

Aus dem Bereich Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Herstellung polyklonaler Antikörper gegen das TRPC3-Kanalprotein von Maus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Medizin“

der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes 2013

vorgelegt von:

Michael Hoshke

geb. am: 05.11.1983

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Die Immunisierung von Kaninchen mit den von mir hergestellten und aufgereinigten TRPC3-Fusionsproteinen, die Blutentnahmen sowie die Haltung der immunisierten Kaninchen erfolgte dankenswerterweise in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Zimmermann am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (Frau Elisabeth Ludes, Frau Sabine Pelvay, Herr PD Dr. Jung)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	4
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	6
2 EINLEITUNG.....	8
2.1 IONENKANÄLE.....	8
2.2 TRP-KANÄLE.....	9
2.3 TRPC-SUBFAMILIE UND TRPC3.....	11
2.4 ZIELSETZUNG.....	13
3 MATERIAL UND METHODEN.....	15
3.1 GERÄTE.....	15
3.1.1 Zentrifugen.....	15
3.1.2 Gelelektrophorese-Apparaturen.....	15
3.1.3 Sonstige.....	15
3.2 SOFTWARE.....	15
3.3 CHEMIKALIEN.....	16
3.4 PUFFER/LÖSUNGEN.....	16
3.4.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden.....	16
3.4.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden.....	17
3.5 BAKTERIEN/ZELLEN.....	21
3.5.1 <i>E. coli</i> XL1-blue (Stratagene, LA Jolla, USA).....	22
3.5.2 <i>E. coli</i> BL21(DE3) (Stratagene, LA Jolla, USA).....	22
3.5.3 COS-Zellen.....	22
3.6 MIKROSOMALE PROTEINFRAKTIONEN.....	22
3.7 VEKTOREN.....	22
3.7.1 pET-19b (Novagen).....	22
3.7.2 pET-SUMO (Invitrogen).....	22
3.7.3 pGEX-4T-2 (GE-Healthcare).....	23
3.8 OLIGODESOXYNUKLEOTID-PRIMER („OLIGONUKLEOTIDE“).....	23
3.9 ENZYME.....	24
3.9.1 Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs).....	24
3.9.2 Andere.....	25
3.10 ANTIKÖRPER.....	25
3.10.1 Erst-Antikörper.....	25
3.10.2 Zweit-Antikörper.....	26
3.11 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	26
3.11.1 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).....	26
3.11.2 Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	27
3.11.3 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA.....	28
3.11.4 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA.....	28
3.11.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
3.11.6 Modifikation von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	29
3.11.7 Dephosphorylierung linearisierter DNA.....	29
3.11.8 Ligation zur Herstellung rekombinanter Plasmide.....	30
3.11.9 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	30
3.11.10 Elektroelution.....	31
3.11.11 DNA-Fällung.....	31
3.11.12 DNA-Sequenzierung.....	32
3.11.13 Transformation von DNA in Bakterienzellen.....	33
3.12 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	35
3.12.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
3.12.2 Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	36
3.12.3 Western Blot.....	36
3.12.4 Wiederverwendung von Western Blots.....	37

3.12.5	<i>Expression rekombinanter Fusionsproteinen</i>	37
3.12.6	<i>Proteinquantifizierung</i>	38
3.12.7	<i>Zellaufschluss und Reinigung von Fusionsproteinen</i>	38
3.12.8	<i>Immunisierung von Kaninchen, Blutentnahme, Seren-Testung</i>	40
3.12.9	<i>Affinitätschromatographie von Antiseren</i>	41
3.12.10	<i>Präparation von Gewebemikrosomen</i>	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	HERSTELLUNG REKOMBINANTER MTRPC3-FUSIONSPROTEINE	43
4.1.1	<i>Auswahl von Proteinfragmenten des mTRPC3-Proteins</i>	43
4.1.2	<i>Konstruktion von Fusionsproteinen</i>	44
4.1.3	<i>Expression der rekombinanten Fusionsproteine</i>	46
4.2	HERSTELLUNG POLYKLONALER ANTIKÖRPER	48
4.3	TESTUNG DER GEWONNENEN SEREN AUF SPEZIFISCHE MTRPC3-ANTI-KÖRPER	49
4.4	AUFREINIGUNG DER SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER	50
4.5	INWIEWEIT ERKENNEN DIE ANTIKÖRPER 45/47 UND 63/64 NEBEN TRPC3 AUCH TRPC6 UND TRPC7 ?.....	52
4.6	NACHWEIS VON MTRPC3 IN PROTEINFRAKTIONEN VON MAUS	53
4.7	NACHWEIS VON MTRPC3 AN HYPERTROPHIERTEN HERZZELLEN	56
4.8	OPTIMIERUNG DER WESTERN BLOTS ZUM NACHWEIS VON TRPC3	58
5	DISKUSSION	60
6	LITERATURVERZEICHNIS	63
6.1	EIGENE VERÖFFENTLICHUNG	63
6.2	ZITIERTER VERÖFFENTLICHUNGEN	63
7	ANHANG	70
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	70
7.2	AMINOSÄUREN	72
7.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	73
7.4	TABELLENVERZEICHNIS.....	73

1 Zusammenfassung

Der TRPC3-Kanal ist ein Ionenkanal aus der Familie der TRP-Kanäle. Er ist permeabel für verschiedene Kationen wie Na^+ , K^+ und Ca^{2+} . Über seine genaue Funktion in Säugetierzellen ist bisher wenig bekannt, ebenso wie über das Expressionsmuster des TRPC3-Gens in verschiedenen Zelltypen. Die Erforschung dieser Eigenschaften gestaltet sich schwierig, da bislang noch kein spezifischer Ligand gefunden wurde, der diesen Kanal blockiert oder aktiviert. Ebenso sind bisher keine Liganden/Antikörper bekannt, die hochaffin von den TRPC3-Kanalproteinen gebunden werden und die zur Detektion dieser Proteine verwendet werden könnten.

Ziel meiner Versuche war es deshalb, polyklonale Antikörper gegen mTRPC3 zu erzeugen. Hierzu habe ich die cDNA von insgesamt sieben Fusionsproteinen aus Teilen des mTRPC3-Proteins in vitro kloniert und die entsprechenden Proteine rekombinant in E.coli hergestellt. Nach Aufreinigung wurden diese Proteine dazu verwendet, Kaninchen zu immunisieren. Auf diese Weise wurden zwei verschiedene polyklonale Antikörper gegen das TRPC3-Protein von Maus (mTRPC3) hergestellt, die das Protein nach Überexpression der cDNA spezifisch erkennen. Mit einem der beiden Antikörper konnte das ~91.000-Da-mTRPC3-Protein in Proteinfractionen von Wildtyptieren detektiert werden. Als Kontrolle wurden Proteinproben einer Mauslinie verwendet, deren TRPC3-Gen durch homologe Rekombination deletiert worden war. Auf diese Weise konnte das mTRPC3-Protein in Fraktionen von Gesamthirn und insbesondere von Kleinhirn nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieses Antikörpers steht erstmals ein Antikörper zu Verfügung, der das TRPC3-Protein zweifelsfrei detektiert. Ein zweiter Antikörper erkennt neben TRPC3 auch die strukturell eng verwandten TRPC6- und TRPC7-Proteine. Möglicherweise lässt sich durch Präabsorption dieser Antikörper an Proteinfractionen von TRPC3-defizienten Tieren ihre Spezifität und Sensitivität noch optimieren.

Summary

The TRPC3-channel is an ion channel which belongs to the family of TRP cation channels. It is permeable to various cations like Na^+ , K^+ and Ca^{2+} . Only little is known about its specific function in mammalian cells and its expression pattern in different cell types. To study these properties is challenging because a specific ligand, which is blocking or activating this channel, has not been found yet. Also no ligands are known to date that would be bound with high affinity by the TRPC3 channel proteins and so could be used to detect these proteins.

Thus the goal of my experiments was to create polyclonal antibodies against mTRPC3. I cloned the cDNA of seven fusion proteins, encoding parts of the mTRPC3 protein and generated the corresponding recombinant proteins in E.coli. After purifying these proteins, they were used to immunize rabbits. After bleeding of the rabbits I tested the sera for the presence of antibodies against TRPC3. By these experiments two different polyclonal antibodies against the TRPC3 protein from mouse (mTRPC3) were produced which are able to specifically detect the protein after over-expression of the cDNA. One of these antibodies was able to detect the 91.000-Da-mTRPC3 protein in proteinfractions from of wild-type animals. Protein samples of a TRPC3-gen-deficient mouse strain were used to control the results. Evidence of an expression of mTRPC3 could be found in fractions of brain and especially cerebellum. This antibody is the first available antibody that unequivocally detects the TRPC3 protein. A second antibody detects in addition to TRPC3 two closely related proteins, the TRPC6 and TRPC7 proteins. The specificity and sensitivity of these antibodies may be further optimized by preabsorption on protein fractions of TRPC3-deficient mice.

2 Einleitung

2.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind Poren bildende Proteine in den Membranen von Zellen und Zellorganellen, die es Ionen ermöglichen, die jeweilige Membran zu überwinden und in das Innere der Zelle oder des Organells zu gelangen, beziehungsweise die Zelle oder das Organell zu verlassen. Die Richtung des Ionenstroms wird dabei bestimmt durch den Konzentrations- und den Potentialgradienten. Abzugrenzen sind Ionenkanäle daher von aktiven Transportproteinen, z.B. Ionenpumpen, die unter Energieaufwand Ionen entgegen dem Gradienten transportieren. Ionenkanäle weisen eine Selektivität auf für Anionen oder Kationen oder bestimmte Ionen, wie zum Beispiel Na^+ , Ca^{2+} , K^+ oder Cl^- . Die Kanäle können in geöffnetem oder geschlossenem Zustand vorliegen. Die Öffnung der Kanäle ist von verschiedenen äußeren Faktoren abhängig, die aktivierend oder deaktivierend wirken. So werden viele Kanäle durch das Membranpotential gesteuert (spannungsabhängige Ionenkanäle) oder durch extra- oder intrazelluläre Liganden beeinflusst, die durch Bindung an das Kanalprotein den Kanal öffnen oder schließen. Weitere Faktoren können die Umgebungstemperatur oder mechanische Reize sein. Ionenkanäle spielen durch die Steuerung von Transportprozessen über die Membran eine wichtige Rolle in der Ionen-Homöostase, der Aufnahme und Ausscheidung von Stoffen sowie in der Erregungsbildung vor allem in Nerven und Muskelzellen. Mutationen in den Genen von Ionenkanälen führen dementsprechend in den meisten Fällen zu schwerwiegenden Erkrankungen. Zum anderen sind Ionenkanäle auch häufiger Zielmoleküle medikamentöser Behandlung. Die eingesetzten Pharmaka können den jeweiligen Kanal aktivieren, deaktivieren oder blockieren. Beispiele sind Lokalanästhetika, die spannungsabhängige Natriumkanäle blockieren, Sulfonylharnstoffe, die Kaliumkanäle blockieren und bei Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden, oder Benzodiazepine und Barbiturate, welche den Chloridstrom durch GABA_A -Kanäle modulieren.

Anhand ihrer Aminosäuresequenzen und ihrer biophysikalischen Eigenschaften, wie Ionenselektivität und Öffnungsmechanismen, werden Ionenkanäle in Gruppen zusammengefasst. Eine dieser Gruppen ist die der TRP-Kanäle, auf die nun näher eingegangen werden soll. TRP-Kanäle bzw. deren Gene stellen neben den Kaliumkanalgenen die größte Kanalgruppe im Säugetiergenom dar.

2.2 TRP-Kanäle

Die TRP-Kanäle bilden eine große Gruppe von Kationen-selektiven Ionenkanälen. Benannt sind sie nach einem Ionenkanal, der in *Drosophila melanogaster* entdeckt wurde und eine wichtige Rolle bei der Phototransduktion spielt (Montell & Rubin 1989). Da eine TRP-Mutante auf einen kontinuierlichen Lichtreiz nicht mit einem anhaltenden Rezeptorpotential antwortete, sondern nur ein vorübergehendes – sogenanntes transientes – Potential zeigte, wurde der Kanal „transient receptor potential channel“ getauft (Cosens & Manning 1969, Hardie & Minke 1992). Ähnliche Kanäle wurden dann auch in Säugetieren, Würmern und Manteltieren entdeckt. Definiert wird diese Gruppe durch Ähnlichkeiten in Struktur und Sequenz sowie durch ihre Kationenselektivität. In Säugetieren sind derzeit mehr als 25 Typen von TRP-Kanälen bekannt; die Ionenkanalproteine werden in 7 Unterkategorien unterteilt, in TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP und TRPML. Die siebte Gruppe, TRPN, kommt nur in Fliegen, Würmern und Manteltieren vor.

TRP-Proteine sind Membranproteine und besitzen 6 Transmembrandomänen mit Ausbildung

TRP subfamilies	Fly	Worm	Sea squirt	Fish	Mouse	Human
TRPC	3	3	8	8	7	6
TRPV	2	5	2	4	6	6
TRPM	1	4	2	6	8	8
TRPA	4	2	4	1	1	1
TRPN	1	1	1	-	-	-
TRPP	4	1	9	2	3	3
TRPML	1	1	1	4	3	3
Total	16	17	27	25	28	27

Tabelle 1 TRP-Subfamilien

TRP-Subfamilien und Anzahl der identifizierten Gene in Fliegen, Würmern, Manteltieren, Maus und Mensch (nach Flockerzi, 2007)

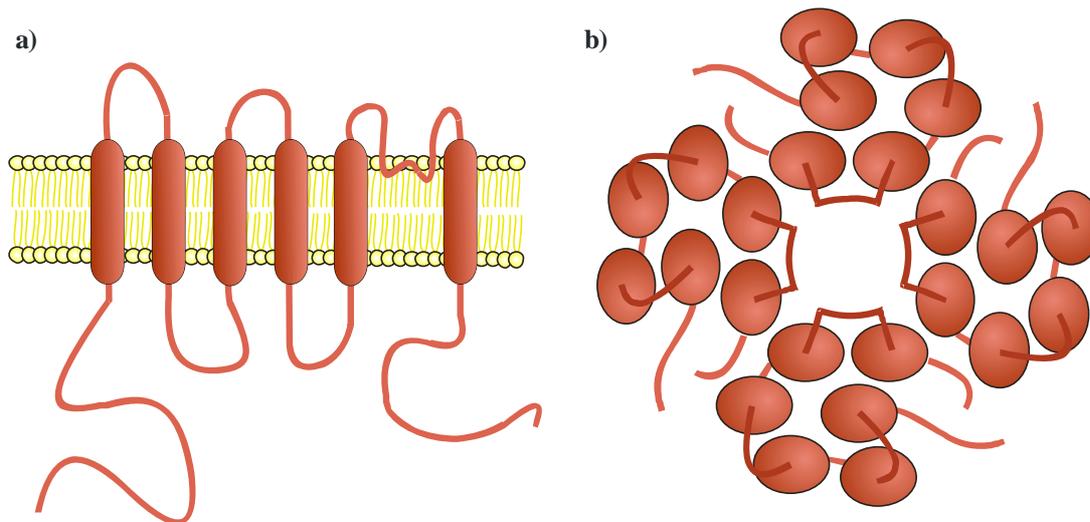


Abbildung 1 TRP-Kanal

a) Schematische Darstellung eines TRP-Kanals; b) TRP-Tetramer

einer Pore zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne. Amino- und Carboxyterminus des Proteins befinden sich vermutlich intrazellulär. Es wird davon ausgegangen, dass sich jeweils vier TRP-Proteine zu einer Einheit zusammenlagern. Dabei sind sowohl vier gleiche TRP-Proteine möglich, die ein homologes Tetramer bilden, als auch heterologe Tetramer aus verschiedenen TRP-Typen.

TRP-Kanäle leiten meist verschiedene Kationen wie Natriumionen (Na^+), Kaliumionen (K^+) und Kalziumionen (Ca^{2+}), manche auch Magnesiumionen (Mg^{2+}). Die Aktivierung kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Sowohl rezeptorgesteuerte Aktivierung, z.B. über G-Proteine oder Tyrosinkinasen, als auch Liganden-gesteuerte Aktivierung sind möglich. Einige TRP-Kanäle werden auch durch Wärme (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4) oder Kälte (TRPA1, TRPM8 (Peier et al 2002)) aktiviert. Zumindest YVC1, der einzige TRP-Kanal, der in Bäckerhefe exprimiert wird, kann mechanisch durch Schrumpfung der Hefezelle aktiviert werden (Chang et al. 2010). TRP-Kanäle beeinflussen den transmembranen Kationenfluss und erhöhen bei Aktivierung die intrazelluläre Konzentration, vor allem von Kalziumionen ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) und Natriumionen ($[\text{Na}^+]_i$), was zur Depolarisation der Zellen führt. Verschiedene TRP-Kanäle spielen dadurch eine Rolle im Temperaturempfinden, in der Wahrnehmung osmotischer und mechanischer Reize, in olfaktorischer, gustatorischer und visueller Wahrnehmung sowie in der Nozizeption. Daneben wurde für einige TRP-Kanäle auch eine Funktion in nicht-erregbaren Zellen nachgewiesen, z.B. bei der endothelvermittelten Vasorelaxation (TRPC4, Freichel et al. 2001), der Kontraktilität glatter

Muskelzellen (Dietrich et al. 2005 und 2006) und der Kontrollfunktion im Zellzyklus (West et al. 2001).

Verschiedene familiäre Krankheitsbilder des Menschen sind durch Mutationen in TRP-Genen hervorgerufen, wie die *fokal segmentale Glomerulosklerose* durch Punktmutation in TRPC6, die *Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie* durch Punktmutation in TRPM6 (Schlingmann et al 2002, Walder et al 2002), die *autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung* durch Punktmutation in TRPC2 oder die *stationäre Nachtblindheit* durch Mutationen in TRPM1 (van Genderen et al. 2009). Weiter bestehen Korrelationen zwischen bestimmten Malignomen und erhöhter oder verminderter Expression von TRP-Proteinen. Beim kapselüberschreitenden Prostatakarzinom sind z.B. Transkripte von TRPV6 und TRPM8 hochreguliert (Wissenbach et al. 2004), beim malignen Melanom kann die Abnahme der Expression von TRPM1 als Prognoseparameter für eine Metastasierung betrachtet werden (Duncan et al. 1998).

2.3 TRPC-Subfamilie und TRPC3

Die „classical“ oder „canonical“ TRP-Kanäle (TRPC) erhielten ihren Namen, da sie mit dem ersten gefundenen TRP-Kanal, dem TRP-Kanal von *Drosophila*, am engsten verwandt sind. Ihre Aminosäuresequenzen sind zu 30-40% mit derjenigen des *Drosophila*-TRP-Kanals identisch. Sie werden nach Aminosäuresequenz und Funktion in drei Gruppen unterteilt:

- 1) TRPC1, TRPC4 und TRPC5
- 2) TRPC3, TRPC6 und TRPC7
- 3) TRPC2

Die Kanalproteine der zweiten Gruppe – TRPC3, TRPC6 und TRPC7 – sind sehr ähnlich und weisen eine zu 65-78% identische Aminosäuresequenz auf (Abbildung 2). Sie können über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder DAG (Diacylglycerin) aktiviert werden (Hofmann et al. 1999). Die Aktivität kann zudem durch Glykosylierung der Membranproteine positiv und – bei TRPC3 – durch Phosphorylierung negativ beeinflusst werden.

Über RT-PCR-Analysen wurde eine Expression von TRPC3 festgestellt in Neuronen des zentralen Nervensystems (Zhu et al. 1996), Endothelzellen der Blutgefäße (Freichel et al. 1999) und glatten Muskelzellen (Beech et al. 2004).

TRPC3	-----	
TRPC7	-----MLGSN	
TRPC6	MSQSPRFVTRRGGSLKAAPGAGTRRNESQDYLLMDELGDGYPQLPLPPYGYPSFRGNE	60
TRPC3	-----MRDKGRRQAVRGPAFMFGARGPSLTAEEERFLDAAEYGNIPVVRKMLEES	50
TRPC7	FKNMQRRTTLREKGRRAIRGPAYMFNEKGTSLTPEEERFLDAAEYGNIPVVRKMLEES	66
TRPC6	NRLTHRRQTLREKGRRLANRGPAYMFDHSTLSLIEEERFLDAVEYGNIPVVRKMLEEC	120
TRPC3	RTLNVNVDYMGQNALQLAVGNEHLEVTELLKKNENLARI GDALLLAI SKGYVRIVEAIL	110
TRPC7	KTLNFCVVDYMGQNALQLAVGNEHLEVTELLKKNENLAVGDALLLAI SKGYVRIVEAIL	126
TRPC6	HSLNVNVDYMGQNALQLAVANEHLEI TELLKKNENLSRVGDALLLAI SKGYVRIVEAIL	180
TRPC3	GHPGFAASRRLTLSPCEQELRDDDFYAYDEDGTRFSPDITPIILAACHKYEVVHLLLLK	170
TRPC7	SHPAFAQGQRLTLSPLEQELRDDDFYAYDEDGTRFSDITPIILAACHQEYEIVHILLK	186
TRPC6	NHPSFAEGKRLATSPSQSELQDDDFYAYDEDGTRFSDVTPPIILAACHQEYEIVHTLLRK	240
TRPC3	GARIEFAHDYFCRCSDCAEKQRLDAFSHSRSRINAYKGLASPAYLSLSSDPVLTALELS	230
TRPC7	GARIEFRPHDYFCKNECTEKQKDSFHSRSRMNAYKGLASAAAYLSLSSDPVLTALELS	246
TRPC6	GARIEFRPHDYFCKCTECSQKQKHSFHSRSRINAYKGLASPAYLSLSSDPVMTALELS	300
TRPC3	NELAKLANIEKEFKNDYRKLMSQCKDFVVGVDLDCRDSEVEAILNGDLESAPLERHGH	290
TRPC7	NELARLANIETEFKNDYRKLMSQCKDFVVGVDLDCRDTEVEVEAILNGDVN-LQVWSDH-H	304
TRPC6	NELAVLANIEKEFKNDYRKLMSQCKDFVVGVDLDCRNTEVEVEAILNGDAETROPGDFG--	358
TRPC3	KASLSRVKLAIKYEVKKFVAHPNCQQQLLTIWYENLSGLRQQTIAIKLVVIVVALGLPF	350
TRPC7	RPPLSRKLAIKYEVKKFVAHPNCQQQLLTMWYENLSGLRQQSIQAVKFLAVFGVSIQLPF	364
TRPC6	RPNLSRLKLAIKDEVKKFVAHPNCQQQLLSIWYENLSGLRQQTMAVKFLVIVVAIGLPF	418
TRPC3	LAIGYWIAPCSRLGKILRSPFMKFVAHAASFTIFLGLLVFNASDRFEGITLIPNETVIDY	410
TRPC7	LAIAYWIAPCSKLGQTLRSPFMKFVAHAASFTIFLGLLVFNASDRFEGVKTLPNETFTDY	424
TRPC6	LALIYWCAPCSKMGKILPRPFMKFVAHAASFTIFLGLLVFNASDRFEGTKLIPNETSTDN	478
TRPC3	PKQIFRVKTTQFTWTEMLIMVVLGMMWSECKELWLEGPREYIVQLWNVLDGMLSI FIA	470
TRPC7	PKQIFRVKTTQFSWTEMLIMKVLVGMWSECKEIVEEGPREYVHLWNLLDFGMLSI FVA	484
TRPC6	ARQLFRMKTSCFSWMEMLIISVWVIGMIWAECKEIVTQGPKEYL FELWNMLDFGMLAIFAA	538
TRPC3	AFTARFLAFLQATKAQQYVDSHVQESDLSEVTLPPVQYFTYARDKWLPSDPQIISEGLY	530
TRPC7	SFTARFMAFLKASEAQLYVDQYVQDVTLHNVSLPPEVAYFTYARDKWWPSDPQIISEGLY	544
TRPC6	SFTARFMAFWHASKAQSIIDANDTLKDLTKVTLGDNVQYINLARIKWDPDPQIISEGLY	598
TRPC3	AIAVVLSFSRIAAYILPANESFGPLQISLGRTVKDI FKFVMVLFIMVFLAFMIGMFI LYSY	590
TRPC7	AIAVVLSFSRIAAYILPANESFGPLQISLGRTVKDI FKFVMVLFIMVFLAFMIGMFI LYSY	604
TRPC6	AIAVVLSFSRIAAYILPANESFGPLQISLGRTVKDI FKFVMVLFIMVFLAFMIGMFI LYSY	658
TRPC3	LGAKVNPFAFTTVEESFKTLFWSIFGLSEVTSVVLKYDHKFIENIGYVLYGIYNVMTMVVL	650
TRPC7	RGAKYNPFAFTTVEESFKTLFWSIFGLSEVTSVVLKYDHKFIENIGYVLYGVYNVMTMVVL	664
TRPC6	IGAKQNEAFTTVEESFKTLFWAIFGLSEVKSVVINYNHKFIENIGYVLYGVYNVMTMVVL	718
TRPC3	LNMLIAMINSSYQEI EDDSDVEWKFA RSKLWLSYFDDGKTLPPFSLVPSPKSFVYFIMR	710
TRPC7	LNMLIAMINSSYQEI EDDADVEWKFA RAKLWLSYFDEGRTLPA PFNLVPSPKSFYFYLIMR	724
TRPC6	LNMLIAMINSSYQEI EDDADVEWKFA RAKLWLSYFDEGRTLPA PFNLVPSPKSLLYLLK	778
TRPC3	ITN---FSKCRRRRLQKDLLELGMGN-----SKSRLNLFQSNRSRV	747
TRPC7	IKMCLIELCQSKAKRCENDLEMGM LN-----SKFRKTRY-QAGMRN	764
TRPC6	FKKWMCELIQGQKQGFQEDAEMNKRNEEKKFGISGSHEDLSKFSLDKNQLAHNKQSSTRS	838

TRPC3	FESHFSN\$ILNQPTRYQQIMKRLIKRYVLKAQVDKENDEVNEGELKEIKQDISSLRYELL	807
TRPC7	SENLTANSTFSKPTRYQKIMKRLIKRYVLKAQVDRENDDEVNEGELKEIKQDISSLRYELL	824
TRPC6	SEDYHLNSF\$SNP\$PRQYQKIMKRLIKRYVLQAQIDKESDEVNEGELKEIKQDISSLRYELL	898
TRPC3	EDKSQATEELAILIHKLSEK----LNPSVLRCE----	836
TRPC7	EKKSQATGELADLIQQLSEKFGKNLNKDHLRVNQGD	861
TRPC6	EKKSQNSEDLAELIRKLGRLS--LEPKLEESRR---	930

Abbildung 2 Vergleich der Aminosäuresequenzen von mTRPC3, mTRPC6 und mTRPC7

Identische Aminosäurereste sind farblich markiert, die vorhergesagten Transmembrandomänen TM1, TM2, TM3, TM4, TM5 und TM6 angegeben. Die GenBank Accession-Nummern sind NM 019510 (TRPC3), NM 012035 (TRPC6) und NM 013838 (TRPC7). Die Aminosäuresequenzen der drei Proteine sind zu 62% identisch.

Es wird angenommen, dass TRPC3-Kanäle eine wichtige Rolle für die Glutamat-vermittelte Informationsübertragung in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns und somit in der Steuerung der Motorik spielen. So zeigen auch TRPC3-defiziente Mäuse eine Beeinträchtigung des Gehvermögens (Hartmann et al. 2008).

Kardiomyozyten von Mäusen weisen nach Induktion einer kardialen Hypertrophie – zum Beispiel durch Angiotensin II – eine erhöhte Expression von TRPC3 auf, während eine Unterdrückung der TRPC3-Expression zu verminderter Ausschüttung von ANP und BNP (atrial bzw. brain natriuretic peptide) führt (Onohara et al 2006, Brenner et al 2007) – beides Indikatoren für eine Herzinsuffizienz. TRPC3 scheint also eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie zu spielen und ist somit als potentieller Ansatzpunkt einer Therapie dieser Erkrankung denkbar.

2.4 Zielsetzung

Das Ziel meiner Versuche war es, zum Zweck der genaueren Charakterisierung des TRPC3-Proteins von Maus, Antikörper herzustellen, die spezifisch das mTRPC3-Protein binden und es dadurch detektieren. Die Identifizierung von mTRPC3 im Gewebe und in Proteinfractionen und die Charakterisierung seiner Funktion ist schwierig, da derzeit keine spezifischen Liganden bekannt sind, die TRPC3 blockieren oder aktivieren. Des Weiteren existiert bisher auch kein Antikörper, der mTRPC3 spezifisch erkennt. Als Problem erwies sich vor allem auch die große Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von mTRPC3 zu den Sequenzen der

beiden nächsten Verwandten mTRPC6 (71,2 % identische Aminosäuresequenz) und mTRPC7 (81 % identische Aminosäuresequenz). In vorangegangenen Versuchen wurde die Herstellung von Antikörpern mittels synthetisierter Peptide versucht, die einem kurzen Abschnitt der Proteinsequenz von mTRPC3 entsprachen. Diese Peptide wurden dann als Hapten an ein Trägerprotein gekoppelt und Kaninchen zur Antikörperbildung mit dem gekoppelten Produkt immunisiert. Einige der daraus gewonnenen polyklonalen Antiseren erkannten zwar das mTRPC3-Protein nach Überexpression in COS- oder HEK-Zellen, nicht aber in Proteinfractionen von Maus, so dass der Nachweis ihrer Spezifität und Sensitivität nicht erbracht werden konnte. Meine Versuche sollten daher anstatt solcher etwa 10 bis 20 Aminosäurereste langer Peptide längere Proteinabschnitte des mTRPC3-Proteins verwenden. Diese Proteinabschnitte sollten zunächst rekombinant in E.coli als Fusionsproteine hergestellt, aufgereinigt und anschließend Kaninchen injiziert werden. Die aus den Kaninchen gewonnenen Seren sollten affinitätsaufgereinigt und sodann auf ihre mTRPC3-Selektivität zunächst in Überexpressionssystemen getestet werden, im Anschluss sollten Gewebeproben im Western Blot mit Hilfe dieser Antikörper untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

3.1.1 Zentrifugen

- Tischzentrifuge 1-14 (SIGMA, Osterode)
- Mikrotiterplattenzentrifuge 4-15C (SIGMA, Osterode)
- Optima MAX-E Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld)
- J2-HS-Zentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld)
- Universalzentrifuge 3-16 PK (Sigma)

3.1.2 Gelelektrophorese-Apparaturen

- Mini Protean II (Bio-Rad, München)
- Mini Protean III (Bio-Rad, München)
- Blotting-Apparatur Mini Trans-Blot (Bio-Rad, München)

3.1.3 Sonstige

- Thermocycler Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Forster City, USA)
- GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Langenfeld)
- 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Langenfeld)
- DNA-Sequenzierer ABI PRISM System 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Langenfeld)
- Sonorex Digital 10P Ultraschall-Quelle
- Sonopuls Ultrasonic Homogenizer (Bandelin, Berlin)
- ÄKTAprime purification system (GE Healthcare, München)
- Ultrospec 3000 Photometer (GE Healthcare, München)
- Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech, Uppsala)

3.2 Software

- CorelDRAW 12 (Corel Corporation, Ottawa)
- AIDA Image Analyzer 3.8 (Raytest, Straubenhardt)
- IrfanView 3.9 (Irfan Skiljan, Jajce)
- MS Excel (Microsoft, Redmont)
- Accelerlys Gene (Accelerlys Inc., San Diego)

3.3 Chemikalien

Die in den Versuchen benutzten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), GE Healthcare (München), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Schwalbach), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (München) bezogen.

3.4 Puffer/Lösungen

3.4.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Für das Ansetzen der Puffer und Lösungen wurde entionisiertes, autoklaviertes Wasser verwendet, und die Puffer und Lösungen wurden ebenfalls bei 121°C und 1bar 20 Minuten autoklaviert, falls nicht anders angegeben.

- 10x DNA-Auftragepuffer
 - 40% (w/v) Harnstoff
 - 40% (w/v) Glycerin, wasserfrei
 - 0,05 M EDTA, pH 8,0
 - 0,01 M Tris, pH 7,0
 - 0,05 M EDTA, pH 8,0
 - 0,25% (w/v) Bromphenolblau
 - 0,25% (w/v) Xylencyanol FF
- STET-L-Puffer pH 8,0
 - 8% (w/v) Saccharose
 - 5% (v/v) Triton-X-100
 - 0,05 M Tris
 - 0,05 M EDTA

Vor Gebrauch Zugabe von Lysozym

- Lysozym-Lösung
10 mg/ml Lysozym
- Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE), pH 8,0
0,089 M Tris
0,089 M Borsäure
0,001 M EDTA
- TSS-Puffer (TBE), pH 8,0
10 % (w/v) PEG 3350
5 % (v/v) DMSO
1 % (w/v) Caseinhydrolysat
1 % (w/v) NaCl
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,05 M Magnesiumchlorid

3.4.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Zum Ansetzen der Puffer und Lösungen diene, soweit nicht anders angegeben, entionisiertes Wasser.

- 2x SDS-Probenpuffer, pH 6,8 (Laemmli)
120 mM Tris
20% (v/v) Glycerin
10% (v/v) β -Mercaptoethanol
8% (w/v) SDS
0,01% (w/v) Bromphenolblau
- 4xTrenngelpuffer, pH 8,8
1,5 M Tris

- 0,4% (w/v) SDS
- 4x Sammelgelpuffer, pH 6,8
 - 0,5 M Tris
 - 0,4% (w/v) SDS
- 10xSDS-Elektrophoresepuffer, pH 8,3
 - 0,25 M Tris
 - 1,92 M Glycin
 - 1% (w/v) SDS
- Blotting-Puffer, pH 8,3
 - 0,25 M Tris
 - 1,92 M Glycin
 - 20% (v/v) Methanol
 - 1% (w/v) SDS
- Ponceau-S-Färbelösung
 - 2% (w/v) Ponceau S
 - 3% (v/v) Trichloressigsäure
- Blockierungspuffer
 - 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer
- 10xTBS-Puffer, pH 7,5
 - 0,5 M Tris
 - 1,5 M NaCl
- Stripping-Puffer, pH 6,8
 - 2% (w/v) SDS
 - 0,1 M β -Mercaptoethanol

-
- 0,00625 M Tris
 - Lyse-Puffer, pH 8,0
 - 0,1 M Tris
 - 0,001 M Magnesiumchlorid
 - Saccharose-Puffer, pH 7,4
 - 0,25 M Saccharose
 - 0,01 M Tris
 - Coomassie-Färbelösung
 - 45% (v/v) Ethanol
 - 10% (v/v) Essigsäure
 - 0,125% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
 - Destain-Lösung
 - 9% (v/v) Ethanol
 - 6% (v/v) Essigsäure
 - Fixierlösung?
 - Protease-Inhibitoren

90mM	Iodacetamid	(Stammlsg: 9 M)
1mM	Benzamidin	(Stammlsg: 1 M)
1mM	Phenanthrolin	(Stammlsg: 1 M)
2 µM	Leupeptin	(Stammlsg: mM)
2 µM	Pepstatin	(Stammlsg: 1 mM)
1 µM	Antipain	(Stammlsg: 1 mM)
0,1 µM	PMSF	(Stammlsg: 0,1 mM)
0,3 µM	Aprotinin	(Stammlsg: 0,3 mM)

Die Protease-Inhibitoren wurden in Stammlösungen angesetzt und in dem späteren Puffer auf die entsprechend, erstabgeführte Konzentration verdünnt.

- PBS-Puffer, pH 7,4 oder pH 8,0

0,14 M NaCl

0,0027 M KCl

0,0015 M KH_2PO_4

0,008 M Na_2HPO_4

Nach dem Ansetzen wurde der PBS-Puffer autoklaviert

- 8x Bindungspuffer, pH 7,9

4 M NaCl

0,16M Tris

0,04 M Imidazol

- 8x Ladungspuffer

- 0,4 M NiSO_4

- 8x Wasch-Puffer, pH 7,9

4 M NaCl

0,48 M Imidazol

0,16 M Tris

- 4x Elutionspuffer, pH 7,9

2 M NaCl

4 M Imidazol

0,08 M Tris

- STE-Puffer, pH 8,0

0,15 M NaCl

0,01 M Tris

-
- 0,001 M EDTA
 - GST-Elutionspuffer, pH 8,0
 - 0,2 M NaCl
 - 0,05 M Tris
 - 0,02 M reduziertes Glutathion
 - 0,005 M DTT
 - 0,1% (v/v) Triton-X-100
 - LB(Luria-Bertani)-Medium
 - 1% (w/v) Caseinhydrolysat
 - 1% (w/v) NaCl
 - 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 - LB^{Amp}-Medium
 - 50 µg/ml Ampicillin in LB-Medium
 - LB-Agar
 - 1,5% (w/v) Agar in LB-Medium
 - Kopplungspuffer
 - 0,2 M NaHCO₃
 - 0,5 M NaCl
 - 0,1-0,5% (w/v) Triton
 - 5 mM DTT

3.5 Bakterien/Zellen

Es wurden Escherichia-coli-Stämme verwendet, die sich vom Stamm E. coli K12 ableiten. Durch verschiedene Deletionen ist das Klonieren und Exprimieren von Fremd-DNA vereinfacht.

3.5.1 E. coli XL1-blue (Stratagene, LA Jolla, USA)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F2proAB lacIqZΔM15 Tn10(Tet^r)]

3.5.2 E. coli BL21(DE3) (Stratagene, LA Jolla, USA)

F-dcm ompT hsdS(r_B-m_B-) galλ(DE3) (defizient für die Proteasen Ion und ompT)

3.5.3 COS-Zellen

Es wurden SV40- transformierte Affennierenzellen, sogenannte COS-7-Zellen, als Überexpressionssystem verwendet. (ATCC CRL-1651)

3.6 Mikrosomale Proteinfractionen

Die mikrosomalen Proteinfractionen aus Herz, Skelettmuskulatur, Lunge, Hirn, Kleinhirn von Wildtyp- und TRPC3-defizienten-Mäusen wurden in unserer Arbeitsgruppe oder von mir selbst präpariert.

3.7 Vektoren

3.7.1 pET-19b (Novagen)

pET-q9b ist ein prokaryontischer Expressionsvektor, der die Expression von Fusionsproteinen mit einem N-terminalen His-Tag aus 10 Histidinresten ermöglicht. Der cDNA des Fusionsproteins vorgeschaltet ist der T7lac-Promotor, der durch das nicht-spaltbare Galaktose-Derivat IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosylpyranosid) aktiviert wird. Die Expression des Fusionsproteins kann somit durch Zugabe von IPTG induziert werden.

3.7.2 pET-SUMO (Invitrogen)

pET-SUMO ist ebenfalls ein prokaryontischer Expressionsvektor für die Expression von Fusionsproteinen mit einem N-terminalen His-Tag. Zusätzlich wird noch das SUMO-Protein (small ubiquitin-related modifier) angehängt, das die Löslichkeit des gebildeten

Fusionsproteins erhöht. Die Transkription des Fusionsproteins wird ebenfalls vom lac-Promotor gesteuert und kann durch Zugabe von IPTG induziert werden.

3.7.3 pGEX-4T-2 (GE-Healthcare)

pGEX-4T-2 ist ein prokaryontischer Expressionsvektor, der die Expression von Fusionsproteinen ermöglicht, denen N-terminal das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) angefügt wurde. Die Transkription des Fusionsproteins wird ebenfalls vom lac-Promotor gesteuert und kann durch Zugabe von IPTG induziert werden. (Abbildung 3)

3.8 Oligodesoxynukleotid-Primer („Oligonukleotide“)

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen und jeweils in einer Konzentration von 100 pM in autoklaviertem Wasser bei -20°C aufbewahrt. Gebrauchslösungen wurden noch einmal 1:10 mit autoklaviertem Wasser verdünnt. Bezeichnung, Nukleotidsequenz und Anwendung der verschiedenen Oligonukleotide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 Oligonukleotide

Verwendete Oligonukleotide zur Amplifizierung von mTRPC3-DNA-Fragmenten

Bezeichnung	Sequenz
MM_45	5'-CGC GGA TCC GAT GCG TGA CAA GGG CCG GC-3'
MM_46	5'-CGC GGA TCC ATG CGT GAC AAG GGC CGG C-3'
MM_47	5'-CGC GGA TCC TTA CTT CTT CAG CAG CAG CTC GG-3'
MM_48	5'-CGC GGA TCC TTA CGA GAA GCG TGT GCC ATC C-3'
MM_49	5'-CGC GGA TCC GAG CCG GCG CCT GAC CCT C-3'
MM_50	5'-CGC GGA TCC AGC CGG CGC CTG ACC CTC-3'
MM_51	5'-CGC GGA TCC TTA TTT GCA TTG CAT GGA GAG TTT C-3'
MM_52	5'-CGC GGA TCC GAG GGC ACA CGA CTA CTT CTG-3'

MM_53	5'-CGC GGA TCC AGG GCA CAC GAC TAC TTC TG-3'
MM_54	5'-CGC GGA TCC TTA GTT CTC ATA CCA GAT TGT CAA AA-3'
MM_55	5'-CGC GGA TCC GAC GAA GGC GCA GCA GTA TG-3'
MM_56	5'-CGC GGA TCC ACG AAG GCG CAG CAG TAT G-3'
MM_57	5'-CGC GGA TCC TTA GAT CTG AGG GTC TGA GGG G-3'
MM_58	5'-CGC GGA TCC GTA CCA AGA GAT CGA GGA TGA C-3'
MM_59	5'-CGC GGA TCC TAC CAA GAG ATC GAG GAT GAC-3'
MM_60	5'-CGC GGA TCC GAA CTT TTC CAA ATG CAG GAG G-3'
MM_61	5'-CGC GGA TCC AAC TTT TCC AAA TGC AGG AGG-3'
MM_62	5'-CGC GGA TCC GGA AAA CGA TGA GGT GAA TGA AG-3'
MM_63	5'-CGC GGA TCC GAA AAC GAT GAG GTG AAT GAA G-3'
MM_64	5'-CGC GGA TCC TTA CTC ACA TCT CAG CAC ACT GG-3'

Die beiden folgenden Primer wurden zur Sequenzierung verwendet

T7-Promotor	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T7-Terminator	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GAG G -3'

3.9 Enzyme

3.9.1 Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs)

BamHI (G/GATCC)

PstI (CTGCA/G)

ApaI (GGGCC/C)

EcoRV (GAT/ATC blunt)

XhoI (C/TCGAG)

3.9.2 Andere

PhusionTM High-Fidelity DNS Polymerase (New England Biolabs)

T4-DNA-Ligase (NEB)

Antarctic Phosphatase (NEB)

3.10 Antikörper

3.10.1 Erst-Antikörper

- Anti-mTRPC3-Antikörper

Die Anti-mTRPC3-Antikörper 45/47 und 63/64 wurden im Laufe der Versuche von mir hergestellt. Sie wurden in einer Verdünnung von 1:200-250 verwendet.

- Anti-His-Antikörper

Dieser polyklonale Antikörper wurde in unserer Arbeitsgruppe hergestellt und in einer Verdünnung von 1:500 verwendet, um die Expression von His-Tag-Fusionsproteinen im Western Blot zu überprüfen.

- Anti-CaV β 3-Antikörper

Dieser polyklonale Antikörper wurde in unserer Arbeitsgruppe hergestellt und in einer Verdünnung von 1:500 verwendet, um die Expression von CaV β 3 im Western Blot zu prüfen. (Hier verwendet um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen pro Spur aufgetragen wurden)

- Anti-Glutathion-S-Transferase-Antikörper

Dieser polyklonale Antikörper wurde von GE Healthcare (München) bezogen und in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet, um die Expression von GST-Fusionsproteinen im Western Blot zu überprüfen.

- Anti-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Antikörper (Anti-GAPDH)

Dieser polyklonale Antikörper wurde von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) bezogen und in einer Verdünnung von 1:500 verwendet, um die Menge an Protein auf einem Western Blot zu bestimmen.

3.10.2 Zweit-Antikörper

- ECLTM Anti-Kaninchen IgG aus Esel (GE Healthcare)

Der Zweit-Antikörper ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert und wurde in Blockierungspuffer verdünnt.

3.11 Molekularbiologische Methoden

3.11.1 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die PCR ist ein enzymatisches Verfahren zur gezielten Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts. Die Reaktion wurde angesetzt mit:

5µl Template (Matrize)

2x2,5 µl Primer

1 µl dNTP-Mix

0,5 µl Polymerase (Phusion)

28,5 µl H₂O

Als Template diente mTRPC3-DNA. Die benutzten Primer – zum 5'-Ende des DNA-Strangs komplementäre Oligonukleotide – enthielten zusätzlich an ihrem 5'-Ende eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease BamHI, so dass auch die entstandenen DNA-Fragmente diese Schnittstelle aufweisen. Die PhusionTM-High-Fidelity (New England Biolabs) wurde aufgrund ihrer hohen Amplifikations- und geringen Fehlerrate als DNA-Polymerase verwendet.

Die Reaktion bestand aus 35 Zyklen. Jeder Zyklus begann mit einer Temperaturerhöhung auf 98°C zur Denaturierung, d.h. Auftrennung des DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge. Danach wurde auf eine - je nach Schmelztemperatur der Primer unterschiedliche - Annealing-Temperatur abgekühlt, damit die Primer sich an die komplementäre Sequenz des Templates anlagern konnten. Schließlich synthetisierte die DNA-Polymerase, ausgehend von den Primern, einen zur Vorlage komplementären Strang bei einer Temperatur von 72°C. (Murray 1989) Das verwendete PCR-Protokoll sah aus wie folgt:

98°C	Denaturierung	1min		
98°C	Denaturierung	5sec	}	x 35
T _M -4°C	Annealing	10 sec		
72°C	Elongation	10 sec/kb		
72°C	Elongation	2 min		
4°C		∞		

Überprüft wurde das Ergebnis mittels einer Agarosegelelektrophorese (1µl PCR-Produkt auf 10µl verdünnt, siehe Kap. 3.11.9)

3.11.2 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter Bakterienzellen erfolgt nach dem Protokoll von Chung et al. (1989). Kompetent nennt man Zellen, die in der Lage sind, Fremd-DNA aufzunehmen.

Zuerst wurde ein fraktionierter Ausstrich eines Bakterienstammes auf LB-Agar angefertigt und eine einzelne Kolonie in 5 ml LB-Medium überführt. Dieses wurde 16 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur wurden dann 100 ml LB-Medium in einem Erlenmeyer-Kolben angeimpft. Dieser wurde bei 37 °C unter Schütteln so lange inkubiert, bis die optische Dichte des Mediums bei 578 nm Wellenlänge (OD₅₇₈) 0,4-0,5 betrug. Anschließend wurde bei 4 °C und 4500 xg für zehn Minuten zentrifugiert und das Sediment in 10-15 ml kalten TSS-Puffer aufgenommen. Diese Lösung wurde auf 300-µl-Aliquots verteilt und schließlich mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Mit einem der Aliquots wurde eine Test-Transformation durchgeführt, um den Grad der Kompetenz zu bestimmen. Als Test-Plasmid diente dabei pUC18. Das Transformationsprodukt wurde in den Verdünnungen 1:100 und 1:1000 auf je zwei LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Am folgenden Tag wurden die Kolonien gezählt und zu der eingesetzten Menge DNA ins Verhältnis gesetzt. Weiterverwendet wurden nur Bakterien mit einer Kompetenz von mindestens 10⁷ Kolonien/µg DNA.

3.11.3 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA

Die analytische Isolierung dient der Überprüfung des Erfolgs der Transformation eines Ligationsansatzes in Bakterien (Holmes & Quigley 1981). Dazu wurden mehrere Bakterienkolonien in je 5ml LB-Medium (+50µl Ampicillin/ml) 16 Stunden inkubiert und dann je 1,5ml Medium abzentrifugiert und das Sediment in 200 STET-Puffer + 100µg Lysozym/ml resuspendiert. Die Suspension wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert, danach 1 Minute auf 95°C erhitzt, um das Lysozym zu deaktivieren. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 14.000xg wurden die Zellreste mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die frei in der Lösung befindliche DNA wurde ausgefällt, indem 200µl Isopropanol zugegeben und dann noch einmal 30 Minuten bei 14.000xg, zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Überstand verworfen und es folgte ein Waschschriff mit 1000µl 70%-Ethanol. Auch dieser Überstand wurde verworfen und die DNA nach Trocknung in 50µl H₂O aufgenommen. Die enthaltene Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen verdaut und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kap. 3.11.6/3.11.9).

3.11.4 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparative Isolierung erfolgte mittels des Invitrogen DNA Purification Kit und diente der Isolierung ausreichender Mengen der gewünschten Plasmid-DNA für die Expression.

Eine 400 ml LB_{Amp}-Kultur wurde mit 400 µl einer bestehenden Vorkultur angeimpft und 16 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde zunächst bei 5000 xg 15 Minuten zentrifugiert und das Sediment in 10 ml Resuspension-Puffer mit RNase aufgenommen. Durch Zugabe von 10 ml alkalischem Lysis-Puffer wurden die Bakterienzellen aufgeschlossen und deren Proteine denaturiert. Nachdem 10 ml Resuspension-Puffer mit Kaliumacetat zugegeben wurde, entstand schwerlösliches Kaliumdodecylsulfat, welches zusammen mit Proteinen, Zellbestandteilen und chromosomaler DNA ausfiel und bei Zentrifugation (15 Minuten, 14000xg) sedimentierte. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde anschließend über eine Säule durch Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt und mit Isopropanol ausgefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in 100 µl sterilem, autoklaviertem Wasser aufgenommen.

3.11.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung aufgereinigter DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm – dem Absorptionsmaximum von DNA – in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke. Die Konzentration ergab sich dann nach folgender Formel:

$$C = A_{260\text{nm}} \cdot V \cdot 50 \mu\text{g/ml}$$

$A_{260\text{nm}}$ = Absorption bei 260 nm

V = Volumen der Lösung

3.11.6 Modifikation von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die dazu dienen, fremde DNA zu zerschneiden und damit unschädlich zu machen. Jede Restriktionsendonuklease erkennt und schneidet eine bestimmte DNA-Sequenz, meist sind dies kurze Palindrome. Zur Untersuchung einer analytischen Plasmidisolierung (siehe Kap. 3.11.3) wurde folgender Ansatz beim Temperatur-Optimum des jeweiligen Enzyms für eine Stunde inkubiert:

5 μl	Plasmid-DNA
0,5 μl	Restriktionsendonuklease
2 μl	10x Puffer (je nach Enzym)
2 μl	10x BSA
10,5 μl	H ₂ O

Zur Linearisierung von Plasmid-DNA und Herstellung entsprechender Fragmente für die Ligation (siehe Kap. 3.11.8) wurde die Restriktionsendonuklease BamHI eingesetzt. Der folgende Ansatz wurde 3 Stunden bei 37°C (Temperaturoptimum von BamHI) inkubiert.

3.11.7 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Die Abspaltung der 5'-terminalen Phosphatgruppe linearisierter Plasmid-DNA mittels einer Phosphatase soll verhindern, dass diese sich wieder zu einem Ring zusammenschließt, bevor

ein DNA-Fragment eingebaut wurde. Durchgeführt wurde die Reaktion, indem folgender Ansatz

26µl	DNA in H ₂ O
3µl	10x alkalischer Puffer (Antarctic Puffer)
1µl	Phosphatase (Antarctic Phosphatase)

für 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurde. Danach wurde der Reaktionsansatz auf 65°C erhitzt, um die Phosphatase zu deaktivieren.

3.11.8 Ligation zur Herstellung rekombinanter Plasmide

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide wurden DNA-Fragmente mittels einer DNA-Ligase in einen linearisierten, dephosphorylierten Vektor eingebaut. Die Ligase katalysiert dabei die Bildung einer Phosphodiesterbindung zu einer 3'-Hydroxylgruppe.

50 fmol	DNA-Fragment
10 fmol	Plasmid
2µl	10x-Ligase-Puffer
1µl	DNA-Ligase
mit H ₂ O auf 20 µl auffüllen	

Obiger Reaktionsansatz wurde 16 Stunden bei 16 °C inkubiert und anschließend in kompetente Zellen transformiert.

3.11.9 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist eine Methode, Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe zu trennen. Die DNA-Moleküle wandern dabei aufgrund ihrer Ladung in einem elektrischen Feld zum Pluspol und werden dabei durch die Poren einer Gelmatrix ihrer Größe nach aufgetrennt.

Herstellung des Gels

Zunächst wurde eine Lösung von 2% oder 0,8% Agarose - je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente – in TBE angerührt und erhitzt bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 50 °C wurde sie nach Zugabe von final 0,05% Ethidiumbromid in einen geeigneten Gelträger gegossen. Auf einer Seite des Gelträgers war ein Kamm eingesteckt, dessen Zinken die Taschen des Gels bildeten. Das feste Gel wurde schließlich in eine Elektrophoresekammer gelegt und vollständig mit TBE-Puffer bedeckt.

Durchführung der Elektrophorese

Die Proben wurden mit 1/10 Volumen 10xLoading-Dye versetzt und in die Taschen pipettiert. In eine der Taschen wurde zum Vergleich ein Marker, bestehend aus einer Mischung von DNA-Strängen bekannter Länge pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V. Das Gel wurde danach unter UV-Licht betrachtet und die Größe der Fragmente anhand des Markers bestimmt.

3.11.10 Elektroelution

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurden diese auf einem Gel aus präparativer Agarose elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden die entsprechenden Banden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und zusammen mit 300 µl autoklaviertem TBE-Puffer in einen Dialyseschlauch gegeben. Dieser wurde verschlossen und in eine ebenfalls mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Bei 4°C und 135 V wurden die Fragmente 30 Minuten aus dem Gel eluiert. Das nun die DNA enthaltende TBE wurde aus dem Dialyseschlauch herauspipettiert und dieser noch einmal mit 100 µl TBE ausgespült.

3.11.11 DNA-Fällung

Zur Reinigung und Konzentrierung isolierter DNA wurde diese mittels Alkohol ausgefällt.

Zunächst wurde der in Lösung befindlichen DNA 1/10 Volumen 5M-NaCl-Lösung zugegeben, um die negativ geladenen DNA-Moleküle unlöslich zu machen. Danach wurde das 2,5fache Volumen reines Ethanol zugegeben, wodurch der DNA das Wasser entzogen

wurde und die DNA-Moleküle ausfielen. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 Minuten wurde der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde noch einmal mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und nach Abpipettieren des Überstandes an der Luft getrocknet und anschließend in autoklaviertem H₂O aufgenommen.

3.11.12 DNA-Sequenzierung

Die Kettenabbruch-Synthese oder Didesoxymethode nach Sanger et al. (1977) ist ein enzymatisches Verfahren zur DNA-Sequenzierung. Dabei wird – ausgehend von einem Primer wie bei der PCR – durch eine Polymerase ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Neben den 2'-Desoxynukleotiden sind jedoch auch 2',3'-Didesoxynukleotide im Reaktionsansatz vorhanden, die, wenn sie in den Strang eingebaut werden, zum Abbruch der Synthese führen, da die OH-Gruppe am 3'-C-Atom fehlt, die zur Bindung an die Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids benötigt wird. Auf diese Weise entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Diese können dementsprechend elektrophoretisch aufgetrennt werden und, da die verschiedenen ddNTP mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, der jeweiligen Base zugeordnet werden.

Zunächst wurde die DNA im Thermocycler amplifiziert.

0,5 µg	DNA
1,5 µl	Big Dye (Applied Biosystems)
1 µl	Oligonukleotidprimer
+ H ₂ O bis 12 µl	

Dabei wurde das folgende Protokoll verwendet:

95°C	Denaturierung 1min		
95°C	Denaturierung 30sec		} x 35
55°C	Annealing	150 sec	
15°C	∞		

Die nicht eingebauten ddNTPs wurden anschließend über eine Sepharose-Säule abgetrennt. Dazu wurde eine Lochplatte mit Sepharose gefüllt und diese mit 300 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$ pro Loch für 3 Stunden bei Raumtemperatur aufgequollen. Das Wasser wurde dann 5 Minuten bei 910 xg abzentrifugiert und verworfen. Dieser Schritt wurde noch einmal mit 150 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$ wiederholt. Anschließend wurde ein frisches PCR-Reaktionsgefäß mit 8 μl HiDi-Formamid unter die Sepharose-Säule gestellt, die Sequenzreaktion auf die Säule gegeben und 5 Minuten bei 910 xg zentrifugiert.

Das Eluat wurde schließlich im ABI PRISM 310 Genetic Analyser mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die Reihenfolge der Basen über die Fluoreszenzmarkierung detektiert.

3.11.13 Transformation von DNA in Bakterienzellen

- 1) Hitzeschock-Transformation

Zu 1 μg Plasmid-DNA wurden 300 μl kompetente Bakterien gegeben und diese 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 1 Minute in einem 42°C-Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen und anschließend weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 μl LB-Medium wurden die Bakterien 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Schließlich wurde 150 μl auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert, der Rest der Lösung 5 Minuten bei 1000xg abzentrifugiert und das Sediment – in wenig Medium aufgenommen – auf eine weitere LB-Agarplatte ausplattiert. Die beiden Agarplatten wurden daraufhin ca. 16 Stunden bei 37°C bebrütet.

- 2) Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch Anlage eines elektrischen Feldes permeabel gemacht.

1 μg Plasmid DNA wurde mit 40-80 μl Bakteriensuspension gemischt und 30 Sekunden auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension in eine vorgekühlte, mit zwei Elektroden ausgestattete Küvette pipettiert. Die Küvette wurde in einen Elektroporator gestellt, der ein elektrisches Feld (1,5kV, 25 μF) erzeugt. Nach Zugabe von 1 μl Soc-Medium wurde die

Suspension 1 Stunde bei 37°C geschüttelt und anschließend auf 2 LB-Agarplatten ausplattiert (150µl direkt, 150µl 1: 10 verdünnt).

3.12 Proteinbiochemische Methoden

3.12.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Größenauftrennung von Proteinen wurde die SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli 1970) benutzt. Die Protein-Lösung wurde dabei zunächst mit der gleichen Menge 2xLaemmli-Puffer gemischt und 5 Minuten bei 95°C bzw. 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch das im Puffer enthaltene SDS und β -Mercaptoethanol wurden die Proteine denaturiert und verloren so ihre Sekundär- und Tertiärstruktur sowie ihren Ladungsunterschied, so dass ihre Bewegungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld nur noch von ihrer Größe abhängig war. Die denaturierten Proben wurden auf ein – je nach Größe der Proteine verschieden konzentriertes – Polyacrylamidgel aufgetragen. Dieses Gel bestand aus den zwei Anteilen Trenngel und Sammelgel, die wie folgt zusammengesetzt waren:

	Trenngel	Sammelgel
40% Acrylamid	Je nach Prozentigkeit	
4xTrenngelpuffer	¼ Volumen	
4x Sammelgelpuffer		¼ Volumen
H ₂ O _{dest}	Je nach Prozentigkeit	
10% APS	7,5 µl	7,5 µl
TEMED	1,5 µl	1,5 µl

Nach Auftragen der Proben und eines Markers mit Proteinen bekannter Größe zum Vergleich wurde die Elektrophorese in SDS-Puffer durchgeführt. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V angelegt, die bei Erreichen der Sammelgel/Trenngel-Grenze auf 150 V erhöht wurde. Die Elektrophorese endete, sobald das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau aus dem Gel ausgelaufen war.

3.12.2 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Zum Sichtbarmachen der Proteine auf Polyacrylamid-Gelen wurde das Gel mit Coomassie Brillant Blau gefärbt (Chrambach et al. 1967). Der Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren an.

Die zu färbenden Gele wurden etwa eine Stunde auf dem Schüttler in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend mit Destain-Lösung entfärbt, so dass nur noch die Proteinbanden farbig waren. Danach wurden die Gele am Computer eingescannt und anschließend getrocknet.

3.12.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, ein Proteingemisch mit Hilfe von Antikörpern auf bestimmte Antigene hin zu untersuchen.

Das Proteingemisch wurde zunächst mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und dann auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dazu wurde das Gel 10 Minuten in Blotting-Puffer inkubiert und anschließend möglichst luftblasenfrei in ein sogenanntes „Blotting Sandwich“ eingebaut. Zuunterst lagen dabei zwei Lagen Filterpapier, dann das Gel, die Membran und zuoberst wieder zwei Lagen Filterpapier. Diese Konstruktion wurde von einer Kunststoffkassette zusammengehalten und in eine Blotting-Apparatur gestellt. Schließlich wurde bei 4°C in Blotting-Puffer eine Spannung senkrecht zum Gel angelegt, so dass ein Strom der Stärke 350 mA floss, der die Proteine vom Gel auf die Membran übertrug. Nach 90 Minuten wurde die Apparatur wieder abgebaut und die Membran 10 Minuten in Ponceau-S-Lösung gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser entfärbt. Die Proteinbanden wurden dabei sichtbar, sodass die Membran bei geplanter Verwendung verschiedener Antikörperlösungen in Streifen geschnitten werden konnte. Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen auf der Membran wurde diese eine Stunde in 5%iger Magermilch inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit Antikörperlösungen über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Antikörper, die nicht gebunden hatten, in drei zehnmütigen Waschschritten mit TBST (TBS-Puffer + 0,1% Tween) entfernt. Dann wurde die Membran eine Stunde mit einem gegen den Erst-Antikörper gerichteten, enzymmarkierten Zweitantikörper inkubiert und anschließend zweimal je 10 Minuten mit TBST und einmal mit TBS gewaschen. Schlussendlich wurde die Membran eine Minute mit frisch angesetzter ECL-Reagenz (Western Lightning Chemilumineszenz Plus) bedeckt. Nach Entfernen der Reagenz

wurde die Chemolumineszenz mit der Lumineszenz Image Analyzer LAS3000 (Fuji) gemessen.

3.12.4 Wiederverwendung von Western Blots

Vor der Wiederverwendung eines Western Blots mit einem anderen Erst-Antikörper mussten bereits gebundene Antikörper entfernt werden. Hierzu wurde die Membran 4-mal je 5 Minuten mit TBST gewaschen, dann 30 Minuten bei 50°C unter leichtem Schwenken in Stripping-Puffer inkubiert und schließlich weitere 6-mal je 5 Minuten mit TBST gewaschen, um SDS und β -Mercaptoethanol des Stripping-Puffers zu entfernen. Danach war es nötig, die wieder frei gewordenen Bindungsstellen der Membran mit 5%-Magermilch zu blockieren, bevor ein neuer Erstantikörper aufgebracht werden konnte.

3.12.5 Expression rekombinanter Fusionsproteinen

Zum Zweck der Expression der Fusionsproteine wurde der Protease-defiziente E.coli-Stamm BL21 mit entsprechenden Plasmiden transfiziert. Eine Vorkultur aus LB_{AMP} -Medium mit 0,4% Glukose wurde mit diesen Bakterien angeimpft und 16 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurde dann am folgenden Tag eine neue LB_{AMP} -Kultur in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane angeimpft, um diese bei 30 °C unter Schütteln zu kultivieren bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei 578 nm. Dann wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben, um die Expression des Fusionsproteins zu induzieren (Abbildung 3), und die Kultivierung vier Stunden lang fortgesetzt. Vor Induktion

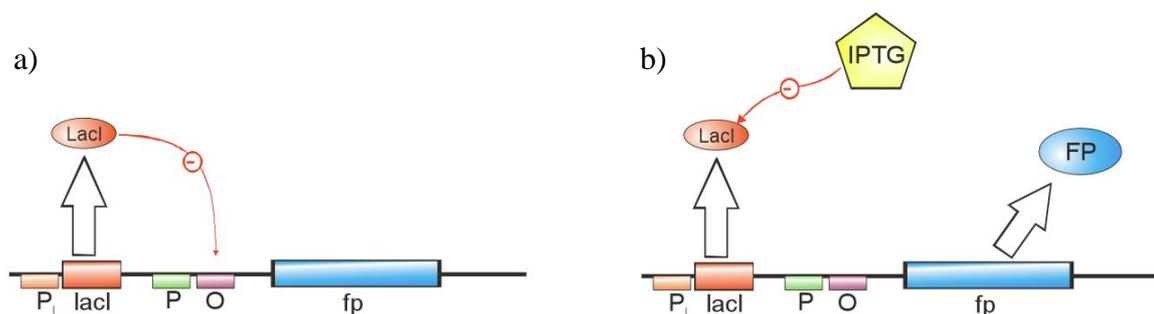


Abbildung 3 Expression rekombinanter Fusionsproteine über T7lac-Promoter

Schematische Darstellung der cDNA eines Fusionsproteins (fp) mit vorangehendem T7lac-Promoter (P = Promoter); Bei Anwesenheit von Glukose wird das LacI-Protein exprimiert, das wiederum die Expression des Fusionsproteins durch Bindung an das lac-Operon (O) inhibiert (a); nach Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosylpyranosid) bindet dieses an das LacI-Protein, die cDNA des Fusionsproteins kann abgelesen werden und das Fusionsprotein wird exprimiert (b)

und jede Stunde nach Induktion wurde jeweils eine Probe genommen und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung die Synthese des Fusionsproteins überprüft.

3.12.6 Proteinquantifizierung

- Proteinquantifizierung

Zur Mengenbestimmung von gereinigten, konzentrierten und dialysierten Proteinen wurden Proteinlösungen mit unterschiedlichen Volumina zusammen mit Albumin-Lösungen bekannter Konzentration auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (siehe Kap. 3.12.2). Anschließend wurde das Gel eingescannt und mit der AIDA Image Analyser-Software densitometrisch ausgewertet, wobei die Intensität der Färbung der verschiedenen Albuminmengen als Eichgerade dienten, anhand derer dann die Konzentration des rekombinanten Proteins errechnet wurde.

- Photometrische Proteinquantifizierung

Zur Mengenbestimmung gereinigter Antikörper wurde die Absorption der Antikörper-Lösung bei 280 nm gemessen und anschließend die Proteinmasse errechnet anhand der Formel:

$$m_{\text{Prot}} = A_{280} \times V \times 0,8 \text{ mg/ml}$$

3.12.7 Zellaufschluss und Reinigung von Fusionsproteinen

His-Fusionsproteine (denaturierende Bedingungen, Bornhorst & Falke 2000)

Die 200 µl Bakterienzellen-Suspension aus der Expression wurde 15 Minuten bei 4500 xg zentrifugiert und das Sediment in 40 ml Bindungspuffer aufgenommen, Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall bei 50 %iger Intensität für 3x30 sec mit je 30 Sekunden Pause. Nach erneuter Zentrifugation bei 20000 xg und 4 °C für 20 Minuten wurde der Überstand (ÜI) aufgehoben, das Sediment in 20 ml Bindungspuffer resuspendiert und erneut per Ultraschall aufgeschlossen. Im Anschluss an eine weitere 20-minütige Zentrifugation bei 20000 xg und 4 °C wurde das Sediment in 8 ml Bindungspuffer mit 6M Harnstoff aufgenommen und mit einem Glas-Teflon- Homogenisator homogenisiert. Nach einer Stunde Inkubation im Schüttler bei 4 °C erfolgte ein letzter Zentrifugations-Schritt (25 Minuten bei 39000 xg, 4 °C), um alle noch nicht gelösten Bestandteile zu sedimentieren. Das Sediment wurde in 1 ml Bindungspuffer mit 6M-Harnstoff aufgenommen und zur Kontrolle behalten, der Überstand, der das gelöste Fusionsprotein enthält, weiterverwendet.

Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte mittels Flüssigkeitschromatographie anhand der eingefügten Histidin-Reste. Dieser Schritt erfolgte halbautomatisch unter der Verwendung der ÄKTAprime-Chromatographieeinheit. Als Chromatographiematrix diente eine Nickel-Agarose-Säule, über die die Proteinlösung mit einer Flussrate von 0,5 ml/min gepumpt wurde. Ungebundene Proteine wurden in zwei Waschschrritten mit 25 ml Bindungspuffer + 6M Harnstoff und 25 ml Waschpuffer + 6M-Harnstoff entfernt. Vom Durchfluss der Proteinlösung sowie der beiden Waschschrritten wurden ebenfalls Proben genommen. Anschließend wurde das His-Fusionsprotein mit Elutionspuffer wieder von der Säule gelöst und die Eluate in 0,3-ml-Fraktionen aufgefangen. Je nach Menge des Proteins wurden 3 bis 30 Fraktionen eluiert. Die Säule wurde anschließend wieder mit 25 ml Bindungspuffer gewaschen und regeneriert.

Der Erfolg von Zellaufschluss und Reinigung wurde anhand der Eluate und der während des Prozesses entnommenen Proben auf einem SDS-PAGE überprüft.

- GST-Fusionsproteine (Frangioni & Neel 1993)

Je 100 ml Bakteriensuspension wurden 15 Minuten bei 4500 xg und 4 °C zentrifugiert und das Sediment in 60 ml STE-Puffer mit Lysozym (100 µg/ml) aufgenommen. Nach 15

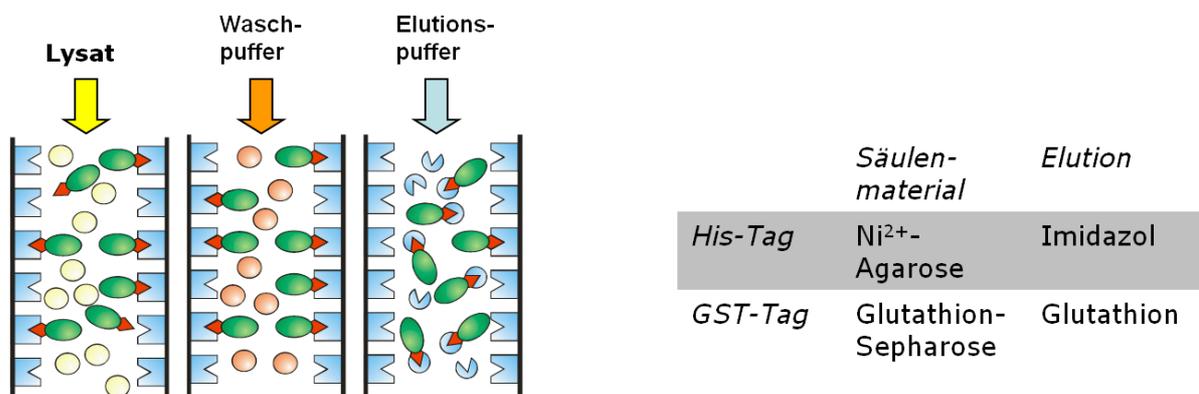


Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Flüssigkeitschromatographie

In Schritt 1 wird das die Fusionsproteine enthaltene Lysat über Säule gegeben. Die Fusionsproteine binden mit einer spezifischen Bindungsstelle (in diesem Fall His- bzw. GST-Tag) an die Chromatographiematrix (Nickel-Agarose bzw. Glutathionsepharose). Das restliche Lysat und ungebundene Proteine werden in Schritt 2 mit einem Waschpuffer entfernt. Im 3. Schritt wird ein Elutionspuffer der ebenfalls Moleküle mit Bindungsaffinität zu den Fusionsproteinen (Imidazol bzw. Glutathion) enthält zugegeben und somit die Fusionsproteine aus den Säulen ausgewaschen.

Minuten Inkubation unter Schütteln auf Eis wurde die Bakteriensuspension zweimal bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellen aufzuschließen. Nach Zugabe von DTT mit einer Endkonzentration von 10 mM, Sarcosyl mit einer Endkonzentration von 1,5 % und den Proteaseinhibitoren PMST, Leupeptin, Phenanthrolin, Aprotinin, Antipain, Benzamidin, Iodacetamid und Pepstatin wurden die Zellen für ca. 10 Sekunden mit Ultraschall im Eisbad weiter aufgeschlossen. Anschließend wurde durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 17000 xg die schwerlöslichen Anteile sedimentiert und verworfen. Dem Überstand wurde Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 4% zugegeben und dann das gesamte Volumen mit STE-Puffer verdoppelt. Danach wurde das Lysat 30 Minuten bei 4 °C schüttelnd inkubiert.

Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte mittels Flüssigkeitschromatographie anhand des GST-Tags. Dieser Schritt wurde halbautomatisch durchgeführt unter der Verwendung der ÄKTAprime. Als Chromatographiematrix diente eine Glutathion-Sepharose-Säule, über die die Proteinlösung mit einer Flussrate von 0,5 ml/min gepumpt wurde. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit 25 ml TBS entfernt. Vom Durchfluss der Proteinlösung sowie des Waschschritts wurden ebenfalls Proben genommen. Anschließend wurde das GST-Fusionsprotein mit Glutathion-haltigem Elutionspuffer wieder von der Säule gelöst und die Eluate in 0,3-ml-Fraktionen aufgefangen. Je nach Menge des Proteins wurden 10 bis 30 Fraktionen eluiert. Die Säule wurde anschließend wieder mit 5 ml Bindungspuffer gewaschen und regeneriert.

Der Erfolg von Zellaufschluss und Reinigung wurde anhand der Eluate und der während des Prozesses entnommenen Proben auf einem SDS-PAGE-Gel überprüft.

3.12.8 Immunisierung von Kaninchen, Blutentnahme, Seren-Testung

Bevor die Fusionsproteine zur Immunisierung verwendet wurden, musste ein Wechsel des Puffermediums durchgeführt werden. Dafür wurde die Proteinlösung - möglichst ohne Entstehung von Luftblasen - in eine Dialysekammer gespritzt und diese anschließend zweimal für zwei Stunden in ca. 2 l Kopplungspuffer unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Als letztes erfolgte eine weitere Inkubation über Nacht. Fiel das Protein während dieser Prozedur aus, wurde die Triton-Konzentration des Kopplungspuffers von 0,1% auf 0,5% erhöht.

Die folgenden Schritte, die Immunisierung der Kaninchen sowie die Blutentnahme erfolgte am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie und wurde von Frau Pelvay,

Frau Ludes und Herrn PD Dr. Jung aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zimmermann durchgeführt:

Vor der ersten Immunisierung wurde den Kaninchen zum Vergleich ca. 10 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Dann wurden etwa 100 µg Fusionsprotein subkutan injiziert und dies alle 2 Wochen wiederholt. In den Wochen dazwischen wurde den Kaninchen ca. 20 ml Testblut entnommen. Bei gutem Allgemeinzustand der Tiere und positiven Testresultaten wurden bis zu 8 Injektionen verabreicht. Das gewonnene Blut wurde bis zur vollständigen Gerinnung 16h bei 4°C gelagert, anschließend 10 Minuten bei 400 rpm (Sigma 302) zentrifugiert, das Sediment verworfen und das Serum bei -20°C gelagert.

Zur Testung der Seren auf spezifische Antikörper gegen mTRPC3 wurden diese 1:500 mit TBS (1% BSA, 0,05% NaN₃) verdünnt und als AK-Lösung auf einem Western Blot verwendet. Dabei wurden Zelllysate von COS-Zellen verwendet, die mTRPC3 nicht exprimieren, und mit COS-Zellen verglichen, die mit der cDNA von mTRPC3 transfiziert worden waren und deshalb mTRPC3 exprimieren. Da COS-Zellen rekombinante Proteine erheblich überexprimieren – dies ist der Grund, weshalb diese Zellen ursprünglich in die Labors eingeführt wurden – wurden in einem zweiten Schritt mikrosomale Proteinfractionen verschiedener Gewebe von Mäusen präpariert und untersucht. Als Kontrolle dienten dabei jeweils die korrespondierenden Proteinfractionen von mTRPC3-defizienten Mäusen.

3.12.9 Affinitätschromatographie von Antiseren

Zur Isolierung der spezifischen polyklonalen Antikörper aus Kaninchenserum diente die Affinitätschromatographie.

Zunächst wurde eine Sepharose-Säule hergestellt. Eine 1 cm durchmessende Glassäule (Bio-Rad, München) wurde mit 2 bis 3 ml Sepharose gefüllt und dann zur Aktivierung mit dem 15-fachen Volumen Salzsäure (1mM) gewaschen. Anschließend wurden 15 mg Fusionsprotein in 5 ml Kopplungspuffer gelöst, zur Säule gegeben und zweieinhalb Stunden unter Schütteln inkubiert. Nach Ablassen der Proteinlösung wurde 10 ml 0,5 M Ethanolamin (pH8,0) zugegeben und die Säule über Nacht bei 4°C inkubiert, um eventuelle freie Bindungsstellen der Sepharose zu blockieren. Am Folgetag wurde die Säule dreimal alternierend mit 0,5 M Ethanolamin (pH 8,0) und 0,5 M Natriumacetat (pH4,0) gewaschen.

5 ml des gewonnenen Serums wurden mit 20 ml TBS verdünnt und mittels Filterung durch einen 0,45- μm -Filter von größeren Partikeln befreit. Die Lösung wurde dann eine Nacht lang bei 4 °C in einem geschlossenen Kreislauf über die Säule gepumpt. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde die Säule am nächsten Tag mit TBS gewaschen, bis der Ausfluss bei 280 nm die gleiche optische Dichte aufwies wie reines TBS. Dann wurden die gebundenen Antikörper konsekutiv mit einer sauren Lösung (0,1 M Glycin pH 1,8), einer alkalischen Lösung (0,1 M Triethanolamin pH 11,5) und einer hochkonzentrierten Salzlösung (3M MgCl_2) eluiert, und zwar mit jeder Lösung – jeweils in 5-ml-Fractionen – so lange, bis die optische Dichte des Eluats gleich der ursprünglichen Optischen Dichte der Lösung war. Sofort nach der Elution wurden die Elutionsfraktionen neutralisiert; dabei wurde zur Neutralisation der sauren Lösungen je 1ml 1M Tris pH 9,0 verwendet, für die alkalischen Lösungen 1ml 1M Tris pH 6,8 und für die MgCl_2 -Lösungen 1ml Tris pH 7,5. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde photometrisch bestimmt (siehe Kap. 3.12.6). Anschließend wurden die Eluate zusammengeführt und in Konzentrationsröhren durch Zentrifugation aufkonzentriert und dreimal mit 20 ml TBS gewaschen. Die Proteinmenge der konzentrierten Lösung wurde noch einmal bestimmt, die Lösung mit BSA (1% Endkonzentration) und NaN_3 (0,05 Endkonzentration) versetzt und bei -80 °C gelagert.

3.12.10 Präparation mikrosomaler Gewebsfraktionen

Die Mäuse wurden zunächst durch Dekapitation getötet, die gewünschten Organe wurden entnommen, zerschnitten und im Lyse-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde das Gewebe im Glas-Teflon-Homogenisator zerkleinert und für 20 Minuten bei -80 °C eingefroren. Nach Auftauen bei -4 °C und einer weiteren Homogenisierung wurde das Homogenisat durch eine Spritzenkanüle (0,55 mm Durchmesser) geschert. Sodann wurde die fünffache Menge Saccharose-Puffer zugegeben und das Gemisch bei 3000 xg für 15 Minuten zentrifugiert, um noch intakte Zellen und Zellkernmembranen abzutrennen. Der Überstand wurde ein weiteres Mal zentrifugiert, um die verbliebenen Zellorganellen und Membranen zu sedimentieren, diesmal bei 50.000 xg für 60 Minuten (Optima MAX-E Ultrazentrifuge). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in Saccharose-Puffer aufgenommen und ein weiteres Mal homogenisiert. Die Lösung wurde aliquotiert (à 50 μl) und bei -80 °C verwahrt. Eine kleiner Menge von 5 μl wurde zur Quantifizierung der Proteinmenge verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung rekombinanter mTRPC3-Fusionsproteine

4.1.1 Auswahl von Proteinfragmenten des mTRPC3-Proteins

Zunächst wurde ein Hydrophathie-Blot des TRPC3-Proteins nach Kyte und Doolittle (Kyte, & Doolittle 1982) hergestellt. Abbildung 5 zeigt eine graphische Darstellung dieser mit dem Programm Accelrys Gene durchgeführten Auswertung. Auf der y-Achse ist das Ausmaß der Lipidlöslichkeit (Hydrophathie) aufgetragen, je größer die positiven Werte desto lipophiler die entsprechenden Sequenzabschnitte. Im Prinzip berechnet das Programm die Lipophilie über den bekannten Verteilungsquotienten jeder einzelnen Aminosäure in einem Lipid/Wasser-Gemisch. Durch die Vorgabe, wie viele Aminosäurereste jeweils zusammen auf Lipophilie untersucht werden, erhält man Aussagen, inwieweit das Protein über transmembranöse Abschnitte verfügt. So benötigt man 19 bis 21 Aminosäurereste, um eine α -Helix zu erhalten, welche die 3 nm dicke Lipiddoppelschicht der Plasmamembran durchqueren kann. Die in Abbildung 5 gezeigte Darstellung benutzt eine Vorgabe von 19 Aminosäureresten. Man erkennt, dass das TRPC3-Protein über mindestens sechs Sequenzabschnitte verfügt, die als α -

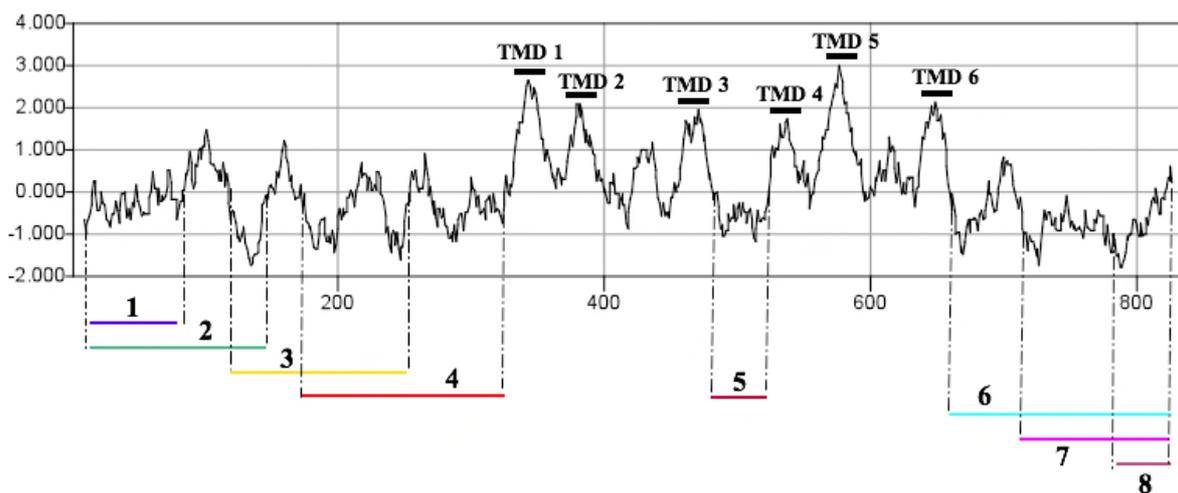


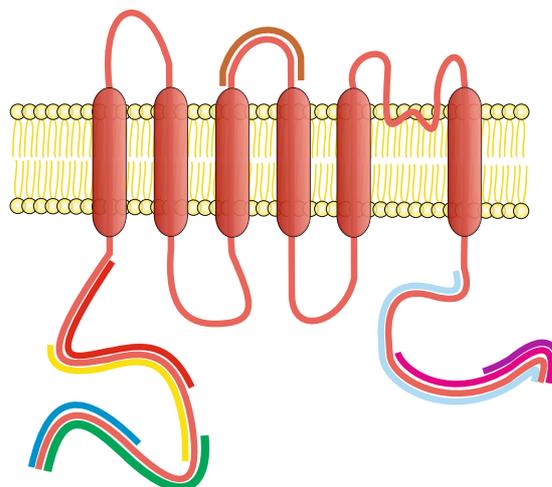
Abbildung 5 Kyte & Doolittle Hydrophathieplot von mTRPC3

Kyte & Doolittle Hydrophathieplot: Die Darstellung zeigt die Aminosäuresequenz von mTRPC3 aufgetragen auf der x-Achse (836 aa) und die Lipidlöslichkeit von jeweils um einen Aminosäurerest verschobenen 19aa-langen Abschnitten von mTRPC3. Die aus dieser Darstellung vorhergesagten Transmembranomänen (Abschnitte mit einer Lipophilie $> 1,6$) sind dargestellt (TMD1 bis TMD 6) Zur Herstellung von Antikörpern wurden die acht besonders hydrophilen Abschnitte 1 bis 8 gewählt.

Helices die Plasmamembran durchqueren, sogenannte Transmembrandomänen. Sie sind in Abbildung 5 gekennzeichnet: Nach Kyle und Doolittle sind Peaks $> 1,6$ im Hydropathieplot gute Kandidaten für solche Domänen. Alle Abschnitte < 0 repräsentieren dagegen eher hydrophile Sequenzabschnitte, die bevorzugt als mögliche Antigene verwendet werden. Die Übertragung der Ergebnisse des Hydropathieplots auf die schematische Struktur und die Aminosäuresequenz von mTRPC3 ist in Abbildung 6 zu sehen. Die entsprechenden Abschnitte sind farblich wie in Abbildung 5 markiert.

4.1.2 Konstruktion von Fusionsproteinen

Es wurden (His)₉- und Glutathion-S-Transferase(GST)-TRPC3-Fusionsproteine hergestellt. Dazu wurden insgesamt 8 Abschnitte der Protein-Sequenz vom mTRPC3 ausgewählt, die nach dem oben beschriebenen Hydropathieplot besonders hydrophil sind, daher am



```

MRDKG RRQAV RGP AF MFGAR GPSLT AEEER FLDAE EYGN I PVVRK MLEES RTLNV NCVDY
MGQNA LQLAV GNEHL EVTEL LLKKE NLARI GDALL LAISK GYVRI VEAIL GHPGF AASRR
LTLSP CEQEL RDDDF YAYDE DGTRF SPDIT PIILA AHCHK YEVVH LLLLK GARIE RAHDY
FCRCS DCAEK QRLDA FSHSR SRINA YKGLA SPAYL SLSSE DPVLT ALELS NELAK LANIE
KEFKN DYRKL SMQCK DFVVG VLDLC RDSEE VEAIL NGDLE SAEPL ERHGH KASLS RVKLA
IKYEV KKFVA HPNCQ QQLLT IWYEN LSGLR EQTIA IKCLV VLVVA LGLPF LAIGY WIAPC
SRLGK ILRSP FMKFV AHAAS FIIFL GLLVF NASDR FEGIT TLPNI TVIDY PKQIF RVKTT
QFTWT EMLIM VWVLG MMWSE CKELW LEGPR EYIVQ LWNVL DFGML SIFIA AFTAR FLAFL
QATKA QQYVD SHVQE SDLSE VTLPP EVQYF TYARD KWLPS DPQII SEGLY AIAVV LSF SR
IAYIL PANES FGPLQ ISLGR TVKDI FKFMV LFIMV FLAFM IGMFI LYSYY LGAKV NPAFT
TVEES FKTLF WSIFG LSEVT SVVLK YDHKF IENIG YVLYG IYNVT MVVVL LNMLI AMINS
SYQEI EDDSD VEWKF ARSKL WLSYF DDGKT LPPPF SLVPS PKSFV YFIMR ITNFS KCRRR
RLQKD LELGM GNSKS RLNLF TQSNS RVFES HSFNS ILNQP TRYQQ IMKRL IKRYV LKAQV
DKEND EVNEG ELKEI QODIS SLRYE LLEDK SQATE ELAIL IHKLS EKLNP SVLRC E

```

Abbildung 6 Proteinsequenz von mTRPC3

Zusammenfassung der Ergebnisse des Hydropathieplots. TRPC3 ist ein Membranprotein mit sechs Transmembrandomänen; Aminoterminus und C-Terminus sind jeweils im Zytosol lokalisiert. Die abgeleiteten Sequenzen, die rekombinant als Fusionsproteine hergestellt wurden, sind farblich gekennzeichnet. Unten: Aminosäuresequenz von mTRPC3 mit den entsprechend farblich hinterlegten Proteinfragmenten.

Fusionsprotein	His	GST
 1)	45/47	46/47
 2)	45/48	46/48
 3)	49/51	50/51
 4)	52/54	53/54
 5)	58/64	59/64
 6)	60/64	61/64
 7)	62/64	63/64

Tabelle 3 Fusionsproteine

Auflistung und Gegenüberstellung der korrespondierenden His- und GST-Fusionsproteine, die Farben entsprechen Abbildung 6

wahrscheinlichsten außerhalb der Lipidmembran liegen und somit für Antikörper erreichbar sind. Die ersten vier Proteinfragmente wurden vom Aminoterminus von TRPC3 abgeleitet (Aminosäurerest 1 bis 84, 1 bis 146, 118 bis 255 und 176 bis 325). Der Abschnitt von Aminosäurerest 482 bis 524 entspricht der wahrscheinlich extrazellulär liegenden Schleife zwischen Transmembrandomäne drei und vier. Drei weitere Fragmente wurden vom Carboxyterminus des Proteins abgeleitet (Aminosäurerest 662 bis 836, 713 bis 836 und 783 bis 836). Die diese Proteinabschnitte kodierenden DNA-Sequenzen wurden mittels Polymerasekettenreaktion (siehe Kap. 3.11.1) unter Verwendung der in Kap. 3.8 genannten Oligonukleotid-Primer amplifiziert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit der Restriktionsendonuklease BamHI geschnitten und anschließend jeweils in die Vektoren pET-19b bzw. pGEX-4T2 kloniert, die zuvor mit BamHI linearisiert worden waren. Das Ligationsprodukt wurde zuerst in Bakterienzellen des E.coli-Stammes XL1 Blue transformiert (siehe Kap. 3.5.1) und die resultierende Plasmid-DNA mittels verschiedener Restriktionsendonukleasen fragmentiert; die Fragmente wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Auf diese Weise wurden diejenigen Plasmide identifiziert, die das Insert – die DNA, welche das jeweilige Proteinfragment kodiert – in der korrekten Orientierung und im richtigen Leserahmen enthielten. Danach wurde die DNA-Sequenz mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger (siehe Kap. 3.11.12) überprüft. Auf diese Weise habe ich 7 Bakterienklone erhalten, die ein Plasmid mit der DNA-Sequenz eines His-TRPC3-Fusionsproteins trugen, sowie 7 Klone mit der korrespondierenden Sequenz von TRPC3 als GST-Fusionsprotein. Die Fusionsproteine wurden nach den Nummern der sie definierenden Oligonukleotid-Primer benannt und sind in Tabelle 3 aufgelistet. Das Fragment 55/57 (aa482-524) konnte nicht erfolgreich kloniert werden, da es in mehreren Versuchen

Geplantes FP	Abschnitt von TRPC3	His-TRPC3-FP	kloniert	rekomb. Expression	GST-TRPC3-FP	kloniert	rekomb. Expression
1	aa 1-84	45/47	+	+	46/47	+	+
2	aa 1-146	45/48	+	+	46/48	+	+
3	aa 118-255	49/51	+	+	50/51	+	+
4	aa 176-325	52/54	+	+	53/54	+	+
5	aa 482-524	55/57	-	-	56/57	-	-
6	aa 662-836	58/64	+	-	59/64	+	-
7	aa 713-836	60/64	+	-	61/64	+	-
8	aa 783-836	62/64	+	-	63/64	+	+

Tabelle 4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Herstellung rekombinanter Fusionsproteine;

(+) steht für kloniert und rekombinante Expression, (-) für fehlende Klonierung oder Expression ausschließlich in falscher Orientierung in den Vektor eingebaut wurde. His-55/57 wurde daher ebenso wie sein GST-Gegenstück 56/57 nicht weiter verwendet.

In den oben genannten Bakterienklonen wurden die Plasmide mit den gewünschten DNA-Fragmenten amplifiziert, anschließend präparativ isoliert (siehe Kap. 3.11.4) und in ausreichend großer Menge für die Transformation in einen Expressions-Bakterienstamm gewonnen.

4.1.3 Expression der rekombinanten Fusionsproteine

Zur Expression der Fusionsproteine diente der E.coli-Stamm BL21(D3). Jedes der Plasmide wurde in BL21(D3) transformiert und in den Bakterien exprimiert. Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Expression des (His)₉-TRPC3₁₋₁₄₆-Fusionsproteins (45/48) angefärbt mit Coomassie Brilliant Blue in Bakterienlysate, das mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt worden war (die Pfeilspitze kennzeichnet die Laufhöhe des exprimierten Fusionsproteins). Anschließend wurde das exprimierte Fusionsprotein aus der Bakteriensuspension isoliert (Kapitel 3.12.7). Die einzelnen Schritte wurden für alle Konstrukte teilweise mehrfach wiederholt, bis jeweils eine ausreichende Menge Protein zur Immunisierung aufgereinigt war. Erreicht werden konnte dies bei den His-TRPC3-Fusionsproteinen 45/47, 45/48, 49/51, 52/54

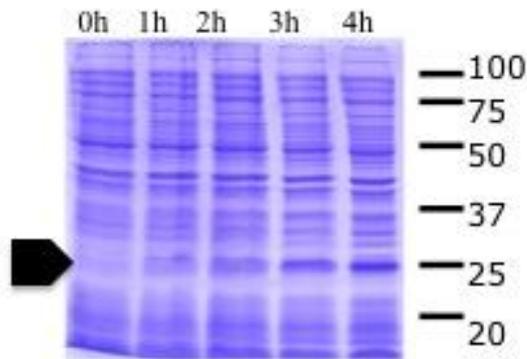


Abbildung 7 Ergebnisse der Expression des (His)₉-TRPC3₁₋₁₄₆-Fusionsproteins (45/48),

angefärbt mit Coomassie Brilliant Blue. In der ersten Spur (0h) sind Proben vor Beginn der Expression aufgetragen, in den folgenden Spuren ist nach je einer, zwei, drei und vier Stunden, das Fusionsprotein bei etwa 25 kDa zu erwarten (Pfeil). Über die Zeit ist auf dieser Höhe eine zunehmend stärker werdende Bande zu erkennen, was für einen Erfolg der Expression spricht.

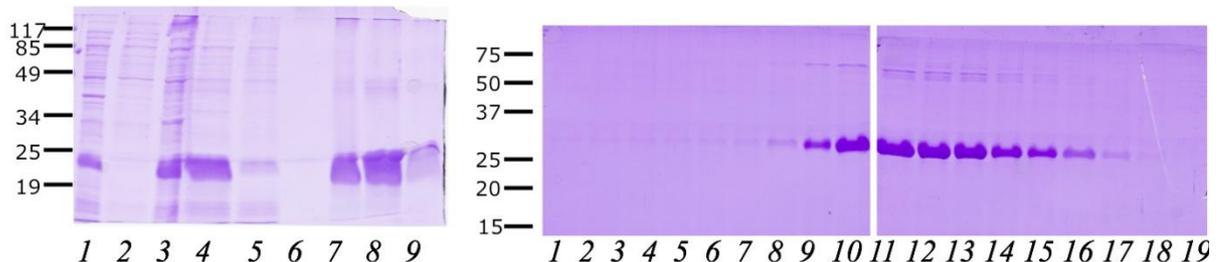


Abbildung 8 Ergebnisse der Aufreinigung (Coomassie-gefärbte SDS-Gele)

(a) Ergebnisse der Aufreinigung von His- Fusionsprotein 49/51

Spur 1) Bakterienlysats nach 4h Expression; Spur 2) Überstand nach Zellaufschluss und Proteinisolierung; Spur 3) Pellet aus Zellresten; Spur 4) Ergebnis der Proteinisolierung vor Aufreinigung; Spur 5) Durchfluss der Flüssigkeitschromatographie; Spur 6) Durchfluss nach Waschen der Säule; Spuren 7-9) spezifische Eluate mit dem rekombinanten Protein

(b) Ergebnisse der Aufreinigung von GST-Fusionsprotein 63/64

In den Spuren 1-19 sind Proben der aufeinanderfolgenden Eluate aufgetragen. Auf Höhe von etwa 30 kDa ist eine zunächst zu- dann wieder abnehmend starke Bande – das rekombinante GST-TRPC3-Fusionsprotein - zu erkennen; die Eluate 9-16 wurden weiterverwendet.

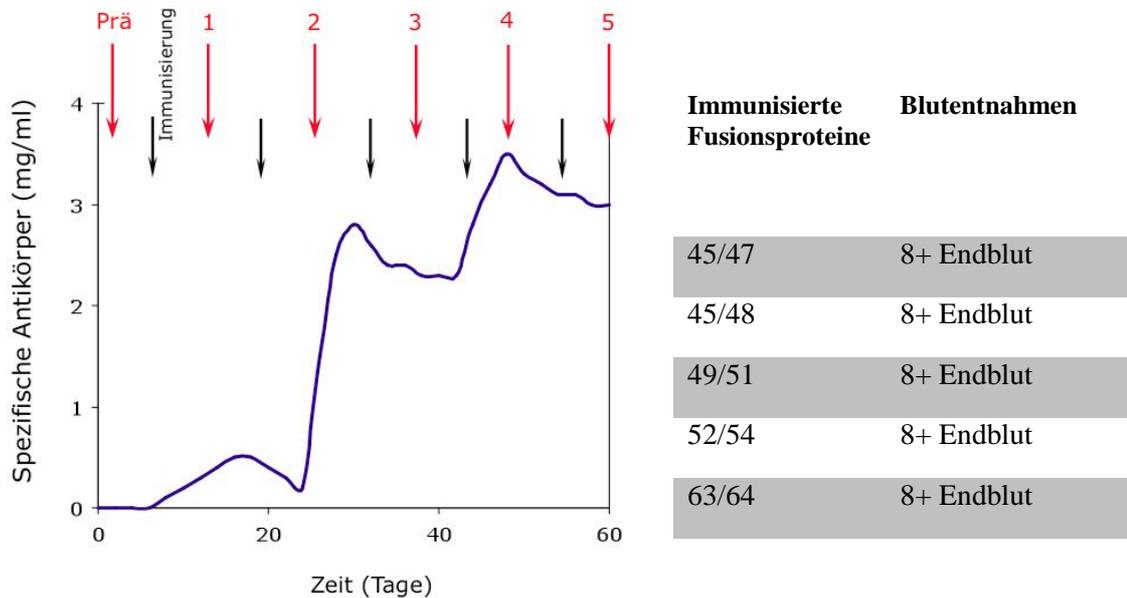


Abbildung 9 Immunisierung der Kaninchen

Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der wiederholten Immunisierungen mit den erstellten Fusionsproteinen, die Rote Pfeile die Zeitpunkte der Blutentnahmen. Prä bezeichnet die Blutentnahme vor der Immunisierung, 1-5 die wiederholten Blutentnahmen nach der Immunisierung. Die Kurven gibt die Menge spezifischer Antikörper gegen das jeweilige Fusionsprotein, aufgetragen gegen die Zeit an. Der Titer steigt durch wiederholte Immunisierungen sprunghaft an.

Tabelle 5 Blutentnahmen

Tabellarische Auflistung der gewonnenen Seren pro zur Immunisierung benutztem Fusionsprotein. Jedem Kaninchen wurden nach der Immunisierung jeweils 8 Blutproben entnommen. Danach wurde das Tier getötet um das gesamte Blut mit den enthaltenen spezifischen Antikörpern zu gewinnen („Endblut“)

und den GST-Fusionsproteinen 50/51, 53/54, 63/64. (Tabelle 4) Die GST-Fusionsproteine 46/47, 46/48 wurden zwar exprimiert, ließen sich aber nicht in der notwendigen Menge aus der Zellsuspension gewinnen. Die C-terminalen His-Fusionsproteine (58/64, 60/64, 62/64), ließen sich nicht ausreichend exprimieren.

4.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

Jeweils 100µg der gewonnenen His-TRPC3-Fusionsproteine 45/47, 45/48, 49/51, 52/54 und des GST-TRPC3-Fusionsproteins 63/64 wurden zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (Abbildung 7 und 3.12.8). In den Wochen nach Injektion wurde, wie in Abbildung 9 dargestellt, Blut entnommen und das Serum auf Antikörper gegen TRPC3 getestet.

4.3 Testung der gewonnenen Seren auf spezifische mTRPC3-Antikörper

Hierzu wurden mit mTRPC3-cDNA transfizierte COS-Zellen sowie nicht-transfizierte, „leere“ COS-Zellen verwendet. Zwei Tage nach Transfektion wurden die COS-Zellen in denaturierendem Laemmli-Puffer lysiert und die Proteine des Lysats mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, anschließend auf Nitrocellulosefilter geblottet und mit den einzelnen Seren inkubiert. Anschließend wurden die Filter gewaschen und mit einem enzymgekoppelten Zweitantikörper inkubiert, der Kaninchenimmunglobuline erkennt, die auf dem Blot verblieben sind. Der gebundene Zweitantikörper wird dann über seine (gekoppelte) Enzymaktivität sichtbar gemacht. Abbildung 10 zeigt Beispiele solcher Auswertungen, die für die His-TRPC3-Fusionsproteine 45/47 und 52/54 sowie für das GST-

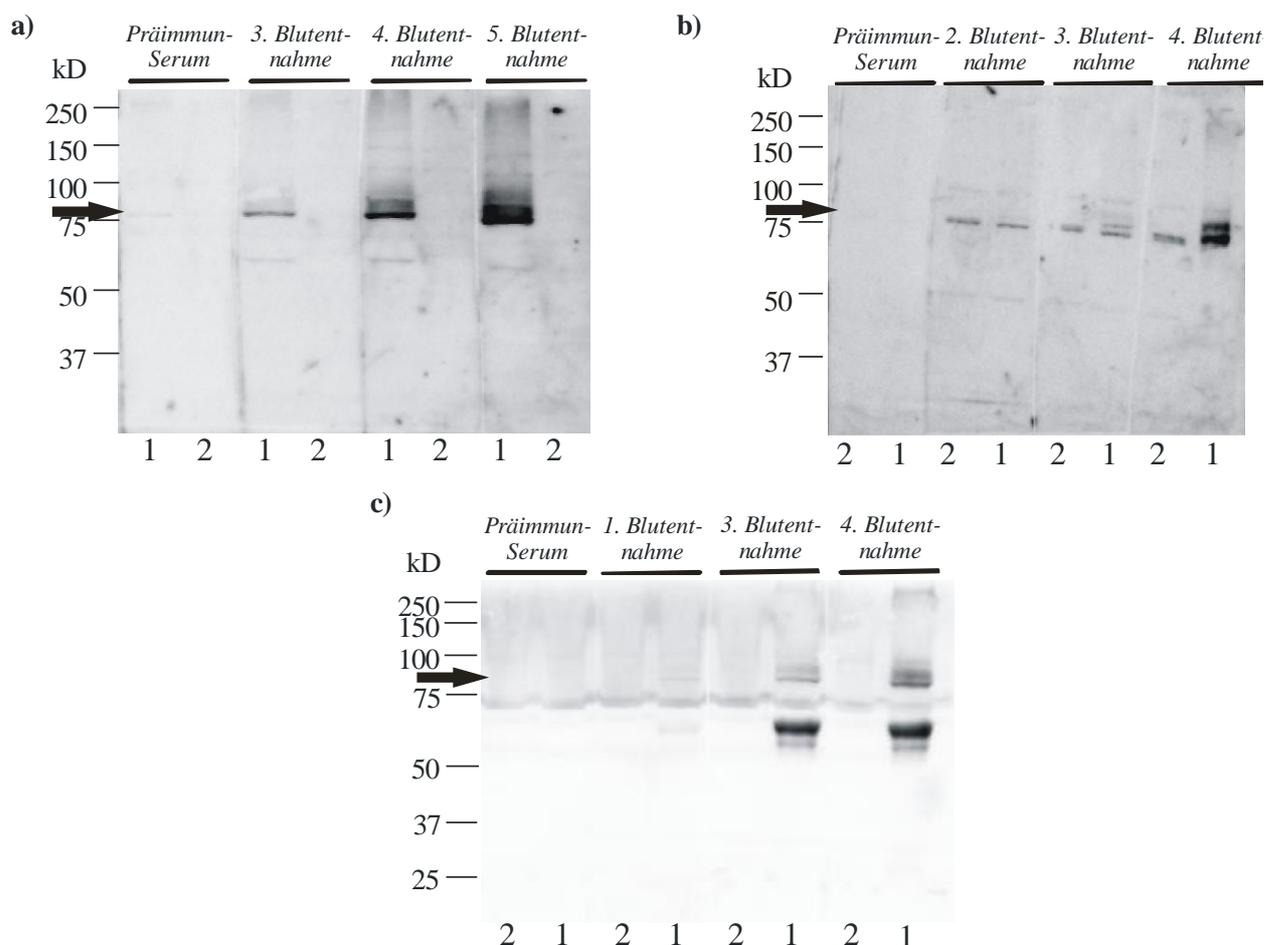


Abbildung 10 Serentestung

Test der jeweiligen Präimmunsere und Seren, die nach den angegebenen Blutentnahmen gewonnen wurden für His-TRPC3-Fusionsprotein 45/47 (a), 52/54 (b), und GST-TRPC3-Fusionsprotein 63/64. Aufgetragen sind jeweils Proteinlysate von COS-Zellen, die TRPC3 exprimieren (Spuren 1) und Lysate von COS-Zellen, die TRPC3 nicht exprimieren (Spuren 2). Die Pfeilspitzen geben die erwartete Laufhöhe des TRPC3-Proteins an.

Fusionsprotein		Serentest
His-TRPC3 45/47		+++
His-TRPC3 45/48		(+)
His-TRPC3 49/51		+
His-TRPC3 52/54		+
GST-TRPC3 63/64		++

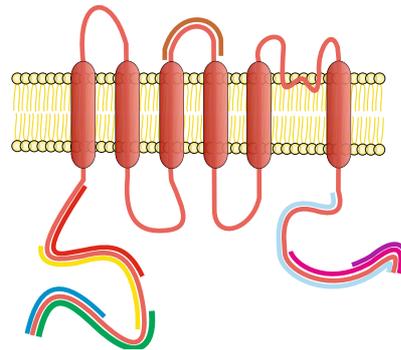


Tabelle 6 Ergebnisse der Serentests

Ergebnisse der Testung der verschiedenen aus dem Blut der immunisierten Kaninchen gewonnenen Seren. Die Ergebnisse reichen von schwach positiv (+) bis stark positiv +++; Nebenstehend die schematische Darstellung von mTRPC3 mit farblicher Markierung der zur Herstellung der Fusionsproteine benutzten Sequenzen

TRPC3-Fusionsprotein 63/64 durchgeführt wurden. Aufgrund der Größe von mTRPC3 wurde bei positiven Zellen eine Protein-Bande von etwa 80 kDa erwartet, die durch das Serum erkannt werden sollte (Pfeilspitzen in Abbildung 10).

Mit den Seren der mit 45/47 und 63/64 immunisierten Kaninchen zeigten sich deutliche Banden bei den TRPC3 exprimierenden Zellen in richtiger Höhe von etwa 80 kDa, während in Lysaten von „leeren“ Zellen kein Protein zu erkennen war (Abbildung 10). Während z.B. Serum 45/47 nur eine deutliche Bande nachwies, erkannte Serum 63/64 eine zweite – sogar deutlichere – zwischen 50 und 75 kDa. Bei 49/51 und 52/54 traten Banden sowohl in leeren, als auch in transfizierten Zellen in gleicher Höhe auf. Das Signal aus den transfizierten Zellen war jedoch deutlich stärker. Serum 45/48 wurde erst in späten Blutentnahmen schwach positiv. Tabelle 6 fasst diese Ergebnisse zusammen.

4.4 Aufreinigung der spezifischen Antikörper

Im nächsten Schritt sollten die anti-TRPC3-Antikörper aus den Endblut-Seren der positiv getesteten Kaninchen (45/47 und 63/64) angereichert werden. Um die anti-TRPC3-Antikörper aus den Seren anzureichern, die aus Kaninchen gewonnen wurden, die mit His-TRPC3-Fusionsproteinen immunisiert worden waren, wurde das korrespondierende GST-TRPC3-Fusionsprotein an Sepharose immobilisiert. Da kein korrespondierendes rekombinantes His-

TRPC3-Fusionsprotein 62/64 (siehe Tabelle 4) für die durch das GST-TRPC3-Fusionsprotein 63/64 erhaltenen Kaninchenserum verfügbar war, wurde ein Proteinabschnitt, welcher die Aminosäurereste 662 bis 836 von mTRPC3 enthält, als His-SUMO-TRPC3-Fusionsprotein rekombinant hergestellt, exprimiert und für die Aufreinigung der durch Immunisierung von GST-TRPC3 63/64 gewonnenen Antikörper verwendet. Das His-Fusionsprotein 45/47 wurde gegen sich selbst aufgereinigt, da sein GST-Gegenstück nicht in ausreichender Menge rekombinant gewonnen werden konnte.

Die aufgereinigten Antikörperlösungen wurden getestet (Abbildung 11) und zeigten eine deutliche, in Leerzellen nicht sichtbare Bande nur in Zelllysaten von mTRPC3-exprimierenden Zellen. Die bereits im Serum-Test von 63/64 aufgefallene zweite Bande war auch weiterhin sichtbar, jetzt aber weniger deutlich als die Bande bei 80 kDa. Somit lagen nach diesen Schritten zwei affinitätsgereinigte Seren vor, die in Verdünnung von $> 1:200$ das überexprimierte TRPC3-Protein erkannten, die polyklonalen Antikörper 45/47 (Kaninchen Lili) und 63/64 (Kaninchen Elli).

Im nächsten Schritt sollte getestet werden, inwieweit die beiden Antikörper spezifisch für TRPC3 waren bzw. ob sie auch die TRPC6- und TRPC7-Proteine erkennen würden. Wie in Abbildung 2 dargestellt, stimmen die Aminosäuresequenzen von TRPC3, TRPC6 und TRPC7 zu 62 % überein, so dass es nicht unwahrscheinlich war, dass beide Antikörper auch diese Proteine erkennen.

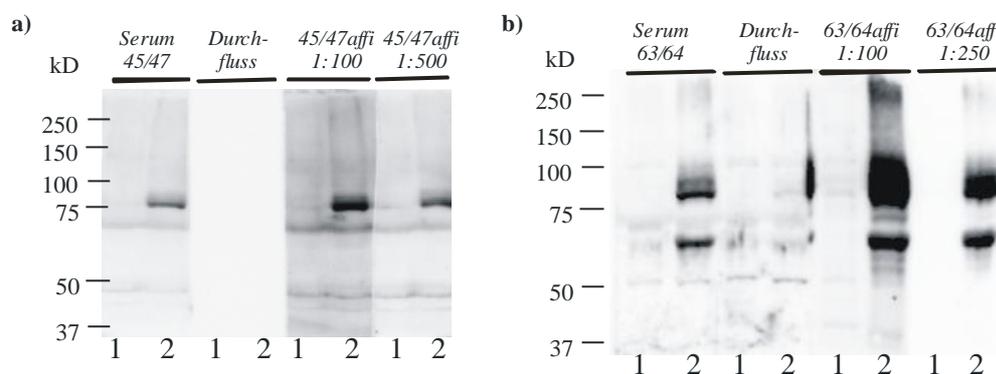


Abbildung 11 Testung der affinitätsgereinigten Antikörper

Verlauf der Testung der affinitätsgereinigten Antikörper 45/47 (a) und 63/64 (b): jeweils von links nach rechts Test des nicht behandelten Serums, Test der nicht an das immobilisierte Fusionsprotein gebundenen Fraktion (Durchfluss), sowie der spezifisch eluierten Fraktionen, die in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt wurden. Auf den Spuren 1 wurden jeweils Zelllysate von COS-Zellen aufgetragen, die TRPC3 nicht exprimieren, auf den Spuren 2 Zelllysate von COS-Zellen, die TRPC3 exprimieren.

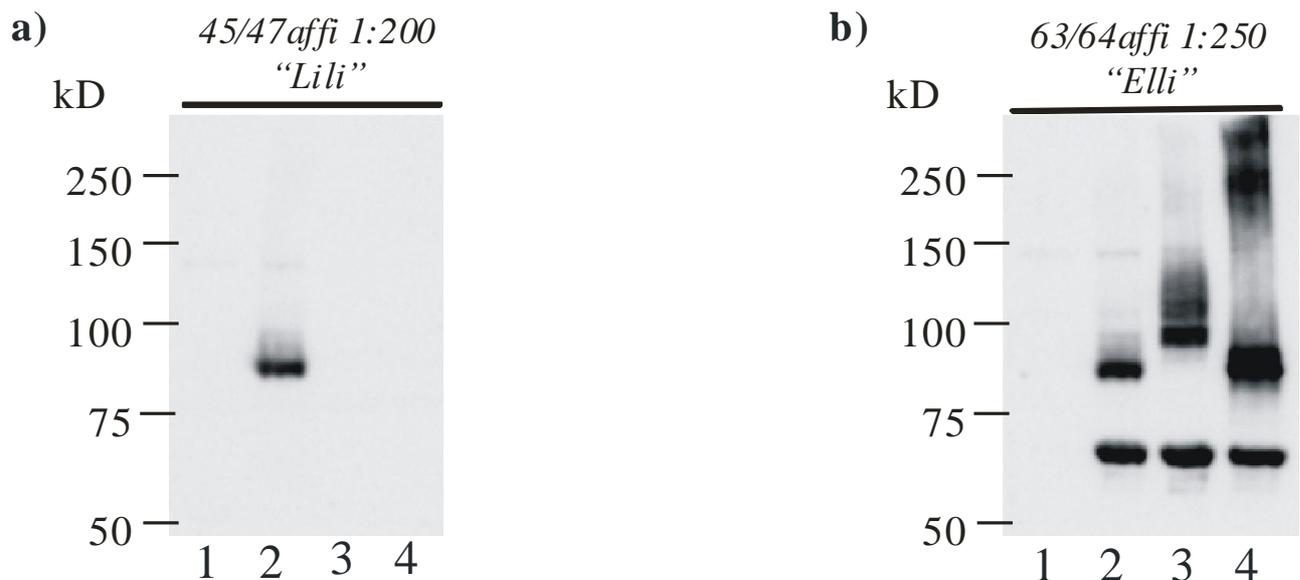


Abbildung 12 Testung der aufgereinigten Antikörper

Testung der aufgereinigten Antikörper (affi) 45/47 und 63/64 auf mTRPC3, mTRPC7 und mTRPC6

- (a) Test von 45/47 (Belichtungszeit 1 Minute); (b) Test von 63/64 (Belichtungszeit 60 Minuten); in Spur 1 sind jeweils nicht-transfizierte COS-Zell-Lysate, in Spur 2 mTRPC3-transfizierte COS-Zell-Lysate, in Spur 3 mTRPC6-transfizierte und in Spur 4 mTRPC7-transfizierte COS-Zell-Lysate aufgetragen.

4.5 Inwieweit erkennen die Antikörper 45/47 und 63/64 neben TRPC3 auch TRPC6 und TRPC7 ?

Für diese Untersuchungen wurden Zelllysate von COS-Zellen verwendet, die weder TRPC3 noch TRPC6 oder TRPC7 exprimieren (C für COS-Zellen), sowie COS-Zellen, die TRPC3 (C-C3), TRPC6 (C-C6) oder TRPC7 exprimieren (C-C7).

Antikörper 45/47 erkannte im Western Blot mTRPC3, aber weder mTRPC6 noch mTRPC7 (Abbildung 12a); Antikörper 63/64 jedoch erkennt sowohl TRPC3 als auch TRPC6 und TRPC7. TRPC6 liegt in glykosylierter und nicht glykosylierter Form vor, beide Formen werden von Antikörper 63/64 erkannt. Die hochmolekularen Proteine, die in der TRPC7-Spur erkannt werden, sind wahrscheinlich Oligomere von TRPC7, denn solche Proteine werden in den anderen Spuren nicht detektiert. Die Bande zwischen 50 und 75 kDa wird in allen drei Spuren erkannt, die TRPC-Proteine exprimierende Zellen enthalten, nicht aber in der Spur, die lediglich Zelllysate von „leeren“ COS-Zellen enthält. Die Identität dieser Proteine ist unbekannt, möglicherweise handelt es sich um etwa gleich große Abbauprodukte von TRPC3, TRPC6 und TRPC7, die ebenfalls von Antikörper 63/64 erkannt werden.

4.6 Nachweis von mTRPC3 in Proteinfractionen von Maus

Nachdem die gewonnen Antikörper im COS-Überexpressionssystem erfolgreich mTRPC3 detektieren, sollte herausgefunden werden, ob dies auch in normal exprimierenden Zellen von Maus der Fall ist und in welchen Geweben gegebenenfalls mTRPC3 nachgewiesen werden kann. Um dies zu testen, wurden mikrosomale Proteinfractionen verschiedener Gewebe von Mäusen präpariert und im Westerblot mit den neuen Antiseren getestet. Es wurden hierzu Organe von sogenannten Wildtyp-Mäusen entnommen sowie von Mäusen, die sich von diesen Wildtyp-Tieren durch das Fehlen des TRPC3-Gens unterschieden. Diese TRPC3-defizienten Tiere (im Folgenden C3⁻) wurden von Professor Lutz Birnbaumer (NIEHS, USA) unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt (Hartmann et al., 2008). Getestet wurden Proteinfractionen von Herz, Skelettmuskulatur, Lunge, Hirn und Kleinhirn. Unter anderem wurden auch Proben von neugeborenen, 7 Tage alten Mäusen untersucht, da von Li et al. (1999) eine erhöhte Expression von TRPC3 in Gehirnzellen von Ratten in einer relativ kurzen perinatalen Phase beschrieben wurde.

Abbildung 13 fasst einige der ersten Westerblots zusammen. Verglichen mit der Positivkontrolle in Spur 1 in (a) und (b) (beide Abbildungen zeigen den selben Westerblot, jedoch nach unterschiedlichen Belichtungszeiten) erkennt der Antikörper 45/47 ein Protein mit vergleichbarem Laufverhalten in der Elektrophorese nur in den Spuren 5 (Abbildung 13a) bzw. in den Spuren 3 und 5 nach längerer Exposition (Abbildung 13a b). In den Spuren 3 und 5 sind jeweils Proteinfractionen von Gesamthirn (Spur 3) und Kleinhirn (Spur 5), aufgetragen und zwar gewonnen von Wildtyp-Tieren. In den Spuren 2 und 4 werden die entsprechenden Proteine nicht exprimiert. Da die Proteinfractionen der Spuren 2 und 4 aus TRPC3-defizienten Tieren präpariert wurden, spricht dieses erste Ergebnis dafür, dass Antikörper 45/47 das mTRPC3-Protein, insbesondere in der Proteinfraction von Kleinhirn (schon nach kurzer Entwicklung des Blots erkennbar, Abbildung 13a), weniger gut in der Proteinfraction von Gesamthirn detektiert.

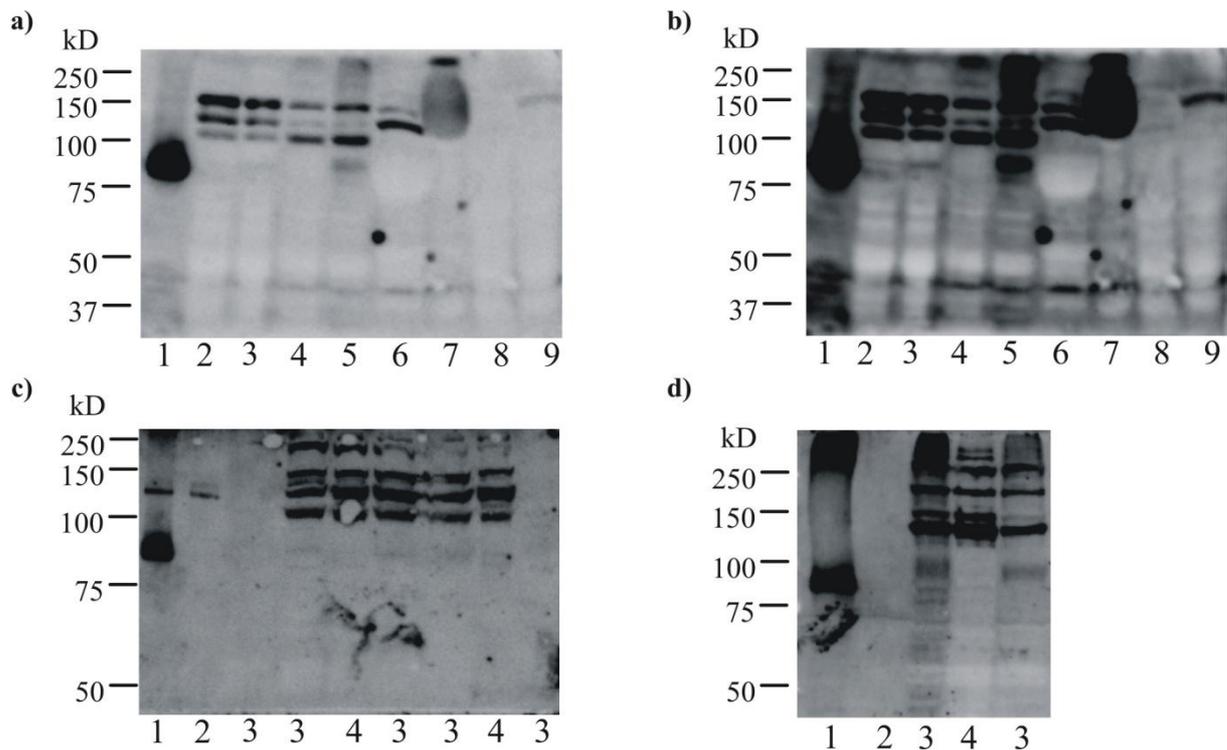


Abbildung 13 Expressionsanalysen von mTRPC3 mit Antikörper 45/47. Gezeigt sind Western Blots.

- a) Belichtungszeit 5 Minuten; aufgetragen sind in **Spur 1** sind mTRPC3-transfizierte COS-Zell-Lysate, in **Spur 2** mikrosomale Proteinfraktionen von Hirn von mTRPC3-defizienten, 7 Tage alten Mäusen, in **Spur 3** mikrosomale Proteinfraktionen von Hirn von Wildtyp-Tieren (7 Tage alt), in **Spur 4** mikrosomale Proteinfraktionen von Kleinhirn von mTRPC3-defizienten Tieren, in **Spur 5** mikrosomale Proteinfraktionen von Kleinhirn von Wildtyp-Tieren, in **Spur 6** mikrosomale Proteinfraktionen von Skelettmuskulatur von mTRPC3-defizienten Tieren, in **Spur 7** mikrosomale Proteinfraktionen von Skelettmuskulatur von Wildtyp-Tieren, in **Spur 8** mikrosomale Proteinfraktionen von Lunge von mTRPC3-defizienten Tieren, in **Spur 9** mikrosomale Proteinfraktionen von Lunge von Wildtyp-Tieren.
- b) wie (a) nach einer Belichtungszeit von 60 Minuten.
- c) Belichtungszeit 5 Minuten; in **Spur 1** sind mTRPC3-transfizierte COS-Zell-Lysate aufgetragen, in **Spur 2** nicht-transfizierte COS-Zell-Lysate, in **Spur 3** mikrosomale Proteinfraktionen von Hirn von Wildtyp-Tieren, in **Spur 4** mikrosomale Proteinfraktionen von Hirn von mTRPC3-defizienten Tieren; die Gewebeproben stammten jeweils aus verschiedenen Präparationen.
- d) Belichtungszeit 60 Minuten; in **Spur 1** sind mTRPC3-transfizierte COS-Zell-Lysate, in **Spur 2** nicht-transfizierte COS-Zell-Lysate, in **Spur 3** mikrosomale Proteinfraktionen von Kleinhirn von Wildtyp-Tieren und in **Spur 4** mikrosomale Proteinfraktionen von Kleinhirn mTRPC3-defizienten Tieren aufgetragen.

Im nächsten Westernblot (Abbildung 13c) lässt sich dieses Ergebnis nicht eindeutig reproduzieren, wohl aber im dritten Westernblot (Abbildung 13d). Hier erkennt der Antikörper 45/47 wiederum eindeutig das TRPC3-Protein in den Spuren 3, in denen Proteinfractionen von Kleinhirn aufgetragen sind, die aus verschiedenen Wildtyp-Tieren präpariert wurden, nicht aber in der Proteinfraction, die aus TRPC3-defizienten Tieren präpariert wurden. Die Intensität der Proteine > 100 kDa, deren Identität unbekannt ist, die aber nichts mit TRPC3 zu tun haben - sie werden auch in Spur 4 nachgewiesen - spricht dafür, dass in diesem Versuch vergleichbare Mengen Protein in allen Spuren aufgetragen wurden.

Der Antikörper 63/64, der auch mTRPC6 und mTRPC7 erkennt, wurde ebenfalls mit Proteinfractionen von mehreren Geweben, darunter Lunge, Herz und Hirn, getestet (Abbildung 14). Im Westernblot war eine Bande auf Höhe der Positivkontrolle (Spur 1) aber keine Proteine in den Fractionen von Wildtyp und mTRPC3-defizienten (C3⁻) und mTRPC6-defizienten (C6⁻) Tieren erkennbar.

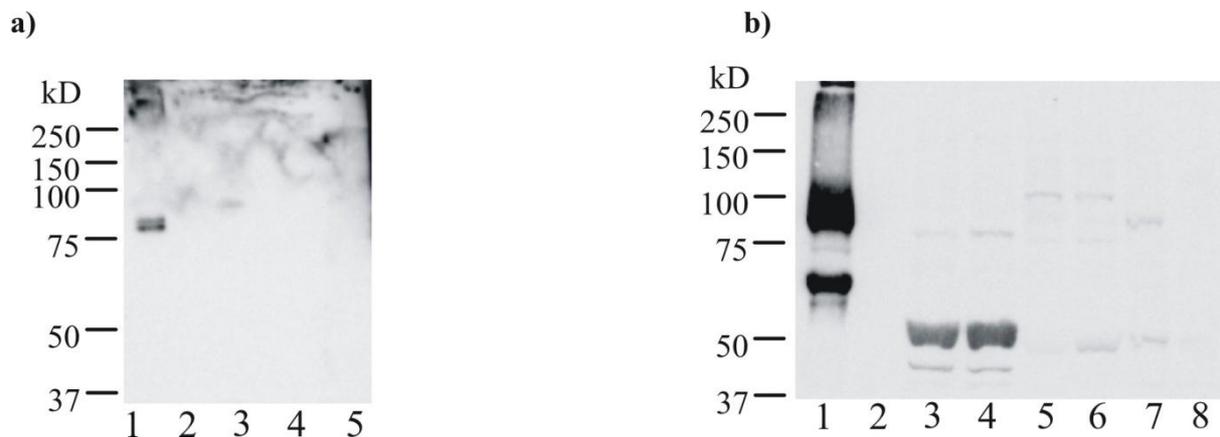


Abbildung 14 Expressionsanalysen von mTRPC3 mit Antikörper 63/64. Gezeigt sind Western Blots.

- a) Belichtungszeit 5 Minuten; in **Spur 1** mTRPC3-transfizierte COS-Zell-Lysate; in **Spur 2** nicht-transfizierte COS-Zell-Lysate, in **Spur 3** mikrosomale Proteinfractionen von Lunge von Wildtyp-Tieren, in **Spur 4** mikrosomale Proteinfractionen von Lungen von mTRPC3-defizienten Tieren und in **Spur 5** mikrosomale Proteinfractionen von Lunge von mTRPC6-defizienten Tieren aufgetragen.
- b) Belichtungszeit 1 Minute; aufgetragen sind in **Spur 1** mTRPC3-transfizierte COS-Zell-Lysate, in **Spur 2** nicht-transfizierte COS-Zell-Lysate, in **Spur 3** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von Wildtyp-Tieren (7 Tage alt), in **Spur 4** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von mTRPC3-defizienten Tieren (7 Tage alt), in **Spur 5** mikrosomale Proteinfractionen von Hirn von Wildtyp-Tieren (7 Tage alt), in **Spur 6** mikrosomale Proteinfractionen von Hirn von mTRPC3-defizienten Tieren (7 Tage alt), in **Spur 7** mikrosomale Proteinfractionen von Lunge von mTRPC6-defizienten Tieren in **Spur 8** mikrosomale Proteinfractionen von Lunge von mTRPC3-defizienten Tieren.

4.7 Nachweis von mTRPC3 an hypertrophierten Herzzellen

In der Literatur gibt es Hinweise, dass eine erhöhte Expression des TRPC3-Proteins nach Induktion einer Herzhypertrophie bei Mäusen nachgewiesen werden konnte (Onohara et al 2006, Nakayama et al 2006, Brenner et al 2007). Daher habe ich untersucht, ob der Antikörper 45/47 einen Unterschied feststellen kann zwischen Proteinfractionen von Herz, die aus gesunden Mäusen präpariert wurden, welche als Placebo eine Behandlung mit Kochsalzlösung erhalten hatten, und solchen, bei denen durch kontinuierliche Gabe von Angiotensin II eine Herzhypertrophie induziert worden war. Diese Untersuchungen an Mäusen wurden von meinem Kollegen Juan Camacho-Londoño im Rahmen seiner Doktorarbeit bei Professor Freichel durchgeführt. Als weitere Vergleichsproben dienten Proben von mTRPC3-defizienten Tieren, die in gleicher Weise behandelt worden waren. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis. Weder mit AK 45/47 noch mit AK 63/64 konnte ein als mTRPC3 interpretierbares Protein nachgewiesen werden. Verschiedene Gründe könnten dieses negative Ergebnis erklären: So könnten unsere Antikörper nicht sensitiv genug sein, um TRPC3 zu erkennen. Andererseits ist keineswegs gesichert, dass TRPC3 tatsächlich in Herzgewebe (Myozyten, Endothel oder Fibroblasten) exprimiert wird. Die zitierten Studien (Onohara et al 2006, Brenner et al 2007) haben diesen Nachweis nicht eindeutig erbracht. Zudem haben sie keine TRPC3-defizienten Kontrollen verwendet.

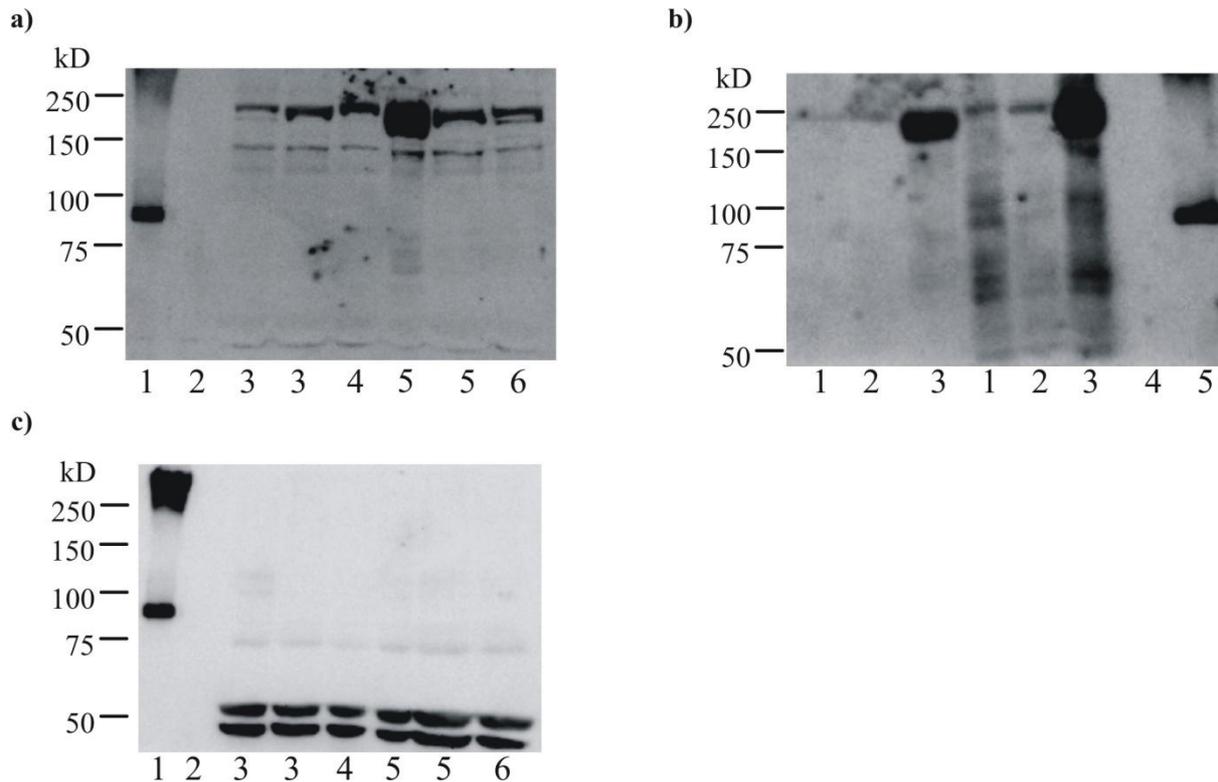


Abbildung 15 Expressionsanalyse von mTRPC3 an hypertrophierten Herzellen

- a) Antikörper 45/47, Belichtungszeit 5 Minuten; aufgetragen sind in **Spur 1** mTRPC3-transfizierte COS-Zell-Lysate, in **Spur 2** nichttransfizierte COS-Zell-Lysate, in **Spur 3** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von Wildtyp-Tieren ohne induzierte Hypertrophie, in **Spur 4** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von mTRPC3-defizienten Tieren, in **Spur 5** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von Wildtyp-Tieren nach Behandlung mit Angiotensin II und in **Spur 6** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von mTRPC3-defizienten Tieren nach Behandlung mit Angiotensin II.
- b) Antikörper 45/47, Belichtungszeit 60 Minuten; in **Spur 1** sind mikrosomale Proteinfractionen von Herz von Wildtyp-Tieren ohne induzierte Hypertrophie, in **Spur 2** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von mTRPC3-defizienten Tieren, in **Spur 3** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von Wildtyp-Tieren nach Behandlung mit Angiotensin II, in **Spur 4** nichttransfizierte COS-Zell-Lysate und in **Spur 5** mTRPC3-transfizierte COS-Zell-Lysate aufgetragen.
- c) Antikörper 63/64, Belichtungszeit 5 Minuten; in **Spur 1** sind mTRPC3-transfizierte COS-Zell-Lysate aufgetragen, in **Spur 2** nichttransfizierte COS-Zell-Lysate, in **Spur 3** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von Wildtyp-Tieren ohne induzierte Hypertrophie, in **Spur 4** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von mTRPC3-defizienten Tieren, in **Spur 5** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von Wildtyp-Tieren nach Behandlung mit Angiotensin II und in **Spur 6** mikrosomale Proteinfractionen von Herz von mTRPC3-defizienten Tieren nach Behandlung mit Angiotensin II.

4.8 Optimierung der Western Blots zum Nachweis von TRPC3

Nachdem – wie in Abbildung 13 gezeigt – der Antikörper 45/47 das TRPC3-Protein in Proteinfractionen, die von Gesamthirn und von Kleinhirn präpariert worden waren, eindeutig erkennt habe ich abschließend versucht, die Bedingungen der Proteinpräparation und des Western Blots zu optimieren, wobei ich weniger die Bedingungen verändert habe, als durch wiederholte Durchführung der im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Vorgehensweisen optimalere Ergebnisse erzielt habe. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

Diese Western Blot-Ergebnisse zeigen, dass das TRPC3-Protein eindeutig in Proteinfractionen von Kleinhirn nachgewiesen werden kann (Abbildung 16 a, b und c unterscheiden sich in der Expositionszeit); das TRPC3-Protein ist auch nach längerer Exposition (b und c) in Proteinfractionen von TRPC3-defizienten Tieren nicht detektierbar. In einem weiteren Experiment wurde versucht, TRPC3 in unabhängigen Proteinfractionen von Gesamthirn, Kleinhirn und Großhirn nachzuweisen, wobei jeweils Proteinfractionen von Wildtyp-Tieren und TRPC3-, TRPC6- und CaV β 3-defizienten Tieren verwendet wurden (Abbildung 16 d). Auch hier zeigte sich, dass das TRPC3-Protein sich eindeutig in Proteinfractionen von Kleinhirn nachweisen lässt, die von Wildtyp-Tieren oder TRPC1-/TRPC6-doppeldefizienten Tieren (die bezüglich der Expression von TRPC3 Wildtyp sind) präpariert wurden. Es ist nicht nachweisbar in Proteinfractionen von TRPC3-defizienten Tieren. Auch in diesem Western Blot wird deutlich, dass in Proteinfractionen von Gesamthirn TRPC3 schwach nachweisbar ist. Um sicherzustellen, dass in allen Spuren etwa die gleiche Proteinmenge aufgetragen ist, wurde der Blot gewaschen („gestrippt“) und als sogenannte „Ladekontrolle“ mit einem Antikörper gegen CaV β 3 inkubiert, der in unserem Labor hergestellt worden war. Der Antikörper erkennt die 55 kDa große β 3-Untereinheit im ZNS exprimierter spannungsabhängiger Kaliumkanäle. Man sieht nach kurzer Exposition das β 3-Protein – außer in der Spur, in der Proteinfractionen von β 3-defizienten Tieren aufgetragen wurden.

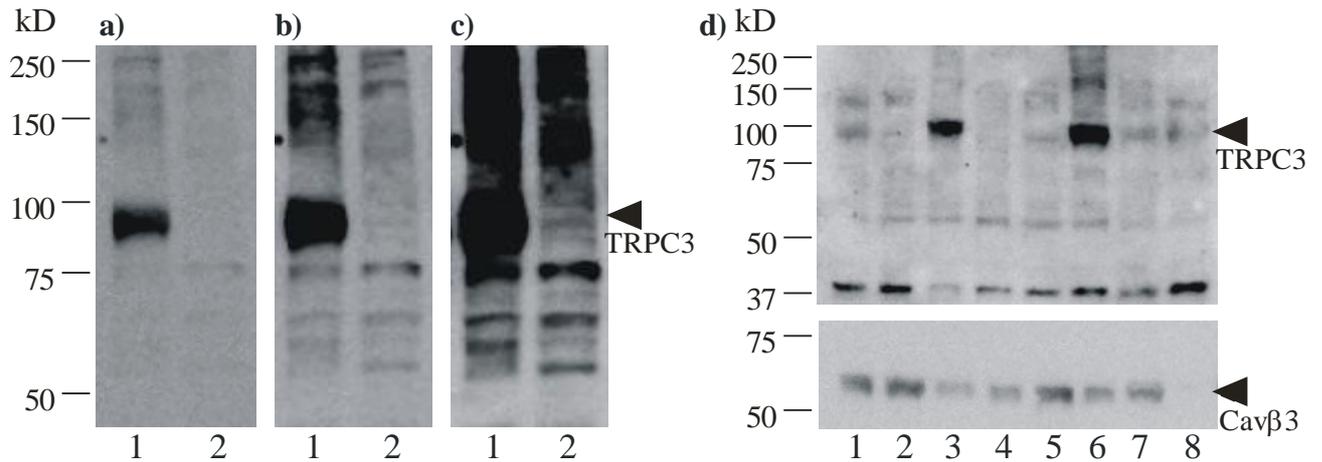


Abbildung 16 Expressionsanalysen an mikrosomalen Proteinfraktionen von Hirn und Kleinhirn

Antikörper 45/47

a/b/c) Es sind aufgetragen in **Spur 1** mikrosomale Proteinfraktionen von Kleinhirn von Wildtyp-Tieren und in **Spur 2** mikrosomale Proteinfraktionen von Kleinhirn von mTRPC3-defizienten Tieren, es wurden jeweils 150µg aufgetragen;

die Expositionszeit beträgt bei (a) 1 Minute, bei (b) 5 Minuten und bei (c) 60 Minuten;

d) es sind aufgetragen in **Spur 1** mikrosomale Proteinfraktionen von Großhirn von Wildtyp-Tieren, in **Spur 2** mikrosomale Proteinfraktionen von Großhirn von mTRPC3-defizienten Tieren, in **Spur 3** mikrosomale Proteinfraktionen von Kleinhirn von Wildtyp-Tieren, in **Spur 4** mikrosomale Proteinfraktionen von Kleinhirn von mTRPC3-defizienten Tieren, in **Spur 5** mikrosomale Proteinfraktionen von Großhirn von mTRPC1- und mTRPC6-defizienten Tieren, in **Spur 6** mikrosomale Proteinfraktionen von Kleinhirn mTRPC1- und mTRPC6-defizienten Tieren, in **Spur 7** mikrosomale Proteinfraktionen von Hirn mTRPC6-defizienten Tieren, in **Spur 8** mikrosomale Proteinfraktionen von Hirn von CaV β3-defizienten Tieren.

Es wurden jeweils 150µg aufgetragen, der obere Blot wurde mit Antikörper 45/47 inkubiert, anschließend der gebundene Antikörper abgelöst und der Blot erneut mit einem Antikörper inkubiert, dem Antikörper für die β3-Untereinheit spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle (CaV β3). Die Intensität der CaV β3-Bande ist ein Maß für die Proteinbeladung der jeweiligen Spur.

5 Diskussion

Ziel der beschriebenen Versuche war es, einen polyklonalen Antikörper gegen das TRPC3-Protein von Maus zu erstellen. Dieser Antikörper sollte der näheren Charakterisierung dieses Kanalproteins dienen. Da bisher keine spezifischen Liganden für TRPC3 bekannt sind, stellt die eigene Herstellung spezifischer Antikörper den einzigen Weg zur Untersuchung der Expression des mTRPC3-Gens dar.

Für die Herstellung der Antikörper sind antigene Epitope des Zielproteins notwendig. Diese Epitope sind bei Membranproteinen sehr limitiert vorhanden. So ist ein Großteil des Proteins von der Lipiddoppelschicht umgeben und Antikörpern nicht zugänglich. Es wurden daher hydrophile Sequenzen zur Herstellung von TRPC3-Fusionsproteinen ausgewählt, die aller Wahrscheinlichkeit nach außerhalb der Membran liegen. Die meisten dieser Sequenzen, von denen man annimmt, dass sie intrazellulär lokalisiert sind, liegen am Carboxy- bzw. Aminoterminus von TRPC3. Andere Erschwernisse sind durch den wahrscheinlich geringen Expressionslevel und die hohe Ähnlichkeit in den Aminosäuresequenzen zwischen mTRPC3, mTRPC6 und mTRPC7 gegeben.

Von insgesamt acht Versuchen, über die Konstruktion von Fusionsproteinen, deren rekombinanter Synthese, Aufreinigung und Immunisierung von Kaninchen mit diesen Proteinen sensitive und spezifische Antikörper gegen mTRPC3 zu erhalten, waren nur zwei erfolgreich. Die beiden Antikörper 45/47 und 63/64 konnten – nach affinitätschromatographischer Aufreinigung der Kaninchen-Seren – mTRPC3 in COS Zellen identifizieren, während COS-Zellen, die TRPC3 nicht exprimieren, zu keinem Signal führten. Beide Antikörper sind gegen den absoluten Aminoterminus (Aminosäurereste 1 bis 84, Antikörper 45/47) bzw. gegen den absoluten Carboxyterminus (Aminosäurereste 783 bis 836, Antikörper 63/64) gerichtet. Bei dem sehr kurzen Fragment 55/57 (Aminosäurereste 482 bis 524), dessen Sequenz relativ mittig in der - wahrscheinlich extrazellulären - Schleife von mTRPC3 liegt, gelang die Klonierung trotz zahlreicher Versuche nicht. Die Fragmente 58/64 (Aminosäurereste 662 bis 836), 60/64 (Aminosäurereste 713 bis 836) und 62/64 (Aminosäurereste 783 bis 836) vom C-Terminus ließen sich als His-TRPC3-Fusionsproteine nicht exprimieren; die Bakterien zeigten nach Transformation der entsprechenden Plasmide kaum Wachstum, so dass möglicherweise die transformierte DNA oder die entstandenen Fusionsproteine eine toxische, wachstumshemmende Wirkung hatten. Die GST-TRPC3-

Fusionsproteine, die zur Immobilisierung für die sich anschließende Affinitätschromatographie gedacht waren, wurden zwar exprimiert, konnten allerdings – bis auf 63/64 (Aminosäurereste 783 bis 836) – nicht in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden. Insgesamt standen also nur noch fünf Fusionsproteine zur Immunisierung zur Verfügung. Die nach Immunisierung mit diesen rekombinanten Proteinen gewonnenen Seren schienen zwar alle TRPC3 in TRPC3-exprimierenden Zellen zu erkennen, sowohl 49/51 (Aminosäurereste 118 bis 255) als auch 52/54 (Aminosäurereste 176 bis 325) zeigten allerdings eine deutliche, wenn auch schwächere Bande auf gleicher Höhe in Zellen, die TRPC3 nicht exprimierten und die als Negativkontrolle verwendet wurden. Das Serum 45/48 (Aminosäurereste 1 bis 146) wurde erst bei späten Blutentnahmen schwach positiv. Die Anreicherung der polyklonalen Antikörper konzentrierte sich daher auf die beiden anderen Seren, die bereits bei frühen Blutentnahmen zu eindeutigen Signalen führten. Eine Gewinnung von spezifischen Antikörpern aus den Seren 45/48, 49/51 und 52/54 könnte vielleicht noch erfolgreich sein.

Antikörper 45/47 konnte hochspezifisch Zelllysate von mTRPC3-exprimierenden Zellen von Zelllysaten unterscheiden, die aus Zellen gewonnen werden, die TRPC3 nicht exprimieren, und zudem wies er keinerlei Kreuzreaktion zu den mTRPC6- und mTRPC7-Proteinen auf. Im Vergleich von Proteinfraktionen von Gesamthirn bzw. Kleinhirn von Wildtyp-Mäusen mit den korrespondierenden Fraktionen von TRPC3-defizienten Mäusen konnte der Antikörper 45/47 das TRPC3-Protein eindeutig identifizieren. Dabei zeigte sich auch, dass die Menge an detektierbarem TRPC3-Protein in den Proteinfraktionen von Kleinhirn wesentlich höher ist als in den Proteinfraktionen von Großhirn oder Gesamthirn. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass insbesondere Purkinjezellen des Kleinhirns Transkripte von TRPC3 exprimieren (Hartmann et al. 2008). Insgesamt sprechen unsere Daten dafür, dass das TRPC3-Protein überwiegend im Kleinhirn exprimiert wird. Das schwächere Signal in Proteinfraktionen von Gesamthirn spricht weniger dafür, dass TRPC3 auch in anderen Teilen des ZNS exprimiert wird, sondern dafür, dass der Anteil von TRPC3 aus dem Kleinhirn in diesen Proben von Gesamthirn verdünnt wurde. Der Befund, dass das TRPC3-Protein in Proteinfraktionen von Gesamthirn, die von TRPC6-defizienten Tieren stammen, ebenfalls nur schwach exprimiert ist (Abbildung 16d), spricht dagegen, dass das TRPC3-Protein in TRPC6-defizienten Tieren kompensatorisch höher exprimiert ist. Zumindest an glatten Muskelzellen der Aorta scheint dies aber der Fall zu sein (Dietrich et al. 2005) In Proteinproben von anderen Geweben, wie Lunge und Skelettmuskulatur, konnte der

Antikörper 45/47 nicht zwischen Wildtyp und mTRPC3-defizienten Proteinproben differenzieren. In beiden Geweben war kein eindeutiges TRPC3-Signal nachweisbar. Falls TRPC3 in diesen Geweben exprimiert wird, liegt sein Expressionsniveau unter der Nachweisgrenze dieses Antikörpers.

Der zweite aufgereinigte Antikörper (AK 63/64) konnte ebenfalls mTRPC3 in den als Überexpressionssystem verwendeten COS-Zellen identifizieren, er erkannte allerdings auch die überexprimierten TRPC6- bzw. TRPC7-Proteine. In Proteinproben verschiedener Gewebe konnte der Antikörper 63/64 das TRPC3-Protein (oder das TRPC6- oder TRPC7-Protein) nicht erkennen.

Da eine gesteigerte Expression von TRPC3 in den Gehirnen neugeborener Ratten beschrieben ist (Montell 2005), wurden auch mikrosomale Proteinfractionen von 7 Tage alten Mäusen untersucht, ohne dass ein signifikanter Unterschied festzustellen war. Ob diese erhöhte Expression bei Mäusen überhaupt gegeben ist, ist bis dato nicht bekannt, sodass dieses Ergebnis auch in einer unterschiedlichen Expression bei Ratten im Vergleich zu Mäusen begründet sein kann. Auch die Untersuchung von Proteinfractionen von Herz erbrachte keinen Nachweis, dass in diesem Gewebe TRPC3-Proteine exprimiert werden.

Zusammenfassend konnte ich zwei polyklonale Antikörper herstellen und charakterisieren, die das TRPC3-Protein von Maus im Western Blot detektieren. Der Antikörper, der gegen carboxyterminale Epitope von TRPC3 gerichtet ist, erkennt TRPC3-Proteine, aber auch TRPC6- und TRPC7-Proteine im Überexpressionssystem eindeutig, die entsprechenden Proteine in Proteinfractionen von Maus jedoch nicht. Der zweite Antikörper, der gegen den Aminoterminus von TRPC3 gerichtet ist, erkennt dagegen ausschließlich TRPC3, sowohl im Überexpressionssystem als auch in Proteinfractionen von Maus. Insbesondere lässt sich seine Spezifität in Experimenten eindeutig zeigen, bei denen parallel in einem Polyacrylamidgel korrespondierende Proteinfractionen von Wildtyp-Tieren (TRPC3 positiv) und TRPC3-defizienten Tieren (TRPC3 negativ) aufgetrennt wurden. Damit ist dies der erste Antikörper für das TRPC3-Protein von Maus, der diesen rigorosen Test besteht. Vergleichbar sensitive und selektive Antikörper sind für das TRPC3-Protein bisher nicht von anderen Gruppen publiziert worden.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Eigene Veröffentlichung

Meissner M., Obmann, V., Hoschke, M., Link, S., Jung M., Held, G., Philipp, S., Zimmermann, R., Flockerzi V.

TRP Channels, Chapter 6: Lessons of Studying TRP Channels with Antibodies

CRC Press; 2011.

6.2 Zitierte Veröffentlichungen

Beech D.J., Muraki K. & Flemming R. 2004

Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP.

J Physiol. 2004 Sep 15;559(Pt 3):685-706.

Birnboim, H.C. & Doly, J. 1979

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

Bornhorst, J.A. & Falke, J.J. 2000

Purification of proteins using polyhistidine affinity tags.

Methods Enzymol, 326,245-54

Brenner J.S. & Dolmetsch R.E. 2007

TrpC3 Regulates Hypertrophy-Associated Gene Expression without Affecting Myocyte -----

PLoS ONE 2: e802

Chrambach, A., Reisfeld, R.A., Wyckoff, M. & Zaccari, J. 1967

A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis.

Anal Biochem, 20, 150-4

Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. 1989

One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.

Proc Natl Acad Sci USA, 86, 2172-5

Cosens, D.J. & Manning, A. 1969

Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant.

Nature, 224, 285-7

Dietrich A., Kalwa H., Rost B.R. & Gudermann T. 2005

The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance.

Pflugers Arch. 451(1);72-80

Dietrich A, Mederos Y, Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L. 2005

Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice.

Mol Cell Biol. 2005 Aug;25(16):6980-9.

Dietrich A., Chubanov V., Kalwa H., Rost B.R. & Gudermann T. 2006

Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells.

Pharmacol Ther. 2006 Dec;112(3):744-60

Dietrich A., Kalwa H., Fuchs B., Grimminger F., Weissmann N. & Gudermann T. 2007

In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature.

Cell Calcium. 2007 Aug;42(2):233-44

Dietrich A., Mederos y Schnitzler M., Kalwa H., Storch U. & Gudermann T. 2005

Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 371(4), 257-65.

Duncan L.M., Deeds J., Hunter J., Shao J., Holmgren L.M., Woolf E.A., Tepper R.I. & Shyjan A.W. 1998

Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis.

Cancer Res. 1998 Apr 1;58(7):1515-20

Flockerzi, V.

An introduction on TRP channels.

Handb Exp Pharmacol. 2007;(179):1-19.

Frangioni, J.V. & Neel, B.G. 1993

Solubilization and purification of enzymatically active glutathion-S-transferase (pGEX) fusion proteins.

Anal Biochem, 210, 179-87

Freichel M., Schweig U., Stauffenberger S., Freise D., Schorb W. & Flockerzi V. 1999

Store-operated cation channels in the heart and cells of the cardiovascular system.

Cell Physiol Biochem. 1999;9(4-5):270-83.

Freichel M., Suh S.H., Pfeifer A., Schweig U., Trost C., Weissgerber P., Biel M., Philipp S., Freise D., Droogmans G., Hofmann F., Flockerzi V. & Nilius B. 2001

Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice.

Nat Cell Biol. 2001 Feb;3(2):121-7

Freichel M., Vennekens R., Olausson J., Stolz S., Philipp S.E., Weissgerber P. & Flockerzi V. 2005

Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies.

J Physiol. 2005 Aug 15;567(Pt 1):59-66

Hardie, R.C. & Minke, B. 1992

The *trp* gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors.

Neuron. Apr;8(4):643-51

Harlow, E. & Lane, D. 1988

Antibodies: a laboratory manual.

Cold Spring Harbour Laboratory, New York

Hartmann J., Dragicevic E., Adelsberger H., Henning H.A., Sumser M., Abramowitz J., Blum R., Dietrich A., Freichel M., Flockerzi V., Birnbaumer L. & Konnerth A. 2008

TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination.

Neuron 59(3), 392-8.

Hofmann T., Obukhov A.G., Schaefer M., Harteneck C., Gudermann T. & Schultz G. 1999

Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol.

Nature. 1999 Jan 21;397(6716):259-63.

Holmes, D.S. & Quigley, M. 1981

A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.

Anal Biochem, 114, 193-7

Kyte, J. & Doolittle, R.F. 1982

A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein.

J Mol Biol. 1982 May 5;157(1):105-32

Laemmli, U.K. 1970

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, 227, 680-5

Montell, C. & Rubin, G.M. 1989

Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction.

Neuron, 2, 1313-23

Montell C. 2005

The TRP superfamily of cation channels.

Sci STKE. 2005 Feb 22;2005(272):re3.

Murray, V. 1989

Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction.

Nucleic Acids Res. 1989 November 11; 17(21): 8889

Nakayama H., Wilkin B.J., Bodi I. & Molkentin J.D. 2006

Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart.

FASEB J. 20(10),1660-70

Onohara N., Nishida M., Inoue R., Kobayashi H., Sumimoto H., Sato Y., Mori Y., Nagao T. & Kurose H. 2006

TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy.

EMBO J. 15;25(22), 5305-16

Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S. & Patapoutian, A. 2002

A TRP channel that senses cold stimuli and menthol.

Cell, 108, 705-15

Ramsey, I.S., Delling, M. & Clapham, D.E.

An introduction to TRP channels.

Annu Rev Physiol. 2006;68:619-47.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci USA. 1977 Dec;74(12):5463-7

Schlingmann, K.P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsum, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H.W. & Konrad, M. 2002

Hypomagnesemia with secondary hypocalcaemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family.

Nat Genet, 31, 166-70

Smith, D.B. 2000

Generating fusions to glutathione S-Transferase for protein studies.

Methods Enzymol, 326, 254-70

van Genderen MM, Bijveld MM, Claassen YB, Florijn RJ, Pearring JN, Meire FM, McCall MA, Riemsdag FC, Gregg RG, Bergen AA, Kamermans M.

Mutations in TRPM1 are a common cause of complete congenital stationary night blindness.

Am J Hum Genet. 2009 Nov;85(5):730-6.

Walder R.Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borchowitz, Z., Boettger, M.B., Beck, G.E., Englehardt, R.K., Carmi, R. & Sheffield, V.C. 2002

Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia.

Nat Genet, 31, 171-4

West R.J., Sun A.Y., Church D.L. & Lambie EJ.2001

The *C. elegans* gon-2 gene encodes a putative TRP cation channel protein required for mitotic cell cycle progression.

Gene. 2001 Mar 21;266(1-2):103-10

Wissenbach U., Niemeyer B., Himmerkus N., Fixemer T., Bonkhoff H. & Flockerzi V.2004

TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca²⁺ channel expression.

Biochem Biophys Res Commun. 2004 Oct 1;322(4):1359-63

Zhu X., Jiang M., Peyton M., Boulay G., Hurst R., Stefani E. & Birnbaumer L. 1996

trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry.

Cell. 1996 May 31;85(5):661-71.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fmol	Femtomol
GST	Glutathion-S-Transferase
His	Histidin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosylpyranosid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
min	Minute
ml	Milliliter
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	pondus hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration)
pM	Pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-Borat-EDTA-Puffer mit 0,1% Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TrisHCl	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan-hydrochlorid
TRP	transient receptor potential

Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

7.2 Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin

S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 TRP-Kanal.....	10
Abbildung 2 Aminosäuresequenzen von mTRPC3, mTRPC6 und mTRPC7	13
Abbildung 3 Expression rekombinanter Fusionsproteine über T7lac-Promoter	37
Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Flüssigkeitschromatographie	39
Abbildung 5 Kyte & Doolittle Hydropathieplot von mTRPC3.....	43
Abbildung 6 Proteinsequenz von mTRPC3	44
Abbildung 7 Ergebnisse der Expression des (His) ₉ -TRPC3 ₁₋₁₄₆ -Fusionsproteins (45/48),.....	47
Abbildung 8 Ergebnisse der Aufreinigung (Coomassie-gefärbte SDS-Gele).....	47
Abbildung 9 Immunisierung der Kaninchen	48
Abbildung 10 Serentestung	49
Abbildung 11 Testung der affinitätsgereinigten Antikörper	51
Abbildung 12 Testung der aufgereinigten Antikörper	52
Abbildung 13 Expressionsanalysen von mTRPC3 mit Antikörper 45/47.....	54
Abbildung 14 Expressionsanalysen von mTRPC3 mit Antikörper 63/64. Gezeigt sind Westernblots	55
Abbildung 15 Expressionsanalyse von mTRPC3 an hypertrophierten Herzzellen.....	57
Abbildung 16 Expressionsanalysen an Hirn- und Kleinhirnmikrosomen.....	59

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 TRP-Subfamilien.....	9
--------------------------------	---

Tabelle 2 Oligonukleotide	23
Tabelle 3 Fusionsproteine.....	45
Tabelle 4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Herstellung rekombinanter Fusionsproteine;	46
Tabelle 5 Blutentnahmen.....	48
Tabelle 6 Ergebnisse der Serentests	50

Danksagung

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung dieser Doktorarbeit geht vor allem an meinen Doktorvater Prof. Dr. Veit Flockerzi sowie an meine Ansprechpartner Dr. Marcel Meissner und die Mitarbeiter Dr. Christof Störger, Sven Kappel, Christine Wesely, Heidi Löhr, Karin Wolske, Martin Simon-Thomas, Ute Soltek, Thorsten Kessler, Dr. Ulrich Wissenbach und Dr. Kathrin Schumacher für Hilfe und Unterstützung.

Lebenslauf

1990-1994:	Aschbachschule Gersweiler (Grundschule)
1994-2003:	Gymnasium am Schloß in Saarbrücken
Juli 2001:	dreiwöchige Teilnahme an der Deutschen Schülerakademie in Marburg zum Thema Humangenomprojekt
2003:	Abitur
August 2003	
-Mai 2004:	Zivildienst als Rettungshelfer bei der Berufsfeuerwehr Saarbrücken
seit WS 2004/05:	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
2006:	1. ärztliche Prüfung
24.08.09	
-25.07.10	Praktisches Jahr
	24.08. – 13.12. Radiologie Klinikum Saarbrücken
	14.12. – 04.04. Chirurgie Zieglerspital Bern
	05.04. – 25.07. Innere Medizin Klinikum Saarbrücken
07.10.2010	2. ärztliche Prüfung, schriftlicher Teil
23.11.2010	2. ärztliche Prüfung, mündlich-praktischer Teil
23.12.2010	Approbation als Arzt
Seit 01.05.2011	Arzt in Weiterbildung in der Abteilung für Innere Medizin des Nardinklinikums Zweibrücken