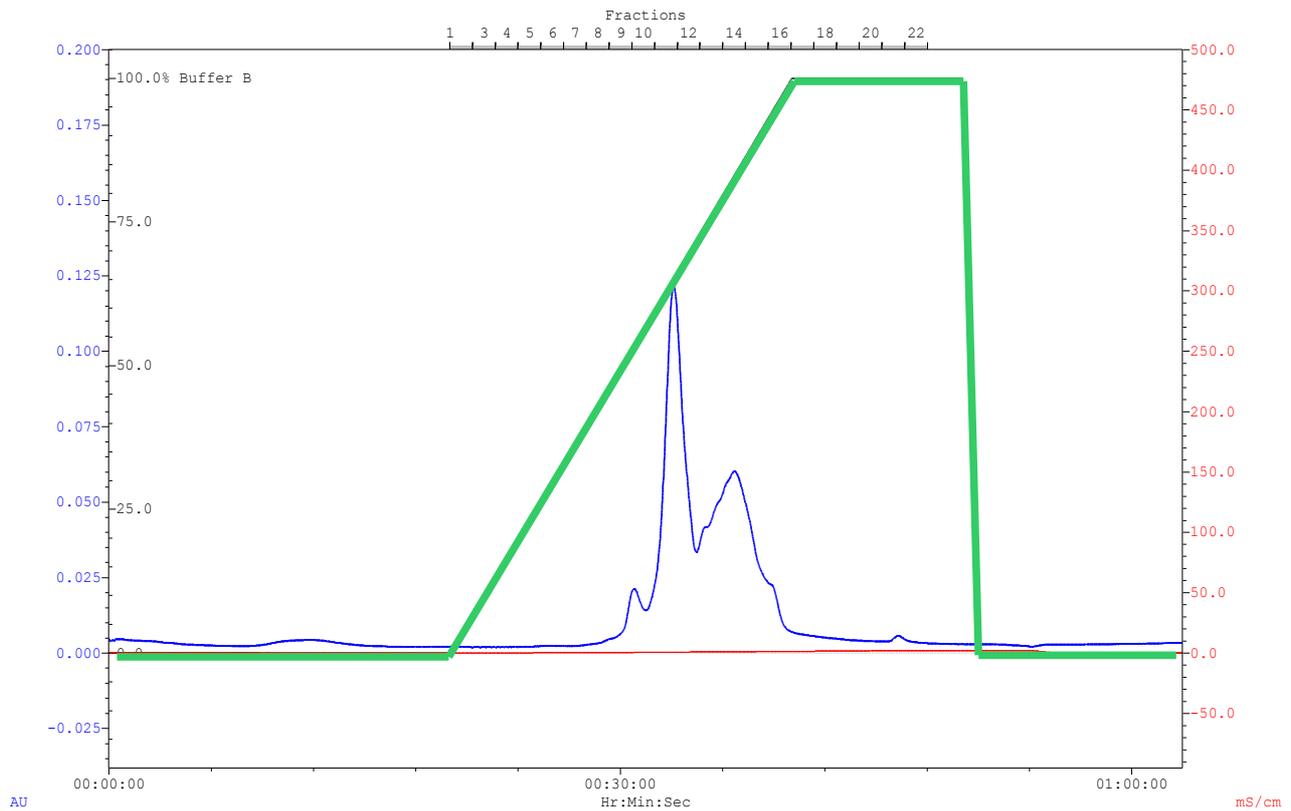


Abb. 5.15. Elutionsdiagramm aus einem FPLC-Lauf mit 6 ml ResourceQ-Säule. In grün ist der Gradient des Hochsalzpuffers eingetragen. Zu erkennen sind wieder verschiedene Absorptionsmaxima (blau).

Die einzelnen Fraktionen wurden auf einer Nitrocellulosemembran mit Amidoblack gefärbt und bei positivem Nachweis von Proteinen mittels PAGE aufgetrennt und mit AgNO_3 gefärbt (Abb. 5.16).

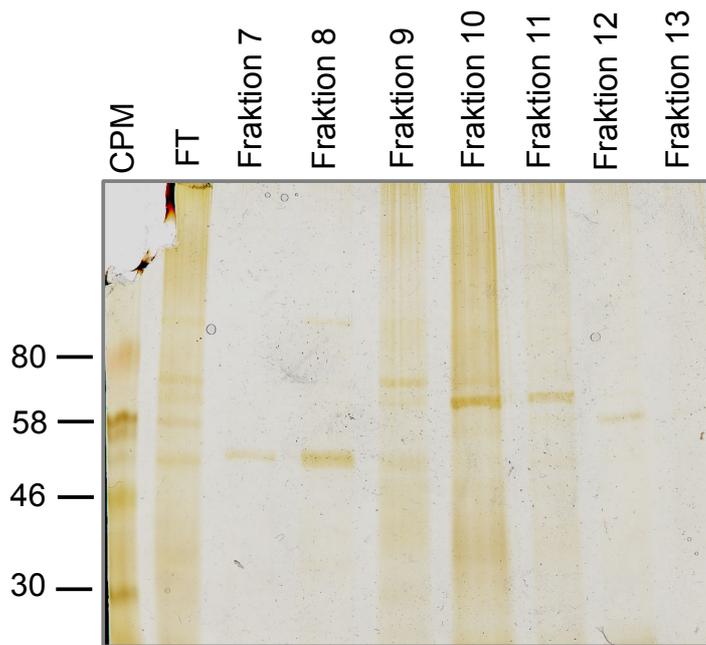


Abb. 5.15. Silberfärbung des FPLC-Laufs mit ResourceQ-Säule 6 ml. Hier sind nur ganz vereinzelte schwache Banden zu erkennen, die für Gephyrin nicht die richtige Größe haben. Eine Überexpression einer bestimmten Bande ist nicht zu sehen.

Auf analogen Westernblots waren mit Gephyrin-Antikörper keine Banden nachweisbar, was auf einen Verlust des Proteins während der Aufreinigung hindeutet. Das könnte in Zusammenhang mit dem Auftreten kleinerer Banden ein Hinweis für die Degradation von Gephyrin sein.

In länger gelagerten Protein-Suspensionen, die nach der Reinigung mit Ni-NTA-Agarose entstanden waren, setzten sich nach einiger Zeit Proteinpellets ab. Diese wurden im gleichen Volumen SDS gekocht, mit PAGE und Westernblot fixiert und mit Maus-Anti-Gephyrin-Antikörper gefärbt (Abb. 5.16).

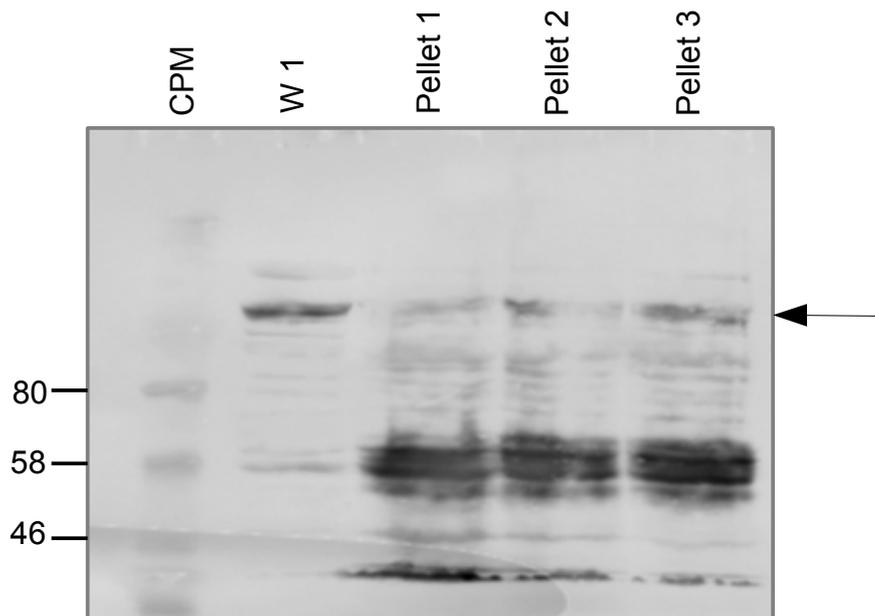


Abb. 5.16. Westernblot der Proteinpellets, Gephyrin-AK. Aufgetragen sind drei Pellets aus verschiedenen Suspensionen. Die Positivkontrolle ist der Überstand nach dem ersten Waschschrift der Ni-NTA-Säule im Batch-Verfahren. Der Pfeil zeigt die zu erwartende Größe von Gephyrin bei 93 kDa an. Die Bande von Gephyrin ist in den Pellets nur noch undeutlich vorhanden, dafür hebt sich eine starke Bande bei 58 kDa ab, an die der Gephyrin-AK bindet.

Aus den durchgeführten Aufreinigungsversuchen lässt sich zusammenfassen, dass die deutlichsten Banden für Gephyrin im Batch-Verfahren mit Ni-NTA-Agarose erhalten wurden. Die anschließenden Reinigungsschritte zeigten keine eindeutigen Banden mehr. Das könnte an einer mangelnden Bindung des Gephyrin am Säulenmaterial liegen oder an einer schnellen Degradation des Proteins, was mit Abbildung 5.16 vereinbar ist.

5.2 Expression von Glycinrezeptor β -Transkripten in Zelllinien

5.2.1 Verwendete Zelllinien

Für Expressions-Untersuchungen wurden verschiedene Tumorzelllinien, HEK 293-Zellen und Astrozyten verwendet. Die Auswahl der Zelltypen orientierte sich an den Veröffentlichungen von Neumann et al. 2005 und Kreisler et al. 2010 [69, 49]. Bei den Tumorzelllinien lag der Schwerpunkt auf SCLC-Linien, die sich in der Transkription von Glycinrezeptor-Genen unterscheiden. Die Zelllinie H 69 zeigte ein starkes Vorhandensein von *GLRB*- und *GLRA1*-mRNA, während in CRL 2195 mäßig bzw. in H 146 und in SW 2 kaum Transkripte von *GLRB* nachweisbar waren. Diese Zelllinien besaßen keine Transkripte von *GLRA1*. Als Negativkontrolle wurde H 128 mitgeführt, das auf mRNA-Ebene weder *GLRA1* noch *GLRB* enthielt. Für die Glycinrezeptor- β -Untereinheit wurden Maus-Astrozyten und Ratten-Hippocampus-Neurone präpariert und in Kultur gebracht. Als Positivkontrolle dienten HEK293-Zellen, die besonders leicht zu transfizieren sind und somit Kontrollzelllinie der Wahl sind.

Um einen Eindruck über die verschiedenen Wachstumsmuster zu vermitteln, sind im Folgenden verschiedene Vergrößerungen der einzelnen Zelltypen abgebildet.

H 69

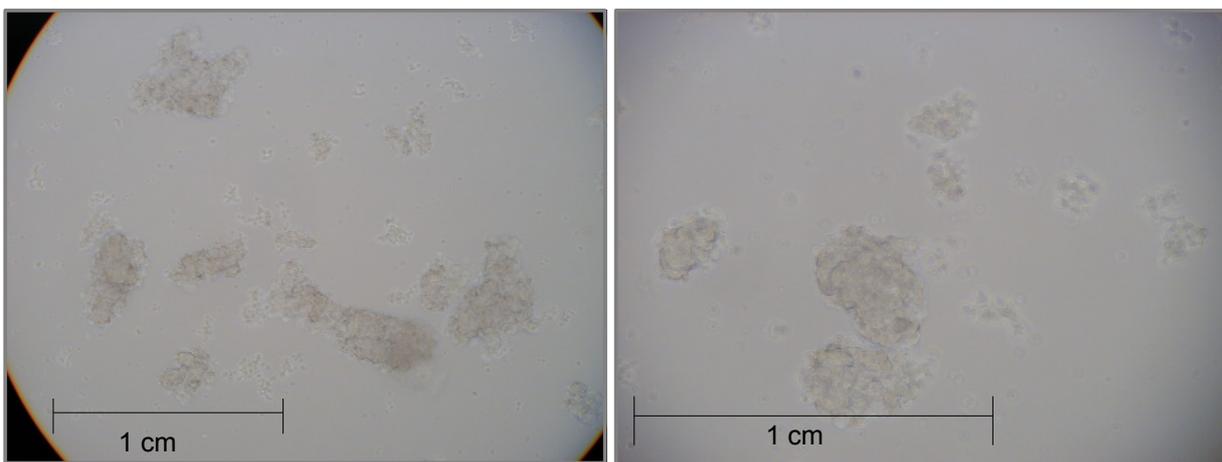


Abb. 5.17. H 69-SCLC-Tumorzelllinie. Bei allen hier verwendeten SCLC-Zelllinien handelt es sich um Suspensionszellen, die in RPMI-Vollmedium kultiviert wurden, zu dem zum besseren Wachstum nicht-essentielle Aminosäuren zugesetzt wurden. H 69-Zellen wuchsen eher langsam in mittleren bis größeren Haufen, wirken, als Einzelzelle betrachtet, morphologisch klein und kompakt und wurden einmal pro Woche umgesetzt.

H 128

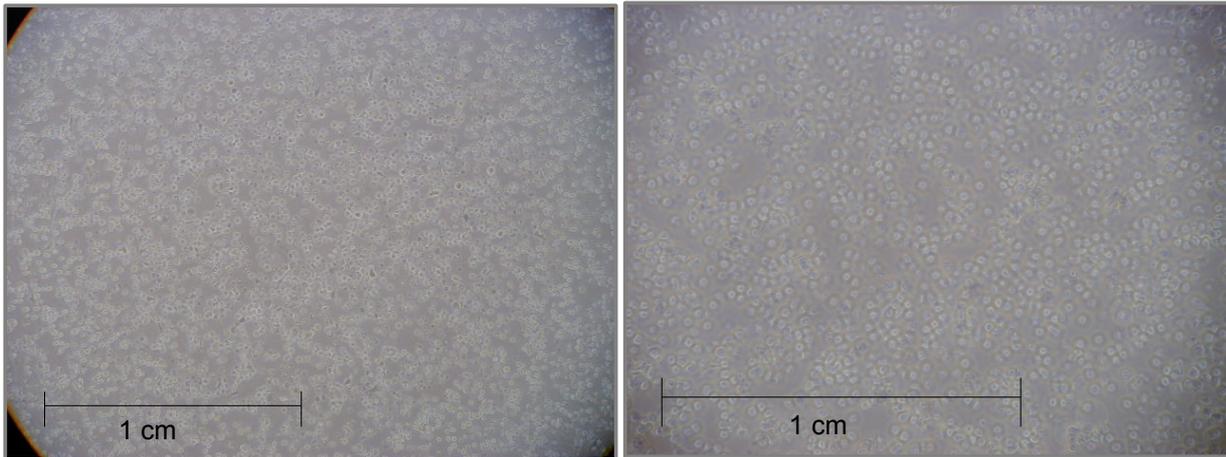


Abb. 5.18. H 128-SCLC-Tumorzelllinie. H 128-Zellen sind Suspensionszellen, die als einzelne, blasig imponierende Zellen frei im Medium schwimmen. Sie wiesen die höchste Wachstumsrate auf und wurden alle zwei bis drei Tage gesplittet.

SW 2

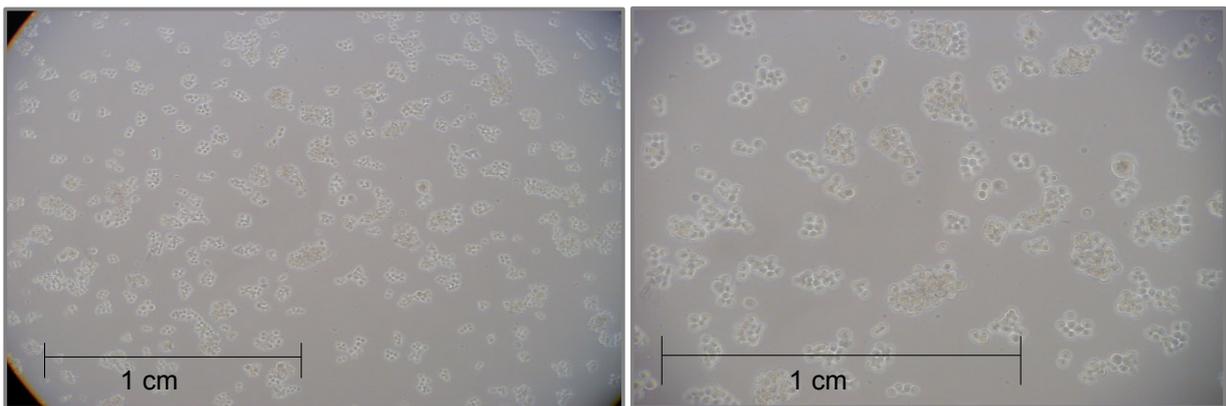


Abb. 5.19. SW 2-SCLC-Tumorzelllinie. Die Zellen wachsen in kleineren Haufen mittelschnell und konnten ca. alle 5 Tage neu ausgesät werden.

CRL 2195

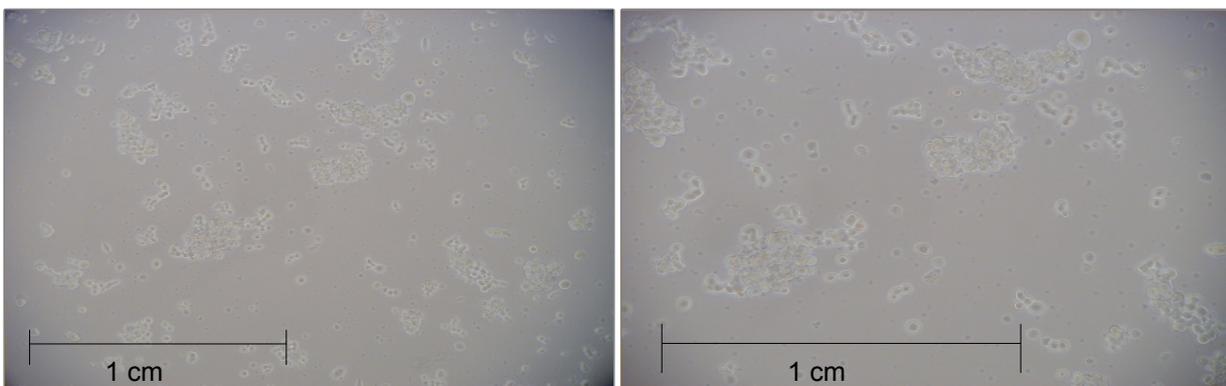


Abb. 5.20. CRL-SCLC-Tumorzelllinie. Die Zellen wachsen in mittelgroßen Haufen.

Maus-Astrozyten

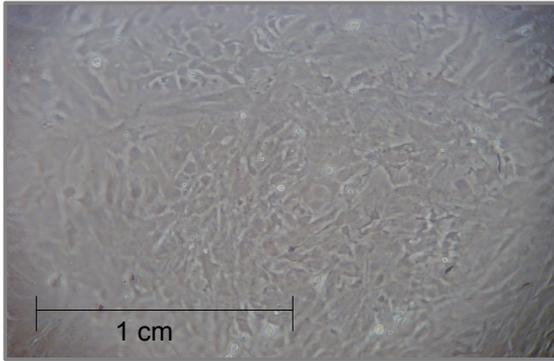


Abb. 5.21. Maus-Astrozyten aus C57BL6J-Wildtypmäusen. In Maus-Astrozyten wurde insbesondere die Spleißvariante $\beta\Delta 7$ nachgewiesen (vgl. [71]), die aber das Gephyrinbindemotiv enthält und deshalb bei Fishing-Experimenten an einer Säule als Kontrolle mitgeführt werden kann. Die Gehirne stammten von sechs Tagen alten Mäusen, die sich zum Zeitpunkt der hier gezeigten Aufnahme seit fünf Tagen in Kultur befanden und noch nicht umgesetzt worden waren.

HEK293-Zellen

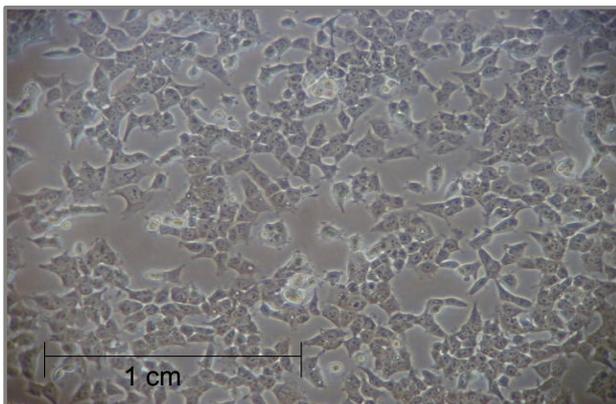


Abb. 5.22. HEK293-Zellen. Sie wurden mitgeführt, um sie im jeweils transfizierten Zustand als Positivkontrolle zu verwenden.

5.2.2 Nachweis verschiedener mRNAs in den Zelllinien

Zunächst wurde mit der Phenol-Chloroform-Methode die RNA verschiedener Zelllinien gewonnen und durch RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Eine PCR mit Primern, die für eine bestimmte Region spezifisch sind, bestätigte das Vorliegen der entsprechenden mRNA und diente somit als Transkriptionsnachweis.

Durch Primer für β -Aktin (#127 / #128), das in allen Zellen vorhanden ist, konnte der Erfolg der reversen Transkription getestet werden. Diese Primer amplifizieren ein ca. 700 bp großes DNA-Fragment (siehe Abb. 5.23, 5.24, 5.25). Dieser PCR-Schritt wurde für alle verwendeten Zelllinien durchgeführt, um für darauffolgende Experimente einen sicheren Nachweis über die gelungene reverse Transkription zu haben. Die erhaltenen Produkte wurden auf 1% Agarose-Gelen aufgetrennt.

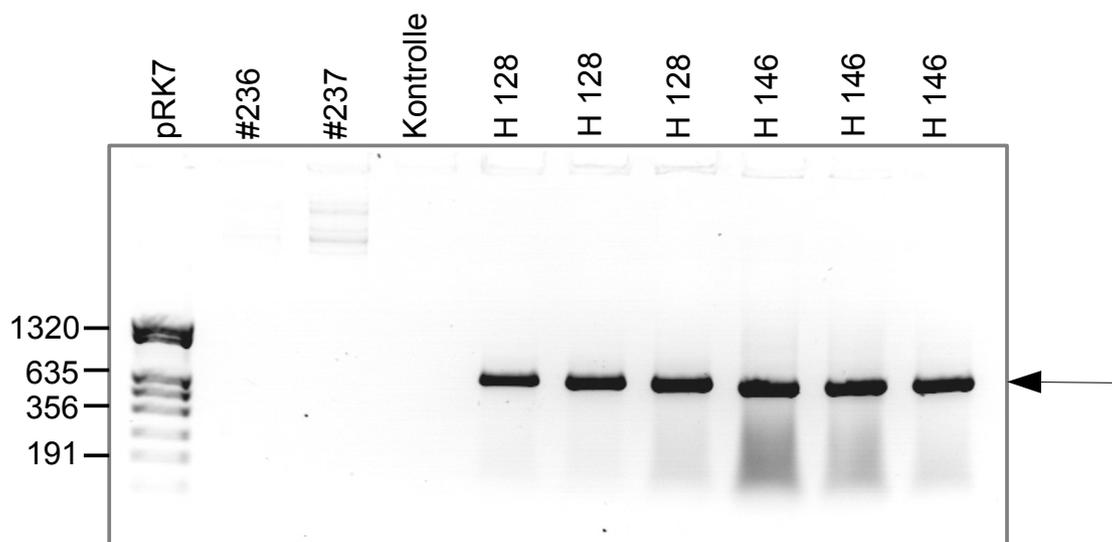


Abb. 5.23. PCR mit β -Aktin-Primern für die Tumorzelllinien H 128 und H 146. #236 und #237 Plasmide, die die cDNA der β -Untereinheit und der Spleißvariante $\beta\Delta 7$ des Glycinrezeptors. Sie wurden trotz zu erwartenden negativen Ergebnisses mitamplifiziert, um den Unterschied zu der anschließenden PCR mit Glycinrezeptor-Primern zu verdeutlichen. Als Kontrolle wurde statt cDNA die gleiche Menge an Wasser eingesetzt. Der Pfeil markiert die erhaltenen Banden, die auf der erwarteten Größe von ca. 700 bp liegen.

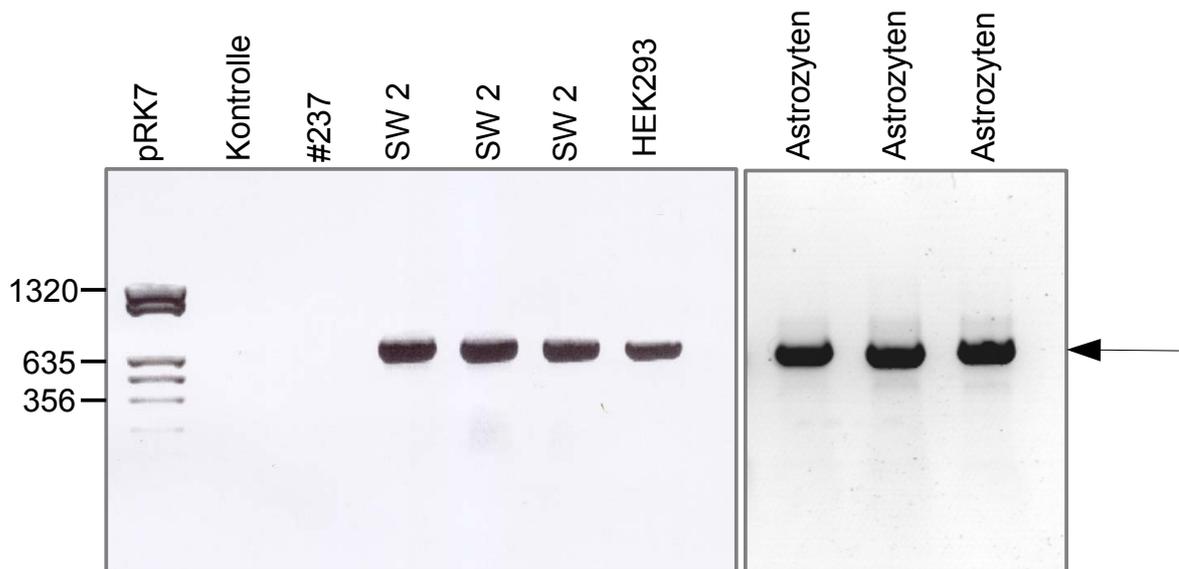


Abb. 5.24. PCR mit β -Aktin-Primern (#127 / #128) für cDNA aus den Tumorzelllinien SW 2, HEK293-Zellen sowie aus neonatalen Mausastrozyten. Bei der Kontrolle handelt es sich um eine mit Wasser statt DNA durchgeführte Amplifikation. Der Pfeil markiert die dargestellten Banden bei einer Größe von 700 bp.

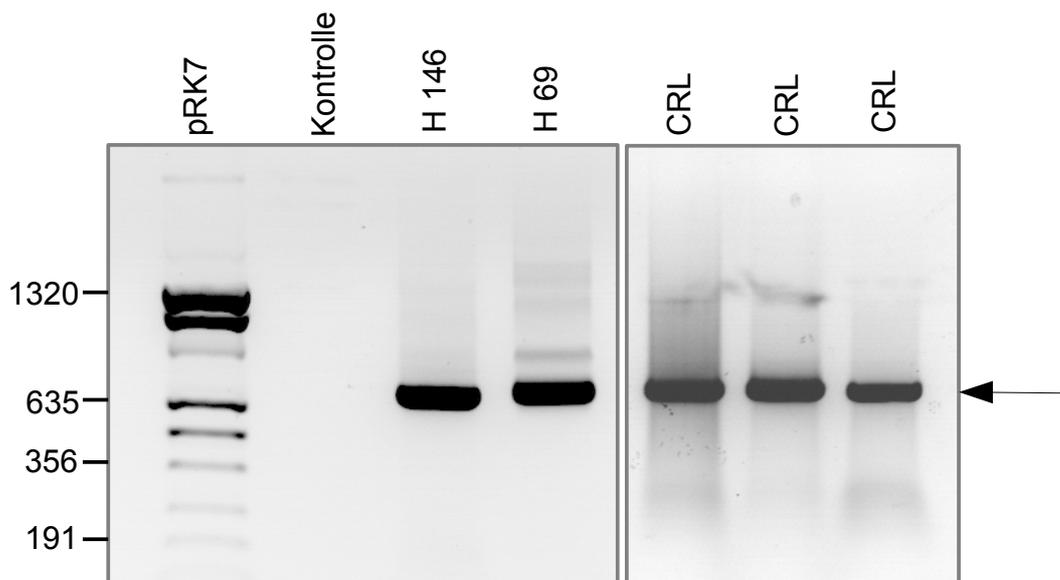


Abb. 5.25. PCR mit β -Aktin-Primern (#127 / #128) für die cDNA aus den Tumorzelllinien H 146, H 69 und CRL. Ein mit Wasser durchgeführter Ansatz ist als Kontrolle mit abgebildet. Der Pfeil befindet sich auf der vorausgesagten Höhe von 700 bp.

Alle Amplifikationen von β -Aktin waren entsprechend den oben gezeigten Abbildungen erfolgreich und die cDNA konnte somit für weitere Experimente verwendet werden.

Im nächsten Schritt wurden von den RT-PCRs Amplifikationen für die β -Untereinheit des Glycinrezeptors mit den Primern #153 / #49 durchgeführt. Die Primer liegen vor bzw. hinter den Exonen, so dass auf diese Weise verschiedene Spleißvarianten, falls vorhanden, detektiert werden können. Die Produkte wurden auf 1%-Agarose-Gelen analysiert.

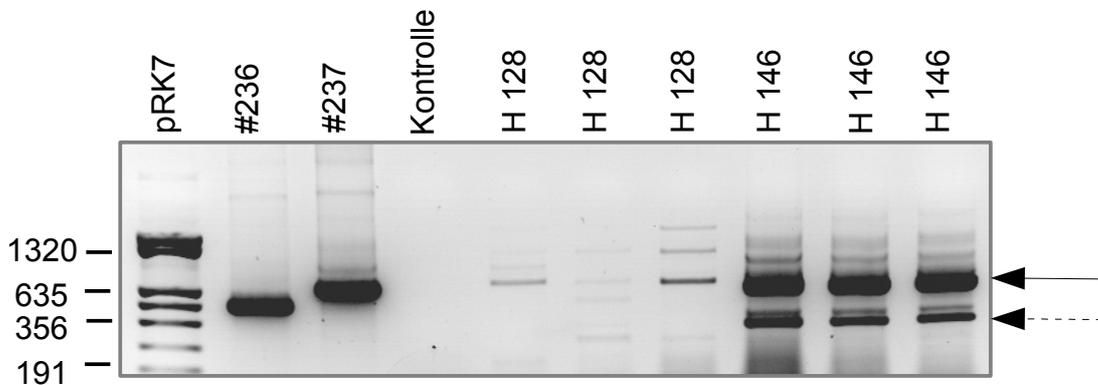


Abb. 5.26. PCR mit β -Primern für die Tumorzelllinien H 128 und H 146. Die Vektoren #236 ($\beta\Delta 7$) und #237 (β) sind als Positivkontrollen mitgeführt, die Negativkontrolle besteht aus dem gleichen Ansatz mit Wasser statt cDNA. Der durchgehende Pfeil deutet auf die größere, der gestrichelte Pfeil auf die kleinere bei der Amplifikation erhaltene Bande.

Wie in Abbildung 5.26 zu erkennen, ließen sich aus den Zellen der Linie H 146 neben mehreren kleineren Banden auch zwei deutlich stärkere Banden amplifizieren (siehe Pfeile in der Abbildung). Dabei befindet sich die größere Bande anscheinend auf der gleichen Höhe wie die Vektor-DNA #237 (entsprechend der β -Untereinheit, 606 bp), während die kleinere Bande kleiner als $\beta\Delta 7$ (die 456 bp groß ist) imponiert. Für H 128 ist bestenfalls die größere dieser Banden auszumachen.

Die gleichen Schritte wurden auch für die Zelllinien SW 2, CRL 2195, H 69 sowie HEK293-Zellen und neonatale Astrozyten durchgeführt (Abb. 5.27 und 5.28).

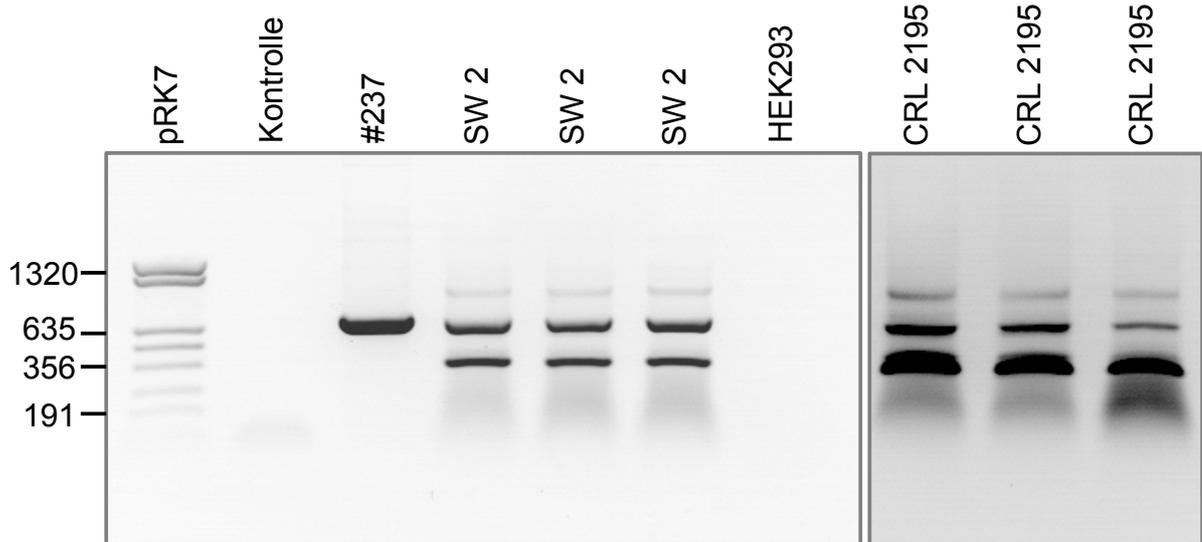


Abb. 5.27. PCR mit β -Primern für die Tumorzelllinien SW 2, CRL 2195 und HEK293-Zellen. Der Kontrolllauf wurde mit Wasser durchgeführt.

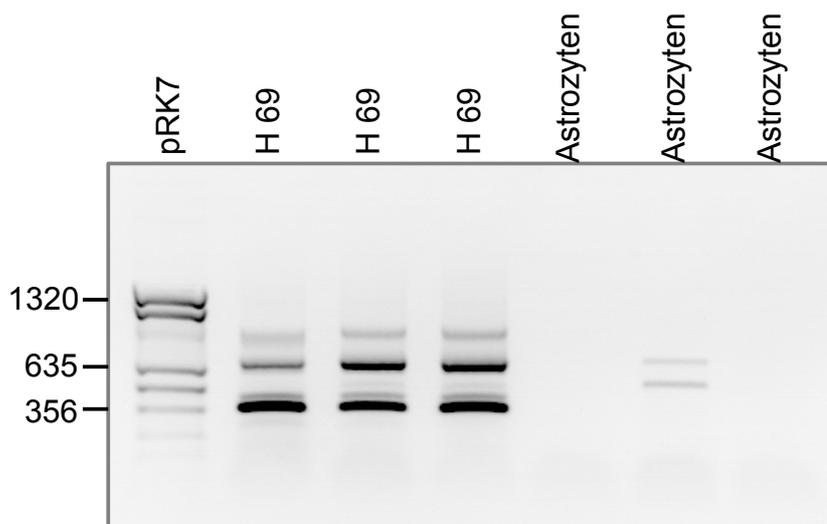


Abb. 5.28. PCR mit β -Primern für die Tumorzelllinie H 69 und für neonatale Maus-Astrozyten.

In beiden Abbildungen sind bei verschiedenen Zellarten wiederum ähnliche Banden zu erkennen wie in den H 146 Zellen in Abb. 5.26. Auffallend ist, dass die Breite der einzelnen Banden zwischen den Zellarten wechselt. Das könnte ein Hinweis auf unterschiedlich starkes Vorliegen der jeweiligen mRNAs sein. Während sich in HEK293-Zellen keine Banden fanden (vgl. Abb. 5.27), sind in Abb. 5.28 in Astrozyten ganz schwache Banden zu erkennen. Zur besseren Darstellung ist die mittlere Spur der Astrozyten aus Abb. 5.28 noch einmal verstärkt kontrastiert in Abb. 5.29 dargestellt.

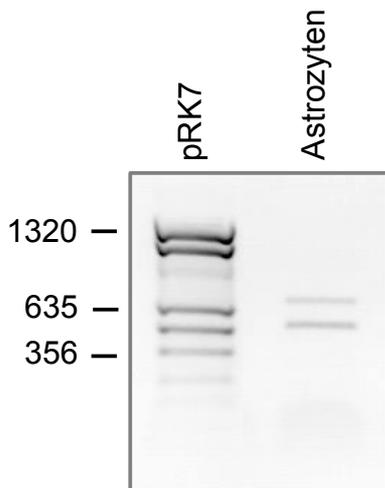


Abb. 5.29. Verstärkte Kontrastierung der mittleren Astrozytenspur aus Abb. 5.28. Zur besseren Größenorientierung ist der Größenmarker pRK7 mit abgebildet.

Zusammenfassend ergibt sich aus den Abbildungen 5.26 bis 5.29, dass die Tumorzelllinien alle in unterschiedlichem Ausmaß mRNA für die β -Untereinheit des Glycinrezeptors enthalten. Neben der alle Exone enthaltenden Form muss jedoch noch andere mRNA vorhanden sein, die von den Primern #153 / #49 amplifiziert werden kann.

Aus dem Nachweis von β -Transkripten ergibt sich die Frage, ob auch Transkripte für das Bindeprotein Gephyrin in diesen Zellen gefunden werden kann. Möglich wäre dann auch eine Interaktion zwischen den beiden Bindepartnern. Für spätere Fishing-Experimente könnte das ein wichtiger Ausgangspunkt sein.

Um die Gephyrin-mRNA zu vervielfältigen, wurde mit dem Primerpaar #274 / #275 gearbeitet.

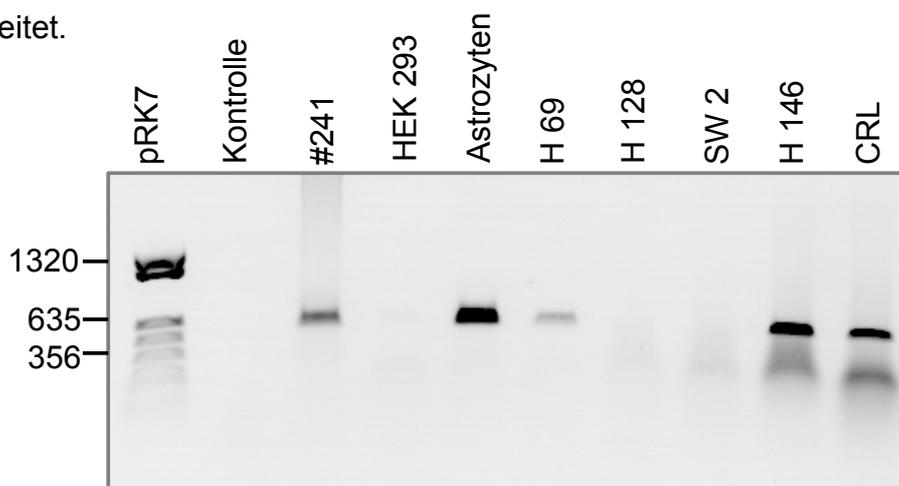


Abb. 5.30. PCR mit Gephyrin-Primern #274 / #275. Das Plasmid #241 (humanes Gephyrin) dient als Positivkontrolle.

Aus Abbildung 5.30 lässt sich erkennen, dass Gephyrin-mRNA in Astrozyten, H69, H 146 und CRL 2195 vorliegen. Diese fehlt in HEK293, H128 und SW 2. Damit ergibt sich kein direkter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von β - und Gephyrintranskripten.

5.2.3 Sequenzierung der unterschiedlichen PCR-Banden der GlyR β -Untereinheit

Bei den PCRs für die β -Untereinheit des Glycinrezeptors wurden mehrere Banden unterschiedlicher Größe identifiziert (s. oben). Diese Banden der Größe ~ 600 bp und ~ 350 bp wurden aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und über einen Kit in Topoklonierungsvektoren kloniert. Die Konstrukte wurden auf Ampicillin-resistenten Agar-Platten bebrütet und Minipräparationen angefertigt. Aus ihnen erfolgte mit M13-Primern (#807 / #795) die Sequenzierung.

Im Folgenden ist für beide Banden je eine Sequenzierung abgebildet (Abb. 5.31 und 5.32), bei denen es sich um Sequenzen des humanen Glycinrezeptors handelt. Die Ergebnisse waren für die jeweilige Bande gleich, unabhängig von der ursprünglichen Tumorzelllinie.

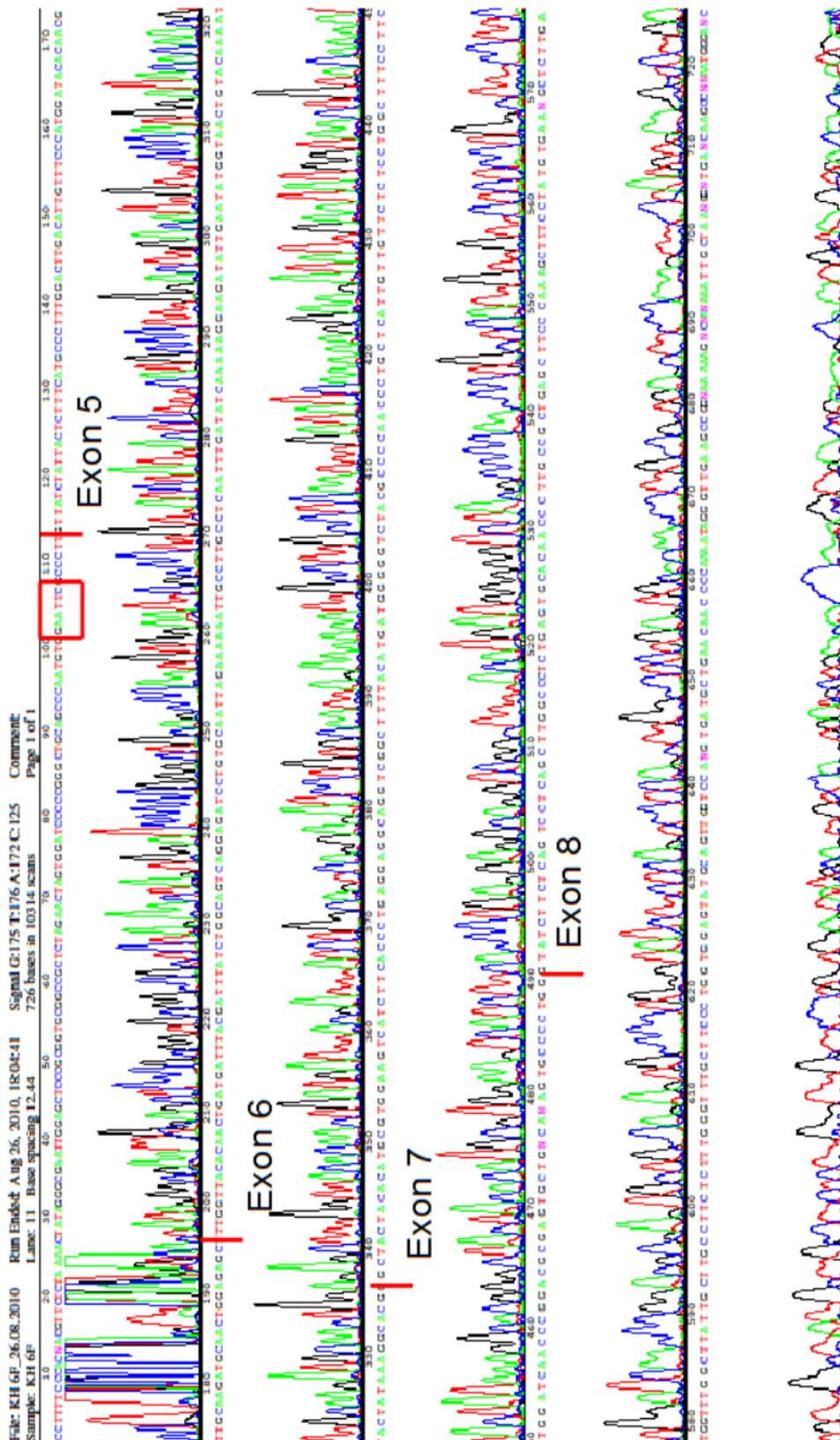


Abb. 5.31. Sequenzierung mit Sense-Primer der ca. 600 bp großen Bande (aus der Zelllinie H146). Es handelt sich um eine humane Sequenz. Eingezeichnet sind die Eco RI-Schnittstelle (roter Rahmen) aus dem TOPO-Klon und die Trennungen zwischen den Exonen 5 bis 8. Analoge Sequenzen ergaben sich für die anderen analysierten Zelllinien und Antisense-Primer.

Aus der Sequenzierung in der Abb. 5.31 wird ersichtlich, dass es sich bei der einen Bande tatsächlich um die korrekt gespleißte Form der GlyR- β -Untereinheit der Größe 606 bp handelt. Bei der Sequenz in Abb. 5.32 folgt auf Exon 7 direkt das Exon 9. Damit handelt es sich um die Spleißvariante $\beta\Delta 8$. Die für diese Variante errechnete Größe von 313 bp korreliert mit der analysierten Größe.

Die genauere Betrachtung der Sequenz von $\beta\Delta 8$ birgt eine erstaunliche Entdeckung: Durch die Anzahl der Nukleotide, die durch das Spleißen wegfallen, kommt es zu einer Leseraster-Verschiebung bei der Translation. Daraus ergibt sich zunächst ein Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Tryptophan und dann das Stopp-Codon TGA, das zum Kettenabbruch führt. Zur besseren Anschaulichkeit, sind die Basen- und Aminosäuresequenz in Abbildung 5.33 gegenüber gestellt.

ATC	AAC	CCG	GAC	GCG	AGT	GCT	GCC	AGA	GTG	CCC	
Ile	Asn	Pro	Asp	Ala	Gly	Ala	Ala	Arg	Val	Pro	
CTG	GGT	TGG	TGA	GAC	CAG	ATG	CAA	AAA	AGT	TTG	
Leu	Gly	Trp	Stopp								
TAC	TTC	TAA	GTC	TGA	TCT	GAG	ATC	TAA	TGA	CTT	CAG
CAT	TGT	TGG	AAG	CTT	ACC	AAG	AGA	TTT			

Abb. 5.33. Sequenz der Basen und Aminosäuren der Spleißvariante $\beta\Delta 8$. Die wesentlichen Änderungen, die durch die Verschiebung zustande kommen, sind rot markiert.

Vergleicht man das so entstehende Protein mit der Topologie der β -Untereinheit, zeigt sich, dass durch den Kettenabbruch in der Transmembrandomäne 2 wesentliche Teile fehlen. So fallen nicht nur die anschließenden Transmembrandomänen 3 und 4 sowie die verbindenden Schleifen weg, sondern auch der Abschnitt, der das Gephyrin-bindende Motiv enthält. Damit kann die Spleißvariante nicht mehr von Gephyrin gebunden und verankert werden. Das Ergebnis ist eine trunkierte Form des Proteins, das den extrazellulären N-Terminus besitzt, anschließend mit der TM 1 einmal die Zellmembran durchdringt und eine intrazelluläre Schleife ausbildet.

Abbildung 5.34 stellt die Aminosäuren der korrekt gespleißten β -Untereinheit und der Variante $\beta\Delta 8$ gegenüber, die topologischen Beziehungen sind mit angegeben.



Abb.5.34. Vergleich der Aminosäuresequenz von β und $\beta\Delta 8$.

Daraus ergibt sich im Weiteren die Frage, ob die mRNA von $\beta\Delta 8$ überhaupt zu einem Protein prozessiert wird und falls ja, wo es nachweisbar ist.

5.3 Charakterisierung der Untereinheit $\beta\Delta 8$

5.3.1 Klonierung von $\beta\Delta 8$ in Sp-myc / pRK7

Die weitere Charakterisierung der Spleißvariante $\beta\Delta 8$ erforderte die Herstellung eines exprimierbaren Konstrukts von $\beta\Delta 8$. Dafür wurde aus dem vorhandenen Klon # 237 (pRK7-sp-myc / β) das Exon 8 der β -Untereinheit des Glycinrezeptors mittels PCR-Mutagenese deletiert. Im Gegensatz zu den oben abgebildeten Sequenzierungen handelt es sich dabei allerdings um die Mausequenz von β . Die PCR wurde mit den Primern # 2447 / # 2448 für $\beta\Delta 8$ durchgeführt und gleichzeitig für die Klonierung die Schnittstellen Hind III und Cla I eingefügt. Das Ergebnis der PCR ist in Abb. 5.35 abgebildet.

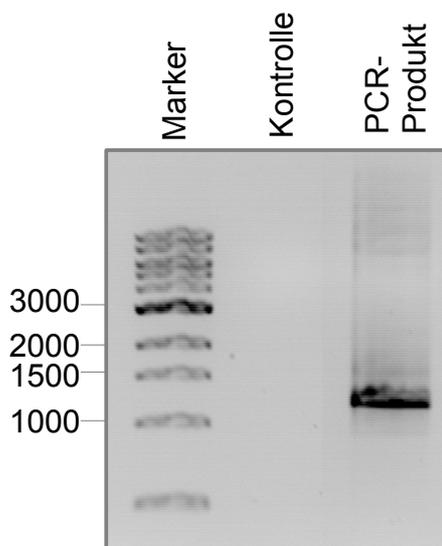


Abb.5.35. Ergebnis der PCR mit der Matrize # 237 und den Primern # 2447 / # 2448. Als Kontrolle wurde ein mit Wasser statt DNA durchgeführter PCR-Ansatz aufgetragen.

Durch Verdau des PCR-Produkts sowie des Vektors (# 237) mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Cla I, Aufreinigen der Vektor-Bande und des PCR-Inserts aus dem Gel mit anschließender Ligation der beiden Fragmente konnte Sp-myc- $\beta\Delta 8$ / pRK7 hergestellt werden.

Die ligierte DNA wurde in DH5 α -kompetente *E. coli* transformiert. Die Bakterien wurden auf Ampicillin-resistenten Platten ausgesät und aus den gewachsenen Kolonien DNA-Minipräparationen angefertigt. Zur Kontrolle wurden sie mit Hind III / Cla I verdaut. Dabei sollten zwei Fragmente entstehen, eines für den Vektor und eines für das inklonierte Insert $\beta\Delta 8$. Die Abbildung 5.36 zeigt diesen Kontrollverdau.

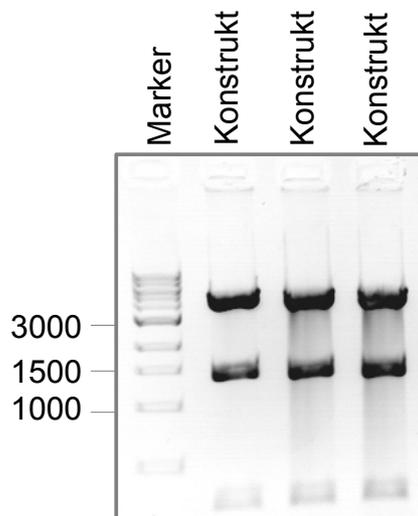


Abb. 5.36. Kontrollverdau der DNA-Minipräparationen von Sp-myc- $\beta\Delta 8$ / pRK7 mit Hind III / Cla I. Es sind drei Beispiele gezeigt.

Zur Verifizierung wurde die DNA aus einer positiven Minipräparation mit den Primern # 384 und # 385 sequenziert (Abb. 5.37).

5.3.2 Expressionsstudien an $\beta\Delta 8$

Um mehr über die Zellkompartimentierung der Untereinheit $\beta\Delta 8$ zu erfahren, wurden HEK 293-Zellen als geeignetes *in vitro* System ausgewählt und auf Deckgläschen mit 200 μ l Gesamtvolumen in folgenden Kombinationen transfiziert:

- α - / β -Untereinheit (1:4)
- α - / $\beta\Delta 8$ -Untereinheit (1:4)

β - bzw. $\beta\Delta 8$ -DNA wurde im Überschuss zugegeben, da diese Untereinheiten nicht so gut an die Membran binden und sich generell besser in Kombination mit der α -Untereinheit transfizieren lassen.

Teilweise wurde zusätzlich mit Gephyrin kotransfiziert, wodurch eine Verankerung der transfizierten Glycinrezeptor-Untereinheiten erreicht werden sollte. Nach zweitägiger Inkubationszeit wurden die Zellen mit PAFA fixiert. Die Primärantikörper wurden so verwendet, dass mit 0,7 μ l mab2b (Verdünnung 1:500) gegen $\alpha 1$ und mit 1,8 μ l polymyc (Verdünnung 1:200) gegen β bzw. $\beta\Delta 8$ gearbeitet wurde. Die Sekundärantikörper waren mit Alexa 488 (grünfluoreszent) oder Cy3 (rotfluoreszent) als Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt und wurden so eingesetzt, dass jedes Deckgläschen mit zwei Wellenlängen angeregt werden konnte.

Die so erhaltenen Präparate wurden unter dem konfokalen Mikroskop fotografiert und sind in den Abbildungen 5.38 ff. dargestellt.

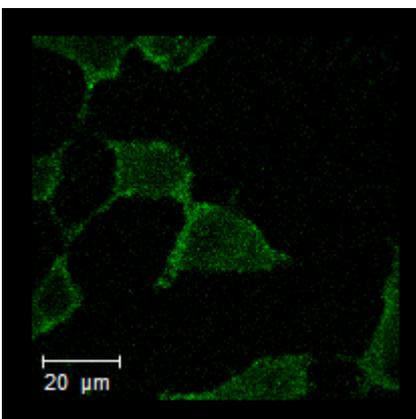


Abb. 5.38. Mit DNA für $\beta\Delta 8$ transfizierte Wildtyp-HEK293-Zellen. Als Primärantikörper wurde ein polymyc-Antikörper verwendet, der mit Alexa 488 gegengefärbt wurde. Dadurch fluoreszieren die Zellen grün.

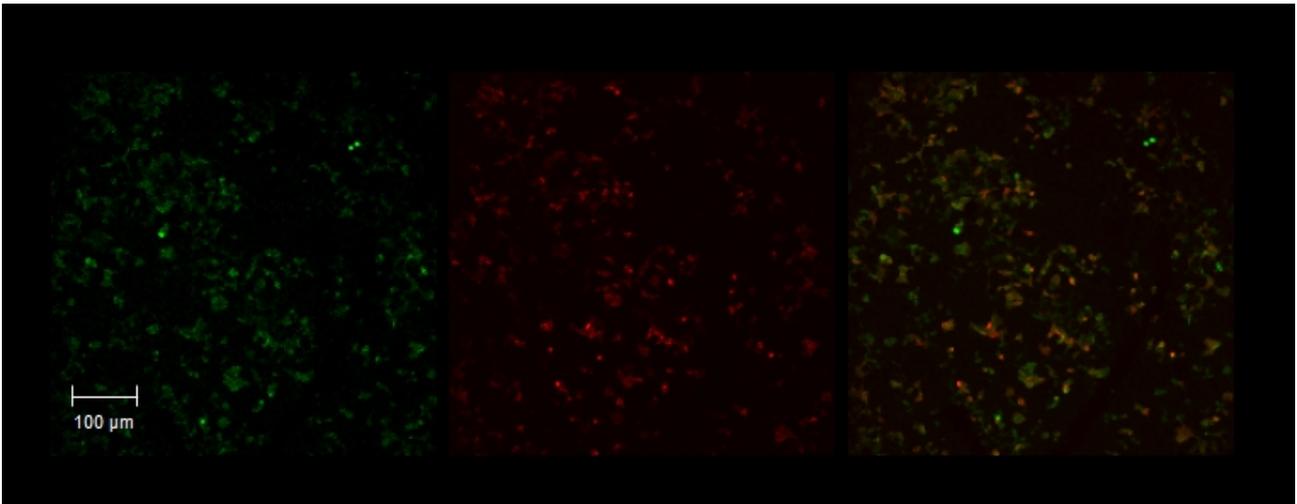


Abb. 5.39. Übersichtsaufnahmen von mit α - und $\beta\Delta 8$ -Untereinheiten sowie Gephyrin transfizierten HEK293-Zellen. Im linken Bild wurde $\beta\Delta 8$ an einen polymyc-Primärantikörper gebunden und dann mit Alexa 488, das grün fluoresziert, als Sekundärantikörper gefärbt. Das mittlere Bild zeigt die mit mab2b / Cy3 gefärbte und somit rot fluoreszierende α -Untereinheit. Das rechte Bild ist die Überlagerung der anderen beiden Bilder. Daraus folgt, dass eine grüne Fluoreszenz $\beta\Delta 8$ und eine rote Fluoreszenz α entspricht.

Wird nur eine einzelne Zelle betrachtet, zeigt sich ein analoges Bild (Abb. 5.40).

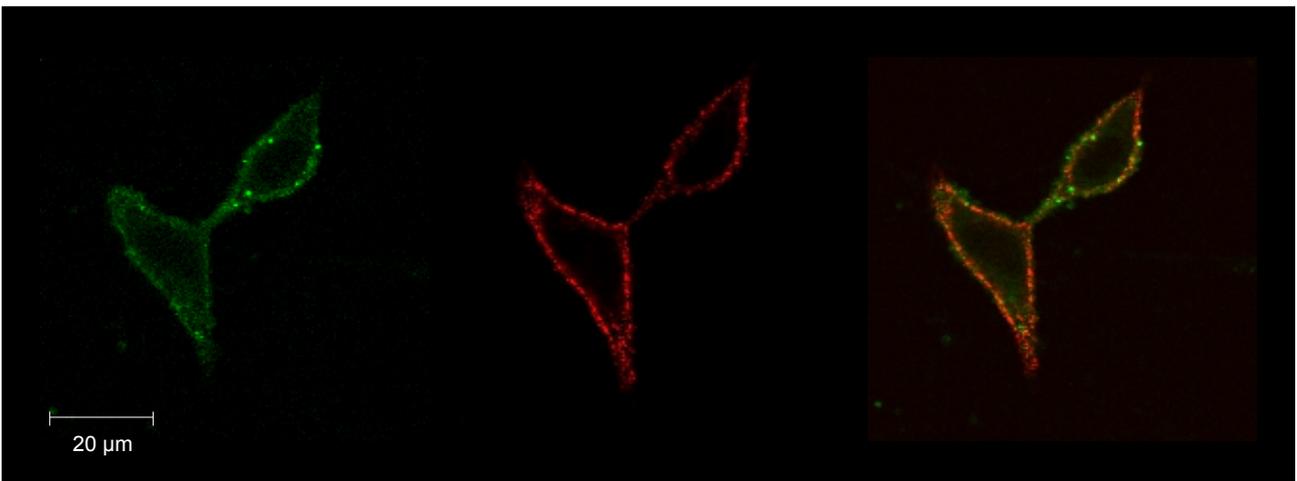


Abb. 5.40. Aufnahmen in stärkerer Vergrößerung als in Abb. 4.39. Die HEK293-Zellen wurden mit α - und $\beta\Delta 8$ -Untereinheiten sowie mit Gephyrin transfiziert. Im linken Bild wurde $\beta\Delta 8$ an einen polymyc-Antikörper gebunden und mit dem grün fluoreszierenden Alexa 488 als Sekundärantikörper markiert. Das mittlere Bild zeigt die α -Untereinheit, die mit mab2b / Cy3 gefärbt wurde und somit rot erscheint. Das rechte Bild ist die Überlagerung der anderen beiden Bilder.

Während in Abbildung 5.39 und Abbildung 5.40 α und $\beta\Delta 8$ transfizierte Zellen betrachtet wurden, wurden für die Abbildungen 5.41 und 4.42 α und β (entsprechend den Klonnummern # 222 und # 237) transfizierte Zellen verwendet.

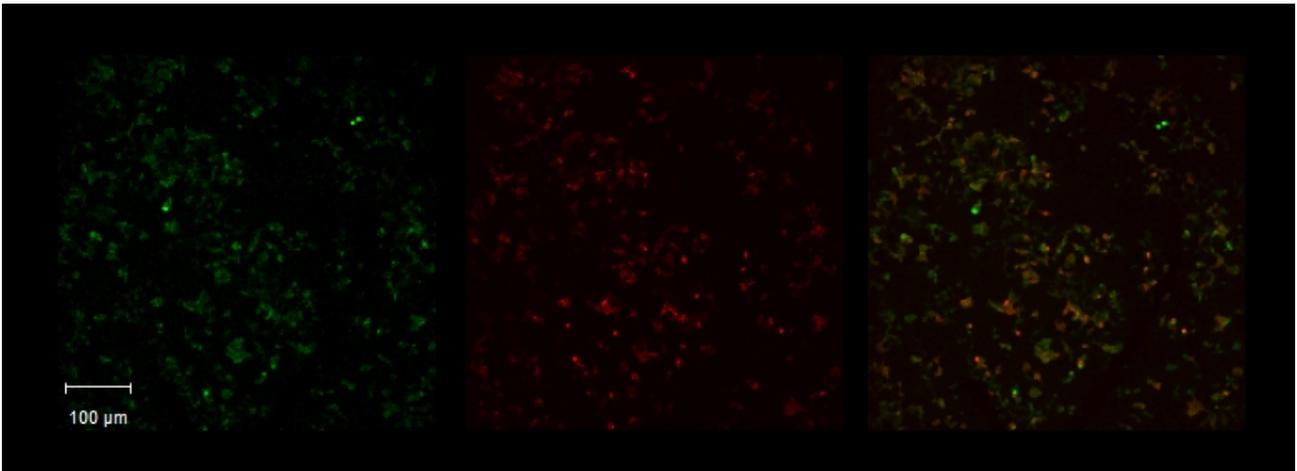


Abb. 5.41. Übersichtsaufnahmen der Immunzytochemie für mit α , β und Gephyrin transfizierte HEK293-Zellen. Das linke Bild zeigt die mit polymyc / Alexa 488 gebundene β -, das mittlere Bild die mit mab2b / Cy3 gefärbte α -Untereinheit. Das rechte Bild ist die Überlagerung der anderen beiden Bilder.

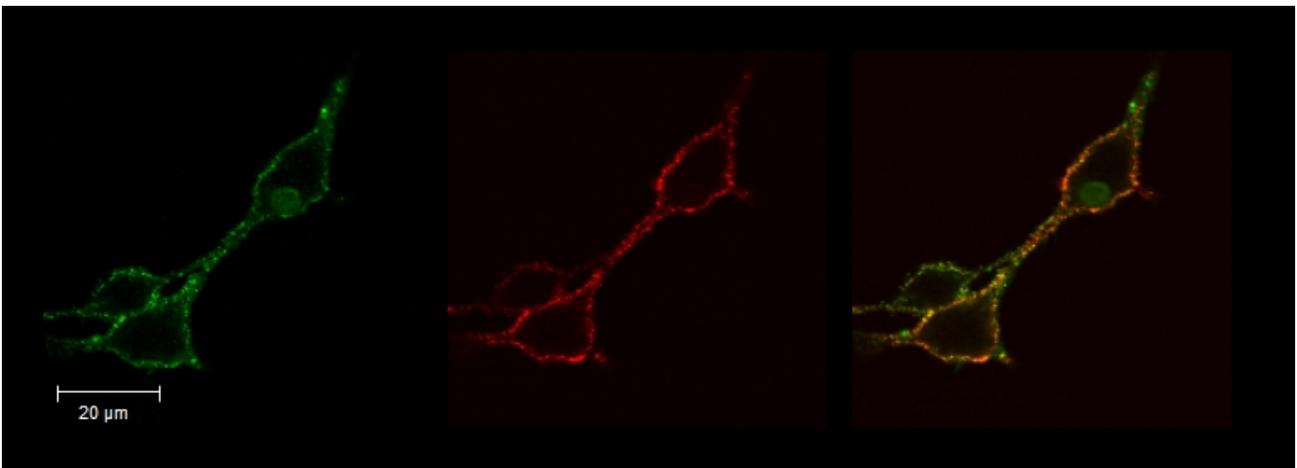


Abb. 5.42. Detailaufnahmen der mit α , β und Gephyrin transfizierten Zellen. Abgebildet ist links ist die mit polymyc / Alexa 488 gebundene β -Untereinheit und in der Mitte die mit mab2b / Cy3 gefärbte α 1-Untereinheit. Das rechte Bild ist die Überlagerung der anderen beiden Bilder.

Während in Abbildung 5.41 in der Überlagerung eine gute Kolokalisation der Färbungen zu erkennen ist, sind in Abbildung 5.39 deutlich mehr grün als rot fluoreszierende Anteile auszumachen, die sich nicht kontinuierlich überlappen. Das könnte entweder bedeuten, dass nicht alle α -Untereinheiten markiert werden konnten, oder dass α und $\beta\Delta 8$ nicht zwangsweise zusammen kolokalisieren. Dieser Eindruck bestätigt sich auch bei Betrachtung der einzelnen Zellen in den Abbildungen 5.40 und 5.42. Hier erscheint auch das Zytoplasma ungefärbt und die Zellmembran gefärbt. Das würde zu einem Einbau der Rezeptoruntereinheiten in die Membran passen.

Interessant ist, dass in Abbildung 5.38 – also Wildtyp-HEK-Zellen mit $\beta\Delta 8$ transfiziert – die Fluoreszenz relativ einheitlich über die komplette Zelle verteilt ist. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Kombination mit der α -Untereinheit notwendig ist, um einen Einbau des Rezeptors in die Zellmembran zu bewirken.

6. Diskussion und Ausblick

6.1 Diskussion

Der Glycinrezeptor spielt neben dem GABA-Rezeptor eine essentielle Rolle bei der Transduktion neuronaler inhibitorischer Signale [4, 8]. Neben dem normalen Vorkommen des Wildtyp-Glycinrezeptors im ZNS konnten verschiedene Spleißvarianten der β -Untereinheit wie $\beta\Delta 5$, $\beta\Delta 7$ oder $\beta\Delta 8$ nachgewiesen werden, von denen für $\beta\Delta 5$ eine Assoziation mit der neurologischen Bewegungsstörung Hyperekplexie gezeigt werden konnte [73]. Die Variante $\beta\Delta 8$ wurde in Zelllinien von Kleinzelligen Bronchialkarzinomen (SCLC) nachgewiesen, einem Tumor, der zu neurologischen paraneoplastischen Syndromen führen kann [69, 24, 53]. Daraus resultiert die Fragestellung, ob der Glycinrezeptor oder seine Spleißvarianten über intrazelluläre Mechanismen die Eigenschaften des Tumors beeinflussen und auf diese Weise die Entstehung einer Paraneoplasie erklären können. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung eines Expressionskonstrukts von Gephyrin, dem Ankerprotein des Glycinrezeptors, welches zur Analyse von Lysaten verschiedener Zelllinien und zur Charakterisierung der Spleißvariante $\beta\Delta 8$ diene. Aufbauend auf diesen grundlegenden Untersuchungen können weiterführende Fishing-Experimenten durchgeführt werden, die es ermöglichen, intrazelluläre Bindepartner des Glycinrezeptors zu identifizieren.

Die Aufreinigung von Gephyrin wurde gewährleistet, indem die cDNA in entsprechende Vektoren für eine Expression in *E. coli* kloniert wurde und zur späteren Detektion zusätzlich mit Epitopen eines His- oder T7-Tags versehen wurde. Die Histidin-Reste erlauben eine Bindung an Ni-NTA-Enden einer entsprechenden Säule und ermöglichen so die Bindung des Proteins [80, 1]. Um einen höheren Reinheitsgrad zu erreichen, wurde in dieser Arbeit eine Anionentauscher-Chromatographie über Resource Q-Säulen angeschlossen. Da Gephyrin aus verschiedenen Domänen besteht, können diese auch für sich alleine kloniert, exprimiert und gereinigt werden [80]. Darüber ist dann die gezielte Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen möglich. Es ist bekannt, dass die Bindung des Glycinrezeptors an Gephyrin auf Interaktionen der β -Untereinheit des Rezeptors mit der C-terminalen E-Domäne von Gephyrin zurückzuführen ist, während es mit der C- und G-Domäne nur zu schwachen, unspezifischen Interaktionen kommt [80]. Die Methodik

dieser Arbeit war angelehnt an eine frühere Arbeit von Schrader et al. [80]. In dieser wurden ebenfalls chromatographische Verfahren, wie beispielsweise die Affinitäts- oder die Größenausschluss-Chromatographie, zur Aufreinigung von einzelnen Domänen und Vollängen-Gephyrin genutzt. Auch dort war ebenfalls eine Kombination verschiedener Methoden nötig, um den gewünschten Reinheitsgrad zu erreichen [80]. In einer weiteren Arbeit wurde die Interaktion von GlyR β mit den Proteinen Vacuolar Protein Sorting 35 (Vps35) und Neurobeachin (Nbea) mithilfe Glutathion-S-Transferase (GST) pull-down-Experimenten untersucht. Dabei wurde ein Fusionsprotein aus GST und einer intrazellulären Schleife der β -Untereinheit hergestellt, womit neben Gephyrin auch eine Bindung von Vps35 und Nbea an die β -Untereinheit selbst nachgewiesen werden konnte. Diese Proteine scheinen eine Rolle bei der korrekten Lokalisation des Rezeptors an der Postsynapse zu spielen. Zum Nachweis der Proteine wurde dabei u.a. auch mit 6 x His-markiertem Vps35 gearbeitet und dieses mittels Western Blot und 6 x His-Antikörper analysiert. Allerdings wurde dieses Konstrukt, anders als in der vorliegenden Arbeit, nicht über die His-Reste an einer Säule gereinigt [16].

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Säulen-Auftrennung des His-markierten Gephyrin mit Ni-NTA-Agarose im Batch-Verfahren nur geringe Verluste des Proteins. Obwohl die Verunreinigung der Elutionen während der ersten Versuche relativ gering erschien, ergaben sich bei Einsetzen größerer Lysatmengen deutliche Begleitbanden vermutlich durch bakterielle Proteine. Auch das Anwenden diverser Detergenzien und KCl-Puffer in unterschiedlichen Konzentrationen konnte dieses Verhältnis nicht wesentlich verbessern und den Gephyrin-Anteil nicht ausreichend erhöhen. Durch Verwenden einer Durchflusssäule konnte jedoch eine bessere Abtrennung von Gephyrin erzielt werden. Die nachgeschalteten Reinigungsschritte mittels Resource Q-Säule, die in früheren Arbeiten zum Erfolg geführt hatten, brachten allerdings nicht die erwünschte Erhöhung des Reinheitsgrades, sondern führten zum weitgehenden Verlust des Proteins.

Als mögliche Ursache der schlechten Ausbeute können ein zu hohes eingesetztes Elutionsvolumen im Vergleich zum gebundenen Gephyrin genannt werden. Eine Vergrößerung der Ausgangsvolumina der Protein-Suspension mit einer erhöhten Konzentration des enthaltenen Gephyrins sowie eine Verringerung der Elutionsvolumina konnten die Resultate jedoch nicht verbessern.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Gephyrin in Lösung bzw. an den Säulen selbst ausfällt [41]. Außerdem kann das Protein in verschiedenen oligomeren Konformationen vorliegen (Trimere, Dimere), eine Absenkung des pH-Werts führt darüber hinaus zur Bildung von Gephyrin-Clustern. Durch genaue Analysen zeigte sich, dass ein erneutes Anheben des pH-Werts zu einer Vielzahl an Banden führt, was die verschiedenen Konformationen von Gephyrin widerspiegelt [84]. Außerdem ist Gephyrin in seiner Funktion als Ankerprotein an der Zellmembran ein zur Aggregation neigendes Protein, was das Ausfallen unter entsprechenden Bedingungen nahelegt. Ein Ausfallen des Proteins führte auch in der vorliegenden Arbeit häufig zum Verstopfen der Säulen und erklärt die geringe Menge des aufgereinigten Proteins.

Die Tumorzelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren bereits aus früheren Untersuchungen grundlegend charakterisiert [69, 49]. Es wurde in SCLC-Linien ein Zusammenhang zwischen der Expression des regulatorischen Proteins NRSF / REST und neuronalen Zielproteinen gefunden. Dabei führte die Abwesenheit von NRSF / REST zu einem Wegfall der Hemmung der Transkription und darüber zu einem Anstieg der mRNA für GlyR-Untereinheiten α und β [69]. Außerdem konnte über das Zielprotein AKT2 eine Korrelation mit dem Wachstum des Tumors gezeigt werden [49]. In diesem Zusammenhang konnte auch die Untereinheit $\beta\Delta 8$ erstmalig in SCLC-Linien nachgewiesen werden [69].

In den meisten in der vorliegenden Arbeit untersuchten SCLC-Linien war die konventionelle β -Untereinheit detektierbar und deutlich erhöht. Im Unterschied zu diesen Zelllinien ließ sich die β -Untereinheit in den anderen ebenfalls verwendeten Zelllinien nicht finden. Vergleicht man für $\beta\Delta 8$ die nach der Translation entstehende Aminosäuresequenz mit der Sequenz der konventionellen β -Untereinheit, zeigt sich, dass es am Übergang von Exon 7 zu Exon 9 zu einer Leserasterverschiebung kommt. Diese führt zu einem vorzeitigen Stopp-Codon im Exon 9. Das so entstandene Protein besitzt dementsprechend eine veränderte Topologie. Durch den Kettenabbruch sind von der Transmembrandomäne 2 nur die N-terminalen Aminosäurereste -PLGW noch vorhanden, wobei durch die Leserasterverschiebung das ursprünglich vorhandene Isoleucin durch Tryptophan ersetzt wurde. Die anschließenden Transmembrandomänen 3 und 4 sowie die verbindenden Schleifen, die das Gephyrin-bindende Motiv enthalten, fehlen vollständig. Das Ergebnis ist eine trunke Form des Proteins, das den extrazellulären N-Terminus besitzt,

anschließend mit der TM 1 einmal die Zellmembran durchdringt und einen intrazellulären C-Terminus ausbildet. Damit kann die Spleißvariante nicht mehr von Gephyrin gebunden und verankert werden.

Das Vorliegen der Spleißvariante $\beta\Delta 8$ wurde auf mRNA-Ebene in mehreren Tumorzelllinien beobachtet, wie beispielsweise in den SCLC-Linien H69 und H146, nicht jedoch in H128. Bisher war $\beta\Delta 8$ in einer früheren Arbeit nur auf mRNA-Ebene nachgewiesen worden, ob ein Protein überhaupt gebildet wird und wie dieses sich verhält, wurde nicht postuliert [69]. Die Betrachtung der mRNA-Sequenz von $\beta\Delta 8$ lässt eine Leseraster-Verschiebung erkennen, die am C-Terminus zu der Aminosäuren-Sequenz -RVPLGW-Stopp führt. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in der Arbeit von Neumann et al. gezeigt werden [69]. Vorzeitige Stopp-Kodone führen bei anderen Transkripten häufig zu Nonsense-mediated Decay, dem Abbau eines nicht funktionsfähigen Proteins, und sind mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. So wird vermutet, dass sie eine Rolle bei rund 10% aller Erbkrankheiten spielen wie zum Beispiel bei den Muskeldystrophien Typ Duchenne und Becker [6].

Von der β -Untereinheit des Glycinrezeptors ist weiterhin die Variante $\beta\Delta 7$ bekannt, eine Spleißvariante, die u. a. durch ihre ungewöhnliche Topologie auffällt. Durch den Wegfall des Exons 7 fehlen die TM 1 und der eigentliche N-terminale Beginn der TM 2 und dadurch die Ionenkanalpore [71]. Daher war hier die Frage, ob der verbliebene Rest der TM 2 ausreicht um eine funktionsfähige Ionenkanalpore zu bilden. Ein funktioneller Rezeptor wurde in dieser Arbeit jedoch nicht identifiziert. Im Gegensatz zu $\beta\Delta 8$ fallen die Exongrenzen der Exone 6 und 8 bei $\beta\Delta 7$ so zusammen, dass die RNA-Sequenz weiterhin *in frame* ist und es nicht zu einer Verschiebung des Leserasters bei der Translation kommt. Deshalb sind bei $\beta\Delta 7$ auch die auf den Exonen 8 und 9 kodierten Eigenschaften, wie z.B. das Gephyrin-Bindemotiv, weiter vorhanden. Bei Fishing-Experimenten an Gephyrin-Säulen muss daher beachtet werden, dass zwar die konventionelle β -Untereinheit und $\beta\Delta 7$ daran binden können, nicht aber $\beta\Delta 8$. Um $\beta\Delta 8$ bei solchen Experimenten nicht im Durchfluss zu verlieren und so daran bindende Proteine identifizieren zu können, müsste ein entsprechendes Bindemotiv an die Untereinheit kloniert werden, das die Bindung an die Säule ermöglichen würde. Jedoch wäre diese Methode nur für *in vitro*-Versuche geeignet und könnte nicht direkt mit $\beta\Delta 8$ aus SCLC-Zellen durchgeführt werden.

Hier wurde die Spleißvariante $\beta\Delta 8$ erstmals in HEK293-Zellen transfiziert und *in vitro* untersucht. HEK293-Zellen besitzen ein schnelles Wachstum, sind leicht zu transfizieren und zeichnet sich durch eine sehr gute Transfektions-Effizienz aus [89]. Zu diesem Zeitpunkt war für die β -Untereinheit kein käuflicher Antikörper verfügbar, was Versuche zur direkten Protein-Detektion in den SCLC-Linien ausschloss. Der in der Zwischenzeit beschriebene Antikörper mAb-GlyR β bindet an der β -Untereinheit an die intrazelluläre Schleife zwischen den Transmembrandomänen TM3 und TM4, da hier die größten Unterschiede zwischen den einzelnen Untereinheiten vorliegen [96]. Bei $\beta\Delta 8$ ist aufgrund des Kettenabbruchs in der TM2 diese Schleife nicht vorhanden, weshalb eine Detektion von $\beta\Delta 8$ mittels direkter Antikörperbindung auch weiterhin nicht möglich ist.

In vitro wurde $\beta\Delta 8$ mit einem myc-Tag versehen, der bereits bei der Charakterisierung der Spleißvariante $\beta\Delta 7$ erfolgreich verwendet wurde. Auch dort war die Schaffung einer zusätzlichen Antikörper-Bindestelle nötig, da kein entsprechender, direkt-bindender Antikörper zur Verfügung stand [71]. Über eine Umklonierung von $\beta\Delta 8$ an den myc-Tag war es möglich, die Untereinheit mittels Anti-myc-Antikörper nachzuweisen und so zu zeigen, dass die Untereinheit $\beta\Delta 8$ bei Überexpression in HEK293-Zellen und Koexpression mit der $\alpha 1$ -Untereinheit des Glycinrezeptors trotz ihres vorzeitigen Kettenabbruchs als Protein vorliegen kann.

Die weitergehenden Untersuchungen detektierten $\beta\Delta 8$ verstärkt an der Zellmembran, sowohl wenn diese Untereinheit isoliert exprimiert wurde als auch in Kombination mit der α -Untereinheit. In transfizierten HEK293-Zellen wurde $\beta\Delta 8$ zum Protein translatiert und nicht vorher bereits auf Transkriptebeine durch Mechanismen wie Nonsense-mediated Decay degradiert. Weiterhin kann so eine Fehlfaltung, die einen Proteinabbau durch das endoplasmatische Reticulum induzieren würde, ausgeschlossen werden. Eine Korrekturfaltung kann durch den von der Mutation nicht betroffenen extrazellulären N-Terminus bedingt sein, der ebenfalls membranassoziiert vorliegt, wenn er als isolierte Domäne aus Bakterien aufgereinigt und rückgefaltet wurde [11]. Eine Verankerung des trunkierten Proteins in der Membran über die verbliebene TM1 wäre ebenfalls denkbar. Dagegen ist eine Assoziation von $\beta\Delta 8$ an der Membran über die Untereinheit $\alpha 1$ unwahrscheinlich, da nur in der Zelllinie H69 eine starke Expression dieser Untereinheit vorliegt [49]. Weiterführende Fishing-Experimente durch den Einsatz von $\alpha 1$ und die Bindung von $\beta\Delta 8$ daran sind zwar möglich, lösen jedoch nicht das Problem der Detektion,

da der für die β -Untereinheit verfügbare Antikörper aufgrund der fehlenden TM2 nicht an $\beta\Delta 8$ binden kann. Lediglich durch den Einsatz von nativen Gelen wäre eine Darstellung der erhaltenen Komplexe möglich und darüber eine weitere Analyse.

6.2 Ausblick

Die vorliegende Arbeit stellt die experimentellen und materiellen Grundlagen zur Verfügung, um mittels Fishing-Experimenten intrazelluläre Interaktionspartner der β -Untereinheit des Glycinrezeptors in Zellen des Kleinzelligen Bronchialkarzinoms zu identifizieren. Diese Experimente sollten daher auf dieser Arbeit basierend weitergeführt werden.

Bei der Aufreinigung von Gephyrin ist vor allem auf eine zügige Vorgehensweise mit insgesamt möglichst wenigen Reinigungsschritten bei trotzdem hohem Reinheitsgrad zu achten, um die Proteinverluste gering zu halten. Die Suche nach Interaktionspartnern der Spleißvariante $\beta\Delta 8$ erfordert jedoch eine geeignete Bindematrix für die Säule.

Über weiterführende Zelloberflächenlokalisation mittels Biotin sowie elektrophysiologische Messmethoden kann die Beteiligung und Beeinflussung von $\beta\Delta 8$ an der Ausbildung eines funktionellen Ionenkanals untersucht werden. Die Bedeutung der Spleißvariante in den Zellen von Bronchialkarzinomen ist wahrscheinlich völlig unabhängig von der Funktion eines Ionenkanals, da die zur Assemblierung und Ausbildung eines funktionellen Kanals notwendige α -Untereinheit dort nur in geringem Maße oder gar nicht vorhanden ist.

Um Rückschlüsse auf die Relevanz der Glycinrezeptor-Untereinheiten β und $\beta\Delta 8$ in Tumorzellen zu bekommen, sind weiterführende Untersuchungen an nativen, unfixierten Geweben aus Kleinzelligen Bronchialkarzinomen unerlässlich. Weiterhin gilt es der Frage nachzugehen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten neuronaler Gentranskripte bzw. neuronaler Proteine auf der einen Seite und der Aggressivität des Tumors auf der anderen Seite besteht. Als Marker dafür ließen sich beispielsweise die Verdoppelungszeiten der Tumorzellen, das Auftreten von Metastasen oder das Vorliegen neurologischer Paraneoplasien einsetzen. Derartige Experimente sind nur durch die Existenz eines $\beta\Delta 8$ -Antikörpers, der für diese Methoden einsetzbar ist, möglich und gleichzeitig essentiell, um die zugrunde liegenden Pathomechanismen zu verstehen.

Mit der Weiterführung der Experimente könnte eine Verbindung zwischen Rezeptor und intrazellulärer Signalverarbeitung insbesondere in Tumorzellen gefunden werden und somit die Rolle der Glycinrezeptor- β -Untereinheit in Kleinzelligen Bronchialkarzinomen besser verstanden werden.

7. Literaturverzeichnis

- [1] The QIAexpressionist. (2003) Qiagen.
- [2] Archer VE, Saccomanno G, Jones JH. (1974) Frequency of different histologic types of bronchogenic carcinoma as related to radiation exposure. *Cancer*. 34(6):2056-2060.
- [3] Becker CM, Hoch W, Betz H. (1988) Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *The EMBO Journal*. 7(12):3717-3726.
- [4] Belcher G, Davies J, Ryall RW. (1976) Glycine-mediated inhibitory transmission of group 1A-excited inhibitory interneurons by Renshaw cells. *The Journal of Physiology*. 256(3):651-662.
- [5] Betz H, Laube B. (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *Journal of Neurochemistry*. 97(6):1600-1610.
- [6] Bidou L, Allamand V, Rousset JP, Namy O. (2012) Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends in Molecular Medicine*. 18(11):679-688.
- [7] Bormann J, Rundstrom N, Betz H, Langosch D. (1993) Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *The EMBO Journal*. 12(10):3729-3737.
- [8] Bradley K, Eccles JC. (1953) Strychnine as a depressant of primary inhibition. *Nature*. 171(4363):1061-1062.
- [9] Braun J. Lunge. In: Renz-Polster H. KS, (Hrsg). *Basislehrbuch Innere Medizin*. 4. Aufl. Elsevier, München, 2008:1355.
- [10] Breitinger HG, Becker CM. (2002) The inhibitory glycine receptor-simple views of a complicated channel. *ChemBioChem*. 3(11):1042-1052.
- [11] Breitinger U, Breitinger HG, Bauer F, Fahmy K, Glockenhammer D, Becker CM. (2004) Conserved high affinity ligand binding and membrane association in the native and refolded extracellular domain of the human glycine receptor alpha1-subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(3):1627-1636.
- [12] Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK. (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*. 411(6835):269-276.
- [13] Carney DN, Marangos PJ, Ihde DC, Bunn PA, Jr., Cohen MH, Minna JD, Gazdar AF. (1982) Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and

response to therapy of small-cell lung cancer. *Lancet*. 1(8272):583-585.

- [14] Cook RM, Miller YE, Bunn PA, Jr. (1993) Small cell lung cancer: etiology, biology, clinical features, staging, and treatment. *Current Problems in Cancer*. 17(2):69-141.
- [15] de Ruyscher D. (2010) Treatment of limited disease small cell lung cancer. *Frontiers of Radiation Therapy and Oncology*. 42:173-179.
- [16] del Pino I, Paarmann I, Karas M, Kilimann MW, Betz H. (2011) The trafficking proteins Vacuolar Protein Sorting 35 and Neurobeachin interact with the glycine receptor beta-subunit. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 412(3):435-440.
- [17] Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM. (2005) International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *International journal of cancer Journal International du Cancer*. 117(2):294-299.
- [18] Dlugaiczyk J, Singer W, Schick B, Iro H, Becker K, Becker CM, Zimmermann U, Rohbock K, Knipper M. (2008) Expression of glycine receptors and gephyrin in the rat cochlea. *Histochemistry and Cell Biology*. 129(4):513-523.
- [19] Ellison DH, Berl T. (2007) Clinical practice. The syndrome of inappropriate antidiuresis. *The New England Journal of Medicine*. 356(20):2064-2072.
- [20] Feng G, Tintrup H, Kirsch J, Nichol MC, Kuhse J, Betz H, Sanes JR. (1998) Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science*. 282(5392):1321-1324.
- [21] Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, Wistuba I, Sekido Y, Bader SA, Ahmadian M, Ong ST, Rassool FV, Zimmerman PV, Giaccone G, Gazdar AF, Minna JD. (1997) FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Research*. 57(11):2256-2267.
- [22] Fritschy JM, Harvey RJ, Schwarz G. (2008) Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends in Neurosciences*. 31(5):257-264.
- [23] Gandhi L, Johnson BE. (2006) Paraneoplastic syndromes associated with small cell lung cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 4(6):631-638.
- [24] Gilhus NE. (2011) Lambert-eaton myasthenic syndrome; pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Autoimmune Diseases*. 2011:973808.
- [25] Giuliani ME, Atallah S, Sun A, Bezjak A, Le LW, Brade A, Cho J, Leigh NB,

- Shepherd FA, Hope AJ. (2011) Clinical outcomes of extensive stage small cell lung carcinoma patients treated with consolidative thoracic radiotherapy. *Clinical Lung Cancer*. 12(6):375-379.
- [26] Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann KM, Ficker JH, Freitag L, Lubbe AS, Reinhold T, Spath-Schwalbe E, Ukena D, Wickert M, Wolf M, Andreas S, Auberger T, Baum RP, Baysal B, Beuth J, Bickeboller H, Bocking A, Bohle RM, Bruske I, Burghuber O, Dickgreber N, Diederich S, Dienemann H, Eberhardt W, Eggeling S, Fink T, Fischer B, Franke M, Friedel G, Gauler T, Gutz S, Hautmann H, Hellmann A, Hellwig D, Herth F, Heussel CP, Hilbe W, Hoffmeyer F, Horneber M, Huber RM, Hubner J, Kauczor HU, Kirchbacher K, Kirsten D, Kraus T, Lang SM, Martens U, Mohn-Staudner A, Muller KM, Muller-Nordhorn J, Nowak D, Ochmann U, Passlick B, Petersen I, Pirker R, Pokrajac B, Reck M, Riha S, Rube C, Schmittel A, Schonfeld N, Schutte W, Serke M, Stamatis G, Steingraber M, Steins M, Stoelben E, Swoboda L, Teschler H, Tessen HW, Weber M, Werner A, Wichmann HE, Irlinger Wimmer E, Witt C, Worth H, German Respiratory S, German Cancer S. (2011) Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer: interdisciplinary guideline of the German Respiratory Society and the German Cancer Society. *Pneumologie*. 65(1):39-59.
- [27] Goldstein SD, Yang SC. (2011) Role of surgery in small cell lung cancer. *Surgical oncology clinics of North America*. 20(4):769-777.
- [28] Greferath U, Brandstätter JH, Wässle H, Kirsch J, Kuhse J, Grunert U. (1994) Differential expression of glycine receptor subunits in the retina of the rat: a study using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Visual Neuroscience*. 11(4):721-729.
- [29] Grenningloh G, Pribilla I, Prior P, Multhaup G, Beyreuther K, Taleb O, Betz H. (1990) Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron*. 4(6):963-970.
- [30] Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B. (2005) The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron*. 45(5):727-739.
- [31] Hackshaw AK. (1998) Lung cancer and passive smoking. *Statistical Methods in Medical Research*. 7(2):119-136.
- [32] Harvey K, Duguid IC, Alldred MJ, Beatty SE, Ward H, Keep NH, Lingenfelter SE,

- Pearce BR, Lundgren J, Owen MJ, Smart TG, Luscher B, Rees MI, Harvey RJ. (2004) The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *The Journal of Neuroscience*. 24(25):5816-5826.
- [33] Haverkamp S, Müller U, Harvey K, Harvey RJ, Betz H, Wassle H. (2003) Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha3 subunit. *The Journal of Comparative Neurology*. 465(4):524-539.
- [34] Hilf RJ, Dutzler R. (2008) X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature*. 452(7185):375-379.
- [35] Hirzel K, Müller U, Latal AT, Hulsmann S, Grudzinska J, Seeliger MW, Betz H, Laube B. (2006) Hyperekplexia phenotype of glycine receptor alpha1 subunit mutant mice identifies Zn(2+) as an essential endogenous modulator of glycinergic neurotransmission. *Neuron*. 52(4):679-690.
- [36] Ikejima K, Qu W, Stachlewitz RF, Thurman RG. (1997) Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. *The American Journal of Physiology*. 272(6 Pt 1):G1581-1586.
- [37] Janssen-Heijnen ML, Maas HA, Siesling S, Koning CC, Coebergh JW, Groen HJ. (2012) Treatment and survival of patients with small-cell lung cancer: small steps forward, but not for patients >80. *Annals of Oncology*. 23(4):954-960.
- [38] Junker K, Gumprich T, Müller KM. (1997) Discontinuous lymph node metastases ("skipping") in malignant lung tumors. *Der Chirurg*. 68(6):596-599; Discussion 600.
- [39] Junker K, Müller, K.M. (1989) Metastasierungsmuster beim Bronchialkarzinom. *Z Herz Thorax Gefäßchir.* (3):189–194.
- [40] Junker K, Petersen I. (2009) Small cell lung cancer: pathology and molecular pathology. *Der Pathologe*. 30(2):131-140.
- [41] Kim EY, Schrader N, Smolinsky B, Bedet C, Vannier C, Schwarz G, Schindelin H. (2006) Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin. *The EMBO Journal*. 25(6):1385-1395.
- [42] Kingsmore SF, Giros B, Suh D, Bieniarz M, Caron MG, Seldin MF. (1994) Glycine receptor beta-subunit gene mutation in spastic mouse associated with LINE-1 element insertion. *Nature Genetics*. 7(2):136-141.
- [43] Kins S, Betz H, Kirsch J. (2000) Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nature Neuroscience*. 3(1):22-29.
- [44] Kirchhoff F, Mulhardt C, Pastor A, Becker CM, Kettenmann H. (1996) Expression of glycine receptor subunits in glial cells of the rat spinal cord. *Journal of*

Neurochemistry. 66(4):1383-1390.

- [45] Kirsch J. (2006) Glycinergic transmission. *Cell and Tissue Research*. 326(2):535-540.
- [46] Kirsch J, Betz H. (1998) Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature*. 392(6677):717-720.
- [47] Kneussel M, Betz H. (2000) Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *The Journal of Physiology*. 525 Pt 1:1-9.
- [48] Kralic JE, Sidler C, Parpan F, Homanics GE, Morrow AL, Fritschy JM. (2006) Compensatory alteration of inhibitory synaptic circuits in cerebellum and thalamus of gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1 subunit knockout mice. *The Journal of Comparative Neurology*. 495(4):408-421.
- [49] Kreisler A, Strissel PL, Strick R, Neumann SB, Schumacher U, Becker CM. (2010) Regulation of the NRSF/REST gene by methylation and CREB affects the cellular phenotype of small-cell lung cancer. *Oncogene*. 29(43):5828-5838.
- [50] Kuhse J, Kuryatov A, Maulet Y, Malosio ML, Schmieden V, Betz H. (1991) Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Letters*. 283(1):73-77.
- [51] Langosch D, Thomas L, Betz H. (1988) Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85(19):7394-7398.
- [52] Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H. (2002) Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends in Pharmacological Sciences*. 23(11):519-527.
- [53] Levine SM. (2006) Cancer and myositis: new insights into an old association. *Current Opinion in Rheumatology*. 18(6):620-624.
- [54] Liu J, Wu DC, Wang YT. (2010) Allosteric potentiation of glycine receptor chloride currents by glutamate. *Nature Neuroscience*. 13(10):1225-1232.
- [55] Lowenbraun S, Bartolucci A, Smalley RV, Lynn M, Krauss S, Durant JR. (1979) The superiority of combination chemotherapy over single agent chemotherapy in small cell lung carcinoma. *Cancer*. 44(2):406-413.
- [56] Luscher B, Keller CA. (2004) Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacology &*

Therapeutics. 102(3):195-221.

- [57] Lynch JW. (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological Reviews*. 84(4):1051-1095.
- [58] Lynch JW. (2009) Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*. 56(1):303-309.
- [59] Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, Betz H. (1991) Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 266(4):2048-2053.
- [60] Malosio ML, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H. (1991) Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *The EMBO Journal*. 10(9):2401-2409.
- [61] Meier J, Meunier-Durmort C, Forest C, Triller A, Vannier C. (2000) Formation of glycine receptor clusters and their accumulation at synapses. *Journal of Cell Science*. 113 (Pt 15):2783-2795.
- [62] Meier JC, Henneberger C, Melnick I, Racca C, Harvey RJ, Heinemann U, Schmieden V, Grantyn R. (2005) RNA editing produces glycine receptor alpha3(P185L), resulting in high agonist potency. *Nature Neuroscience*. 8(6):736-744.
- [63] Minna JD, Bunn PA, Jr., Carney DN, Cohen MH, Cuttita F, Fosiack BE, Jr., Gazdar AF, Ihde DC, Johnston-Early A, Matthews MJ, Makuch R, Oie H, Rosen S, Lichter A, Glatstein E. (1982) Experience of the National Cancer Institute (USA) in the treatment and biology of small cell lung cancer. *Bulletin du Cancer*. 69(1):83-93.
- [64] Minna JD, Schiller, J.H. *Neoplasms of the Lung*. 17. Mc Graw Hill. New York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, New Delhi, San Juan, Seoul, Singapore, Sydney, Toronto. 2008.
- [65] Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*. 423(6943):949-955.
- [66] Mülhardt C, Fischer M, Gass P, Simon-Chazottes D, Guenet JL, Kuhse J, Betz H, Becker CM. (1994) The spastic mouse: aberrant splicing of glycine receptor beta subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element. *Neuron*. 13(4):1003-1015.
- [67] Müller K-M. Lunge. In: Böcker W, Denk, H., Heitz, Ph. U., (Hrsg). *Pathologie*. 3. Aufl. Urban & Fischer, München, Jena, 2004:1290.
- [68] Murray N, Turrisi AT, 3rd. (2006) A review of first-line treatment for small-cell lung

- cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 1(3):270-278.
- [69] Neumann SB, Seitz R, Gorzella A, Heister A, Doeberitz M, Becker CM. (2004) Relaxation of glycine receptor and onconeural gene transcription control in NRSF deficient small cell lung cancer cell lines. *Brain Research Molecular Brain Research*. 120(2):173-181.
- [70] Nikolic Z, Laube B, Weber RG, Lichter P, Kioschis P, Poustka A, Mulhardt C, Becker CM. (1998) The human glycine receptor subunit alpha3. Glra3 gene structure, chromosomal localization, and functional characterization of alternative transcripts. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(31):19708-19714.
- [71] Oertel J, Villmann C, Kettenmann H, Kirchhoff F, Becker CM. (2007) A novel glycine receptor beta subunit splice variant predicts an unorthodox transmembrane topology. Assembly into heteromeric receptor complexes. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(5):2798-2807.
- [72] Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J, Betz H. (1992) The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *The EMBO Journal*. 11(12):4305-4311.
- [73] Rees MI, Lewis TM, Kwok JB, Mortier GR, Govaert P, Snell RG, Schofield PR, Owen MJ. (2002) Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB). *Human Molecular Genetics*. 11(7):853-860.
- [74] Saiyed T, Paarmann I, Schmitt B, Haeger S, Sola M, Schmalzing G, Weissenhorn W, Betz H. (2007) Molecular basis of gephyrin clustering at inhibitory synapses: role of G- and E-domain interactions. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(8):5625-5632.
- [75] Sato K, Zhang JH, Saika T, Sato M, Tada K, Tohyama M. (1991) Localization of glycine receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the rat brain: an analysis using in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*. 43(2-3):381-395.
- [76] Sato Y, Son JH, Meizel S. (2000) The mouse sperm glycine receptor/chloride channel: cellular localization and involvement in the acrosome reaction initiated by glycine. *Journal of Andrology*. 21(1):99-106.
- [77] Schmieden V, Betz H. (1995) Pharmacology of the inhibitory glycine receptor: agonist and antagonist actions of amino acids and piperidine carboxylic acid compounds. *Molecular Pharmacology*. 48(5):919-927.
- [78] Schmieden V, Jezequel S, Betz H. (1996) Novel antagonists of the inhibitory glycine

receptor derived from quinolinic acid compounds. *Molecular Pharmacology*. 50(5):1200-1206.

- [79] Schoenherr CJ, Anderson DJ. (1995) The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*. 267(5202):1360-1363.
- [80] Schrader N, Kim EY, Winking J, Paulukat J, Schindelin H, Schwarz G. (2004) Biochemical characterization of the high affinity binding between the glycine receptor and gephyrin. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(18):18733-18741.
- [81] Schrag JD, Huang W, Sivaraman J, Smith C, Plamondon J, Larocque R, Matte A, Cygler M. (2001) The crystal structure of *Escherichia coli* MoeA, a protein from the molybdopterin synthesis pathway. *Journal of Molecular Biology*. 310(2):419-431.
- [82] Schwartz WB, Bennett W, Curelop S, Bartter FC. (1957) A syndrome of renal sodium loss and hyponatremia probably resulting from inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *The American Journal of Medicine*. 23(4):529-542.
- [83] Sellers TA, Bailey-Wilson JE, Elston RC, Wilson AF, Elston GZ, Ooi WL, Rothschild H. (1990) Evidence for mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 82(15):1272-1279.
- [84] Sola M, Bavro VN, Timmins J, Franz T, Ricard-Blum S, Schoehn G, Ruigrok RW, Paarmann I, Saiyed T, O'Sullivan GA, Schmitt B, Betz H, Weissenhorn W. (2004) Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *The EMBO Journal*. 23(13):2510-2519.
- [85] Spiro SG, Gould MK, Colice GL, American College of Chest P. (2007) Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 132(3 Suppl):149S-160S.
- [86] Stallmeyer B, Nerlich A, Schiemann J, Brinkmann H, Mendel RR. (1995) Molybdenum co-factor biosynthesis: the *Arabidopsis thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*. 8(5):751-762.
- [87] Studer R, von Boehmer L, Haenggi T, Schweizer C, Benke D, Rudolph U, Fritschy JM. (2006) Alteration of GABAergic synapses and gephyrin clusters in the thalamic reticular nucleus of GABA α 3 subunit-null mice. *The European Journal of Neuroscience*. 24(5):1307-1315.

- [88] Terzolo M, Reimondo G, Ali A, Bovio S, Daffara F, Paccotti P, Angeli A. (2001) Ectopic ACTH syndrome: molecular bases and clinical heterogeneity. *Annals of Oncology*. 12 Suppl 2:S83-87.
- [89] Thomas P, Smart TG. (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 51(3):187-200.
- [90] Travis WD, Brambilla, E., Müller-Hermeling, K., Harris, C.C. Tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon. 2004.
- [91] Turecek R, Trussell LO. (2002) Reciprocal developmental regulation of presynaptic ionotropic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(21):13884-13889.
- [92] Unwin N. (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of molecular biology*. 346(4):967-989.
- [93] Veruki ML, Gill SB, Hartveit E. (2007) Spontaneous IPSCs and glycine receptors with slow kinetics in wide-field amacrine cells in the mature rat retina. *The Journal of Physiology*. 581(Pt 1):203-219.
- [94] Villmann C, Becker, C.M. Cys-loop receptors - Glycine receptors In: Kew JD, C., (Hrsg). *Ion channels – from Structure to function*. 1. Aufl. Oxford University Press Canada., 2009.
- [95] Weiss W, Moser RL, Auerbach O. (1979) Lung cancer in chloromethyl ether workers. *The American Review of Respiratory Disease*. 120(5):1031-1037.
- [96] Weltzien F, Puller C, O'Sullivan GA, Paarmann I, Betz H. (2012) Distribution of the glycine receptor beta-subunit in the mouse CNS as revealed by a novel monoclonal antibody. *The Journal of Comparative Neurology*. 520(17):3962-3981.
- [97] Wynder EL, Muscat JE. (1995) The changing epidemiology of smoking and lung cancer histology. *Environmental Health Perspectives*. 103 Suppl 8:143-148.
- [98] Xiang S, Nichols J, Rajagopalan KV, Schindelin H. (2001) The crystal structure of *Escherichia coli* MoeA and its relationship to the multifunctional protein gephyrin. *Structure*. 9(4):299-310.
- [99] Young-Pearse TL, Ivic L, Kriegstein AR, Cepko CL. (2006) Characterization of mice with targeted deletion of glycine receptor alpha 2. *Molecular and Cellular Biology*. 26(15):5728-5734.
- [100] Young TL, Cepko CL. (2004) A role for ligand-gated ion channels in rod photoreceptor development. *Neuron*. 41(6):867-879.

8. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serumalbumin
CHAPS	Cholamidopropyl-dimethylammonio-propan-sulfonat
CPM	Coloured Protein Marker
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal Calf Serum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GFP	Green fluorescent protein
HBS	HEPES Buffered Saline
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinethansulfonsäure
hs	Homo sapiens
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid
L-Gln	L-Glutamin
MEM	Minimal Essential Medium
mm	Mus musculus
NiNTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NTP	Nukleotidtriphosphat
PAA	Polyacrylamid
PAFA	Paraformaldehyd
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PPM	Prestained Protein Marker
rn	Rattus norvegicus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotations Per Minute
TBB	Tetrabromobenzotriazol
TBE	Tris-Borat-EDTA

TBS	Tris Buffered Saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyldiamin
TWS	Triton Wash Solution

9. Anhang

c-DNA-Sequenz von humanem Gephyrin

ATCAGACCCATCGGCCATGACATTAAGAGGGGAATGTGTTTTGGCCAAAGGAACCC
ACATGGGCCCTCAGAGATTGGTCTTCTGGCAACTGTAGGTGTCACAGAGGTTGAAG
TTAATAAGTTTCCAGTGGTTGCAGTCATGTCAACAGGGAATGAGCTGCTAAATCCTGAA
GATGACCTCTTACCAGGGAAGATTGAGACAGCAATCGTTCAACTCTTCTAGCAACAA
TTCAGGAACATGGTTACCCACGATCAACTTGGGTATTGTAGGAGACAACCCAGATGA
CTTACTCAATGCCTTGAATGAGGGTATCAGTCGTGCTGATGTCATCATCACATCAGGGG
GTGTATCCATGGGGGAAAAGCTTGCCAACAACATTTGCAACTTTGGATATTGATGGTGT
AAGAAAATAATCTTTGCACTACCTGGGAATCCTGTATCGGCTGTGGTCACCTGCAATC
TCTTTGTTGTGCCTGCACTGAGGAAA

Aminosäuren-Sequenz von humanem Gephyrin (Isoform 1)

MATEGMILTNDHQIRVGLTVSDSCFRNLAEDRSGINLKDLVQDPSLLGGTISAYKIVPDE
IEEIKETLIDWCDEKELNLILTTGGTGFAPRDVTPEATKEVIEREAPGMALAMLMGSLNVTP
LGMLSRPVCGIRGKTLIINLPGSKKGSQECFQFILPALPHAIDLLRDAIVKVKEVHDELEDLP
SPPPPLSPPPTTSPHKQTEDKGVQCEEEEEEEKDSGVASTEDSSSSHITAAAIAAKIPDSII
SRGVQVLPRTASLSTTPSESPRAQATSRLSTASCPTPKVQSRCSSKENILRASHSAVDIT
KVARRHRMSPFPLTSMDKAFITVLEMTPVLGTEIINYRDGMGRVLAQDVYAKDNLPPFPAS
VKDGYAVRAADGPGDRFIIGESQAGEQPTQTVMPGQVMRVTTGAPIPCGADAVVQVEDT
ELIRESDDGTEELEVRILVQARPGQDIRPIGHDIKRGECVLAKGTHMGPSEIGLLATVGVTE
VEVNKFPVAVMSTGNELLPEDDLLPGKIRDSNRSTLLATIQEHGYPTINLGIVGDNPDLL
LNALNEGISRADVITSGGVSMGEKDYLKQVLDIDLHAQIHFRVFMKPLPTTFATLDIDG
VRKIIFALPGNPVSAVVTCLNFVVPALRKMQGILDPRPTIHKARLSCDVKLDPRPEYHRCILT
WHHQEPLPWAQSTGNQMSSRLMSMRSANGLLMLPPKTEQYVELHKGEVVDVMVIGRL

c-DNA-Sequenz der β -Untereinheit des humanen Glycinrezeptors

ATGAAGTTTTTATTGACAACCTGCCTTTTTAATTTAATTTTCTTGTGGGTGGAAGAAGCC
TATTCTAAGGAAAAGTCTTCAAAGAAAGGGAAGGGGAAAAGAAGCAGTATCTATGCC
CATCTCAGCAGTCAGCAGAGGACCTTGCCCGAGTACCTGCCAACTCCACTAGCAATAT
CTTGAACAGGTTATTGGTCAGTTATGATCCCAGGATAAGACCAAACCTTCAAAGGCATTC
CTGTTGATGTAGTAGTCAACATTTTTATTAACAGTTTTGGATCCATTCAAGAAACAACAA

TGGACTATAGAGTTAACATCTTCCTGAGACAAAAATGGAATGACCCCAGGCTGAAGCT
CCCCAGTGATTTTAGGGGTTTCAGATGCACTGACAGTGGATCCAACAATGTACAAGTGT
TTATGGAAACCTGATTTATTTTTTGCAAATGAAAAAGTGCCAATTTTCATGATGTGACC
CAGGAAAACATCCTCCTCTTTATTTTTTCGTGATGGAGATGTCCTTGTGAGCATGAGGTT
ATCTATTACTCTTTCATGCCCTTTGGACTTGACATTGTTTCCCATGGATACACAACGTTG
CAAGATGCAACTGGAGAGCTTTGGTTACACAACACTGATGATTTACGATTTATCTGGCAGT
CAGGAGATCCTGTGCAATTAGAAAAAATTGCCTTGCCTCAATTTGATATCAAAAAGGAA
GATATTGAATATGGTAACTGTACAAAATACTATAAAGGCACGGGCTACTACACATGCGTG
GAAGTCATCTTCACCCTGAGGAGGCAGGTCGGCTTTTACATGATGGGGGTCTACGCC
CCAACCTCTGCTCATTGTTGTTCTCTCCTGGCTTTCCTTCTGGATCAACCCGGACGCGA
GTGCTGCCAGAGTGCCCTGGGTATCTTCTCAGTCCTCAGCTTGGCCTCTGAGTGCA
CAACCCTTGCCGCTGAGCTTCCCAAAGTTTCTTATGTGAAGGCTCTTGATGTTTGGCT
TATTGCTTGCCTTCTCTTTGGGTTTGGCTTCCCTGGTGGAGTATGCAGTTGTCCAGGTG
ATGCTGAACAACCCCAAAGGGTTGAAGCTGAAAAAGCCAGAATTGCTAAGGCTGAG
CAAGCAGATGAAAAGGTGGAAATGTGGCTAAAAAGAATACTGTGAATGGAACAGGGA
CTCCTGTTTCATATTAGCACTTTGCAGGTTGGTGAGACCAGATGCAAAAAAGTTTGTACT
TCTAAGTCTGATCTGAGATCTAATGACTTCAGCATTGTTGGAAGCTTACCAAGAGATTTT
GAACTATCCAATTATGACTGCTATGGAAAACCCATTGAAGTTAACAACGGACTTGGGAA
ATCTCAGGCTAAGAACAACAAGAAGCCTCCCCCTGCGAAACCTGTTATTCCAACAGCA
GCAAAGCGAATTGATCTTTATGCAAGAGCATTGTTTCTTTCTGCTTCTTGTCTTCAAT
GTTATATATTGGTCTATATATTTATGA

Aminosäuren-Sequenz der β -Untereinheit des humanen Glycinrezeptors

MKFLLTAFILISLWVEEAYSKEKSSKKGKGGKQYLCPSQQSAEDLARVPANSTSNILNR
LLVSYDPRIRPNFKGIPVDVVNIFINSFGSIQETTMDYRNIFLRQKWNDPRLKLPSDFRGS
DALTVDPMTMYKCLWKPDFFANEKSANFHDVTQENILLFIFRDGDVLVSMRLSITLSCPLDL
TLFPMDTQRCKMQLESFGYTTDDLRFIWQSGDPVQLEKIALPQFDIKKEDIEYGNCTKYY
KGTGYTTCVEVIFTLRRQVGFYMMGVYAPTLIVVLSWLSFWINPDASAARVPLGIFSVLS
LASECTTLAAELPKVSYVKALDVWLIACLLFGFASLVEYAVVQVMLNNPKRVEAEKARIAKA
EQADGKGGNVAKKNTVNGTGTPVHISTLQVGETRCKKVCTSKSDLRSNDFSIVGSLPRDF
ELSNYDCYGKPIEVNNGLGKSQAKNNKKPPPAKPIPTAAKRIDLARALFPFCFLFFNVIY
WSIYL

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Zu aller erst zu erwähnen ist mein Doktorvater Prof. Dr. Cord-Michael Becker für die Vergabe des Themas, die gedankliche Vorarbeit und sein offenes Ohr für Probleme und Anregungen. Besonders bewundernswert ist sein Durchhaltevermögen und seine Einsatzbereitschaft, sodass trotz seiner schweren Erkrankung die Fertigstellung der begonnen Arbeit möglich war. Ich wünsche ihm von Herzen weiterhin gute Besserung und viel Kraft für den weiteren Weg.

Ohne Frau Prof. Dr. Carmen Villmann, die den Großteil der Betreuung übernommen hat, wäre diese Arbeit ebenfalls nicht zustande gekommen. Auf ihre Anleitung, Unterstützung und Überlegungen ist stets Verlass und sie verfügt über eine schier unerschöpfliche Geduld. An ihrer neuen Tätigkeitsstätte in Würzburg wünsche ich ihr eine erfüllende und interessante Forschungsumgebung.

Dr. Christoph Kluck danke ich für die Betreuung und Anleitung der proteinbiochemischen Experimente, sowie die Anregungen über den Tellerrand hinaus zu blicken. Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Ralf Enz bedanken, der bereitwillig das Zweitgutachten und die Abnahme der Verteidigung übernommen hat.

Für die Überlassung der Zellkulturen und die damit verbundenen zugrunde liegenden Arbeiten geht ein Dank an Frau Dr. Annelen Kreissler sowie Frau Rosa Weber. Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Marina Wenzel, Frau Renate Fäcke-Kühnhauser und Frau Annette Serwotka, die mit ihrem technischen Wissen und Können immer wieder Lösungen für anfallende Schwierigkeiten fanden. Herrn Dr. Christoph Kluck, Frau Dr. Astrid Wittmann und Herrn Martin Eberhardt danke ich für unterhaltsame Stunden im Labor und kreativen Input.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mich zu jedem Zeitpunkt unterstützt haben.

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir in allen Teilen selbstständig angefertigt wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden. Darüber hinaus erkläre ich, dass die Dissertationsschrift weder vollständig, noch teilweise, einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt wurde, einen akademischen Grad zu erwerben.