

Institut für Neurowissenschaften und Biophysik
Zelluläre Biophysik (INB-1)

***Identifizierung und Charakterisierung
eines neuen Bindeproteins für
zyklische Nukleotide***

Katharina Debowski

***Identifizierung und Charakterisierung
eines neuen Bindeproteins für
zyklische Nukleotide***

Katharina Debowski

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4260

ISSN 0944-2952

Institut für Neurowissenschaften und Biophysik

Zelluläre Biophysik (INB-1) Jül-4260

D 38 (Diss., Köln, Univ., 2007)

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek, Verlag

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publication@fz-juelich.de

Zusammenfassung

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) sind wichtige intrazelluläre Botenstoffe. Die Bindung zyklischer Nukleotide beeinflusst in vielen Zellen die Funktion von Proteinkinasen, Ionenkanälen und Guaninnukleotid-Austauschfaktoren. Das SCNBP (*soluble cyclic nucleotide-binding protein*) ist ein bisher uncharakterisiertes Protein, für das eine Bindestelle für zyklische Nukleotide vorhergesagt wird. Es kann keiner bisher bekannten Gruppe von Zielproteinen für zyklische Nukleotide zugeordnet werden. In 17 verschiedenen Spezies - vom marinen Invertebraten bis zum Menschen - findet man Gene, die zum Maus-SCNBP ortholog sind. Demnach könnte das SCNBP einer neuen Proteinklasse angehören, die durch zyklische Nukleotide reguliert wird. In Northernblot-Experimenten wurde gezeigt, dass SCNBP-mRNA in der Maus im Wesentlichen im Hoden vorkommt. Mittels *in situ* Hybridisierung wurde SCNBP-mRNA spezifisch in Spermatozyten des Maushodens nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde die Expression des SCNBP im Maushoden auf Proteinebene untersucht. Ich konnte zwei unterschiedliche SCNBP-Varianten nachweisen. Um Hinweise auf die physiologische Funktion des SCNBP zu erhalten, habe ich mögliche Interaktionspartner im Maushoden durch Immunpräzipitation und Massenspektrometrie identifiziert. Für eine umfassende biochemische Charakterisierung wurde das SCNBP heterolog in CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen exprimiert. Nach Fermentation dieser Zellen in einem Rührkesselbioreaktor habe ich das SCNBP affinitätschromatographisch gereinigt.

Abstract

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate are important intracellular messengers. Binding of cyclic nucleotides controls the activity of protein kinases, ion channels and guanine-nucleotide-exchange factors in many cells. The SCNBP (soluble cyclic nucleotide-binding protein) is a novel uncharacterized protein predicted to comprise a cyclic nucleotide-binding domain. This protein belongs to neither of the known families of effector proteins for cyclic nucleotides. Within 17 distinct species - from marine invertebrates to humans - genes orthologous to the mouse SCNBP are present. Hence, the SCNBP could belong to a novel class of effector proteins for cyclic nucleotides. Northern blot experiments with mouse tissue indicate that the mRNA of SCNBP is expressed predominantly in the testis and by means of *in situ* hybridization it was specifically detected in spermatocytes. In the present study, SCNBP expression has been analyzed in mouse testis utilizing specific antibodies. I could provide evidence that two distinct SCNBP variants are present in mouse testis. To approach the physiological function of SCNBP, I identified by immunoprecipitation and mass spectrometry proteins in mouse testis that potentially interact with SCNBP. For a comprehensive biochemical study, SCNBP was heterologously expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Following fermentation of these cells in a stirred tank bioreactor I purified SCNBP by affinity chromatography.

I Inhalt

I INHALT	I
II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Zyklische Nukleotide: Zielproteine und die Bedeutung in Signalwegen	1
1.2 SCNBP	3
1.2.1 Annotierte SCNBP-Varianten	4
1.2.2 Nachweis der SCNBP-mRNA in der Maus	6
1.3 Zielsetzung	6
2 MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 Material	7
2.2 <i>E.coli</i> -Zellkultur	7
2.2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmidvektoren	7
2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für <i>E.coli</i>	8
2.2.3 Anzucht von <i>E.coli</i> -Bakterienkulturen	9
2.3 Plasmid-DNA-Präparationen aus Bakterien	9
2.3.1 Mini-Präparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)	10
2.3.2 Alkalische Maxi- und Mega-Präparationen	10
2.4 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren	11
2.4.1 Phenol/Chloroformextraktion	11
2.4.2 Ethanol-Präzipitation	11
2.4.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren	12
2.4.4 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen	12
2.4.5 DNA-Größen- und Mengenstandard	13
2.4.6 Elution von DNA aus Agarose-Gelen mit der Zentrifugationsmethode	13
2.5 Manipulation von Nukleinsäuren	13
2.5.1 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	13
2.5.2 Klonierung von DNA-Fragmenten	14
2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	15
2.6.1 Bedingungen für die PCR-Reaktionen	15
2.6.2 Reinigung der PCR-Produkte	16
2.7 DNA-Sequenzierung mit LI-COR DNA-Sequenzierer	16
2.7.1 Sequenzierreaktion	17
2.7.2 PCR zur Sequenzierung	17
2.7.3 Denaturierende Polyacrylamid-Sequenziergele	17
2.8 Heterologe Genexpression in Säugetierzellen	18
2.8.1 Kulturbedingungen für HEK 293-Zellen	18
2.8.2 Transiente Genexpression in HEK 293-Zellen	19
2.8.3 Kulturbedingungen für adhärent wachsende CHO-Zellen	20
2.8.4 Stabile Expression von mSCNBP[A]His ₁₀ in CHO-Zellen	21
2.8.5 Fermentation von CHO-Zellen	21

2.9 Präparation von Proteinen	26
2.9.1 Zellernte adhärent wachsendender HEK 293- und CHO-Zellen	26
2.9.2 Präparation von Mausgewebe	26
2.9.3 Proteinpräparation	28
2.10 Quantifizierung von Proteinen	29
2.10.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)	29
2.10.2 Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz	30
2.11 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese	31
2.11.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.11.2 Proteingrößenstandard	31
2.11.3 Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit der Rapid Coomassie-Blaufärbung	32
2.12 Nachweis spezifischer Proteine	33
2.12.1 Transfer und Immobilisierung von Proteinen („Westernblot“)	33
2.12.2 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine	33
2.12.3 Immunzytochemische Färbung von CHO-Zellen	35
2.12.4 Verwendete Antikörper	36
2.13 Chromatographische Verfahren	37
2.13.1 Affinitätschromatographie an einer Antikörper/Säulenmatrix	37
2.13.2 Affinitätschromatographische Reinigung rekombinanter Proteine	39
2.13.3 Größenausschlusschromatographie	40
2.14 Massenspektrometrische Analysen	41
2.14.1 Proteolytische In-Gel-Spaltung von Proteinen	41
2.14.2 Massenspektrometrische Peptidsequenzierung	42
3 ERGEBNISSE	45
3.1 Nachweis von heterolog exprimiertem SCNBP mit spezifischen Antikörpern	45
3.2 Nachweis von SCNBP im Maushoden	48
3.2.1 Westernblot-Analysen mit Proteinpräparationen aus Maushoden	48
3.2.2 Immunpräzipitation von SCNBP	49
3.3 Massenspektrometrische Identifizierung potentieller Interaktionspartner und präzipitierter SCNBP-Varianten	60
3.3.1 Potentielle Interaktionspartner	62
3.3.2 Identifizierte SCNBP-Varianten	67
3.4 Heterologe Expression von mSCNBP[A] in CHO-Zellen	69
3.4.1 Klonierung des Konstruktes pcDNA3.1(+) mSCNBP[A]His ₁₀	70
3.4.2 Herstellung einer stabilen Zelllinie	72
3.4.3 Fermentation von mSCNBP[A]His ₁₀ -Zellen	73
3.5 Reinigung des mSCNBP[A]His₁₀ aus CHO-Zellen	74
3.5.1 Größenausschlusschromatographie	77
4 DISKUSSION	81
4.1 Welche SCNBP-Varianten werden im Maushoden exprimiert?	81
4.2 In welchen Zellen des Maushodens kommt das SCNBP vor?	82
4.3 Interaktionspartner des SCNBP im Maushoden und mögliche Funktionen, die sich für das Protein ergeben	85

I Inhalt	III
4.4 SCNBP in anderen Geweben	88
4.5 Ausblick	90
5 LITERATURVERZEICHNIS	93
6 ANHANG	99
6.1 Klonierung des Konstruktes pcDNA3.1(+) mSCNBP[B]His ₆	99
6.2 Sequenzen und Hybridisierungsbereiche aller verwendeten Primer	100
6.3 Mögliche Interaktionspartner des Maus-SCNBP	100
6.4 Zugangsnummern aller annotierten Maus-SCNBP-Varianten	108

II Abkürzungsverzeichnis

α	Anti-
A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	cirka
cAMP	Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
cDNA	revers transkribierte DNA (<i>complementary DNA</i>)
cGMP	Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
cNMP	zyklische Nukleotide
CHAPS	3-[(N-Cholanamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
cm	Zentimeter
CNBD	<i>cyclic nucleotide-binding domain</i>
C-Terminus	Carboxylterminus einer Polypeptidkette
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoldiamintetraacetat
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
g	Gramm
g	Normal-Fallbeschleunigung ($9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$)
G418	Geneticinsulfat

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HPLC	<i>high-performance-liquid-chromatography</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
kB(p)	1000 Basen(paare)
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
M	molar
MW	Molmasse (<i>molecular weight</i>)
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
min	Minute(n)
mPIC	<i>mammalian protease inhibitor cocktail</i>
N-Terminus	Aminoterminal einer Polypeptidkette
OD	optische Dichte
p.A.	zur Analyse (<i>pro analysis</i>)
PA	Paraformaldehyd
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PVDF	Polyvinylidenfluoride
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
T	Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer

TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propandiol
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
ÜK	Übernachtskultur
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

Es wurden die üblichen Abkürzungen des „Système International“ und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen verwendet.

Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz sind durch die Anfangsbuchstaben der Basen bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin).

Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabenkode abgekürzt:

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Aspartat
C	Cystein
E	Glutamat
Q	Glutamin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

1 Einleitung

Zellen reagieren auf eine Vielzahl von Reizen aus ihrer Umwelt. Die äußeren Reize werden in vielen Fällen durch Rezeptoren aufgenommen und in ein intrazelluläres Signal umgewandelt. In vielen biologischen Signalübertragungsprozessen übernehmen intrazelluläre Botenstoffe eine Schlüsselrolle. Wichtige intrazelluläre Botenstoffe sind Inositol-1-4-5-trisphosphat (IP_3), Ca^{2+} , sowie die beiden zyklischen Nukleotide, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP).

1.1 Zyklische Nukleotide: Zielproteine und die Bedeutung in Signalwegen

Zyklische Nukleotide sind in allen Organismen von Bakterien bis hin zu Säugetieren vertreten. Sie werden durch die Enzymfamilie der Zyklasten aus Adenosintriphosphat (ATP) bzw. Guanosintriphosphat (GTP) synthetisiert. Als Antwort auf viele, sehr unterschiedliche Reize ändert sich die intrazelluläre Konzentration von cAMP und cGMP. Diese Änderung der Konzentration kontrolliert die Funktion verschiedener Proteine. Bis heute sind nur wenige Zielproteine beschrieben, die zyklische Nukleotide binden. Diese Proteine lassen sich in vier Gruppen einteilen:

1. Proteinkinasen. Zyklisch Nukleotid-abhängige Proteinkinasen werden entweder durch cAMP (Proteinkinase A, PKA) oder cGMP (Proteinkinase G, PKG) aktiviert (Übersicht: Francis & Corbin, 1999). Beide Proteinkinasefamilien phosphorylieren Serin- und Threonin-Reste von Proteinen und kontrollieren so deren Funktion. Ein wichtiger Signalweg, an dem die PKA beteiligt ist, ist die Regulation des Glykogenhaushalts. Hier kontrolliert die PKA Enzyme, die an der Steuerung der Glykogensynthese (Nielsen & Richter, 2003) bzw. des Glykogenabbaus (Ramachandran et al., 1987) beteiligt sind. Über die cAMP-abhängige Aktivierung der PKA wird auch die Expression spezifischer Gene reguliert. Die PKA phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie CREB (*cAMP response element binding protein*) oder CREM (*cAMP response element modulator*). Diese Transkriptionsfaktoren binden dann an spezifische DNA-Sequenzen (CRE, *cAMP response element*) und modulieren so die Transkription von Genen.

Die Regulation der Genexpression durch CREB spielt u.a. eine wichtige Rolle beim Langzeitgedächtnis (Bourtchuladze et al., 1994; Übersicht: Josselyn & Nguyen, 2005; Wu et al., 2007) und bei der Zellproliferation (Barton et al., 1996; Servillo et al., 1997). CREM ist entscheidend an der Differenzierung der Spermien in Säugetieren beteiligt (Nantel et al., 1996; Blendy et al., 1996).

Die PKG ist an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Sie steht am Anfang einer Signalkaskade, die zur Erschlaffung glatter Muskelzellen führt (Francis et al., 1988) und spielt eine entscheidende Rolle bei der Natriurese - der (gesteigerten) Ausscheidung von Natriumionen mit dem Harn (Jin et al., 2001). Beide Prozesse haben eine Abnahme des Blutdrucks zur Folge.

2. *EPACs (exchange protein directly activated by cAMP)*. EPACs wurden erst vor einigen Jahren als cAMP-bindende Proteine identifiziert (de Rooij et al., 1998). EPACs gehören zur Familie der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF), die die Aktivität kleiner G-Proteine steuert. EPACs spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, bei der Hormon-/Transmittersekretion und bei der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung (Rangarajan et al., 2003; Kashima et al., 2001; Kaneko & Takahashi, 2004; Oestreich et al., 2007; Übersicht: Bos, 2006).

3. *Ionenkanäle*. Man unterscheidet zwei Klassen von Ionenkanälen, die direkt durch cAMP bzw. cGMP reguliert werden: zyklisch Nukleotid gesteuerte Ionenkanäle (*cyclic-nucleotide-gated channels*, CNG) und hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid gesteuerte Ionenkanäle (*hyperpolarization-activated and cyclic-nucleotide-gated channels*, HCN).

CNG-Kanäle zählen zu der genetischen Superfamilie der spannungsabhängigen Ionenkanäle (Übersicht: Kaupp & Seifert, 2002). Funktionell handelt es sich jedoch um ligandenaktivierte Ionenkanäle, deren Öffnung durch die Bindung von cAMP und cGMP gesteuert wird. Die physiologische Funktion der CNG-Kanäle wurde erstmals in Photorezeptoren (Fesenko et al., 1985) und in olfaktorischen Rezeptorneuronen (Nakamura & Gold, 1987) aufgeklärt. Bei der Phototransduktion (Übersicht: Burns & Arshavsky, 2005) und der Olfaktion (Übersicht: Frings, 2001) der Vertebraten wird das Eingangssignal (Lichtreiz bzw. Duftstoff) über eine Signalkette in ein Botenstoffsignal übersetzt, welches durch das Schließen bzw. Öffnen von CNG-Kanälen ein elektrisches Signal in der Zelle auslöst. Bei der Phototransduktion ist zyklisches GMP, bei der Olfaktion zyklisches AMP der intrazelluläre Botenstoff.

HCN-Kanäle sind spannungsabhängige Ionenkanäle (Übersicht: Kaupp & Seifert, 2001) deren spannungsabhängiges Öffnen durch zyklische Nukleotide moduliert wird. HCN-Kanäle erfüllen im Herzen (DiFrancesco, 1993) und in zahlreichen Regionen des Gehirns (Übersicht:

Lüthi & McCormick, 1998) die Funktion von Schrittmacherkanälen. In vielen Neuronen bestimmen HCN-Kanäle zusammen mit K^+ -Kanälen das Ruhepotential (Übersicht: Robinson & Siegelbaum, 2003).

4. *Transkriptionsfaktoren*. Das CAP (*catabolite activator protein*) ist ein Transkriptionsfaktor aus *Escherichia coli*. Die Bindung von cAMP an CAP aktiviert die Transkription vieler induzierbarer Operons (Übersicht: Busby & Ebright, 1999).

Obwohl diese Proteine unterschiedliche Funktionen ausüben, besitzen sie ein gemeinsames Strukturmerkmal: eine ca. 120 Aminosäuren lange Bindedomäne für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle) (Übersicht: Kaupp & Seifert, 2002).

Außer den o.g. Zielproteinen für zyklische Nukleotide gibt es noch weitere Proteine, deren Funktion durch die Bindung von cAMP bzw. cGMP moduliert wird. Phosphodiesterasen sind die Enzyme, die cAMP und cGMP in der Zelle hydrolysieren. Sie besitzen als regulatorische Domänen sog. GAF-Domänen. GAF-Domänen können zyklische Nukleotide binden, vermitteln aber auch Protein-Protein-Wechselwirkungen. Diese Domänen sind ca. 110 Aminosäuren lang, unterscheiden sich in ihrer Primärsequenz aber von den cNMP-Bindestellen und sind nicht mit ihnen verwandt (Übersicht: Zoraghi et al., 2004).

1.2 SCNBP

Bei einer Datenbankrecherche wurde eine cDNA-Sequenz aus Maushoden entdeckt, die für ein unbekanntes Protein mit einer Bindestelle für zyklische Nukleotide kodiert (Utzerath, 2003). Ein Hydropathieplot der Aminosäuresequenz lässt keine potentiellen transmembranalen Bereiche erkennen. Dies deutet darauf hin, dass es sich um ein lösliches Protein handelt. Deshalb wurde das Protein als *soluble cyclic nucleotide-binding protein* (SCNBP) bezeichnet. Das SCNBP kann keiner bisher bekannten Gruppe von Zielproteinen für zyklische Nukleotide zugeordnet werden. Demnach könnte das SCNBP eine neue Proteinklasse darstellen, die zyklische Nukleotide bindet. In 17 verschiedenen Spezies - vom marinen Invertebraten bis zum Menschen - findet man Gene, die zum Maus-SCNBP ortholog sind (Krähling, 2006).

Abbildung 1.1 zeigt einen Aminosäuresequenzvergleich der putativen zyklisch-Nukleotid (cNMP) Bindestellen des SCNBPs aus Maus und aus Mensch mit cAMP- bzw. cGMP-Bindestellen verschiedener anderer Proteine.

		αA	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	
mSCNBP	216	--LLAKVIRFERFG	RRRVIVKKGQMGNSFYFIYLGTV	AITEDDGSSAF	LDPHPTLLHRGGS	F	GEM		
hSCNBP	126	--LLAKVMRFERFG	RRRVIIKKGQKGN	SFYFIYLGTV	AITKDEDGSSAF	LDPHPKLLHK	GSCF	GEM	
bCNGa1	485	LLVBLVLKLQPVYS	PGDYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVV	ADDG	-----ITQFVVLSDGSY	FGEI			
mHCN1	472	FVTAMLSKLRFEVFQ	PGDYIIREGAVGKKMYFIQHG	VAGVITKS	-----SKEMKLT	DGSYFGEI			
PKA1	143	ERSDIFDAMFPVSEI	AGETVIOQCDEGDNFYVIDQ	GEMDVYVNN	-----EWATS	VGE	GGSF	GEL	
EPAC	211	VKRELAAVLLFE	PHSKAGTVLF	SQCDKGT	SWYIIWKGSVNVVTHG	-----KGLVTTL	HEGDD	FGOL	
CAP	10	TLEWFLSHCHTHKYP	SKSTLIHQEKAETLYIVKGS	VAVLIKDEEGK	---EMILSYLNQ	GDFI	GEL		

		$\beta 7$	$\beta 8$	αB	αC	
mSCNBP		GLLSTTV	-----RSATVVCMEETEFLVVDREDFVANKL	GDEVQKETQYRYNFFRNLDI	FQSWSEE	340
hSCNBP		DVLHASV	-----RRSTVVCMEETEFLVVDREDFVANKL	DQEVQKDAQYRFEFFRKMEL	FASWSE	250
bCNGa1		SILNIKSGKAGNRRTANIKSTIGYSDLFCLSKDDLME	ALTEYPD	AKGML	EKGKQILMKDGLLDI	609
mHCN1		CLLTKG	-----RRTASVRADTYCRLYSLSVDNENE	VLEEYPMMRRAFETVAIDRLDRIGKKN	S	588
PKA1		ALIYGTP	-----RAATVKAKTNVKLGIDRDSYRRILMGSTLR	RKMYE	EFLSKVSITLES	LD-- 258
EPAC		ALVNDAP	-----RAATIIILREDNCHETLRVDKQDENRI	IKDVEAKTMRLEE	-----	316
CAP		GLFEEGQ	-----ERSAWRAKTACEVAEISYKREERQLIQVNP	DILMRLSAQMARR	LQVTS	EKVG-- 132

Abb. 1.1: Aminosäuresequenzvergleich verschiedener cNMP-Bindestellen. Zum Vergleich sind die Bindestellen des SCNBP aus Maus (mSCNBP) und aus Mensch (hSCNBP), der A1-Untereinheit des CNG-Kanals aus Rinder-Sehstäbchen (bCNGA1), des HCN1-Kanals aus Maus (mHCN1), der 1. Untereinheit der Proteinkinase A (PKA1) sowie des EPACs (EPAC) und des bakteriellen CAP abgebildet (Übersicht: Kaupp & Seifert, 2002). Mit Maus-SCNBP übereinstimmende Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Grau unterlegte Aminosäuren kennzeichnen konservative Aminosäureaustausche. Zur Optimierung des Sequenzvergleichs wurden Lücken (-) eingefügt. Aminosäuren, die für die Struktur der Bindestelle oder für die Ligandenbindung wichtig sind, sind mit einem Kreis bzw. Dreieck markiert (●, ▼). Oberhalb der Sequenz sind die Sekundärstrukturelemente angegeben. β -Faltblattstrukturen sind mit $\beta 1-8$, α -helikale Abschnitte mit $\alpha A-C$ gekennzeichnet.

Die Bindestellen für zyklische Nukleotide besitzen alle ein ähnliches Grundgerüst aus α -Helices und β -Faltblattstrukturen (Weber & Steitz, 1987; Diller et al., 2001; Rehmann et al., 2003; Zagotta et al., 2003; vgl. Abb. 1.1). Ebenso sind die Aminosäuren bekannt, die für die Ausbildung der Struktur und Wechselwirkung mit dem Liganden entscheidend sind (Kaupp & Seifert, 2002). In den Bindestellen der SCNBP aus Maus und Mensch sind diese strukturbildenden Aminosäuren (Abb. 1.1, ●) - ein Set konservierter Glycin-Reste - sowie die Aminosäuren, die eine direkte Wechselwirkungen mit dem zyklischen Nukleotid eingehen (Abb. 1.1, ▼), konserviert.

1.2.1 Annotierte SCNBP-Varianten

Das Maus-SCNBP-Gen befindet sich auf Chromosom 2. In den Datenbanken (<http://www.ensembl.org>; <http://vega.sanger.ac.uk>) sind sechs Transkripte des Gens und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen annotiert (Krähling, 2006). In Abbildung 1.2 sind

die annotierten Proteine schematisch dargestellt (bezeichnet als SCNBP A bis F). Alle annotierten Transkripte kodieren für Proteine mit einer vollständigen cNMP-Bindestelle. Die annotierten Transkripte A und B sind fast identisch - im 5'-nicht-kodierenden Bereich ist das Transkript A 151 Basen länger. Für SCNBP A ist das erste ATG, für SCNBP B das zweite ATG der entsprechenden mRNA als Startkodon annotiert. Dadurch ist Variante B im N-terminalen Bereich um 117 Aminosäuren kürzer. Variante C unterscheidet sich von Variante B durch das Fehlen der Aminosäuren 55 bis 66. Für die Varianten D und E sind andere Exon-Intron-Grenzen annotiert, als für die Variante A. Dadurch besitzen die Varianten D und E einen anderen C-Terminus. Die Varianten D und E unterscheiden sich untereinander im N-terminalen Bereich; hier ist Variante E um 117 Aminosäuren kürzer als D. Die Aminosäuresequenz der Variante F stimmt nur im Bereich um die cNMP-Bindestelle mit den übrigen Varianten überein. Sie besitzt sowohl einen anderen N- als auch C-Terminus.

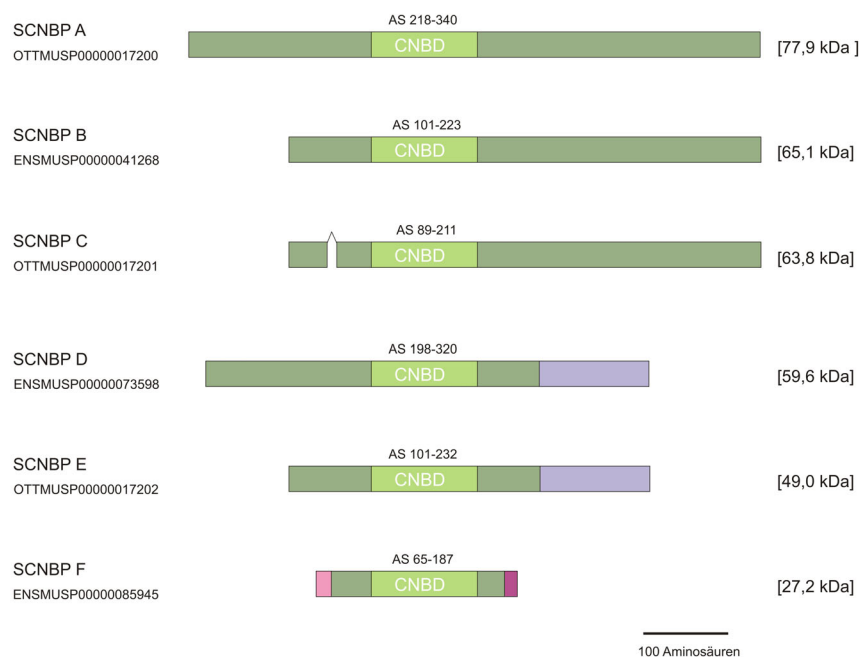


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der annotierten Maus-SCNBPs. Die sechs annotierten Protein-Varianten A bis F sind schematisch dargestellt. Die *Ensembl* bzw. *Vega Peptide-IDs* sind links, die errechnete Molmasse der annotierten Proteine ist rechts in der Abbildung angegeben. Die Sequenzbereiche der Varianten B bis F, die mit SCNBP A identisch sind, sind als grüne Balken dargestellt. Oberhalb der cNMP-Bindestelle (CNBD) sind die Aminosäurepositionen im jeweiligen Protein angegeben.

Ergebnisse aus Datenbankrecherchen und Northernblot-Analysen deuten darauf hin, dass im Maushoden die SCNBP-Varianten A und/oder B exprimiert werden (Krähling, 2006). Diese Proteine werden als mSCNBP[A] bzw. mSCNBP[B] bezeichnet.

1.2.2 Nachweis der SCNBP-mRNA in der Maus

Im Rahmen von zwei Diplomarbeiten über das Maus-SCNBP wurde in Northernblot-Experimenten gezeigt, dass die annotierte mRNA, die für die Varianten A und/oder B kodiert, in der Maus nur im Hoden vorkommt (Utzerath, 2003; Krähling, 2006). Das SCNBP scheint also ein hodenspezifisches Protein zu sein. Mittels *in situ* Hybridisierung ist es gelungen, SCNBP-mRNA im Maushoden zellulär zu lokalisieren (Krähling, 2006). Die SCNBP-mRNA wurde spezifisch in Spermatozyten nachgewiesen. Sie kam nicht in Leydig-, Sertolizellen, Spermatogonien oder Spermatiden vor.

1.3 Zielsetzung

In einer Datenbankrecherche wurde eine cDNA-Sequenz gefunden, die für ein unbekanntes Protein mit einer Bindestelle für zyklische Nukleotide kodiert. Dieses Protein (SCNBP) könnte eine neue Klasse zyklisch-Nukleotid bindender Proteine darstellen. Da das SCNBP-Gen in verschiedenen Spezies vom marinen Invertebraten bis zum Menschen während der Evolution konserviert geblieben ist, muss es sich um eine funktionell wichtige Proteinfamilie handeln. Mittels *in situ* Hybridisierung wurde SCNBP-mRNA im Maushoden spezifisch in Spermatozyten nachgewiesen (Krähling, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das SCNBP mit Hilfe spezifischer Antikörper im Maushoden nachgewiesen werden. Um Hinweise auf die physiologische Funktion des Proteins zu erhalten, sollten mittels Immunpräzipitation und anschließender Massenspektrometrie Interaktionspartner identifiziert werden. Desweiteren sollte das Protein für eine biochemische Charakterisierung heterolog exprimiert werden. Hierzu musste ein geeignetes System etabliert werden, welches die Expression des Proteins in großen Mengen und eine anschließende Reinigung des Proteins ermöglicht.

2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, aus Sambrook et al. (1989) entnommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1 Material

Es wurden Chemikalien in p.A. Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Amersham Biosciences (Freiburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Millipore (Hampshire, UK), MWG-Biotech (Ebersberg), Pierce (Rockford, USA), Riedel-de Haën AG (Seelze), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und USB (Bad Homburg) bezogen. Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Amersham Biosciences (Freiburg), NEB (Schwalbach) und Roche (Mannheim) geliefert. Für die Erhaltung und Vermehrung von Bakterienkulturen wurden Medien von der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet. Proteine wurden auf die PVDF-Membran Immobilon P der Firma Millipore (Eschborn) transferiert. Für die Chemilumineszenz wurden ECL Hyperfilme von Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet. Die Peptide, die zur Herstellung der monoklonalen Antikörper verwendet wurden, wurden von der „Peptide Speciality Laboratories GmbH“ (Heidelberg) hergestellt.

Alle Lösungen wurden ausschließlich mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Soweit erforderlich, wurden die Lösungen durch Autoklavieren (20 min; 121 °C) sterilisiert.

2.2 *E.coli*-Zellkultur

2.2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmidvektoren

In dieser Arbeit wurde der Stamm *Escherichia coli* K12, XL1-Blue (Bullock et al., 1987) (recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rK-, mK+), supE44, relA1, lac [F' proAB, lacIqZΔ M15, Tn10 (Tetr)]) zur Anreicherung von Plasmid-DNA verwendet.

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmidvektoren benutzt:

pBluescript SK⁻

(Short et al., 1988; Stratagene) Dieses Plasmid wurde als Vektor für die Klonierung rekombinanter DNA und zur Sequenzierung verwendet.

pBluescript SK⁻ extendet

Das Plasmid pBluescript SK⁻ (Short et al., 1988; Stratagene) wurde von Dr. W. Bönigk (INB-1; FZJ) so modifiziert, dass die multiple Klonierungsstelle (Multiple Cloning Site, MCS) zusätzlich jeweils eine NdeI-, NsiI- und NcoI-Schnittstelle, sowie zwei SfiI-Schnittstellen beinhaltet. Dieses Plasmid wurde als Vektor für die Klonierung rekombinanter DNA und zur Sequenzierung verwendet.

pcDNA3.1(+) (Invitrogen)

Dieses Plasmid wurde zur transienten und stabilen Genexpression in HEK 293-Zellen verwendet.

2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für *E.coli*

LB (Luria-Bertani)-Medium

1 % (w/v) Baktotrypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) NaCl

Für LB-Agar-Platten wurden 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Die Flüssigmedien wurden in Portionen aufgeteilt, autoklaviert (20 min; 121 °C) und bei RT gelagert. Agar enthaltende Medien wurden autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen (25 - 30 ml/Platte). Bei Bedarf wurde Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) kurz vor dem Gießen der Platten in den höchstens noch 60 °C heißen Agar gegeben. Die Platten wurden bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Farbidentifizierung von XL1-Blue-Bakterienkolonien mit rekombinanter DNA wurden auf LB-Agar-Platten 50 µl X-Gal (250 mg/ml) und 25 µl IPTG (120 mg/ml) ausgestrichen.

2.2.3 Anzucht von *E.coli*-Bakterienkulturen

2.2.3.1 Anzucht von *E.coli*-Zellen zur Plasmidpräparation

E.coli-Zellen einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur wurden mindestens 8 h in LB-Medium bei 37 °C in einem Rotationsinkubator (New Brunswick; Nürtingen) oder in einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel; Melsungen) inkubiert. Zur Selektion auf Plasmide wurde das Medium mit einem geeigneten Antibiotikum (2.2.2) versetzt.

2.2.3.2 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA

Kompetente Zellen wurden mit einer modifizierten Form der CaCl_2 -Methode nach Mandel & Higa (1970) hergestellt. 0,5 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur (ÜK) wurden in 50 ml LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,4 inkubiert und 10 min bis 2 h auf Eis abgekühlt. Bei den folgenden Arbeitsschritten wurden die Zellen immer auf Eis gehalten und ausschließlich vorgekühlte Gefäße und Lösungen verwendet.

Die Zellen wurden 10 min zentrifugiert (5.000 x g; 4 °C), das Pellet wurde vorsichtig in 1 ml 0,1 M CaCl_2 resuspendiert und der Ansatz mit 0,1 M CaCl_2 auf 25 ml aufgefüllt. Nach zweistündiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 1 ml 0,1 M CaCl_2 /25 % (v/v) Glycerol resuspendiert und der Ansatz wurde auf 5 ml aufgefüllt. Nach weiteren 2 h auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen auf Eis aufgetaut.

2.3 Plasmid-DNA-Präparationen aus Bakterien

DNA wurde grundsätzlich in TE bzw. TE_{RNase} aufgenommen:

TE: 1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl, pH 7,5-8,0

TE_{RNase} : TE mit 5 µl/ml RNase-Cocktail (Ambion)

2.3.1 Mini-Präparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)

Für die Präparation wurden die Bakterienzellen aus 2 ml einer ÜK durch Zentrifugation (12.000 x g; 1 min; RT) pelletiert und in 100 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 120 µl Lösung II und vorsichtigem Mischen (Invertieren) lysieren die Zellen, wobei die chromosomale DNA an der Zellwand gebunden bleibt. Zur Präzipitation der Zelltrümmer und Proteine wurden 150 µl Lösung III zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 bis 30 min zentrifugiert (12.000 x g; 4 °C). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 500 µl Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Nach Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 20 µl TE aufgenommen.

War die DNA zur Sequenzierung (2.7) bestimmt, musste sie von RNA-Molekülen befreit werden, da Verunreinigungen durch RNA die Sequenzierreaktionen negativ beeinflussen. Dazu wurde die DNA wie oben beschrieben präpariert. Das Pellet wurde in 100 µl TERNase aufgenommen und 10 bis 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit Phenol extrahiert (2.4.1). Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl 3 M NaAc pH 4,8 und 300 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Nach Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 20 µl TE aufgenommen.

Lösung I

25 mM Tris/HCl pH 7,5

10 mM EDTA

Lösung II

0,2 M NaOH

1 % (w/v) SDS

Lösung III

3 M KAc pH 4,8

2.3.2 Alkalische Maxi- und Mega-Präparationen

Größere DNA-Mengen wurden mittels der LiCl-Plasmidpräparation isoliert. Für eine Maxi-Präparation wurden die Bakterienzellen aus einer 250 ml ÜK pelletiert (5.000 x g; 10 min; 4 °C), in 10 ml Lösung I (2.3.1) resuspendiert und mit 12 ml Lösung II (2.3.1) lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden durch Zugabe von 15 ml Lösung III (2.3.1) gefällt und pelletiert (5.000 x g; 10 min; RT). Nach Filtration wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt, zentrifugiert (5.000 x g; 10 min; 4 °C) und die Nukleinsäuren wurden in 1,45 ml H₂O und 50 µl Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Durch Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl wurde die RNA gefällt und pelletiert (5.000 x g; 5 min; 4 °C).

Der Überstand wurde abgenommen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 12 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (5.000 x g; 15 min; 4 °C) wurde das Pellet in 500 µl TE_{RNase} resuspendiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Phenol-Extraktion (2.4.1) und Ethanol-Präzipitation (2.4.2) gereinigt. Das Pellet wurde getrocknet und in 250 µl TE aufgenommen.

Mega-Präparationen wurden aus 500 ml Bakterienkulturen angefertigt. Die Volumina der oben angegebenen Lösungen wurden entsprechend angepasst.

2.4 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren

2.4.1 Phenol/Chloroformextraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen mit Proteinen, Membranbestandteilen etc., die in organischen Lösungsmitteln löslich sind, wurden durch Phenol/Chloroformextraktion entfernt. Die DNA-Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt, die Phasen gut gemischt und zur Trennung zentrifugiert (15.000 x g; 3 min; RT). Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert (2.4.2).

2.4.2 Ethanol-Präzipitation

Um DNA zu konzentrieren oder umzupuffern, kann sie durch Einstellung definierter Salz- und Alkoholkonzentrationen präzipitiert werden. Die DNA-Lösung wurde auf eine NaAc-Konzentration von 0,3 M (pH 4,8) eingestellt und mit dem 2,5 - 3fachen Volumen absoluten Ethanol versetzt, kurz gemischt und 5 - 30 min bei -20 °C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (18.000 x g; 4 °C) pelletiert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach der Größe und Konzentration der DNA. Je kleiner und je geringer konzentriert die DNA war, desto länger wurde zentrifugiert (30 - 120 min). Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE aufgenommen.

2.4.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.4.3.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Agarose-Gelen

Die Menge an DNA, die auf ein Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (2.4.4) aufgetragen wurde, konnte durch Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen Größen- und Mengenstandard (2.4.5) anhand der Fluoreszenz-Intensitäten der Banden unter UV-Licht abgeschätzt werden.

2.4.3.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die DNA in TE verdünnt und die Absorption bei 260 nm gegen TE gemessen. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht 50 µg DNA/ml oder 33 µg Oligonukleotiden/ml. Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten konnten durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm beurteilt werden. Er sollte nicht kleiner als 1,8 sein. Chromosomale DNA, RNA und Nukleotide sind bei dieser Methode nicht von Plasmid-DNA zu unterscheiden.

2.4.4 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Für Trennungen im Bereich von 500 - 10.000 Bp wurden 0,75 - 1 % (w/v) Agarose-Gele verwendet.

Die Agarose wurde in 1x TAE aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf 60 °C wurde die Gellösung mit 1 µg Ethidiumbromid/ml versetzt und in einen Gelträger mit einem Former für die Probenaschen gegossen. Nach dem Erkalten wurden die Proben, die zuvor mit 1/10 Volumen Farbmaler versetzt worden waren, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE als Laufpuffer bei 90 – 120 V bis zur ausreichenden Trennung der Nukleinsäuren durchgeführt. Diese konnten durch die Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

TAE (50x)

2 M Tris/Acetat pH 7,5

50 mM EDTA

Farbmarker (10x)

10x TAE

50 % (v/v) Glyzerol

0,25 % (w/v) Xylencyanol

2.4.5 DNA-Größen- und Mengenstandard

Als DNA-Größenstandard für Agarosegele diene EcoRI/HindIII geschnittene λ (cl857 Sam 7)-DNA (MBI Fermentas; Vilnius, Litauen). Die Fragmentgrößen und DNA-Mengen/10 μ l betrugen: 21.226 Bp ($\approx$ 292 ng), 5.184 Bp ($\approx$ 71 ng), 4.973 Bp ($\approx$ 6 ng), 4.268 Bp ($\approx$ 59 ng), 3.530 Bp ($\approx$ 49 ng), 2.027 Bp ($\approx$ 28 ng), 1.904 Bp ($\approx$ 27 ng), 1.584 Bp ($\approx$ 24 ng), 1.375 Bp ($\approx$ 19 ng), 947 Bp ($\approx$ 13 ng), 831 Bp ($\approx$ 11 ng), 564 Bp ($\approx$ 8 ng), 125 Bp ($\approx$ 2 ng).

2.4.6 Elution von DNA aus Agarose-Gelen mit der Zentrifugationsmethode

Bei der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mit der Zentrifugationsmethode (Heery et al., 1990) wurde der Deckel eines Eppendorfreaktionsgefäßes entfernt, der Boden mit einer Kanüle durchstoßen und das Eppendorfreaktionsgefäß mit silanisierter Glaswatte gefüllt. Das ausgeschnittene Agarosestück wurde auf die Glaswatte gelegt. Das Reaktionsgefäß wurde in ein zweites Gefäß gesetzt und in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert (7.000 x g; 10 min; RT). Das Eluat enthielt das DNA-Fragment.

2.5 Manipulation von Nukleinsäuren**2.5.1 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Zum Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die Ansätze in 1x Inkubationspuffer (vom Hersteller mitgeliefert) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) inkubiert. Inkubationen mit mehreren Enzymen wurden bei

übereinstimmenden Pufferbedingungen gleichzeitig durchgeführt. Wenn dies nicht möglich war, wurden zwischen den Inkubationen durch Zugabe der entsprechenden Salze die neuen Puffer-Bedingungen eingestellt, nach Ethanol-Präzipitation (2.4.2) umgepuffert oder das benötigte Restriktionsfragment aus einem präparativen Agarose-Gel eluiert (2.4.4, 2.4.6). Zum Schneiden wurden 3-5 U Enzym/ μg Plasmid-DNA eingesetzt. Das Volumen eingesetzter Nukleasen sollte dabei 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da das Glycerol im Aufbewahrungspuffer der Enzyme inhibitorische Wirkung hat. Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA, die durch alkalische Mini-Präparation isoliert worden war, wurden zusätzlich mit RNase-Cocktail (Ambion) versetzt. Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 15 μl durchgeführt und, wenn nicht anders vermerkt, nach 2 h Inkubation auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Das Volumen für präparative Ansätze betrug 20 - 100 μl und wurde vollständig auf das Gel aufgetragen.

2.5.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.5.2.1 Ligation

Zur Ligation wurden ca. 50 ng geschnittener Vektor und ein 3 - 5facher molarer Überschuss an Fragment in 1x Ligasepuffer gemischt. Ligiert wurde mit 0,5 μl 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) 30 min bei 22 °C bzw. ü.N. bei 16 °C. Das Reaktionsvolumen betrug 10 - 20 μl .

Ligase-Puffer (10x)

600 mM Tris/HCl pH 7,5

50 mM MgCl_2

10 mM DTE

10 mM ATP

2.5.2.2 Transformation in Bakterien

Zum Ligationsansatz (2.5.2.1) wurden 50 μl kompetente Zellen (2.2.3.2) gegeben, vorsichtig gemischt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min bei 42 °C („Hitzeimpuls“) und

10 - 15 min auf Eis wurden 200 µl LB-Medium zugegeben und es wurde 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Regenerationszeit, die der Ausprägung der Antibiotika-Resistenz dient, wurden die Zellen auf LB-Agar (100 µg Ampicillin/ml) ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

Die so genannte „Retransformation“ eignet sich, um Plasmid-DNA erneut von Bakterien amplifizieren zu lassen. Dazu wurden 0,5 - 1 µl Plasmid-DNA mit 30 - 50 µl der kompetenten Zellen versetzt und 5 - 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf LB-Agar mit Antibiotikum ausplattiert.

2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Fragmente spezifischer Sequenz amplifiziert werden. In mehreren Zyklen wird die Matrizen-DNA hitzedenaturiert, mit geeigneten Oligonukleotiden („Primern“) hybridisiert und diese mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase verlängert (Mullis et al., 1986). Das PCR-Fragment kann über Schnittstellen in einen Vektor kloniert werden (2.5.2.1).

Oligonukleotide („Primer“) wurden von der Firma Operon (Köln) bezogen. Die Sequenzen und Hybridisierungsbereiche aller verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt (6.2).

2.6.1 Bedingungen für die PCR-Reaktionen

Die Reaktionen wurden in einem „DNA Thermal Cycler“ (Perkin Elmer) oder in einem „TRIO-Thermoblock“ (Biometra) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94 °C denaturiert. Während der Zyklen wurde je 25 - 35 sek denaturiert und hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur entsprach der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) der Primer. Sie wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$T_m = (G/C) \times 4 \text{ °C} + (A/T) \times 2 \text{ °C} - (\text{Basenfehlpaarung}) \times 4 \text{ °C} - 4 \text{ °C}$$

Zur Strangverlängerung wurde bei 72 °C inkubiert. Die Zeitspanne richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und betrug dabei ca. 20 sek/1 kBp. Es wurden

25 - 40 Zyklen durchgeführt. Es wurde die KOD Hot Start Polymerase (Novagen) mit dem Puffer des Herstellers verwendet.

Ein 100 µl PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

1 - 10 ng	Plasmid-DNA
je 120 ng	Primer
10 µl	10 x PCR-Puffer
10 µl	2 mM dNTP
4 µl	25 mM MgSO ₄
2 U	KOD Hot Start Polymerase

2.6.2 Reinigung der PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden durch Phenol/Chloroformextraktion (2.4.1) und Ethanol-Präzipitation (2.4.2) gereinigt. Waren Nebenprodukte vorhanden oder sollten die PCR-Produkte in Plasmidvektoren subkloniert werden, wurde die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.4.4) und die Fragmente der gewünschten Größe wurden eluiert (2.4.6).

2.7 DNA-Sequenzierung mit LI-COR DNA-Sequenzierer

Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Die DNA-Markierung erfolgte durch eine PCR (2.6) mit IRD700- bzw. IRD800-Fluorophor-markierten Primern (6.2). Die Fragmente wurden in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen im „LI-COR DNA Sequencer Long ReadIR 4300“ (MWG-Biotech) aufgetrennt. Zur Sequenzauswertung wurden die Software des Geräteherstellers sowie die Programme PCGene und PCSupp (Dr. W. Bönigk, INB-1, FZJ) eingesetzt.

2.7.1 Sequenzierreaktion

Es wurde das „Thermo Sequenase Kit“ von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Pro kbp der zu sequenzierenden DNA wurden ca. 65 ng DNA eingesetzt. Vom IRD700- bzw. IRD800-Fluorophor-markierten Primer (0,5 - 2 pmol/ μ l) wurden 0,8 μ l hinzu gegeben und der Ansatz anschließend mit H₂O auf ein Volumen von 7 μ l aufgefüllt. Je 1,5 μ l des Ansatzes wurden in vier PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Je 0,5 μ l der vier Terminationsmixe wurden mit dem gleichen Volumen H₂O verdünnt und zu je einem der vier 1,5 μ l-Aliquots gegeben. Die Ansätze wurden mit 20 μ l „Chill-out 14 Liquid Wax“ (MJ Research) überschichtet und zur PCR (2.7.2) eingesetzt.

2.7.2 PCR zur Sequenzierung

Die Reaktionen wurden in einem „TRIO-Thermoblock“ (Biometra) oder in einem „DNA Thermal Cycler“ (Perkin Elmer) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94 °C denaturiert. Während der Zyklen wurde 40 sek denaturiert. Die Hybridisierung der Primer erfolgte bei 50 °C für 40 sek. Zur Strangverlängerung wurde bei 70 °C für 1 min inkubiert. Es wurden 30 - 40 Zyklen durchgeführt.

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 3 μ l Stopppuffer abgebrochen. Es wurde der Stopppuffer des Herstellers verwendet. 1,8 μ l der Proben wurden auf ein Sequenziergel (2.7.3) aufgetragen.

2.7.3 Denaturierende Polyacrylamid-Sequenziergele

Zwei 66 cm lange Glasplatten wurden gründlich mit H₂O und Ethanol gereinigt. Sie wurden durch 0,25 mm starke Abstandhalter getrennt und mit Schraubschienen zusammengedrückt. Die 4,6 %ige Gellösung wurde im Vakuum oder durch Sonifizieren entgast und mit 350 μ l 10 % (w/v) APS und 50 μ l TEMED versetzt. Die Gellösung wurde in eine 60 ml-Spritze gefüllt und luftblasenfrei durch einen Sterilfilter zwischen die Glasplatten gegossen. Ein Teflonkamm wurde in das Gel gedrückt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach 1 - 1,5 h war die Polymerisation des Acrylamids abgeschlossen. Nachdem das Gel in die Kammer

eingespannt war, wurde 1 x TBE eingefüllt. Die Probestaschen wurden von einem „Haifischzahn“-Kamm gebildet, der leicht in die Geloberfläche eingedrückt wurde.

Die Elektrophorese wurde mit 1 x TBE als Laufpuffer bei 45 W und 45 °C durchgeführt. Nach einem 30minütigen Vorlauf wurden die Proben aufgetragen. Die Gelelektrophorese dauerte 20 h. Die Leseweiten betrugen zwischen 600 und 1.200 Bp.

<u>10 x TBE</u>	<u>4,6 % Gellösung</u>
1,34 M Tris	21 g Harnstoff
450 mM Borsäure	5 ml 10 x TBE
25 mM EDTA	0,5 ml DMSO
pH 8,3 - 8,7 (bei 50 °C)	5,6 ml Rapid Gel XL (USB)
	30,5 ml H ₂ O

2.8 Heterologe Genexpression in Säugetierzellen

HEK 293-Zellen

In dieser Arbeit wurden HEK (*human embryonic kidney*) 293-Zellen (Invitrogen) verwendet.

CHO-Zellen:

In dieser Arbeit wurden CHO (*chinese hamster ovary*)-K1-Zellen (ECACC) verwendet.

2.8.1 Kulturbedingungen für HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen wurden in M10-Medium bei 37 °C, 5% CO₂ und ~95% Luftfeuchtigkeit in Petrischalen (Ø 5 cm) kultiviert. Das M10-Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die Generationszeit der Zellen betrug etwa 24 h. Bei ca. 90%iger Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt.

Dazu wurden die Zellen zunächst mit 3 ml PBS gewaschen und dann mit 300 µl Trypsin/EDTA abgelöst (~ 5 min bei 37 °C). Die Zellen wurden in 5 ml M10-Medium resuspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte der Suspension bestimmt. Für die Erhaltung wurden 2 - 4 x 10⁵ Zellen auf Ø 5 cm-Schalen mit frischem M10-Medium

ausgesät. Für die Transfektion wurden 2×10^5 Zellen auf $\varnothing$ 5 cm-Schalen oder 9×10^5 Zellen auf $\varnothing$ 9 cm-Schalen ausplattiert. Nach 30 Passagen wurden die Zellen verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen für die Aussaat vorbereitet.

Für die Langzeitlagerung wurden Zellen geerntet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase (60 - 70% Konfluenz) befanden, und zu $\sim 2 \times 10^6$ Zellen/ml M10-Medium mit 10% (v/v) DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei Bedarf wurden die Zellen schnell bei 37 °C aufgetaut, vorsichtig zu 10 ml M10 Medium (vorgewärmt) in die Schalen pipettiert und im Brutschrank inkubiert.

M10-Medium

MEM (GlutaMAX, Invitrogen)

10% (v/v) FCS (Gibco/BRL)

2 mM L-Glutamin (Gibco/BRL)

1% Penicillin/Streptomycin (Gibco/BRL)

1% nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco/BRL)

PBS (pH 7,4)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na_2HPO_4

1,8 mM KH_2PO_4

Trypsin/EDTA

0,05% (w/v) Trypsin

0,02% (w/v) EDTA

2.8.2 Transiente Genexpression in HEK 293-Zellen

Für die transiente Expression der Gene in HEK 293-Zellen wurde der Plasmidvektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen) verwendet, in den die entsprechende cDNA kloniert war. Die Transfektion wurde nach der CaPO_4 -Methode (Chen & Okayama, 1987) durchgeführt. Die Transfektionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

Tab. 2.1: Komponenten der CaPO_4 -Methode

	$\varnothing$ 5 cm-Schale	$\varnothing$ 9 cm-Schale
DNA	5 - 10 μg in 124 μl H_2O	15 - 30 μg in 372 μl H_2O
CaCl_2 (1 M)	41 μl	123 μl
2 x BBS (pH 6,95) ⁽¹⁾	165 μl	495 μl

⁽¹⁾ 2 x BBS (pH 6,95): 50 mM N,N'-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure (BES); 280 mM NaCl; 1,5 mM Na_2HPO_4

Die Transfektionsansätze wurden 20 min bei RT inkubiert und anschließend zu den Zellen (2.8.1) pipettiert. Die DNA wurde durch eine 20 - 22 h Inkubation bei 35 °C, 3 % CO₂ und ~95 % Luftfeuchtigkeit präzipitiert. Das Kalziumphosphat-DNA-Präzipitat wurde mit 1x PBS/EDTA (2 g EDTA/l) entfernt, die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und anschließend mit 8 ml M10-Medium 20 - 22 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und ~95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.8.3 Kulturbedingungen für adhärent wachsende CHO-Zellen

Adhärent wachsende CHO-K1-Zellen wurden in F12⁺-Medium bei 37 °C, 5% CO₂ und ~95% Luftfeuchtigkeit in Petrischalen (Ø 5 cm) kultiviert. Das F12⁺-Medium in den Schalen wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Die Generationszeit der Zellen betrug etwa 24 h. Bei ca. 60%iger Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt.

Dazu wurden die Zellen einer Schale zunächst mit 3 ml PBS (2.8.1) gewaschen und dann durch Zugabe von 300 µl Trypsin/EDTA (2.8.1) (~5 min bei 37 °C) abgelöst. Die Zellen wurden in 5 ml F12⁺-Medium resuspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte der Suspension bestimmt. Für die Erhaltung wurden ~2 - 4 x 10⁵ Zellen auf Ø 5 cm-Schalen mit frischem F12⁺-Medium ausgesät. Für die Transfektion wurden 3,5 x 10⁶ Zellen auf Ø 5 cm-Schalen ausplattiert. Nach 30 Passagen wurden die Zellen verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen für die Aussaat vorbereitet.

Für die Langzeitlagerung wurden Zellen geerntet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase (60 - 70 % Konfluenz) befanden. ~2 x 10⁶ Zellen/ml F12⁺-Medium wurden mit 10% (v/v) DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei Bedarf wurden die Zellen schnell bei 37 °C aufgetaut, vorsichtig zu 10 ml F12⁺-Medium (vorgewärmt) in die Schalen pipettiert und im Brutschrank inkubiert.

F12⁺-Medium

F12 (GlutaMAX, Invitrogen)

10% (v/v) FCS (Gibco/BRL)

1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Gibco/BRL)

2.8.4 Stabile Expression von mSCNBP[A]His₁₀ in CHO-Zellen

Für die transiente und stabile Expression der Gene in CHO-Zellen wurde der Plasmidvektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen) verwendet, in den die cDNA kloniert war. Die Transfektion wurde mit Lipofectamine LTX (Invitrogen) durchgeführt. 5 µg Plasmid-DNA wurden in 750 µl Opti-MEM I-Medium (GlutaMAX, Invitrogen) verdünnt. 12,5 µl Lipofectamine LTX wurden hinzupipettiert und es wurde sorgfältig gemischt. Der Transfektionsansatz wurde 30 min bei RT inkubiert und anschließend zu den Zellen (2.8.3) pipettiert. Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und ~95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Sie wurden dann mit PBS (2.8.1) gewaschen und mit 300 µl Trypsin/EDTA (2.8.1) vom Schalenboden gelöst (~5 min bei 37 °C). Die Zellen wurden in 4,7 ml F12⁺-Medium (2.8.3) resuspendiert und in unterschiedlichen Verdünnungen auf Ø 9 cm-Schalen verteilt. Transfizierte CHO-Zellen wurden mit dem Antibiotikum G418 (1 mg/ml) selektioniert. Isolierte Kolonien wurden vermehrt, die zytosolischen Proteine isoliert (2.9.1, 2.9.3) und im Westernblot (2.12) auf die Expression des Proteins mSCNBP[A]His₁₀ untersucht. Zellen, die dieses Protein konstitutiv exprimierten, wurden als mSCNBP[A]His₁₀-Zellen bezeichnet. Adhärent wachsende mSCNBP[A]His₁₀-Zellen wurden wie unter 2.8.3 beschrieben in F12⁺-Medium mit 0,8 mg/ml G418 kultiviert.

Für die immunzytochemische Färbung wurde je eine Schale mSCNBP[A]His₁₀-Zellen mit PBS (2.8.1) gewaschen, mit 300 µl Trypsin/EDTA (2.8.1) bei 37 °C abgelöst und in 5 ml F12⁺-Medium resuspendiert. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte der Suspension bestimmt und 0,65 - 4,00 x 10⁴ Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtete Glas-Plättchen in 24-Multiwellplatten pipettiert. Die Plättchen waren zuvor in den Multiwellplatten mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml, >1 h) inkubiert, zweimal mit PBS (2.8.1) gewaschen und dann mit F12⁺-Medium (mit 0,8 mg/ml G418) überschichtet worden. Die Zellen wurden 20 - 48 h bei 37 °C, 5% CO₂ und ~95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.8.5 Fermentation von CHO-Zellen

2.8.5.1 Adaptation von CHO-Zellen an Wachstum in Suspension

Adhärent wachsende mSCNBP[A]His₁₀-Zellen (2.8.4) wurden wie unter 2.8.3 beschrieben in F12⁺-Medium mit 0,8 mg/ml G418 kultiviert. Um die Zellen an ein Wachstum in Suspension

zu adaptieren, wurden sie zunächst in ProCHO4⁺-Medium (Cambrex) überführt. Hierzu wurden je $\sim 2,5 \times 10^6$ Zellen in eine Kulturflasche mit einer Kultivierungsfläche von 75 cm² ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel zu F12-Medium (2.8.3) mit 2 % (v/v) FCS und 0,8 mg/ml G418. Nach drei Passagen und bei ca. 90 % Konfluenz wurden die Zellen geerntet. Etwa 1×10^7 Zellen/ml wurden in ProCHO4⁺-Medium mit 10% (v/v) DMSO ohne G418 in einem Einfriermodul bei -80 °C aufbewahrt. Das Einfriermodul ist mit Isopropanol gefüllt und gewährleistet ein gleichmäßiges Abkühlen der Zellsuspension von 1 °C/min. Nach 24 h wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden 9 ml 4 °C-kaltes ProCHO4⁺-Medium in einem geschlossenen sterilen Gefäß vorgelegt. Die Zellen wurden aufgetaut und sofort in das vorgelegte Medium überführt. Dabei wird das zelltoxische DMSO verdünnt und die Aufnahme von DMSO durch die Zellen durch die niedrige Temperatur minimiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min; 200 x g; 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 9 ml untemperiertem (RT) ProCHO4⁺-Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine Kulturflasche überführt. Nach 24 h wurde in einer Neubauer-Zählkammer die Zelldichte und mittels Erythrosin B-Vitalfärbung die Zellviabilität der Suspension bestimmt. 9 ml der Zellsuspension wurden in ein Spinnergefäß überführt (2.8.5.2).

ProCHO4⁺

ProCHO4 CDM (Cambrex)

4,11 mM L-Glutamin

20 mM NaHCO₃

7,6 mg/l Thymidin

13,6 mg/l Hypoxanthin

330 mg/l G418

2.8.5.2 Kulturbedingungen für CHO-Zellen im Spinnergefäß

Spinnergefäße

Ein Spinnergefäß ist eine Glasflasche, in deren Mitte sich ein frei aufgehängter Glasklöppel mit Magnetkern befindet, so dass die Kultur durch einen Magnetrührer ständig durchmischt werden kann. Der Gasaustausch mit der Umgebung erfolgt passiv durch Sterilfilter, die am

Deckel des Spinnergefäßes angebracht sind. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung und Durchmischung aller Zellen zu gewährleisten, sollte das Kulturvolumen 40 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Zum Befüllen, zum Entnehmen von Proben und zum Mediumwechsel besitzt das Spinnergefäß seitlich zwei weitere Öffnungen.

Kultivierung von CHO-Zellen im Spinnergefäß

Im Spinnergefäß wurden mSCNBP[A]His₁₀-Zellen (2.8.4) in ProCHO⁴⁺-Medium (2.8.5.1) bei 37 °C, 5% CO₂ und ~95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Spinnergefäß hatte ein Volumen von 500 ml, das Kulturvolumen betrug maximal 200 ml.

Zur Inokulation der ersten Spinnerkultur wurden 9 ml Zellsuspension (2.8.5.1) mit ProCHO⁴⁺-Medium auf eine Zelldichte von $\sim 1,5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Jedes Mal, wenn die Kultur eine Zelldichte von $1 - 1,5 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht hatte, wurde die Zellsuspension mit frischem ProCHO⁴⁺-Medium auf eine Zelldichte von $1 - 1,5 \times 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Die Generationszeit der Zellen betrug etwa 24 h. Eine Spinnerkultur wurde nicht länger als 2 - 3 Monate betrieben. Nach dieser Zeit wurde eine frische Spinnerkultur inokuliert (s.u.).

Für die Langzeitlagerung von CHO-Zellen, die an ein Wachstum in Suspension adaptiert sind, wurden nach der Inokulation der ersten Spinnerkultur (s.o) bei einer Zelldichte von $\sim 1 \times 10^6$ Zellen/ml (exponentielle Wachstumsphase) Aliquots zu $\sim 1 \times 10^7$ Zellen/ml in ProCHO⁴⁺-Medium mit 10% (v/v) DMSO ohne G418 in einem Einfriermodul bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h wurden diese Zellen in einen Stickstofftank überführt. Diese Zellen dienten als *master cell bank* (MCB). Mit diesen Zellen wurde eine neue Spinnerkultur inokuliert und analog zur MCB wurde eine *working cell bank* (WCB) angelegt. Als Inokulum für jede neue Kultur wurden Zellen aus der WCB aufgetaut. Eine MCB dient ausschließlich der Generierung neuer WCBs und u.U. der Herstellung modifizierter Zelllinien.

2.8.5.3 Kulturbedingungen für CHO-Zellen im Bioreaktor

Für die Gewinnung größerer Proteinmengen wurden Suspensionskulturen von mSCNBP[A]His₁₀-Zellen (2.8.4) in einem Rührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1,2 l durchgeführt.

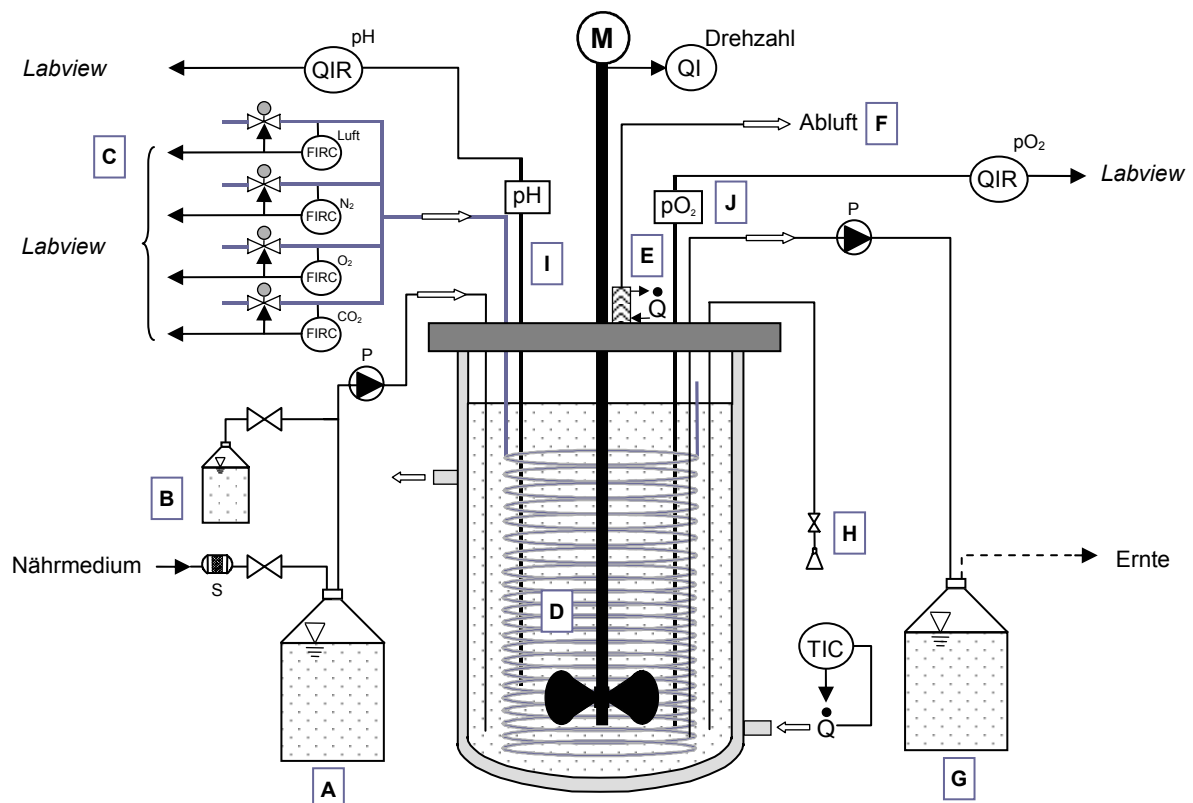


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der verwendeten Prozessanlage. Begriffe der Regelungstechnik: F, Durchfluss / Durchsatz; I, Anzeige; R, Registrierung; C, selbsttätige Regelung; T, Temperatur. Weitere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

Der Bioreaktor (s. Abb. 2.1) wurde über einen Doppelmantel mittels eines externen Wasserbades (G) auf 37 °C temperiert. Die Zellsuspension im Reaktor wurde von einem Propellerrührer durchmischt, der über einen Elektromotor (M) auf 200 rpm angetrieben wurde. Um eine optimale Verteilung und Durchmischung zu gewährleisten, erfolgte die Medienzugabe [A] dicht am Propellerrührer. Die Medienflasche konnte während des Prozesses über einen Medienfilter (S) steril befüllt werden. Zum Inokulieren des Reaktors wurde Zellsuspension über die Inokulumflasche [B] zugeführt. Zur Aufarbeitung der Zellen erfolgte die Entnahme von Zellsuspension aus dem unteren Teil des Reaktors über den Bodenablauf [G]. Zu- und Abläufe wurden über manuell gesteuerte Pumpen (P) gesteuert. Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität erfolgte die Probennahme von Zellsuspension über ein Probennahmeventil [H].

Die Kultur wurde über sog. Massflow-Ventile [C] begast. Das Gasgemisch (Luft, O₂, N₂, und CO₂) gelangt über einen Sterilfilter in den Begasungsschlauch [D] des Reaktors. Die Gase diffundieren blasenfrei in das Medium und werden durch die vom Propellerrührer erzeugte Strömung verteilt. Der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) wurden mittels einer pH-Elektrode [I] bzw. einer pO₂-Elektrode [J] gemessen und über das Prozessleitsystem *Labview* angezeigt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde automatisch von dem Prozessleitsystem über die Öffnung des O₂-Ventiles geregelt. Der Begasungsvolumenstrom wurde automatisch von dem Prozessleitsystem über die Öffnung des N₂-Ventiles konstant gehalten.

Kultivierung von CHO-Zellen im Bioreaktor

Zur Sterilisation wurde der Bioreaktor autoklaviert (3 h, 121 °C). Vor Beginn der eigentlichen Fermentation wurde die Sterilität überprüft: Der Reaktor wurde für mindestens 72 h nur mit Medium betrieben.

Der Reaktor wurde im *repeated Batch* betrieben (wiederholter Satzreaktor). Das Kulturvolumen betrug 1095 - 1300 ml. 1000 ml ProCHO4⁺⁺-Medium wurden mit 95 ml Zellsuspension (2.8.5.2) inokuliert, die eine Zelldichte von $2,4 \times 10^6$ Zellen/ml hatte. Der Begasungsvolumenstrom betrug konstant 5 l/h, der relative pO₂ ~40 % Luftsättigung. Der pH-Wert wurde nicht geregelt und lag zwischen 7,5 und 6,8. Mit sinkendem pH-Wert wurde die Menge an zugeführtem CO₂ schrittweise von 0,5 l/h auf 0 l/h reduziert.

Die Zelldichte und Zellviabilität wurden täglich bestimmt. Hierzu wurden über das Probennahmeventil 5 ml Zellsuspension entnommen. Um zu gewährleisten, dass der Schlauch zum Probennahmeventil mit frischer Zellsuspension befüllt war, wurden vor der eigentlichen Probennahme 10 ml Zellsuspension entnommen und verworfen. 500 µl wurden zur Bestimmung der Zelldichte und Zellviabilität mit dem „Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer“ (Beckmann Coulter) eingesetzt. Der Reaktor wurde alle 72 - 96 h abgeerntet, indem die Zellsuspension über den Bodenablauf abgelassen wurde. Dabei wurde ein Restvolumen von 100 - 150 ml Zellsuspension im Reaktor belassen und neues Medium bis zu einem Volumen von ~ 1250 ml zugeführt.

ProCHO4⁺⁺

ProCHO4 CDM (Cambrex)

8,22 mM L-Glutamin

20 mM NaHCO₃

7,6 mg/l Thymidin

13,6 mg/l Hypoxanthin

4,0 g/l Glukose

2.9 Präparation von Proteinen**2.9.1 Zellernte adhärent wachsender HEK 293- und CHO-Zellen**

Für Westernblot-Analysen (2.12) und Immunpräzipitations-Experimente (2.13.1) wurden Proteine aus transfizierten HEK 293- bzw. CHO-Zellen isoliert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen einmal mit PBS (2.8.1) gewaschen. Die Zellen einer Schale wurden mit ~ 1 ml PBS überschichtet, mit einem Zellschaber abgelöst und zentrifugiert (200 x g; 5 min; RT). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet entweder direkt zur Proteinpräparation (2.9.3) eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

2.9.2 Präparation von Mausgewebe

Geschlechtsreife männliche Mäuse (Stamm: C57Bl/6 oder 129/SV) wurden mit Isofluran narkotisiert und dekapitiert. Hoden und Nebenhoden wurden aus dem hinteren Teil der Bauchhöhle am Anus freipräpariert. Für Westernblot-Analysen (2.12) und Immunpräzipitations-Experimente (2.13.1) wurden Proteine aus dem gesamten Maushoden, aus isolierten Keimzellen oder aus Nebenhodenspermien präpariert.

2.9.2.1 Anreicherung von Keimzellen aus Maushoden

Die Methode zur Dissoziation von Hodenzellen wurde modifiziert nach Bellvé et al. (1977). Zunächst wurde die Tunika Albuginea entfernt und das Hodengewebe eines Hodens in 1 ml PBS⁺/Collagenase Typ IA (1 mg/ml, Sigma) 30 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Die Samenkanäle bleiben hierbei intakt, die Basalmembran wird verdaut und die interstitiellen Zellen dissoziieren. Durch dreimaliges Waschen der Samenkanäle mit PBS⁺ wurden die interstitiellen Zellen entfernt. Die Samenkanäle wurden nachfolgend in 1 ml PBS⁺/Trypsin Typ XIII (0,5 mg/ml, Sigma)/DNaseI (5 µg/ml) 30 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Trypsin dissoziiert die Keimzellen in den Samenkanälen. DNase baut die aus lysierten Zellen austretende DNA ab und verhindert so das Aggregieren von Keimzellen. Um die Keimzellen aus den Samenkanälen zu spülen, wurden die Samenkanäle durch Auf- und Abpipettieren mechanisch zerbrochen. Um die Bruchstücke der Samenkanäle von den ausgespülten Keimzellen zu trennen, wurde die Suspension durch ein Nylonnetz (100 µm Maschenweite) filtriert. Die Zellen wurden pelletiert (5000 x g; 10 min; 4 °C) und zur Proteinpräparation eingesetzt (2.9.3).

PBS⁺ (pH 7,4)

10 mM Na₂HPO₄

1,8 mM KH₂PO₄

150 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM MgSO₄

1,3 mM CaCl₂

30 mM Glukose

2.9.2.2 Präparation von Nebenhodenspermien der Maus

Je zwei Nebenhoden wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in 1 ml Elutionspuffer aufgenommen und mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten. Durch Invertieren (30 min - 1 h bei RT) wurden die Spermien aus den Nebenhoden gespült. Anschließend wurden die zerschnittenen Nebenhoden für ca. 2 min bei RT sedimentiert. Der Überstand mit

den ausgespülten Nebenhodenspermien wurde vorsichtig abpipettiert und die Spermien zur Proteinpräparation (2.9.3) eingesetzt.

Elutionspuffer (pH 7,4)

20 mM HEPES

135 mM NaCl

5 mM KCl

1 mM MgSO₄

2 mM CaCl₂

10 mM Na-Lactat

1 mM Na-Pyruvat

5 mM Glukose

2.9.3 Proteinpräparation

Für die Präparation von Proteinen wurde das entsprechende Gewebe oder Zellpellet zum Zellaufschluss zunächst in hypotonem Puffer A homogenisiert bzw. resuspendiert. In Tabelle 2.2 sind die verschiedenen Ausgangsmaterialien zur Proteinpräparation und die entsprechenden Volumina Puffer A aufgelistet.

Tab. 2.2: Ausgangsmaterialien zu Proteinpräparation und zugehörige Volumina Aufschlusspuffer.

Ausgangsmaterial	Volumen Puffer A
Zellpellet Ø 9 cm-Schale	500 µl
Zellpellet Ø 5 cm-Schale	200 µl
Ein Maushoden	1 ml
Keimzellen aus einem Maushoden	500 µl
Spermien aus zwei Mausnebenhoden	100 µl

Die Suspension wurde für 30 - 90 min auf Eis inkubiert und anschließend ultrazentrifugiert (100.000 x g; 20 min; 4 °C). Der Überstand enthält die löslichen Proteine und das Pellet die unlöslichen Membranproteine. Die Proteinkonzentration des Überstandes konnte anschließend mit der Bradford-Methode (2.10.1) bestimmt werden.

Zur Solubilisierung von Membranproteinen wurde das Pellet in Puffer B resuspendiert. In Tabelle 2.3 sind die verschiedenen Ausgangsmaterialien und die entsprechenden Volumina Puffer B aufgelistet.

Tab. 2.3: Ausgangsmaterialien zu Proteinpräparation und zugehörige Volumina Puffer B.

Ausgangsmaterial	Volumen Puffer B
Zellpellet Ø 9 cm-Schale	100 µl
Zellpellet Ø 5 cm-Schale	30 µl
Ein Hoden	200 µl
Keimzellen aus einem Hoden	100 µl
Nebenhodenspermien aus zwei Nebenhoden	30 µl

Tropfenweise wurde das gleiche Volumen Puffer B/2 % CHAPS hinzugegeben, mind. 15 min auf Eis inkubiert und anschließend ultrazentrifugiert (100.000 x g; 20 min; 4 °C). Der Überstand enthielt die solubilisierten Membranproteine. Die Proteinkonzentration konnte anschließend mit der Amidoschwarz-Methode (2.10.2) bestimmt werden.

Puffer A

20 mM HEPES/NaOH

20 mM NaCl

1 mM EDTA

0,1 mM EGTA

mPIC⁽¹⁾ (Verdünnung 1:500)

pH 7,4

Puffer B

20 mM HEPES/NaOH

150 mM NaCl

1 mM EDTA

0,1 mM EGTA

mPIC⁽¹⁾ (Verdünnung 1:500)

pH 7,4

⁽¹⁾ mammalian Protease Inhibitor Cocktail, Sigma

2.10 Quantifizierung von Proteinen

2.10.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)

Es wurde das „Protein Assay“-Farbreagenz von BioRad (München) verwendet. Die zu vermessende Proteinprobe wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl Farbreagenz vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Absorption bei

595 nm bestimmt. Zur Kalibrierung wurden definierte Mengen an BSA (NEB) vermessen. Eine Absorption bei 595 nm von 0,06 entspricht ca. 1 µg Protein (BSA).

2.10.2 Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

Um die Konzentration von Proteinlösungen, die Detergenzien oder Lipide enthalten, zu bestimmen, ist die Methode nach Bradford (2.10.1) ungeeignet. Die Proteinkonzentration solcher Proben wurde mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt. Es wurde der Amidoschwarz 10B-Farbstoff von Merck verwendet. Die zu vermessende Probe wurde mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 10 µl 10 % (w/v) SDS vermischt, um die Proteine zu solubilisieren. Danach wurden 15 µl 1 % (w/v) SDS/1 M Tris/HCl, pH 7,5 zugegeben. Nach dem Mischen wurden 30 µl 104 % (w/v) TCA zur Fällung der Proteine zugegeben und der Ansatz nochmals gemischt. Die Proben wurden 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Membranfilter (Typ HA, Porendurchmesser 45 µm, Millipore), der zuvor mit 3 ml 6 % (w/v) TCA gewaschen worden war, aufgetragen. Danach wurden die Filter mit 3 ml 6 % (w/v) TCA gewaschen und für 5 min mit Färbelösung gefärbt. Anschließend wurden die Filter kurz mit H₂O gespült und mehrmals in Entfärbelösung gelegt, bis der Hintergrund auf dem Filter entfärbt war. Aus den getrockneten Filtern wurden die gefärbten Bereiche ausgeschnitten. Diese Filterstücke wurden in je 1 ml Elutionslösung für 20 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Absorption bei 630 nm bestimmt. Zur Kalibrierung wurden definierte Mengen an BSA vermessen. Eine Absorption bei 630 nm von 0,03 entspricht ca. 1 µg Protein (BSA).

Färbelösung

0,5 % (w/v) Amidoschwarz 10B

45 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung

90 % (v/v) Methanol

2 % (v/v) Essigsäure

Elutionslösung

50 % (v/v) Ethanol

25 mM NaOH

50 µM EDTA

2.11 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

2.11.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Modifikation nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde in einer „Minigel Twin“-Kammer (Biometra; Gelmaße: 0,1 x 8 x 10 cm) oder in einer „Sturdier SE 400“-Kammer (Hoefer; Gelmaße: 0,15 x 14 x 15 cm) durchgeführt. Für SDS-PAGE in einer „Minigel Twin“-Kammer wurden 10 %ige Trenngele und 5 %ige Sammelgele verwendet. Für SDS-PAGE in einer „Sturdier SE 400“-Kammer wurden Trenngele mit einem Polyacrylamid-Gradienten von 7,5 % bis 15 % mit 5 %igen Sammelgelen oder Trenngele mit einem Polyacrylamid-Gradienten von 4 % bis 19 % mit 3,6 %igen Sammelgelen verwendet. Die Proben wurden mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Trennung im Biometra-System erfolgte bei 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel und dauerte ca. 90 min. Im Hoefer-System wurde die Elektrophorese ü.N. mit 80 V durchgeführt.

4x SDS-Probenpuffer

8 % (w/v) SDS
200 mM Tris/HCl pH 6,8
50 % (v/v) Glycerol
4 % (v/v) β -Mercaptoethanol
0,04 % (w/v) Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer

250 mM Tris
1 % (w/v) SDS
1,92 M Glycin

2.11.2 Proteingrößenstandard

Als Größenstandard für die SDS-PAGE wurde der „Mark12TM Unstained Standard“ (Invitrogen) benutzt (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Im Proteingrößenstandard „Mark12™“ enthaltene Proteine und deren Molmassen.

Protein	Molmasse (kDa)
Myosin	200
β-Galactosidase	116,3
Phosphorylase B	97,4
BSA	66,3
Glutamat-Dehydrogenase	55,4
Laktat-Dehydrogenase	36,5
Carbonat-Dehydrogenase	31,0
Trypsin-Inhibitor	21,5
Lysozym	14,4
Aprotinin	6,0
Insulin B-Kette	3,5
Insulin A-Kette	2,5

2.11.3 Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit der Rapid Coomassie-Blaufärbung

Das Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde alternativ in Anlehnung an Wong et al. (2000) durchgeführt. Es wurde der Farbstoff „Coomassie Blue R 250“ (Serva, Heidelberg) verwendet. Das Gel wurde nacheinander in Färbelösungen unterschiedlicher Farbstoffkonzentrationen (Lösung A, B, C) inkubiert und dann entfärbt. Das Gel wurde in einem mikrowellenfesten Plastikbehälter mit Lösung A überschichtet und in einer Mikrowelle bis zum Sieden der Lösung erhitzt. Das Gel wurde 5 min bei RT auf einem Taumler abgekühlt. Lösung A wurde abgenommen und das Gel mit H₂O gespült. Anschließend wurde das Gel mit Lösung B überschichtet und erneut bis zum Siedepunkt in der Mikrowelle aufgekocht. Lösung B wurde abgenommen und das Gel mit H₂O gespült. Dann wurde das Gel mit Lösung C überschichtet und analog zu den vorherigen Arbeitsschritten behandelt. Zum Entfärben wurde das Gel mit Lösung D überschichtet und wiederum aufgekocht. Ein Zellstofftuch wurde im Behälter platziert, um überschüssigen Farbstoff aufzunehmen. Das Gel wurde 5 min bei RT auf einem Taumler inkubiert. Die gebrauchte Lösung D wurde abgenommen und das Gel mit frischer Lösung D überschichtet. Die Arbeitsschritte zum Entfärben wurden so oft wiederholt, bis der gewünschte Entfärbegrad erreicht war.

Lösung A

0,05 % (w/v) Coomassie Blue R 250

10 % (v/v) Essigsäure

25 % (v/v) Isopropanol

Lösung B

0,005 % (w/v) Coomassie Blue R 250

10 % (v/v) Essigsäure

10 % (v/v) Isopropanol

Lösung C

0,002 % (w/v) Coomassie Blue R 250

10 % (v/v) Essigsäure

Lösung D

10 % (v/v) Essigsäure

2.12 Nachweis spezifischer Proteine**2.12.1 Transfer und Immobilisierung von Proteinen („Westernblot“)**

Die Proteine wurden mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt (2.11.1) und in Anlehnung an Towbin et al. (1979) auf PVDF-Membranen („Immobilon P“; Millipore; Eschborn) transferiert. Der Transfer („Westernblot“) wurde in einem „Semi-dry blotter“ (Sigma-Aldrich) im Halbtrockenverfahren nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Transferzeit betrug 40 min bei 2,4 mA/cm² Gelfläche. Ein erfolgreicher Transfer wurde durch reversible Färbung der Proteine mit 0,2 % (w/v) Ponceau S (Sigma) in 2 % (v/v) Essigsäure überprüft. Gegebenenfalls wurde die Blotmembran in Streifen geschnitten.

Anodenpuffer I

0,3 M Tris/HCl pH 10,4

20 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer II

0,025 M Tris/HCl pH 10,4

20 % (v/v) Methanol

Kathodenpuffer

0,025 M Tris/HCl pH 9,4

0,04 M Glycin

20 % (v/v) Methanol

2.12.2 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Der immunologische Nachweis immobilisierter Proteine (2.12.1) erfolgte in drei Schritten. Der Ablauf der Arbeitsschritte sowie die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst. Im ersten Schritt wurden die

unspezifischen Bindestellen auf der Membran blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Erstantikörper inkubiert. Der spezifische Antigen-Antikörperkomplex wurde dann mit einem Zweitantikörper nachgewiesen, der an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt war. Inkubationsschritte erfolgten bei RT für 30 - 60 min. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Membran gewaschen (je 5 min; RT). Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten unter leichtem Schütteln. Die spezifischen Antigen-Erstantikörper-Zweitantikörper-Komplexe wurden mit dem „ECL Westernblot Detection Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben detektiert.

Tab. 2.5: Arbeitsschritte und Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen beim immunologischen Nachweis immobilisierter Proteine.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Blockierungsreaktion	30 min (RT) oder ü.N. (4 °C)	Blockierungslösung ⁽¹⁾
Waschen	1 x 1 min (RT)	Waschlösung I ⁽²⁾
Erstantikörperinkubation	60 min (RT)	Erstantikörper-Inkubationslsg. ⁽³⁾
Waschen	2 x 5 min (RT)	Waschlösung I ⁽²⁾
Zweitantikörperinkubation	40 min (RT)	Zweitantikörper-Inkubationslsg. ⁽⁴⁾
Waschen	2 x 5 min (RT)	Waschlösung I ⁽²⁾
Waschen	2 x 5 min (RT)	Waschlösung II ⁽⁵⁾

(1) PBS / 0,05 % (v/v) Tween-20 / 2,5 % (w/v) Milchpulver

(2) PBS / 0,05 % (v/v) Tween-20

(3) Erstantikörper in PBS / 0,05 % (v/v) Tween-20

(4) Zweitantikörper in PBS / 0,05 % (v/v) Tween-20;

(5) PBS

PBS (pH 7,4)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1,8 mM NaH₂PO₄

In dieser Arbeit verwendete Antikörper sind unter 2.12.4 aufgeführt.

2.12.3 Immunzytochemische Färbung von CHO-Zellen

Für die immunzytochemische Färbung wurden CHO-K1 bzw. mSCNBP[A]His₁₀-Zellen (2.8.4) auf Glasplättchen umgesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen mit 4% (w/v) Paraformaldehydlösung (PA) auf den Glasplättchen fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS (2.8.1) gewaschen.

Die immunzytochemische Färbung erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit einer Vorinkubationslösung inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper. Im dritten Schritt wurde der spezifische Antigen-Erstantikörperkomplex mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen.

Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden mit dem Eindeckmedium Aqua Poly/Mount (Polysciences) auf einem Objektträger versiegelt und unter einem Konfokalen Laser Mikroskop (Leica TCS) betrachtet. Durchlichtaufnahmen wurden ebenfalls mit dem konfokalen Mikroskop und einer Differenziellen Interferenz (DIC oder Normarski)-Optik digital aus einer einzigen Bildebene aufgezeichnet.

Tab. 2.6: Zeitlicher Ablauf des immunzytochemischen Nachweises von Proteinen.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Blockierungsreaktion	30 min (RT) oder ü.N. (4°C)	Vorinkubationslösung ⁽¹⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBS
Erstantikörperinkubation	1 h (RT)	Erstantikörper-Inkubationslsg. ⁽²⁾
Waschen	2 x 10 min (RT)	PBS
Zweitantikörperinkubation	30 min (RT)	Zweitantikörper-Inkubationslsg. ⁽³⁾
Waschen	2 x 20 min (RT)	PBS

⁽¹⁾ PBS, 0,5% (w/v) Triton X-100, 5%(v/v) Chemiblocker (Millpore)

⁽²⁾Erstantikörper in PBS, 0,5% (w/v) Triton X-100, 5% (v/v) Chemiblocker (Millpore)

⁽³⁾ Zweitantikörper in PBS, 5% (v/v) Chemiblocker (Millpore)

2.12.4 Verwendete Antikörper

2.12.4.1 Erstantikörper

Monoklonale Erstantikörper

Monoklonale Erstantikörper wurden kommerziell erworben oder in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Kremmer vom Institut für molekulare Immunologie, GSF München hergestellt. Die vermeintlich positiven Primärüberstände wurden durch Westernblot-Analysen (2.11, 2.12) getestet. Die Hybridome, deren Primärüberstände sich in diesen Tests als geeignet erwiesen hatten, wurden unter Berücksichtigung der Ig-Subklasse rekloniert. Die Reklonierung erfolgte durch Einzelzellverteilung, bis alle Hybridome auf der Kulturplatte positiv mit dem Antigen reagierten. Der übrig gebliebene Klon wurde expandiert und zur Gewinnung des Überstandes mit dem eigentlichen monoklonalen Antikörper (Reinkultur) verwendet.

Alle verwendeten monoklonalen Erstantikörper sind in Tabelle 2.7 aufgeführt. In der Spalte „Antigen“ ist angegeben, welches Protein von dem jeweiligen Antikörper erkannt wird.

Tab. 2.7: Erstantikörper

Antikörper	Hergestellt in	Ig-Subklasse	Antigen	Hersteller	Verd. im Westernblot	Verd. in der Immunzytochemie
α -HA	Ratte	G1	HA-markierte Proteine	Roche	1:1.000	-
CPRH-2E10	Ratte	G2a	mSCNBP	Frau Dr. E. Kremmer	1:2	unverdünnt
PADK-4F9	Ratte	G2c	mSCNBP	Frau Dr. E. Kremmer	1:2	-
VHKK-3H6	Ratte	G1	mSCNBP	Frau Dr. E. Kremmer	1:2	unverdünnt
VHKK-4B2	Ratte	G1	mSCNBP	Frau Dr. E. Kremmer	-	unverdünnt

Polyklonale Erstantikörper

Der verwendete polyklonale Antikörper #118-4 wurde von Dr. D. Harzheim und Dr. I. Weyand (INB-1, FZJ) in Kaninchen hergestellt und im Rahmen der Diplomarbeit von Miriam Krähling (INB-1, FZJ) charakterisiert. Der Antikörper erkennt die Varianten A und B des mSCNBP. Der Antikörper wurde in Westernblot-Analysen (2.12.2) in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

2.12.4.2 Zweitantikörper

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zweitantikörper sind in Tabelle 2.8 aufgeführt. In der Spalte „Antikörper (Konjugat)“ ist angegeben, ob der Antikörper mit der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) oder mit einem Fluorophor konjugiert ist. Die Antikörper wurden im Westernblot (WB) oder in der Immunzytochemie (IZC) eingesetzt.

Tab.2.8: Zweitantikörper

Antikörper (Konjugat)	Hersteller	Verdünnung
Ziege-anti-Ratte (HRP)	Jackson	1:5.000 im WB
Esel-anti-Kaninchen (HRP)	Amersham Biosciences	1:5.000 im WB
Ziege-anti-Ratte Alexa488 (Alexa488)	Molecular Probes	1:500 in der IZC

2.13 Chromatographische Verfahren

2.13.1 Affinitätschromatographie an einer Antikörper/Säulenmatrix

Die Immobilisierung von monoklonalen Antikörpern an Protein G-Sepharose (2.13.1.1) und die Immunpräzipitation von Proteinen an einer Antikörper/Säulenmatrix (2.13.1.2) wurden in Anlehnung an Bonifacino (1999) durchgeführt.

2.13.1.1 Immobilisierung von monoklonalen Antikörpern an Protein G-Sepharose

Zur Herstellung einer Antikörper/Säulenmatrix wurden monoklonale Antikörper aus immunisierten Ratten (2.12.4.1) gerichtet an „ImmunoPure Immobilized Protein G“ (Pierce) gebunden.

Zunächst wurde 1 ml Protein G-Sepharose in eine Minichromatographiesäule (Biorad) pipettiert und mit 10 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl pH 8,0 äquilibriert. Anschließend wurden 50 ml Reinkultur eines monoklonalen Antikörpers (2.12.4.1) dreimal über die Säule gegeben. Unspezifisch gebundene Bestandteile der Reinkultur wurden mit dem 10fachen Säulenvolumen an 10 mM Tris/HCl pH 8,0 von der Säule gewaschen. Um zu verhindern, dass

sich die Antikörper im Verlauf der eigentlichen Immunpräzipitation (2.13.1.2) wieder vom Protein G lösen, wurden sie mit Hilfe des quervernetzenden Reagenz Dimethylpimelimidat (DMP) kovalent an die Säulenmatrix gekoppelt. Hierzu wurde die Säule zunächst mit 10 Säulenvolumen an 200 mM Borsäure pH 9,0 umgepuffert. Danach wurde DMP in einer Endkonzentration von 20 mM hinzugegeben und der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde das Säulenmaterial durch Invertieren in Suspension gehalten. Durch Waschen der Antikörper/Säulenmatrix mit 20 Säulenvolumen 200 mM Ethanolamin pH 8,0 wurden freie DMP-Moleküle entfernt bzw. noch reaktive Gruppen von einseitig gekoppelten DMP-Molekülen abgesättigt. Die Antikörper/Säulenmatrix wurde schließlich mit 10 Säulenvolumen PBS (2.8.1) umgepuffert und bis zur Immunpräzipitation in PBS/0,05 % NaN_3 gelagert.

2.13.1.2 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen wurden mit Proteinpräparationen aus heterolog transfizierten HEK 293-Zellen oder nativem Gewebe durchgeführt (2.9).

Für Proteine aus heterolog transfizierten HEK 293-Zellen wurde zuerst die Menge bestimmt, die nötig ist, um das Protein spezifisch im Westernblot (2.12) nachweisen zu können. Um bei der späteren Versuchsauswertung deutliche Signale zu erhalten, wurde für die Immunpräzipitation mindestens die 10fache Menge eingesetzt. In Proteinsuspensionen löslicher Proteine (2.9.3) wurde vor der Immunpräzipitation die Salzkonzentration auf 150 mM NaCl eingestellt. Um die Detergenzkonzentration minimal zu halten, wurden Suspensionen solubilisierter Membranproteine mit Puffer B (2.9.3) verdünnt. Die CMC (*Critical Micelle Concentration*) des verwendeten Detergenz wurde dabei berücksichtigt. Anschließend wurde die Proteinsuspension ultrazentrifugiert (100.000 x g; 20 min; 4 °C), um unlösliche (Protein-) Aggregate, die durch das Herabsetzen der Detergenzkonzentration entstanden sind, abzutrennen.

Um mit kleinen Säulenvolumina arbeiten zu können, wurde die Immunpräzipitation im „batch“-Verfahren durchgeführt. Zum Wechseln der Flüssigkeit wurde die Säulenmatrix zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Säulenmaterial resuspendiert. Die Antikörper/Säulenmatrix (2.13.1.1) wurde mit dem Puffer der jeweiligen Proteinsuspension (Proteinpuffer) äquilibriert. Die Proteinsuspensionen wurden zu der äquilibrierten Antikörper/Säulenmatrix gegeben. Der Ansatz wurde für 12 - 20 h bei 4 °C

inkubiert und anschließend zentrifugiert (200 x g; 5 min; RT). Der Überstand mit den nicht-gebundenen Proteinen (Durchfluss) wurde vorsichtig abgenommen und die Antikörper/Säulenmatrix mit dem 20fachen Säulenvolumen an Proteinpuffer gewaschen. Das Waschen erfolgte durch Zugabe von 80 - 500 µl Proteinpuffer, zweiminütige Inkubation auf Eis und anschließende Zentrifugation (200 x g; 30 sek; RT). Der Überstand wurde verworfen. Die gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von zwei Säulenvolumen Elutionspuffer und fünfminütige Inkubation bei RT von der Antikörper/Säulenmatrix eluiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (200 x g; 30 sek; RT). Der Überstand enthielt die eluierten Proteine. Die Auswertung der Immunpräzipitation erfolgte durch SDS-PAGE (2.11) und Westernblot-Analyse (2.12).

Elutionspuffer (pH 7,5)

10 mM Tris/HCl

2 % (w/v) SDS

5 mM EDTA

2.13.2 Affinitätschromatographische Reinigung rekombinanter Proteine

Das heterolog exprimierte mSCNBP[A]His₁₀ besitzt am C-Terminus ein Dekahistidintag, das die Reinigung über eine Co²⁺-beladene Hitrapssäule (Amersham Biosciences) ermöglicht. Um größere Mengen Protein zu isolieren, wurden mSCNBP[A]His₁₀-Zellen (2.8.4) in Suspension kultiviert (2.8.5). Die Zelldichte der Suspension wurde unmittelbar vor der Zellernte bestimmt (2.8.5.3). Die Zellen wurden zentrifugiert (300 x g; 5 min; RT), das Kulturmedium abgenommen und das Zellpellet in PBS (2.8.1) resuspendiert (¹/₁₀₀stel des Kulturvolumens). Nach erneuter Zentrifugation (3000 x g; 5 min; RT) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet entweder direkt zur Proteinpräparation eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

Zum Zellaufschluss wurden die CHO-Zellen in Aufschlusspuffer resuspendiert (~30 - 50 ml / 1 x 10⁹ Zellen), durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (Branson Sonificator B-12; Stufe 6-7; 4 x 15 sek; 4 °C) und 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Proteinsuspension wurde anschließend ultrazentrifugiert (100.000 x g; 20 min; 4 °C). Der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde abgenommen, auf eine Salzkonzentration von 300 mM NaCl eingestellt und in ein frisches Reaktionsgefäß filtriert (steriler Spitzenvorsatzfilter; 0,45 µm CM Membran, Merck).

Eine Hitrapsäule (5 ml; Amersham Biosciences) wurde an ein automatisiertes Pumpensystem (Äkta, Amersham Biosciences) angeschlossen und nach Herstellerangaben mit CoCl_2 (100 mM) beladen. Anschließend wurde die Säule mit dem 5fachen Säulenvolumen Waschpuffer, dem 5fachen Säulenvolumen Elutionspuffer und nochmals mit dem 5fachen Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert. Die filtrierte Proteinprobe wurde auf die Säule gegeben und die Säule anschließend mit mindestens 10 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte in zwei Schritten und wurde mit einem Detektor bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ aufgezeichnet: Um möglichst viel unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen, wurde die Säule zunächst mit einer Lösung, die 34,5 mM Imidazol enthielt (95 % Waschpuffer, 5 % Elutionspuffer) gewaschen, bis keine signifikante Änderung der Absorption festzustellen war. Die Elution erfolgte bei einer Konzentration von 500 mM Imidazol (100 % Elutionspuffer). Die Elutionsfraktionen wurden aufgefangen (1,5 ml-Fraktionen), die darin enthaltenen Proteine durch SDS-PAGE (2.12.1) aufgetrennt und durch Rapid Coomassie-Färbung (2.11.3) oder im Western Blot (2.12) analysiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C .

Aufschlusspuffer (pH 8,0)

50 mM Natriumphosphatpuffer

20 mM NaCl

10 mM Imidazol

mPIC⁽¹⁾ (Verdünnung 1:500)

⁽¹⁾ mammalian Protease Inhibitor Cocktail, Sigma

Waschpuffer (pH 8,0)

50 mM Natriumphosphatpuffer

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

Elutionspuffer (pH 8,0)

50 mM Natriumphosphatpuffer

300 mM NaCl

500 mM Imidazol

2.13.3 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe. Die Trennung erfolgt durch die unterschiedliche Permeation der Moleküle in einem porösen

Trägermaterial mit definierter Größe. Für das Trennverhalten ist das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle verantwortlich. Moleküle einer bestimmten Größe können nicht in die Poren des Trägermaterials eindringen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront im Ausschlussvolumen V_0 . Kleinere Moleküle können in die Poren des Trennmaterials eindringen und eluieren dadurch später. Der Trenneffekt hängt hauptsächlich von den Eigenschaften des Trennmaterials ab und nicht von den Pufferbedingungen. In dieser Arbeit wurde eine Gelfiltrationssäule mit einem Dextran-Agarose-Trennmaterial (Superdex 200 10/300 GL, Amersham Bioscience, Trennleistung: $1 \times 10^4 - 6 \times 10^5$ Da) verwendet. Die Gelfiltrationssäule wurde an ein Äkta-System (Amersham Biosciences) angeschlossen, mit dem zweifachen Säulenvolumen (50 ml) 150 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer äquilibriert und anschließend mit Proteinen bekannter Größe kalibriert (13,7 - 669 kDa; „LMW Gel Filtration Kit“ und „HMW Gel Filtration Kit“, Amersham Biosciences). Danach wurden 250 µl der Proteinprobe aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Die Elution der Proteine wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm verfolgt und die Elutionsfraktionen aufgefangen (0,5 ml Fraktionen). Die Proteine in den Elutionsfraktionen wurden im Vakuum eingengt, durch SDS-PAGE (2.11.1) aufgetrennt und im Western Blot (2.12) bzw. durch Rapid Coomassie-Färbung (2.11.3) analysiert.

2.14 Massenspektrometrische Analysen

2.14.1 Proteolytische In-Gel-Spaltung von Proteinen

Aus Rapid Coomassie gefärbten Proteingelen (2.11.3) wurden mit einem Skalpell Banden von ca. 10 mm Breite und 1,5 - 3 mm Höhe ausgeschnitten. Jede Bande wurde in vier bis sechs Würfel geteilt und in ein 0,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation in 150 µl 50 % (v/v) Acetonitril / 12,5 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung (10 min; 30 °C; unter leichtem Schütteln). Hierbei wird den Gelstücken Flüssigkeit entzogen und die Proteine werden entfärbt. Der Überstand wurde verworfen und die Gelstücke mit 150 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat rehydratisiert (10 min; 30 °C; unter leichtem Schütteln). Anschließend wurden die Gelstücke durch Zugabe von 100 µl Acetonitril wieder dehydratisiert und in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac, Thermo Savant) getrocknet. Die Proteine wurden in der Gelmatrix mit der Serinprotease Trypsin enzymatisch gespalten. Die

Hydrolyse der Proteine erfolgte dabei C-terminal von Arginin- und Lysinresten. Hierzu wurden die getrockneten Gelstücke mit 70 ng Enzym (Promega) in 60 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat überschichtet und für 16 - 22 h bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe von 60 µl 0,5 % (v/v) Trifluoressigsäure in Acetonitril. Zur Extraktion der Peptide aus dem Gel wurde der Ansatz 10 min im Ultraschallbad inkubiert (SONOREX, Bandelin) und der Überstand mit den darin enthaltenen Peptiden in ein Probengläschen (CS-Chromatographie Service) überführt. Durch Zugabe von 20 µl Acetonitril wurde den Gelstücken weitere Flüssigkeit entzogen. Der Überstand wurde mit dem ersten Überstand in dem Probengläschen vereinigt, die Peptide in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 6 µl 5 % (v/v) Acetonitril / 0,1 % (v/v) wässriger Trifluoressigsäure resuspendiert. Diese Peptidlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.14.2 Massenspektrometrische Peptidsequenzierung

Alle Massenspektrometrischen Analysen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. E. Krause am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin durchgeführt. Die Analyse von Peptidmischungen erfolgte mittels Kappilarflüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) an einem Quadrupol-Flugzeit-Hybridmassenspektrometer (*quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer* Q-ToF Ultima (Micromass, Manchester, UK)) durchgeführt. Mit Hilfe eines CapLC-Systems (Waters, Manchester, UK) wurden 5,5 µL der Peptidlösung (2.14.1) injiziert und auf einer Vorsäule (PepMap C18, 5 µm, 100 Å, 5 mm x 300 µm, Dionex, Idstein) konzentriert. Die Auftrennung der Peptide erfolgte über Umkehrphasenchromatographie (*Reversed-Phase HPLC*) an einer Kapillarsäule (Atlantis dC₁₈, 3 µm, 100 Å, 150 mm x 75 µm, Waters GmbH). Eluiert wurde mit einem linearen A-B Gradienten von 2 - 41 % B in 120 min bei einer Flussrate von 100 nl/min. Die mobile Phase A bestand aus 0,1 % (v/v) Ameisensäure / 3 % (v/v) Acetonitril / 96,6 % (v/v) H₂O, die mobile Phase B war 0,1 % (v/v) Ameisensäure / 80 % (v/v) Acetonitril / 19,9 % (v/v) H₂O. Alle Massenspektren wurden im Positiv-Ionen-Modus aufgenommen, wobei PicoTip Spray-Kapillaren (New Objective, Woburn, MA, USA) verwendet wurden. Fragmentionenspektren der tryptischen Peptidionen wurden über Datenabhängige MS zu MS/MS-Umschaltungen aufgenommen. Die Datenbearbeitung, d.h. die Erstellung der Peaklisten-Dateien (pkl), erfolgte mit den Programmen MassLynx (Version 4.0 Micromass-Waters) und ProteinLynx™ Global Server

(Version 2.2 Micromass–Waters). Die experimentellen MS/MS-Spektren wurden mit Hilfe der Datenbanksuchmaschine MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) mit Einträgen der Proteindatenbank NCBI rodent (Stand: 03.03.2007) verglichen. Als Suchparameter wurden ein Maximum von drei Fehlsplattstellen und eine Massenabweichung von 120 ppm für die Peptidionenmassen im MS-Modus bzw. 0,05 Da für die Fragmentionenmassen im MS/MS-Modus zugelassen. Weiterhin wurden als mögliche Proteinmodifizierungen die Addition von nicht polymerisiertem Acrylamid an Cysteinreste sowie die Oxidation von Methioninresten zugelassen. Ein Protein wurde als eindeutig identifiziert eingestuft, wenn mindestens zwei tryptische Peptide signifikant (*MASCOT scoring*) nachgewiesen wurden, welche nicht zu einem anderen, bereits mit höherem Treffer identifizierten Protein der jeweiligen Probe gehörten.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich das SCNBP aus der Maus - ein neues Bindeprotein für zyklische Nukleotide - untersucht. Der Ergebnisteil gliedert sich in fünf Abschnitte. In den ersten beiden Abschnitten beschreibe ich den immunologischen Nachweis von SCNBP in HEK293-Zellen und im Maushoden. Potentielle Interaktionspartner des SCNBP aus Maushoden wurden über massenspektrometrische Analysen identifiziert. Dies wird im dritten Abschnitt erläutert. Die heterologe Expression und Reinigung von SCNBP, als erster Schritt zu einer umfassenden biochemischen Charakterisierung des Proteins, beschreibe ich in den beiden letzten Abschnitten.

3.1 Nachweis von heterolog exprimiertem SCNBP mit spezifischen Antikörpern

Eine Datenbankrecherche ergab, dass in der Maus sechs verschiedene Varianten des SCNBP vorliegen könnten (Krähling, 2006). Sie unterscheiden sich im Wesentlichen im Bereich der N- und C-Termini (vgl. 1.2.1). Der Nachweis des SCNBP sollte immunologisch erfolgen. Für die Untersuchung standen mir verschiedene monoklonale (CPRH-2E10, VHKK-3H6, VHKK-4B2 und PADK-4F9) sowie ein polyklonaler (#118-4) Antikörper zur Verfügung. Die monoklonalen Antikörper wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Kremmer (Institut für molekulare Immunologie, GSF München) hergestellt (2.12.4.1). Die Antikörper #118-4, CPRH-2E10 und PADK-4F9 wurden von Miriam Krähling (INB-1, Forschungszentrum Jülich) im Rahmen ihrer Diplomarbeit (2006) im Westernblot und in der Immunzytochemie charakterisiert. Bei der Herstellung des polyklonalen Antikörpers #118-4 diente das gesamte mSCNBP[B] als Antigen. Abbildung 3.1 zeigt schematisch die Primärstrukturen der vorhergesagten SCNBP-Varianten sowie die Lage der Epitope, gegen die die monoklonalen Antikörper gerichtet sind. Die Epitope wurden so gewählt, dass zwischen den Varianten unterschieden werden konnte.

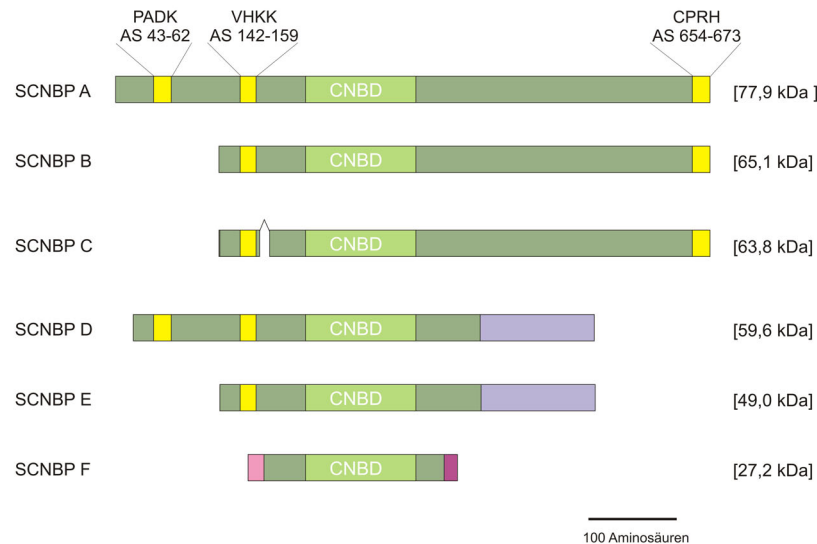


Abb. 3.1: Lage der Antikörperepitope in den annotierten Maus-SCNBPs. Die sechs annotierten Protein-Varianten A bis F sind schematisch dargestellt. Die errechnete Molmasse der annotierten Proteine ist rechts in der Abbildung angegeben. Die Sequenzbereiche der Varianten B bis F, die mit SCNBP A identisch sind, sind als grüne Balken dargestellt. Epitope, gegen die die Antikörper gerichtet sind, sind gelb markiert. Die Aminosäurepositionen der Epitope in der SCNBP-Variante A sind oben in der Abbildung angegeben.

Um die Antikörper im Westernblot zu testen (CPRH-2E10 und PADK-4F9) sowie zu charakterisieren (VHKK-3H6), habe ich zunächst die Hauptvarianten A und B des SCNBP heterolog in HEK293-Zellen exprimiert. Die Expressionsvektoren pcDNA3.1(+) mSCNBP[A]HA bzw. pcDNA3.1(+) mSCNBP[B]HA wurden mir freundlicherweise von Dr. D. Harzheim (INB-1, FZJ) zur Verfügung gestellt. Im Folgenden werden die Konstrukte als pcA-mSCNBP[A]HA bzw. pcA-mSCNBP[B]HA bezeichnet. Sie kodieren für die Varianten A bzw. B des Maus-SCNBPs. Beide Genprodukte besitzen C-terminal ein Hämagglutinin A (HA)-Tag. Das HA-Tag ermöglicht den immunologischen Nachweis der Proteine mit dem Antikörper „rat- α -HA High Affinity“ (Roche).

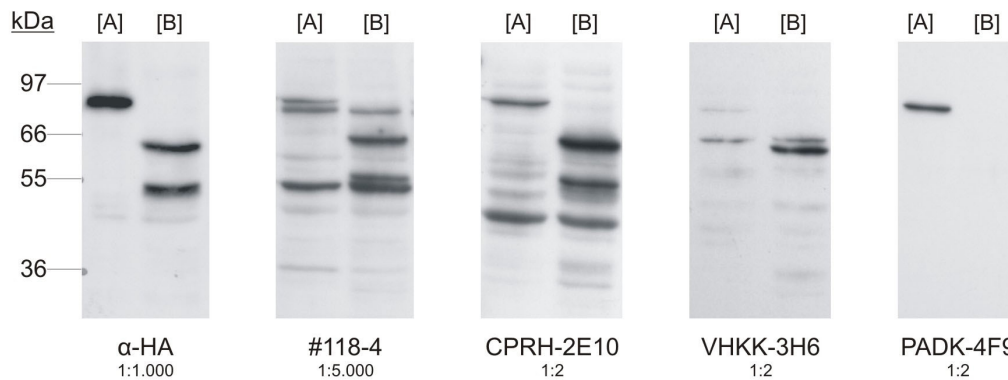


Abb. 3.2: Westernblot-Analyse des heterolog exprimierten SCNBP mit spezifischen Antikörpern. Lösliche Proteine aus HEK293-Zellen wurden in 10 %igen PAA/SDS-Gelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert. Für den Nachweis mit den Antikörpern α -HA, #118-4 und PADK-4F9 wurden je 10 μ g Proteine, für den Nachweis mit den Antikörpern CPRH-2E10 und VHKK-3H6 wurden je 15 μ g Proteine eingesetzt. Die verwendeten Erstantikörper und ihre Verdünnung sind unter der jeweiligen Teilabbildung angegeben. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben; [A]: lösliche Proteine aus pcA-mSCNBP[A]HA-transfizierten HEK293-Zellen; [B]: lösliche Proteine pcA-mSCNBP[B]HA-transfizierten HEK293-Zellen.

Die lösliche Proteinfraction der Zelllysate wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen immobilisiert (2.12) und mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert (Abb. 3.2). In der Spur mit Proteinen von Zellen, die mit mSCNBP[A] transfiziert wurden ([A]), markiert der α -HA-Antikörper eine Bande bei ~82 kDa, was mit der errechneten Molmasse von 78,9 kDa gut übereinstimmt. Auch die SCNBP-spezifischen Antikörper markieren eine Bande bei dieser Größe. Von den Antikörpern #118-4, CPRH-2E10 und PADK-4F9 wird diese Bande gut, von dem Antikörper VHKK-3H6 schwächer erkannt.

In der Spur mit Proteinen von Zellen, die mit mSCNBP[B] transfiziert wurden ([B]), markiert der α -HA-Antikörper eine Bande bei ~66 kDa und eine weitere bei ~52 kDa. Die Größe des Proteins bei 66 kDa stimmt mit der errechneten Molmasse des HA-markierten mSCNBP[B] (66,2 kDa) überein. Die Antikörper #118-4, CPRH-2E10 und VHKK-3H6 erkennen alle die 66 kDa-Bande. Die Bande von ~52 kDa wird nur von den Antikörpern #118-4 und CPRH-2E10 markiert. Da der Antikörper VHKK-3H6, der gegen ein Epitop am N-Terminus des mSCNBP[B] gerichtet ist, diese Bande nicht markiert, deutet dies darauf hin, dass es sich bei dieser Bande um ein N-terminal verkürztes SCNBP handelt. Außer dem Antikörper PADK-4F9 zeigen alle SCNBP-spezifischen Antikörper unspezifische Kreuzreaktionen. Der Antikörper VHKK-3H6 erkennt beispielsweise unspezifisch eine Bande von ~68 kDa.

3.2 Nachweis von SCNBP im Maushoden

3.2.1 Westernblot-Analysen mit Proteinpräparationen aus Maushoden

Um das SCNBP im Maushoden nachzuweisen, wurden Westernblot-Analysen (2.12) mit Proteinpräparationen aus dem gesamten Maushoden, aus angereicherten Keimzellen und aus Nebenhodenspermien durchgeführt. Sowohl lösliche Proteine als auch Membranproteine (2.9.2, 2.9.3) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert (2.12). Der immunologische Nachweis erfolgte durch die Antikörper #118-4, CPRH-2E10 und PADK-4F9. Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch zwei Westernblot-Analysen mit den Antikörpern CPRH-2E10 und #118-4, die sowohl SCNBP[A] als auch SCNBP[B] erkennen können.

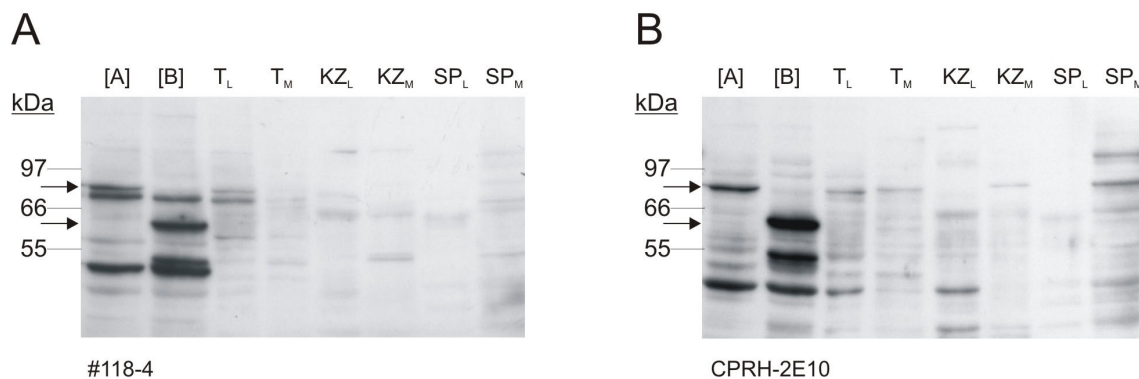


Abb. 3.3: Westernblot-Analyse von löslichen und Membranproteinen aus Maushoden, Keimzellen und Nebenhodenspermien. A) Westernblot-Analyse mit dem Antikörper #118-4 (Verdünnung 1:5000); B) Westernblot-Analyse mit dem Antikörper CPRH-2E10 (Verdünnung 1:2); Die Pfeile kennzeichnen die Positionen von mSCNBP[A]HA bzw. mSCNBP[B]HA. Es wurden je 20 µg Proteine aus Maushoden, Keimzellen bzw. Nebenhodenspermien in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Als Positivkontrolle dienten je 15 µg Proteine aus transfizierten HEK293-Zellen. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben; [A]: lösliche Proteine aus pcA-mSCNBP[A]HA-transfizierten HEK293-Zellen; [B]: lösliche Proteine aus pcA-mSCNBP[B]HA-transfizierten HEK293-Zellen. T_L: lösliche Proteine aus Maushoden; T_M: Membranproteine aus Maushoden; KZ_L: lösliche Proteine aus angereicherten Keimzellen; KZ_M: Membranproteine aus angereicherten Keimzellen; SP_L: lösliche Proteine aus Nebenhodenspermien; SP_M: Membranproteine aus Nebenhodenspermien.

SCNBP[A]: Der Antikörper #118-4 markierte in den Spuren mit löslichen Proteinen aus Maushoden (T_L) eine Bande deren Größe dem des heterolog exprimierten mSCNBP[A] entspricht (Abb. 3.3 A, oberer Pfeil). Die Markierung war aber verhältnismäßig schwach. Der Antikörper CPRH-2E10 erkannte Banden derselben Größe in den Spuren mit löslichen Proteinen aus Maushoden (T_L) und mit Membranproteinen aus Maushoden (T_M), angereicherten Keimzellen (KZ_M) und Nebenhodenspermien (SP_M) (Abb. 3.3 B, oberer Pfeil). Die Intensität der markierten Banden ist vergleichbar mit der Intensität einiger unspezifisch markierter Banden. Auch durch Variation der Proteinmenge (10 - 50 µg/Spur) wurden keine

anderen Ergebnisse erzielt (nicht gezeigt). Selbst wenn die Antikörpermarkierung des mSCNBP[A] spezifisch ist, liefert die Westernblot-Analyse keinen überzeugenden Nachweis für die Expression des Proteins im Maushoden. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, sind empfindlichere Methoden notwendig.

SCNBP[B]: Von keinem der Antikörper wurde in den Hoden-, Keimzell- bzw. Spermienpräparationen eine Bande markiert, die der Größe des heterolog exprimierten mSCNBP[B] entspricht.

3.2.2 Immunpräzipitation von SCNBP

Ein Grund warum das SCNBP im Westernblot nicht überzeugend nachgewiesen werden konnte ist möglicherweise, dass das SCNBP nur in sehr geringen Mengen im Maushoden vorkommt. Damit ein Nachweis im Westernblot gelingt, muss das Protein aus dem Gewebe angereichert werden. Eine Möglichkeit, ein Protein spezifisch anzureichern, ist die Immunpräzipitation. Die Immunpräzipitation ist eine Methode zur Reinigung von Proteinen, bei der die sehr spezifischen und hochaffinen Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper ausgenutzt werden (Bonifacino et al., 1999). Der Antikörper wird an eine Säulenmatrix gekoppelt und mit einem Proteingemisch, welches das Antigen enthält, inkubiert. Der Komplex aus Antigen, Antikörper und Säulenmatrix kann leicht von den übrigen Bestandteilen des Proteingemisches getrennt werden. Die erfolgreiche Präzipitation des Antigens kann im Westernblot überprüft werden. Zur Immunpräzipitation wurden die monoklonalen Antikörper CPRH-2E10 und PADK-4F9 (3.1) eingesetzt, die Antikörper VHKK-3H6 und VHKK-4B2 standen zu diesem Zeitpunkt meiner Arbeit noch nicht zur Verfügung.

3.2.2.1 Immunpräzipitation von SCNBP aus transfizierten HEK293-Zellen

Zunächst wurde überprüft, ob die monoklonalen Antikörper CPRH-2E10 und PADK-4F9 zur Immunpräzipitation geeignet sind. Hierzu wurde jeweils einer der Antikörper an Protein G-Sepharose immobilisiert (2.13.1.1). Anschließend wurde die Antikörper/Säulenmatrix mit löslichen Proteinen (Input) aus transfizierten HEK293-Zellen

gemischt (2.13.1.2) und für 12 - 20 h inkubiert. Proteine, die nicht gebunden haben (Durchfluß), wurden abgetrennt. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine habe ich die Säule mit dem 20fachen Säulenvolumen Puffer B (2.9.3) gewaschen (Wash). Durch Inkubation mit dem Elutionspuffer (zweifaches Säulenvolumen, 2.13.1.2) wurden gebundene Proteine von der Antikörper/Säulenmatrix eluiert (Eluat). Die Immunpräzipitation wurde durch Westernblot-Analyse überprüft. Hierzu wurden Anteile der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine auf PVDF-Membranen immobilisiert (2.12). Die Experimente wurden sowohl mit SCNBP[A] als auch mit SCNBP[B] durchgeführt.

SCNBP[A]: Abbildung 3.4 zeigt die Westernblot-Analyse einer Immunpräzipitation mit 1,2 mg löslichen Proteinen aus HEK293-Zellen (2.8.2), die mit dem Expressionsvektor pcA-mSCNBP[A]HA transfiziert worden waren. In diesem Fall wurden 100 µl der PADK-4F9/Säulenmatrix für die Präzipitation verwendet. Der Nachweis des SCNBP erfolgte mit dem Antikörper rat- α -HA (Roche).

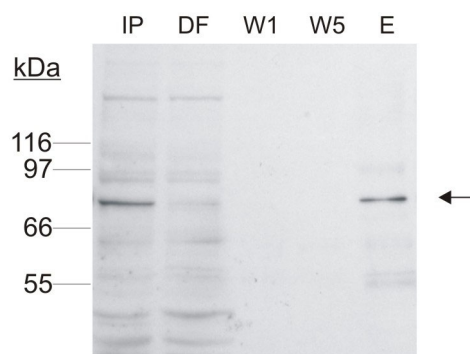


Abb. 3.4: Westernblot-Analyse der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus mSCNBP[A]HA-transfizierten HEK293-Zellen an einer PADK-4F9/Säulenmatrix. Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Aufgetragen sind die Fraktionen der Immunpräzipitation. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben. Der Nachweis erfolgte mit dem Antikörper rat- α -HA (Verdünnung 1:1.000). IP (Input): 1,7 % des Auftrags (entspricht 20 µg Protein); DF (Durchfluss): 1,7 % des Durchflusses; W1 (Wash 1): 1,7 % der ersten Waschfraktion; W5 (Wash 5): 1,7 % der letzten Waschfraktion; E (Eluat): 1,7 % der Elutionsfraktion. Der Pfeil kennzeichnet die Position von mSCNBP[A]HA.

Der Antikörper rat- α -HA markiert im Input (IP) und in der Elutionsfraktion (E) die Bande des heterolog exprimierten SCNBP (Abb. 3.4). Weder in der Durchflussfraktion (DF), noch in den Waschfraktionen (W1, W5) lässt sich das Protein nachweisen. Das Protein bindet also quantitativ an die PADK-4F9/Säulenmatrix. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Antikörper PADK-4F9 zur Immunpräzipitation von mSCNBP[A] geeignet ist.

Abbildung 3.5 zeigt einen ähnlichen Versuch, diesmal mit dem CPRH-2E10-Antikörper. Zur Immunpräzipitation wurden 80 µg Protein und 80 µl Antikörper/Säulenmatrix eingesetzt. Der immunologische Nachweis erfolgte hier mit dem Antikörper #118-4.

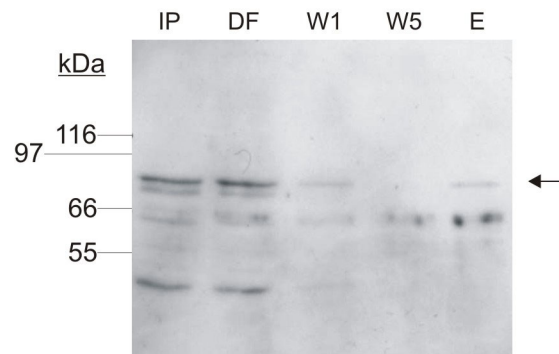


Abb. 3.5: Westernblot-Analyse der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus mSCNBP[A]HA-transfizierten HEK293-Zellen an einer CPRH-2E10/Säulenmatrix. Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Aufgetragen sind die Fraktionen der Immunpräzipitation. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben. Der Nachweis erfolgte mit dem Antikörper #118-4 (Verdünnung 1:5.000). IP (Input): 12,5 % des Auftrags (entspricht 10 µg Protein); DF (Durchfluss): 12,5 % des Durchflusses; W1 (Wash 1): 12,5 % der ersten Waschfraktion; W5 (Wash 5): 12,5 % der letzten Waschfraktion; E (Eluat): 12,5 % der Elutionsfraktion. Der Pfeil kennzeichnet die Position von mSCNBP[A]HA.

Das mSCNBP[A]HA-Protein wird sowohl im Durchfluss (DF), als auch in der ersten Waschfraktion (W1) vom Antikörper markiert. In der letzten Waschfraktion (W5) lässt sich mSCNBP[A]HA nicht mehr nachweisen. In der Elutionsfraktion (E) wird das SCNBP aber wieder erkannt. Die Intensität der Bande, die vom Antikörper #118-4 erkannt wird, ist jedoch viel geringer als im Input. Das Protein bindet also nicht quantitativ an die CPRH-2E10/Säulenmatrix. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Antikörper CPRH-2E10 nur bedingt zur Immunpräzipitation von mSCNBP[A] geeignet ist.

SCNBP[B]: Abbildung 3.6 zeigt die Westernblot-Analyse der Immunpräzipitation mit 100 µg löslichen Proteinen aus HEK293-Zellen (2.8.2), die mit dem mSCNBP[B]HA-Konstrukt transfiziert worden waren, an 100 µl der CPRH-2E10/Säulenmatrix. Der immunologische Nachweis erfolgte durch den Antikörper rat-α-HA (Roche).

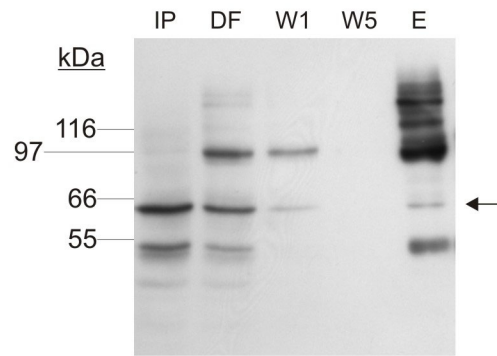


Abb. 3.6: Westernblot-Analyse der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus mSCNBP[B]HA-transfizierten HEK293-Zellen an einer CPRH-2E10/Säulenmatrix. Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Aufgetragen sind die Fraktionen der Immunpräzipitation. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben. Der Nachweis erfolgte mit dem Antikörper rat- α -HA (Verdünnung 1:1.000). IP (Input): 10 % des Auftrags (entspricht 10 μ g Protein); DF (Durchfluss): 10 % des Durchflusses; W1 (Wash 1): 10 % der ersten Waschfraktion; W5 (Wash 5): 10 % der letzten Waschfraktion; E (Eluat): 10 % der Elutionsfraktion. Der Pfeil kennzeichnet die Position von mSCNBP[B]HA.

In der Elutionsfraktion (E) wird das SCNBP[B] erkannt. Wieder lässt sich SCNBP sowohl im Durchfluss (DF), als auch in der ersten Waschfraktion nachweisen. Wie mSCNBP[A]HA bindet auch mSCNBP[B]HA nicht quantitativ an die CPRH-2E10/Säulenmatrix. Zur Immunpräzipitation von mSCNBP[B] ist der Antikörper CPRH-2E10 ebenfalls nur bedingt geeignet.

Mit PADK-4F9 steht ein monoklonaler Antikörper zur Verfügung, der sehr gut geeignet ist, die SCNBP-Variante A mittels Immunpräzipitation aus Proteinpräparationen anzureichern. In anschließenden Westernblot-Analysen kann dann die Expression des SCNBP[A] im Gewebe nachgewiesen werden. Der Antikörper CPRH-2E10 ist nur bedingt geeignet, die SCNBP-Variante B aus Proteinpräparationen anzureichern.

3.2.2.2 Immunpräzipitation von SCNBP aus Maushoden

Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus Maushoden an einer PADK-4F9/Säulenmatrix (Variante A)

Um die Expression des SCNBP im Maushoden nachweisen zu können, habe ich zunächst lösliche Proteine aus fünf Maushoden präpariert (~25 mg) und das Proteingemisch (Input) mit 125 μ l einer PADK-4F9/Säulenmatrix, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, inkubiert. Folgende Kontrollexperimente wurden parallel durchgeführt: (1) lösliche Proteine aus Maushoden

wurden mit einer Säulenmatrix ohne immobilisierten Antikörper inkubiert; (2) anstelle der Proteinpräparation wurde Puffer B (2.9.3) mit der PADK-4F9/Säulenmatrix inkubiert; (3) Puffer B wurde mit einer Säulenmatrix ohne immobilisierten Antikörper inkubiert. Für eine Westernblot-Analyse der Immunpräzipitation habe ich jeweils 0,32 % des Inputs und des Durchflusses, jeweils 16 % der Wasch- und Elutionsfraktionen und jeweils 16 % der Elutionsfraktionen der Kontrollexperimente auf ein Gel aufgetragen. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern CPRH-2E10 bzw. #118-4. Abbildung 3.7 zeigt die Westernblot-Analysen der Immunpräzipitation.

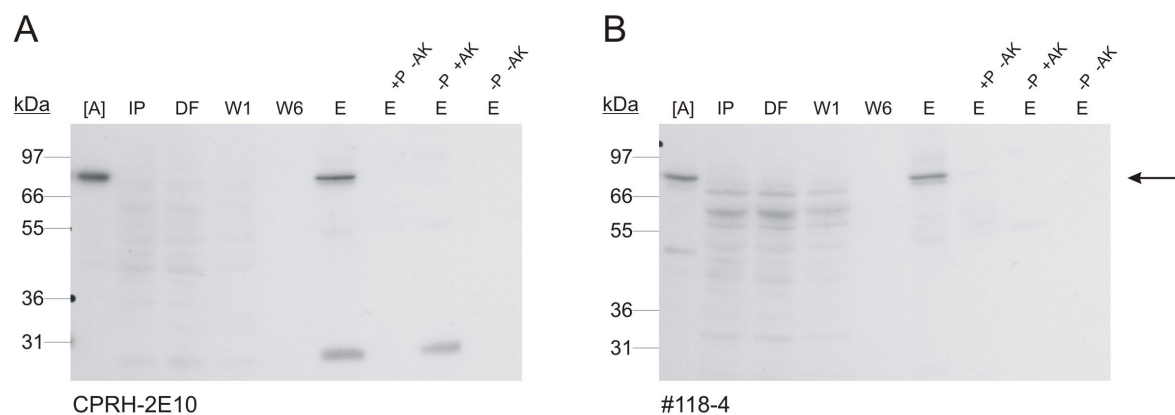


Abb. 3.7: Westernblot-Analyse der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus Maushoden an einer PADK-4F9/Säulenmatrix. Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Aufgetragen sind die Fraktionen der Immunpräzipitation. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. **A)** Nachweis mit dem Antikörper CPRH-2E10 (Verdünnung 1:2). **B)** Nachweis mit dem Antikörper #118-4 (Verdünnung 1:5.000). [A]: 10 µg lösliche Proteine aus pcA-mSCNBP[A]HA-transfizierten HEK293-Zellen; IP (Input): 0,32 % des Auftrags (entspricht 80 µg Protein); DF (Durchfluss): 0,32 % des Durchflusses; W1 (Wash 1): 16 % der ersten Waschfraktion; W6 (Wash 6): 16 % der letzten Waschfraktion; E (Eluat): 16 % der Elutionsfraktion; E^{+P-AK}: 16 % der Elutionsfraktion aus Kontrollexperiment 1 (lösliche Proteine aus Maushoden an einer Säulenmatrix ohne immobilisierten Antikörper); E^{-P-AK}: 16 % der Elutionsfraktion aus Kontrollexperiment 2 (Puffer B an einer PADK-4F9/Säulenmatrix); E^{-AK}: 16 % der Elutionsfraktion aus Kontrollexperiment 3 (Puffer B an einer Säulenmatrix ohne immobilisierten Antikörper). Der Pfeil kennzeichnet die Position von mSCNBP[A]HA.

In Spur [A] waren 10 µg lösliche Proteine aus HEK293-Zellen aufgetragen, die mit pcA-mSCNBP[A]HA transfiziert worden waren. Mit Hilfe der Antikörper CPRH-2E10 (Abb. 3.7 A) bzw. #118-4 (Abb. 3.7 B) lässt sich mSCNBP[A]HA nachweisen. Keiner der Antikörper markiert im Input (IP) eine Bande entsprechender Größe. Auch lässt sich das mSCNBP[A] weder im Durchfluss (DF), noch in einer der Waschfraktionen (W1, W6) nachweisen. Im Eluat (E) erkennen beide Antikörper eine Bande auf der Höhe des heterolog exprimierten mSCNBP[A]. In den Elutionsfraktionen der Kontrollen wird keine entsprechende Bande von den Antikörpern markiert. Der Antikörper CPRH-2E10 erkennt in der Elutionsfraktion zusätzlich Banden bei ca. 50 kDa und 30 kDa. Diese Banden werden

auch im Eluat der Kontrolle markiert, bei der Puffer B mit der PADK-4F9/Säulenmatrix inkubiert wurde (E^{-P+AK}). Ich schließe daraus, dass es sich bei diesen Banden um leichte bzw. schwere Ketten der Antikörper handeln muss.

Um mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen, ob es sich bei dem präzipitierten Protein (Abb. 3.7) um das SCNBP handelt, wurde das Eluat der Immunpräzipitation massenspektrometrisch analysiert. 80 % der Proteine des Eluates wurden in einem 7,5 - 15 % PAA-Gradientengel aufgetrennt (2.11.1). Das Gel wurde mit Rapid Coomassie-Blau gefärbt (Abb. 3.8).

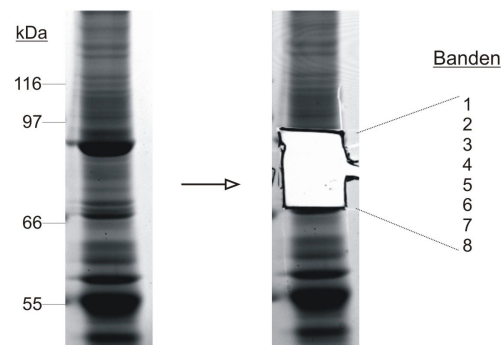


Abb. 3.8: Rapid Coomassie-Färbung des Eluates einer Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus Maushoden an einer PADK-4F9/Säulenmatrix. Die Proteine wurden in einem 7,5 - 15 %igen PAA-Gradientengel aufgetrennt. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben. Der Bereich zwischen 66 und 97 kDa wurde in acht Banden zerteilt (rechts angedeutet). Diese Banden wurden massenspektrometrisch analysiert.

Der Bereich zwischen 66 und 97 kDa wurde in acht Gelstücke (Abb. 3.8) geschnitten. Die massenspektrometrische Analyse wurde von Dr. E. Krause (FMP Berlin) durchgeführt. Dabei wurden die Proteine enzymatisch in der Gelmatrix mit Trypsin gespalten und die Peptidmischung mittels Kapillarflüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) analysiert. Abbildung 3.9 verdeutlicht das Prinzip.

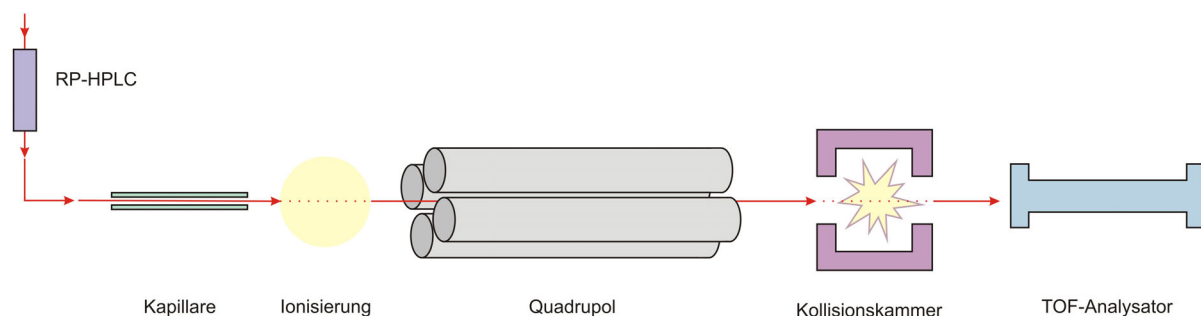


Abb. 3.9: Prinzip der LC-ESI-MS/MS. Peptide werden über *Reversed-Phase-HPLC* (RP-HPLC) aufgetrennt und über eine Kapillare in das System injiziert. Nach der Ionisierung erreichen die Ionen über ein Quadrupol und eine Kollisionskammer den TOF (*time of flight*)-Analysator. Weitere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

Gelelektrophoretisch getrennte Proteine können anhand der Massen ihrer tryptischen Peptidfragmente in einer Proteinsequenzdatenbank identifiziert werden. Dabei wird eine Liste der Massen der Peptide, die aus der Proteinbande stammen, mit einer Liste von Massen der theoretisch zu erwartenden Peptidfragmente aller Proteine der Datenbank (*in silicio* Spaltung) verglichen. Zusätzlich dazu wurden in der vorliegenden Analyse noch Sequenzinformationen zu den tryptischen Peptiden aus MS/MS-Spektren verwendet. Dabei werden die gemessenen MS/MS-Spektren der Peptide mit den theoretisch erzeugten Fragmentationen aller tryptischen Peptide dieser Massen in der Datenbank verglichen. Die Methode erlaubt die eindeutige Identifizierung von Proteinen mit Hilfe von nur ein bis zwei Peptidmassen und den dazugehörigen Fragmentationenspektren. Die hohe Empfindlichkeit massenspektrometrischer Methoden in Kombination mit miniaturisierter Kapillarchromatographie (nano-LC) ermöglicht sowohl die Analyse von sehr komplexen Proteingemischen, als auch die Identifizierung von einzelnen Proteinen mit Femtomol-Empfindlichkeit.

Die Auftrennung der Peptide erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen an einer Umkehrphasen-Kapillarsäule (*Reversed-Phase-HPLC*, RP-HPLC in Abb. 3.9). Der ESI-Prozess beginnt mit der kontinuierlichen Zuführung des Eluenten an die Spitze einer leitfähigen Kapillare. In dem angelegten elektrischen Feld zwischen Kapillarspitze und Massenspektrometer werden die gelösten Peptide desolvatisiert und ionisiert. Im MS-Modus werden die Massen der Peptidionen direkt mit dem TOF (*time of flight*)-Analysator des Massenspektrometers bestimmt.

Um die Aminosäuresequenz eines Peptids zu bestimmen, sind dem Flugzeitmassenspektrometer ein Quadrupol und eine Kollisionskammer vorgeschaltet (Abb. 3.9). Im MS/MS-Modus fungiert der Quadrupol im Wesentlichen als Massenfilter. Unter dem Einfluss eines kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeldes erreichen ausschließlich Ionen eines definierten m/z -Verhältnisses (Vorläuferionen) die nachgeschaltete Kollisionskammer. Durch Zusammenstöße mit einem Stoßgas (Argon) werden die Vorläuferionen in der Kollisionskammer in Fragmentationen zerlegt, deren Massen anschließend mit dem TOF-Analysator (Abb. 3.9) bestimmt werden. Über die gesamte LC-MS Analyse eines tryptischen Verdaus werden kontinuierlich MS-Spektren gemessen, wobei das Instrument zur Aufnahme von Fragmentationenspektren der Peptidionen (Vorläuferionen) mit der höchsten Signalintensität zwischenzeitlich in den MS/MS-Modus umschaltet.

Um eine maximale Empfindlichkeit für den Nachweis des SCNBP zu erreichen, wurden die experimentellen Bedingungen so eingestellt, dass ausschließlich mSCNBP-Peptide fragmentiert und somit analysiert wurden. Die berechneten MS/MS-Spektren wurden mit

Hilfe der Datenbanksuchmaschine MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) mit Einträgen der Proteindatenbank „Special_mSCNBP“ (spezielle Datenbank, die nur die Sequenz des mSCNBP[A] enthält) sowie mit der Datenbank SwissProt verglichen. Abbildung 3.10 zeigt die Aminosäuresequenz von mSCNBP[A]. Die massenspektrometrisch identifizierten Sequenzbereiche sind gekennzeichnet.

```

1  MNRSANPEAASSTSHVKFDLGKSVDISSTDTKDGGTARSPLEPADKSDTT
51  ESKSESGSDSRSEEDKESPASIKEIKAETPQPKDRPGVQIKLSWSQIKIS
101 WTAKKKRKLYQLVIDIIMNVRCKMFRQGLRGFREYQIIEPVHKKHPDFS
151 FWDKKKQGRISFVTEDFAAQEGHFPPRAISITQKKPSWRTHQEIQDLJNI
201 LQALDCYRSYTESLQLLAKVIRFERFGRRRVIVKKQMGNSFYFIYLG
251 VAITEDEDGSSAFLDPHPTLLHRGGSFGEMGLLSTTVRSATVVCMEETEF
301 LVVDREDFVANKLGDEVQKETQYRYNFFRNLDIFQSWSEEKLWKLVALGR
351 IERFSYQMVSKDFMNSAFITFICQGNCEILRLVALGDCSAYYKVVWQQL
401 ELLDHKPLRIHDNEISPKERFKELQIKSYPLQDFTYLKLLRLQAREQQG
451 IDFHGKINKVENTLPKLLGPKIKSRYGHPVKCSMVNTKFGELPKEAIVGV
501 YMKIHKTEEGEIVGLHQAFVPEIQRDCRPFILLSLGSSELIQVRKEKFYDM
551 VDEETRAKIIKMDVDYPSDEDLCSFLKENDYIVFRKDLLQLLVEPLNKS
601 FFIPVQTKKKEIYNHKSFLDLCSLEKKVKQHYPIFLAPQKYLPLRVVQ
651 AISAPRHKIQELLPQYKNAGVLI

```

Abb. 3.10: Aminosäuresequenz von mSCNBP[A]. Die durch Massenspektrometrie identifizierten Sequenzbereiche sind in roter Schrift dargestellt. In Sequenzbereichen, in denen mehrere Peptide identifiziert wurden, sind die einzelnen Peptide durch eckige Klammern über- oder unterhalb der jeweiligen Sequenz markiert. Die Ziffern links bezeichnen die Position der jeweils ersten Aminosäure der Zeile in der Primärstruktur des Proteins.

In den Banden 4 und 5 (Abb. 3.8) konnte das mSCNBP eindeutig nachgewiesen werden. Es wurden 16 tryptische Peptide von mSCNBP[A] identifiziert. Die Sequenzabdeckung betrug 22 %. Bei der von den Antikörpern CPRH-2E10 und #118-4 markierten Bande im Eluat der Immunpräzipitation (Abb. 3.7) handelt es sich also um ein authentisches Signal. Vermutlich ist das präzipitierte Protein die SCNBP-Variante A (vgl. 3.3.2).

Immunpräzipitation mit Membranproteinen aus Maushoden an einer PADK-4F9/Säulenmatrix (Variante A)

Da der Antikörper CPRH-2E10 Proteine der Größe von mSCNBP[A] auch in Membranproteinen aus Maushoden erkennt, (Abb. 3.3 B, oberer Pfeil), habe ich überprüft, ob ich mSCNBP[A] aus der Membranproteinfraction des Maushodens präzipitieren kann. Hierzu wurden 85 µl PADK-4F9/Säulenmatrix für eine Immunpräzipitation mit solubilisierten Membranproteinen aus 13 Maushoden (~17 mg) eingesetzt. Die Immunpräzipitation wurde

wie unter 2.13.1.2 beschrieben durchgeführt. Ich habe jeweils 23,5 % der Elutionsfraktion auf ein Gel aufgetragen. Das entsprach einer Menge von 4 mg eingesetztem Protein aus dem Input. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Zum Vergleich wurden 16 % der Elutionsfraktion aus der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte durch den Antikörper CPRH-2E10 bzw. #118-4. Zur Kontrolle wurde der Westernblot auch nur mit den Zweitantikörpern α -rabbit und α -rat inkubiert. Abbildung 3.11 zeigt die Westernblot-Analyse.

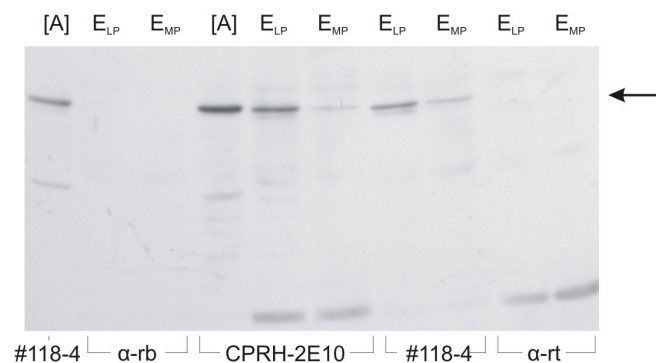


Abb. 3.11: Westernblot-Analyse der Eluate der Immunpräzipitationen mit solubilisierten Membranproteinen bzw. löslichen Proteinen aus Maushoden an einer PADK-4F9/Säulenmatrix. Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Aufgetragen sind die Eluate der Immunpräzipitationen. Der Pfeil kennzeichnet die Position von mSCNBP[A]HA. Die verwendeten Erstantikörper bzw. Zweitantikörper sind im unteren Teil der Abbildung angegeben. [A]: 10 μ g lösliche Proteine pcA-mSCNBP[A]HA-transfizierten HEK293-Zellen; E_{LP}: 16 % der Elutionsfraktion der Immunpräzipitation mit löslichen Proteine; E_{MP}: 23,5 % der Elutionsfraktion der Immunpräzipitation mit Membranproteinen.

Das SCNBP[A] kann auch aus solubilisierten Membranproteinen des Maushodens präzipitiert werden. Die Antikörper CPRH-2E10 und #118-4 erkennen im Eluat (E_{MP}) eine Bande bei der Größe des heterolog exprimierten mSCNBP[A] (Spur [A]). Die Zweitantikörper α -rabbit bzw. α -rat markieren keine Bande. Es handelt sich also um ein spezifisches Signal der verwendeten Erstantikörper. Vergleicht man die Intensität der SCNBP-Banden, so findet man eine stärkere Markierung für die Fraktion der löslichen Proteine. Vermutlich liegt das SCNBP zum größten Teil als lösliches Protein im Zytosol vor. Ein Grund dafür, warum das SCNBP auch in der Membranfraktion nachweisbar ist, könnte sein, dass Wechselwirkungen des SCNBP mit Membranproteinen oder der Membran während des Zellaufschlusses erhalten bleiben. Dadurch würde ein Anteil des SCNBP bei der Proteinpräparation mit den Membranproteinen pelletiert. Ein weiterer Grund wäre, dass ein Teil des SCNBP un- oder nicht korrekt gefaltet vorliegt, daher aggregiert und mit abzentrifugiert werden kann.

Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus Maushoden an einer CPRH-2E10/Säulenmatrix (Varianten A und B)

Um zu überprüfen, ob auch die Variante B des Proteins im Maushoden exprimiert wird, wurden 100 µl der CPRH-2E10/Säulenmatrix für Immunpräzipitationen mit ~20 mg löslichen Proteinen aus Maushoden eingesetzt (2.13.1.2). Zur Auswertung der Immunpräzipitation wurden je 20 % der Elutionsfraktion durch SDS-PAGE aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Als Positivkontrolle wurden neben jeder Spur mit Eluat lösliche Proteine mSCNBP[A]HA-transfizierter HEK293-Zellen aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern PADK-4F9, CPRH-2E10 bzw. #118-4. Abbildung 3.12 zeigt die Westernblot-Analyse der Immunpräzipitation an der CPRH-2E10/Säulenmatrix.

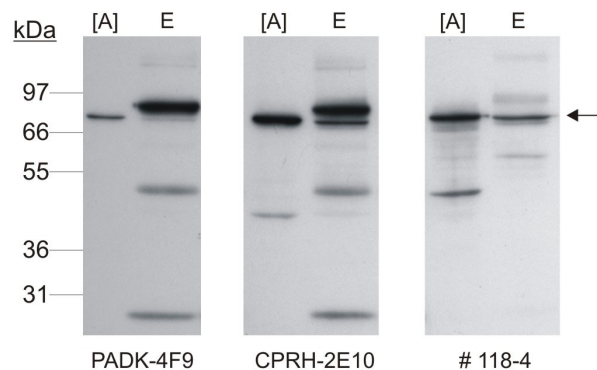


Abb. 3.12: Westernblot-Analyse des Eluates der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus Maushoden an einer CPRH-2E10/Säulenmatrix. Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Die verwendeten Antikörper sind im unteren Teil der Abbildung angegeben. [A]: 10 µg lösliche Proteine pcA-mSCNBP[A]HA-transfizierten HEK293-Zellen; E: 20 % der Elutionsfraktion. Der Pfeil kennzeichnet die Position von mSCNBP[A]HA.

Das heterolog exprimierte mSCNBP[A]HA aus HEK293-Zellen wird von allen verwendeten Antikörpern erkannt (Spuren [A]). In den Spuren, in denen das Eluat der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus Maushoden an einer CPRH-2E10/Säulenmatrix aufgetragen ist (E), markieren alle verwendeten Antikörper unterschiedlich stark eine Bande auf der Höhe des heterolog exprimierten mSCNBP[A]HA. Die Antikörper erkannten keine Bande bei der Größe des mSCNBP[B] (65,1 kDa). Auch wenn die fünffache Proteinmenge (~104 mg) zur Immunpräzipitation eingesetzt wurde, erkannte der Antikörper CPRH-2E10 keine entsprechende Bande (Abb. 3.14 unter 3.3). Dies deutet darauf hin, dass die SCNBP-Variante B im Maushoden nicht exprimiert wird.

3.2.2.3 Immunpräzipitation von SCNBP aus Keimzellen und Nebenhodenspermien

Da die SCNBP-mRNA ausschließlich in Spermatozyten vorkommt (Diplomarbeit M. Krähling, 2006), wollte ich überprüfen, ob das Protein in Keimzellen oder Nebenhodenspermien der Maus vorkommt. Hierzu habe ich Keimzellen aus 20 Maushoden angereichert (2.9.2.1). Die löslichen Proteine (~26 mg) sowie die Membranproteine (~13 mg) wurden präpariert (2.9.3). Zur Immunpräzipitation wurden 20 mg lösliche Proteine mit 100 µl PADK-4F9/Säulenmatrix bzw. 13 mg solubilisierter Membranproteine mit 57 µl PADK-4F9/Säulenmatrix inkubiert. Des Weiteren wurden Nebenhodenspermien aus 20 Nebenhoden präpariert (2.9.2.2) und die löslichen (~0,4 mg) bzw. solubilierten Membranproteine (~0,2 mg) zur Immunpräzipitation mit jeweils 45 µl PADK-4F9/Säulenmatrix eingesetzt. Die Immunpräzipitation wurde wie unter 2.13.1.2 beschrieben durchgeführt. Bei den Experimenten mit Proteinen aus Nebenhodenspermien erfolgte die Elution der gebundenen Proteine aufgrund der geringen Ausgangsproteinmenge mit dem einfachen Säulenvolumen Elutionspuffer.

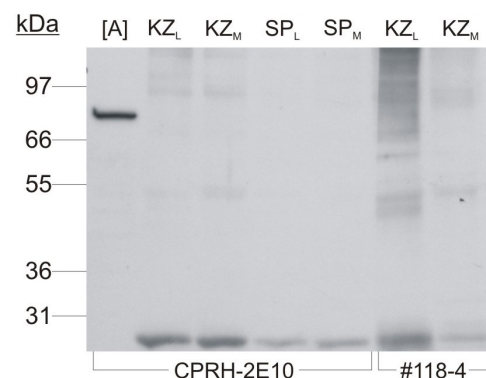


Abb. 3.13: Westernblot-Analyse der Eluate von Immunpräzipitationen mit Proteinen aus Keimzellen bzw. Nebenhodenspermien der Maus an einer PADK-4F9/Säulenmatrix. Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben. Die verwendeten Antikörper sind im unteren Teil der Abbildung angegeben. [A]: 10 µg lösliche Proteine aus pcA-mSCNBP[A]HA-transfizierten HEK293-Zellen; KZ_L: 20 % der Elutionsfraktion der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus angereicherten Keimzellen; KZ_M: 33 % der Elutionsfraktion der Immunpräzipitation mit solubilierten Membranproteinen aus angereicherten Keimzellen; SP_L: gesamte Elutionsfraktion der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus Nebenhodenspermien; SP_M: gesamte Elutionsfraktion der Immunpräzipitation mit solubilierten Membranproteinen aus Nebenhodenspermien.

Im Falle der Keimzellpräparation wurden 20 % des Eluates aus löslichen Proteinen und 33 % des Eluates aus solubilierten Membranproteinen aufgetragen. Dies entspricht einer Menge von 4 mg eingesetztem Protein aus dem Input. Im Falle der Nebenhodenspermienpräparation wurde das gesamte Eluat der Immunpräzipitationen aufgetragen. Abbildung 3.13 zeigt die Westernblot-Analyse der Eluate. Der Nachweis erfolgte mit den Antikörpern CPRH-2E10

und #118-4. In keinem der Eluate wurde eine Bande bei der Größe des heterolog exprimierten mSCNBP[A] markiert. Die SCNBP-Variante A konnte somit weder in Keimzellen noch in Nebenhodenspermien nachgewiesen werden. Die Ausbeute der Proteinpräparation aus Nebenhodenspermien war sehr gering (0,4 mg lösliche Proteine aus 20 Nebenhoden). Deutlich mehr Nebenhodenspermien müssten eingesetzt werden, um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erreichen.

Mit Hilfe der Immunpräzipitation konnte in Westernblot-Analysen gezeigt werden, dass die SCNBP-Variante A im Maushoden exprimiert wird. Das Protein liegt zum größten Teil löslich vor. Eine Expression der kurzen SCNBP-Variante im Maushoden konnte nicht nachgewiesen werden. Weder in Keimzellen noch in Nebenhodenspermien konnte ich das SCNBP nachweisen.

3.3 Massenspektrometrische Identifizierung potentieller Interaktionspartner und präzipitierter SCNBP-Varianten

Die physiologische Funktion des SCNBP ist bisher nicht bekannt. Die Identifizierung von Interaktionspartnern könnte zur Aufklärung der Funktion des SCNBP beitragen. Eine Methode, Interaktionspartner eines Proteins zu finden, ist die Koimmunpräzipitation. Proteine, die an das SCNBP binden, können während der Immunpräzipitation an einer SCNBP-spezifischen Antikörper/Säulenmatrix zusammen mit dem SCNBP präzipitiert und massenspektrometrisch identifiziert werden. Für die Koimmunpräzipitation wurden Säulenmatrizes mit den Antikörpern CPRH-2E10 und PADK-4F9 verwendet. Lösliche Proteine aus 120 Maushoden wurden präpariert (2.9.2, 2.9.3). Zunächst wurden die Proteine dieser Präparation mit 1 ml Protein G-Sepharose 1 h bei 4 °C vorinkubiert. Die Protein G-Sepharose mit den gebundenen Proteinen wurde anschließend durch Zentrifugation sedimentiert. Durch diesen ersten Arbeitsschritt sollte ein großer Teil der Proteine entfernt werden, die unspezifisch an die Säulenmatrix binden. Der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen wurde dann nach einer Proteinbestimmung (2.10.1) zur Immunpräzipitation eingesetzt.

Für die Immunpräzipitation wurden Proteine aus 30 Maushoden (~104 mg Protein) mit 175 µl Antikörper/Säulenmatrix (CPRH-2E10 bzw. PADK-4F9) und als Kontrolle mit Protein G-Sepharose ohne immobilisierten Antikörper inkubiert. Die Immunpräzipitation wurde wie unter 2.13.1.2 beschrieben durchgeführt. Die gebundenen Proteine wurden mit dem einfachen

Säulenvolumen Elutionspuffer von der Säule eluiert. Mittels Westernblot wurde die Immunpräzipitation überprüft. Hierzu wurden die Proteine aus 16 % der Elutionsfraktionen bzw. der Kontrollen durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem Antikörper CPRH-2E10. Abbildung 3.14 zeigt den Westernblot der Immunpräzipitation löslicher Proteine aus Maushoden an einer CPRH-2E10 bzw. PADK-4F9/Säulenmatrix.

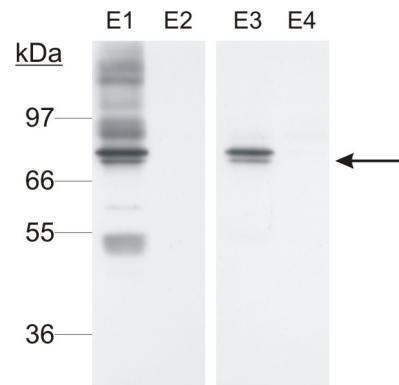


Abb. 3.14: Westernblot der Eluate von Immunpräzipitationen mit löslichen Proteinen aus Maushoden. Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem Antikörper CPRH-2E10 (Verdünnung 1:2). E1: 16 % der Elutionsfraktion der Immunpräzipitation an einer CPRH-2E10/Säulenmatrix; E2: 16 % der Elutionsfraktion der Immunpräzipitation an Protein G-Sepharose; E3: 16 % der Elutionsfraktion der Immunpräzipitation an einer PADK-4F9/Säulenmatrix; E4: 16 % der Elutionsfraktion der Immunpräzipitation an Protein G-Sepharose. Der Pfeil kennzeichnet die Position von mSCNBP[A].

Im Eluat der Immunpräzipitationen an den Antikörper/Säulenmatrizes (E1 und E3) markiert der Antikörper CPRH-2E10 eine Bande bei der Größe des heterolog exprimierten mSCNBP[A] (MW = 78,9 kDa) (Abb. 3.14, gekennzeichnet durch den Pfeil). In den Eluaten der Kontrollen (E2 und E4) wird keine entsprechende Bande markiert. Zusätzlich markiert der Antikörper CPRH-2E10 in den Eluaten 1 und 3 eine Bande von ca. 81 kDa. Diese Bande wird vom Antikörper #118-4 nicht erkannt (vgl. Abb. 3.12). Demnach scheint es sich bei dieser Bande um ein Protein zu handeln, mit dem die Antikörper CPRH-2E10 und PADK-4F9 oder der verwendete Zweitantikörper kreuzreagieren. Im Eluat der Immunpräzipitation an der CPRH-2E10/Säulenmatrix markiert der Antikörper CPRH-2E10 zahlreiche weitere Banden, die im Eluat der Immunpräzipitation an der PADK-4F9/Säulenmatrix nicht markiert werden. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um unspezifisch markierte Proteine.

Um die Proteine aus den Eluaten der Immunpräzipitation zu identifizieren, wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine in einem 4 - 19 % PAA-Gradientengel aufgetrennt (2.11.1) und mit Rapid Coomassie-Blau gefärbt (Abb. 3.15).

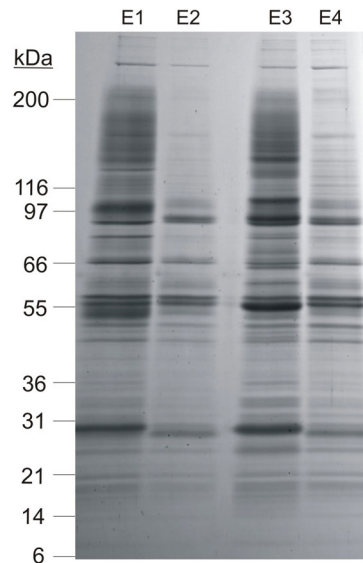


Abb. 3.15: Rapid Coomassie-Färbung der Eluate von Immunpräzipitationen mit löslichen Proteinen aus Maushoden. Die Proteine wurden in einem 4 - 19 %igen PAA-Gradientengel aufgetrennt. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben. E1: 70 % des Eluates der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus Maushoden an einer CPRH-2E10-Säulenmatrix; E2: 70 % des Eluates der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus Maushoden an einer Säulenmatrix ohne Antikörper; E3: 70 % des Eluates der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus Maushoden an einer PADK-4F9-Säulenmatrix; E4: 70 % des Eluates der Immunpräzipitation mit löslichen Proteinen aus Maushoden an einer Säulenmatrix ohne Antikörper.

Jede Spur wurde in jeweils 40 Gelstücke von 1,5 - 3 mm Dicke geschnitten. Dabei enthielt das erste Gelstück die erste sichtbar angefärbte Proteinbande (MW > 200 kDa), das letzte Gelstück enthielt Proteine mit einer Molmasse von ~6 kDa. Unterhalb von 6 kDa waren mit Rapid Coomassie-Blau keine Banden zu erkennen. Die Spuren E1 und E2 sowie die Spuren E3 und E4 wurden in jeweils einem Arbeitsschritt geschnitten, so dass die Proteine, die in jeweils beiden Spuren vorkommen, auch in diesen „Banden“ erscheinen. In Zusammenarbeit mit Dr. E. Krause (FMP Berlin) wurden die Proteine in den Banden massenspektrometrisch identifiziert (vgl. 3.2.2.2).

3.3.1 Potentielle Interaktionspartner

Als Interaktionspartner des SCNBP kommen nur die Proteine in Frage, die in den Eluaten beider Antikörper/Säulenmatrizes, nicht aber im Eluat der Kontrollsäule enthalten sind. In Tabelle 3.1 sind diese Proteine aufgelistet. Zu jedem Kandidaten sind eine NCBI-Zugangsnummer und die Bezeichnung des Proteins aufgeführt. Oft wird ein und dasselbe Protein in der NCBI-Datenbank unter mehreren Zugangsnummern (*accession* Nr.) geführt.

Zusätzlich können weitere Zugangsnummern für unterschiedliche Splicevarianten desselben Proteins vorhanden sein. Eine vollständige Liste mit allen Zugangsnummern der identifizierten Proteine befindet sich im Anhang (6.3). Die Proteine, die sowohl in den Eluaten der beiden Antikörper/Säulenmatrizes als auch in den Eluaten der Kontrollsäulen identifiziert wurden, sind nicht aufgeführt.

Tab. 3.1: Mögliche Interaktionspartner des mSCNBP.

#	NCBI Acc. Nr	Protein
1	94390964	PREDICTED: hypothetical protein LOC69926
2	124486933	Extraembryonic development protein
3	38424077	Protein kinase, lysine deficient 1
4	94400269	PREDICTED: hypothetical protein
5	7710042	IQ motif containing GTPase activating protein 1
6	70887772	Sperm associated antigen 9 isoform 1
7	27369782	Gem (nuclear organelle) associated protein 5
8	20073094	Nardilysin, N-arginine dibasic convertase, NRD convertase 1
9	82997081	PREDICTED: similar to YTH domain containing 2
10	16740643	Dhx30 protein ; DEAH-box helicase DHX30
11	94730677	WD repeat protein 19
12	37538012	TBC1 domain family member 1
13	51555858	Strawberry notch homolog 1
14	13937395	Arsenate resistance protein 2
15	46195739	RNA polymerase III subunit RPC2
16	22122717	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3
17	2495342	Heat shock 70 kDa protein 4 (APG-2)
18	6754206	Hexokinase 1
19	3834675	Interleukin enhancer binding factor 3
20	20532094	Kinesin-associated protein 3 (KAP3)
21	13638207	6-phosphofructokinase, muscle type (Phosphofructokinase 1) (Phosphohexokinase)
22	85701985	Hypothetical protein LOC381738
23	115385968	Transportin 1 isoform 1
24	40068493	DEAD box polypeptide 17 isoform 1
25	74151347	Unnamed protein product
26	20982845	Pigpen
27	6753518	Insulin-like growth factor 2, binding protein 1
28	12746442	Eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA-specific
29	3860189	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2 protein homolog
30	30017383	Vacuolar protein sorting 33B
31	31980994	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7
32	78100038	Dynactin subunit 4 (Dynactin subunit p62)
33	11230780	Tumor susceptibility gene 101 protein
34	7657607	Sperm associated antigen 6
35	23396474	Actin-like protein 6A (53 kDa BRG1-associated factor A)
36	1350831	Programmed cell death protein 2 (Zinc finger protein Rp-8)
37	31982526	Parvin, alpha
38	16716445	Allantoicase
39	113866007	Immunoglobulin (CD79A) binding protein 1b
40	16741389	Rtd1 protein
41	33942104	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1
42	22122515	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1

43	15214218	Multifunctional protein ADE2
44	9789887	ARP10 actin-related protein 10 homolog
45	6016389	Plasma serine protease inhibitor precursor (PCI) (Protein C inhibitor) (Serpin A5)
46	124001574	General transcription factor II I isoform 1
47	21703948	Replication factor C (activator 1) 4
48	13195602	Hsp70-interacting protein
49	9790019	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1
50	4092671	KH domain RNA binding protein QKI-5A
51	19882207	Farnesyl diphosphate synthetase
52	38083783	PREDICTED: similar to mortality factor 4 like 1 isoform b
53	13385328	Fibronectin type 3 and ankyrin repeat domains 1
54	12025542	Arsa (bacterial) arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1
55	28201956	RAE1 RNA export 1 homolog
56	31982373	Fibrillarin
57	595917	Capping protein alpha 1 subunit
58	19353472	Jtv1-pending protein
59	117606409	WBP2 N-terminal like
60	7710036	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
61	18044843	Cab39 protein
62	15809008	FK506 binding protein 6
63	121674797	Palmitoyl-protein thioesterase 1
64	3342500	Protein phosphatase type 2A catalytic subunit alpha isoform
65	88196767	Myeloid leukemia factor 1 isoform a
66	6678235	Transcription elongation factor A protein 2
67	51765108	PREDICTED: hypothetical protein LOC77305 isoform 1
68	13277350	WD repeat domain 61 isoform a
69	110625961	Replication protein A2
70	27229063	Proteasome 26S non-ATPase subunit 8
71	42475954	ATPase, H ⁺ transporting, V1 subunit E-like 2 isoform 2
72	12963799	Atpase, H ⁺ transporting, V1 subunit D
73	12839675	Unnamed protein product
74	12659144	Mage-g2
75	21313192	Hypothetical protein LOC76411
76	20149310	Ovary-specific MOB-like protein
77	21313424	Dr1 associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)
78	85677510	Eukaryotic translation initiation factor 4E member 2 isoform 1
79	123295852	Peroxiredoxin 4
80	31541826	Calcium binding protein 39-like
81	3142331	Calcyclin binding protein
82	7021537	U2 small nuclear ribonucleoprotein A'
83	31982028	Ras suppressor protein 1
84	38083795	PREDICTED: proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 8 isoform 1
85	18202600	Proteasome activator complex subunit 1 (Proteasome activator 28-alpha subunit)
86	85677506	Eukaryotic translation initiation factor 4E member 2 isoform 3
87	6755196	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 4
88	10946940	RAB2, member RAS oncogene family
89	21312044	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 12
90	20987342	Dtymk protein
91	6677781	Ribosomal protein L29
92	21313158	RAB, member of RAS oncogene family-like 4
93	123123576	Tudor domain containing 7
94	25092662	Vacuolar protein sorting 25
95	539918	Bcl-2-associated protein x - mouse

96	90108454	Dynactin subunit 3 (Dynactin light chain p24)
97	3114602	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
98	31560517	Ribosomal protein L27a
99	6680924	Cofilin 1, non-muscle
100	31543918	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
101	94385943	PREDICTED: similar to ribosomal protein L36
102	12842823	Unnamed protein product
103	26337731	Unnamed protein product
104	116643146	Peroxiredoxin 6-related sequence 1
105	21594169	Ribosomal protein S9

Es wurden 105 Proteine als mögliche Interaktionspartner des SCNBP identifiziert. Mögliche zelluläre Prozesse, an denen das SCNBP durch die Interaktion mit diesen Proteinen beteiligt sein könnte, diskutiere ich in Abschnitt 4.3.

Das SCNBP konnte in den Eluaten beider Immunpräzipitationen (E1 und E3) mit einer hohen Sequenzabdeckung nachgewiesen werden. In Bande 17 des Eluates der Immunpräzipitation mit dem CPRH-2E10-Antikörper (E1) betrug die Sequenzabdeckung 12 %, in Bande 18 betrug sie 64 % und in Bande 19 30 %. Die Sequenzabdeckung im Eluat der Immunpräzipitation mit dem PADK-4F9-Antikörper (E3) betrug 8 % in Bande 15, 61 % in Bande 16, 35 % in Bande 17, 8 % in Bande 18 und 5 % in Bande 19. In Tabelle 3.2 ist zu allen Banden die Sequenzabdeckung gezeigt, mit welcher das SCNBP nachgewiesen wurde.

Tab. 3.2: Sequenzabdeckung des SCNBP. In den Spalten E1 bis E4 ist angegeben, mit welcher Sequenzabdeckung das SCNBP in der entsprechenden Bande nachgewiesen wurde. Links von der Tabelle ist die ungefähre Molmasse der Proteine in den entsprechenden Banden angegeben.

	Bande	E1	E2	E3	E4
~kDa	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	7	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
	9	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
	11	-	-	-	-
	12	-	-	-	-
	13	-	-	-	-
	14	-	-	-	-
	15	-	-	8 %	
	16	-	-	61 %	2 %
	17	12 %	-	35 %	-
	18	64 %	15 %	8 %	-
	19	30 %	-	5 %	-
	20	-	-	-	-
	21	-	-	-	-
	22	-	-	-	-
	23	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	26	-	-	-	-
	27	-	-	-	-
	28	-	-	-	-
	29	-	-	-	-
	30	-	-	-	-
	31	-	-	-	-
	32	-	-	-	-
	33	-	-	-	-
	34	-	-	-	-
	35	-	-	-	-
	36	-	-	-	-
	37	-	-	-	-
	38	-	-	-	-
6	39	-	-	-	-
	40	-	-	-	-

Auch in den Eluaten der Kontrollsäulen ließ sich das SCNBP nachweisen. Der relative Anteil des SCNBP in diesen Eluaten ist aber gering (vgl. auch Abb. 3.14). In Bande 16 des Eluates des Kontrollexperiments 4 (E4) betrug die Sequenzabdeckung des SCNBP lediglich 2 %, in Bande 18 des Eluates des Kontrollexperiments 2 (E2) betrug sie 15 %. Dass das SCNBP in den Eluaten der Kontrollexperimente gefunden wurde, könnte verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise bindet das SCNBP oder einer seiner Interaktionspartner zu einem geringen Teil unspezifisch an die Protein G-Sepharose. Eine andere Erklärung ist, dass in geringem Maße auch Seitwärtsdiffusion der Proteine im Gel stattfindet. Vielleicht ist ein Teil des SCNBP in die Kontrollspuren diffundiert und wurde mit der sehr sensitiven Massenspektrometrie nachgewiesen. Das Problem, das sich aus beiden Möglichkeiten ergibt, ist, dass u.U. auch Proteine, die mit dem SCNBP interagieren, ausgeschlossen werden, da sie -

sei es durch Kopräzipitation mit dem SCNBP oder durch Seitwärtsdiffusion im Gel - in den Eluaten der Kontrollexperimente identifiziert werden. Ich werde in Kapitel 4.3 auf diese Problematik noch einmal eingehen.

3.3.2 Identifizierte SCNBP-Varianten

Im Anhang (6.4) sind die *Ensembl* bzw. *Vega Peptide-IDs* aller annotierten Maus-SCNBP-Varianten und die dazugehörigen NCBI-Zugangsnummern angegeben. Abbildung 3.16 zeigt den Aminosäuresequenzvergleich der annotierten SCNBP-Varianten aus der Maus. Die Sequenzen der Peptide, die als Antigene zur Herstellung der monoklonalen Antikörper PADK-4F9 und CPRH-2E10 verwendet wurden, sind in blauer Schrift und unterstrichen dargestellt. Die SCNBP-Varianten A und D enthalten die Sequenz des Antigens PADK, die SCNBP-Varianten A bis C enthalten die Sequenz des Antigens CPRH. Theoretisch können daher mit den Antikörpern CPRH-2E10 und PADK-4F9 die SCNBP-Varianten A bis D aus Maushoden präzipitiert werden. Im Westernblot wurde jedoch nur eine lange Variante des SCNBP bei ~78 kDa nachgewiesen (3.3). Anhand der annotierten Sequenzen muss es sich dabei um Variante A handeln.

Im Eluat der Immunpräzipitation an der CPRH-2E10-Säulenmatrix wurde die Variante A mit einer 64 %igen Sequenzabdeckung identifiziert. Dieselbe Probe enthielt auch ein Peptid (in Abb. 3.12 rot unterlegt), das nur der annotierten Variante C (Aminosäurepositionen 43 - 55) entspricht. In der NCBI-Datenbank gibt es kein anderes Protein, das diese Abfolge von Aminosäuren enthält. In derselben Probe wurden zwei Peptide identifiziert, die in diesem Sequenzbereich nur der Variante A (Aminosäuren 172 - 183) entsprechen (in Abb. 3.16 grün und gelb unterlegt). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sowohl Variante A als auch Variante C im Maushoden vorkommen. Im Westernblot wurde aber nur die Variante A nachgewiesen, deren Größe ~78 kDa beträgt. Die Variante C mit einer annotierten Länge von 544 Aminosäuren hätte eine errechnete Molmasse von ~64 kDa. Ein Protein dieser Größe konnte im Westernblot nicht nachgewiesen werden. Da beide Varianten in derselben Probe identifiziert wurden, ist eine mögliche Erklärung, dass Variante C länger ist als annotiert. Wenn für Variante C das gleiche Startkodon angenommen wird wie für Variante A, stimmt die errechnete Molmasse beider Varianten mit der Größe des im Westernblot nachgewiesenen Proteins überein.

In Bande 19 des Eluates der Immunpräzipitation mit dem CPRH-2E10-Antikörper (E1) betrug die Sequenzabdeckung des SCNBP 30 % (vgl. Tab. 3.2). Hier wurden nur SCNBP-Peptide identifiziert, die sowohl in Variante A als auch in Variante B vorkommen. Aus dem Sequenzbereich von Aminosäure 1 bis Aminosäure 117 der Variante A wurden keine Peptide identifiziert. Dass es sich bei dem identifizierten Protein um Variante B handelt, ist aber unwahrscheinlich, da bei 65 kDa, wo man Variante B im Westernblot findet (Abb. 3.2), keine Antikörpermarkierung zu beobachten war. Deshalb ist anzunehmen, dass auch das in Bande 19 identifizierte Protein die SCNBP-Variante A ist.

SCNBP A	MNRSANPEAASSTSHVKFDLKGKSVDISSTDTKDGGTARSPLE	<u>PADKSDTTESKSESGSDS</u>	60
SCNBP B	-----	-----	
SCNBP C	-----	-----	
SCNBP D	-----GKSVDISSTDTKDGGTARSPLE	<u>PADKSDTTESKSESGSDS</u>	40
SCNBP E	-----	-----	
SCNBP F	-----	-----	
SCNBP A	RSEEDKESPASIKEIKAETPQPKDRPGVQIKLSWSQIKISWTAKKKRKLQVLVIDIIMMN		120
SCNBP B	-----	-----MMN	3
SCNBP C	-----	-----MMN	3
SCNBP D	RSEEDKESPASIKEIKAETPQPKDRPGVQIKLSWSQIKISWTAKKKRKLQVLVIDIIMMN		100
SCNBP E	-----	-----MMN	3
SCNBP F	-----	-----	
SCNBP A	RVCKMFRQGLRGFREYQIIIEPVHKKHPDFSFWDKKKQGR	ISFVTEDFAAQEGHFPPRAIS	180
SCNBP B	RVCKMFRQGLRGFREYQIIIEPVHKKHPDFSFWDKKKQGR	ISFVTEDFAAQEGHFPPRAIS	63
SCNBP C	RVCKMFRQGLRGFREYQIIIEPVHKKHPDFSFWDKKKQGR	ISFVTEDFAAQEGHFPPRAIS	54
SCNBP D	RVCKMFRQGLRGFREYQIIIEPVHKKHPDFSFWDKKKQGR	ISFVTEDFAAQEGHFPPRAIS	160
SCNBP E	RVCKMFRQGLRGFREYQIIIEPVHKKHPDFSFWDKKKQGR	ISFVTEDFAAQEGHFPPRAIS	63
SCNBP F	-----MPSQRRRKPD---GKPLG-----LLGHFPPRAIS		27
SCNBP A	ITQKKPSWRTHQEIQDLCNILQALDCYRSYTESLQLLAKVIRFERFGRRRVIVKKQGMG		240
SCNBP B	ITQKKPSWRTHQEIQDLCNILQALDCYRSYTESLQLLAKVIRFERFGRRRVIVKKQGMG		123
SCNBP C	---KPSWRTHQEIQDLCNILQALDCYRSYTESLQLLAKVIRFERFGRRRVIVKKQGMG		111
SCNBP D	ITQKKPSWRTHQEIQDLCNILQALDCYRSYTESLQLLAKVIRFERFGRRRVIVKKQGMG		220
SCNBP E	ITQKKPSWRTHQEIQDLCNILQALDCYRSYTESLQLLAKVIRFERFGRRRVIVKKQGMG		123
SCNBP F	ITQKKPSWRTHQEIQDLCNILQALDCYRSYTESLQLLAKVIRFERFGRRRVIVKKQGMG		87
SCNBP A	NSFYFIYLGTVAITEDGSSAFLDPHPTLLHRGGSFGEMGLLSTTVRSATVVCMEETEF		300
SCNBP B	NSFYFIYLGTVAITEDGSSAFLDPHPTLLHRGGSFGEMGLLSTTVRSATVVCMEETEF		183
SCNBP C	NSFYFIYLGTVAITEDGSSAFLDPHPTLLHRGGSFGEMGLLSTTVRSATVVCMEETEF		171
SCNBP D	NSFYFIYLGTVAITEDGSSAFLDPHPTLLHRGGSFGEMGLLSTTVRSATVVCMEETEF		220
SCNBP E	NSFYFIYLGTVAITEDGSSAFLDPHPTLLHRGGSFGEMGLLSTTVRSATVVCMEETEF		183
SCNBP F	NSFYFIYLGTVAITEDGSSAFLDPHPTLLHRGGSFGEMGLLSTTVRSATVVCMEETEF		147
SCNBP A	LVVDREDFVANKLGDEVQKETQYRYNFFRNLDIFQSWSEEKLWKLVALGRIERFSYGQMV		360
SCNBP B	LVVDREDFVANKLGDEVQKETQYRYNFFRNLDIFQSWSEEKLWKLVALGRIERFSYGQMV		243
SCNBP C	LVVDREDFVANKLGDEVQKETQYRYNFFRNLDIFQSWSEEKLWKLVALGRIERFSYGQMV		231
SCNBP D	LVVDREDFVANKLGDEVQKETQYRYNFFRNLDIFQSWSEEKLWKLVALGRIERFSYGQMV		340
SCNBP E	LVVDREDFVANKLGDEVQKETQYRYNFFRNLDIFQSWSEEKLWKLVALGRIERFSYGQMV		243
SCNBP F	LVVDREDFVANKLGDEVQKETQYRYNFFRNLDIFQSWSEEKLWKLVALGRIERFSYGQMV		207
SCNBP A	SKDFMNSAFITFICQGNCEILRLVALGDCSAYYKVVWQQLELLDHKPLRIHDNEISPKER	G	420
SCNBP B	SKDFMNSAFITFICQGNCEILRLVALGDCSAYYKVVWQQLELLDHKPLRIHDNEISPKER		303
SCNBP C	SKDFMNSAFITFICQGNCEILRLVALGDCSAYYKVVWQQLELLDHKPLRIHDNEISPKER		291
SCNBP D	SKDFMNSAFITFICQGNCEILRLVALGDCSAYYKVVWQQLELLDHKPLRIHDN-----		393
SCNBP E	SKDFMNSAFITFICQGNCEILRLVALGDCSAYYKVVWQQLELLDHKPLRIHDN-----		296
SCNBP F	SKDFMNSAFITFICQ-----		222

Rahmen dieser Arbeit heterolog in CHO-Zellen exprimiert (3.4.2). Zur Isolierung größerer Proteinmengen wurden die Zellen fermentiert (3.4.3).

3.4.1 Klonierung des Konstruktes pcDNA3.1(+) mSCNBP[A]His₁₀

Um das SCNBP in CHO-Zellen zu exprimieren, wurde die cDNA (mSCNBP [A]) in einen Expressionsvektor kloniert. Der offene Leserahmen wurde mit Hilfe einer PCR am 3'-Ende um die Basensequenz für eine Thrombinschnittstelle, ein Dekahistidintag und ein Stoppkodon erweitert.

Zur Herstellung des Konstruktes wurde eine PCR (2.6) mit den Primern #4334 und #4419 auf dem Konstrukt pcDNA3.1(+) mSCNBP[B]His₆ durchgeführt. Dieses Konstrukt wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die Klonierungsstrategie ist im Anhang beschrieben (6.1). Der Primer #4334 bindet im Bereich einer endogenen NcoI-Schnittstelle. Der Primer #4419 hybridisiert an die Sequenz, die für das Hexahistidintag kodiert und fügt 3'-wärts die Basensequenz für vier weitere Histidine, ein Stoppkodon und eine XhoI-Schnittstelle ein. Das amplifizierte Fragment war 639 Bp groß. Das Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI geschnitten (2.5.1), in einen NcoI/XhoI-geschnittenen Vektor pBluescript SK⁻ extended ligiert (2.5.2.1) und sequenziert (2.7). Dieser Partialklon wurde pBluescript SKext #4334/4419 genannt. Zur Konstruktion des vollständigen Klon wurde zunächst der Klon pcA-mSCNBP[A]HA mit KpnI und NcoI geschnitten (2.5.1) und ein 1464 Bp großes Restriktionsfragment gelelektrophoretisch isoliert (2.4.4, 2.4.6). Dieses Fragment entspricht den Nukleotidpositionen -16 bis 1448 im vollständigen mSCNBP[A]His₁₀-Klon. Das sequenzierte PCR-Fragment #4334/#4419 wurde mit NcoI und XhoI aus dem Vektor pBluescript SKext geschnitten und gelelektrophoretisch isoliert (2.4.4, 2.4.6). Anschließend wurden beide Fragmente in einen KpnI/XhoI-geschnittenen Vektor pcDNA3.1(+) ligiert (2.5.2.1). Der vollständige Klon pcA-mSCNBP[A]His₁₀ wurde durch eine Restriktionsanalyse überprüft. Abbildung 3.17 zeigt das Klonierungsschema des pcA-mSCNBP[A]His₁₀-Konstruktes.

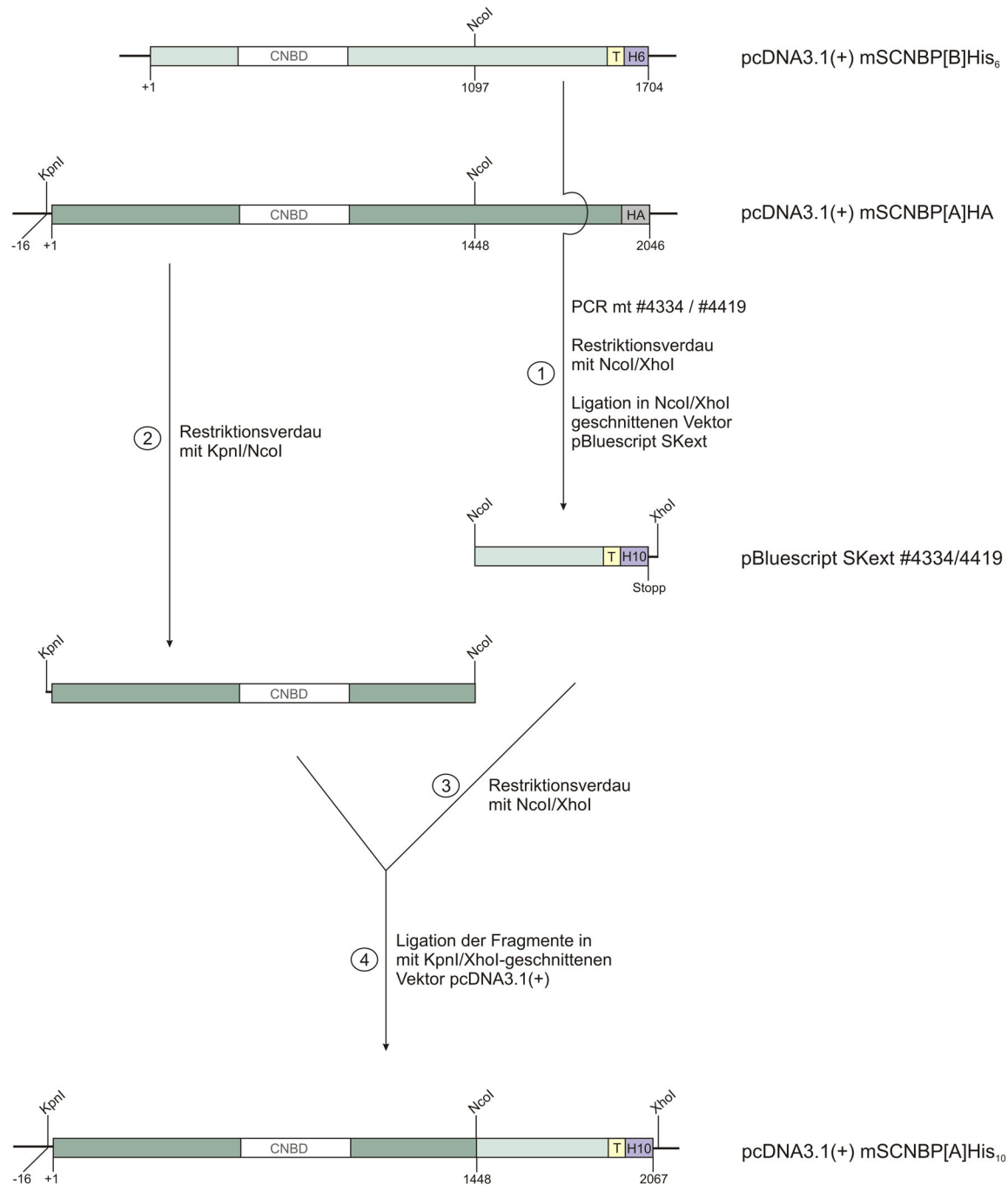


Abb. 3.17: Klonierungsschema des Konstruktes pcA-mSCNBP[A]His₁₀. Kodierende Bereiche sind als Balken dargestellt, Vektorbereiche als schwarze Linien. Unterhalb der Konstrukte ist die Nukleotidposition relativ zur entsprechenden SCNBP-Gesamtsequenz angegeben. „+1“ kennzeichnet das erste Nukleotid des Startkodons ATG; „Stopp“ kennzeichnet das Stoppkodon. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. CNBD, *cyclic nucleotide binding domain*; T, Thrombin-Erkennungssequenz; H6, Hexahistidintag; H10, Dekahistidintag; HA, Hämagglutinin A-Tag. Nähere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

3.4.2 Herstellung einer stabilen Zelllinie

Das Expressionskonstrukt mSCNBP[A]His₁₀ habe ich nachfolgend stabil in das Genom von CHO-Zellen integriert (2.8.4). Der Vektor enthält - neben der SCNBP-cDNA - ein weiteres Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin (G418) vermittelt. Zellen, die sich in Gegenwart von G418 vermehrten, wurden mit biochemischen und immunzytochemischen Methoden auf die Expression des SCNBP untersucht. Für Westernblot-Analysen wurden lösliche Proteine aus diesen Zellen präpariert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert (2.12). Zur Kontrolle wurden die löslichen Proteine nichttransfizierter CHO-Zellen aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem Antikörper PADK-4F9. Abbildung 3.18 zeigt das Ergebnis der Westernblot-Analyse von löslichen Proteinen des Zellklons IC2.

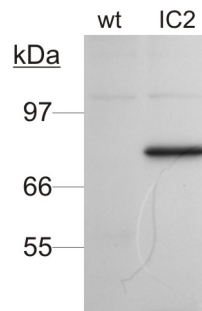


Abb. 3.18: Westernblot-Analyse löslicher Proteine von Zellen des Klons IC2. Es wurden Proteine aus CHO-Zellen in einem 10 %igen PAA/SDS-Gele aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben; wt: 10 µg lösliche Proteine aus nicht transfizierten CHO-Zellen; IC2: 20 µg lösliche Proteine des Zellklons IC2.

In der Spur, in der die Proteine des Zellklons IC2 aufgetragen sind (IC2), erkennt der Antikörper eine Bande bei ~80 kDa, was der errechneten Molmasse (78,9 kDa) des mSCNBP[A]His₁₀-Proteins entspricht. In der Kontrollspur (wt) erkennt der Antikörper keine Bande. Die Zellen des Zellklons IC2 wurden für immunzytochemische Färbungen und später für die Fermentation im Bioreaktor (2.8.5) verwendet. Im Folgenden werden diese Zellen als mSCNBP[A]His₁₀-Zellen bezeichnet.

Abbildung 3.19 zeigt das Ergebnis immunzytochemischer Färbungen von mSCNBP[A]His₁₀-Zellen.

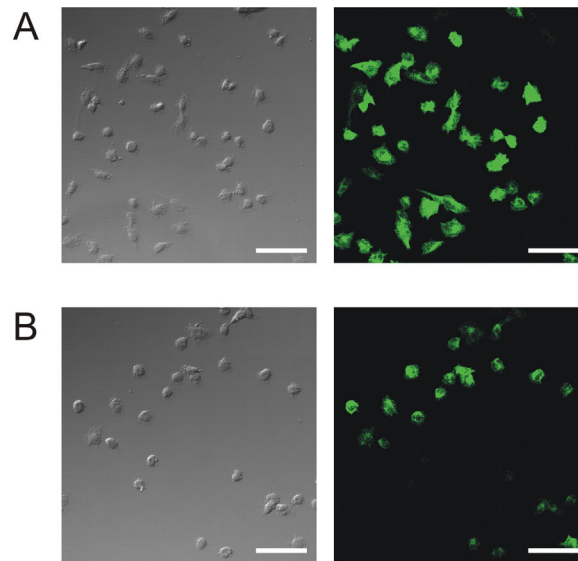


Abb. 3.19: Immunzytochemische Färbungen von mSCNBP[A]His₁₀-Zellen. **A)** Nachweis mit dem Antikörper VHKK-4B2 (unverdünnt). **B)** Nachweis mit dem Antikörper VHKK-3H6 (unverdünnt). Links ist jeweils die Durchlichtaufnahme, rechts die entsprechende Fluoreszenzaufnahme zu sehen. Es wurde der Zweitantikörper Ziege-anti-Ratte Alexa488 (Verdünnung 1:500) verwendet. Der Balken entspricht 50 µm.

Die verwendeten Antikörper VHKK-4B2 (Abb. 3.19 A) und VHKK-3H6 (Abb. 3.19 B) färben das Zytosol aller mSCNBP[A]His₁₀-Zellen spezifisch an. Auf nichttransfizierten Zellen zeigt keiner der beiden Antikörper eine Färbung (nicht gezeigt).

Die Westernblot-Analysen und die immunzytochemischen Untersuchungen zeigen, dass das mSCNBP[A]His₁₀-Protein löslich ist und konstitutiv in CHO-Zellen exprimiert wird. Dies ist eine gute Voraussetzung, um die Zellen zu fermentieren und anschließend lösliches SCNBP[A]-Protein isolieren zu können.

3.4.3 Fermentation von mSCNBP[A]His₁₀-Zellen

Für die Fermentation wurden die mSCNBP[A]His₁₀-Zellen an ein Wachstum in Suspension adaptiert (2.8.5.1). Anschließend wurden die Zellen in einem 1,2 l-Fermenter kultiviert. Die Fermentation der Zellen erfolgte nach der Methode des „*repeated batch*“ wie unter 2.8.5.3 beschrieben. Der Reaktor wurde in einem Zyklus von 72 - 96 h abgeerntet und insgesamt 1433 h lang betrieben. Pro Zellernte betrug die Ausbeute zwischen $3,0 \times 10^9$ und $4,6 \times 10^9$ Zellen.

3.5 Reinigung des mSCNBP[A]His₁₀ aus CHO-Zellen

Die Reinigung des heterolog exprimierten mSCNBP[A]His₁₀ erfolgte affinitätschromatographisch über eine Co²⁺-beladene Säule (Hitrapsäule, Amersham Bioscience).

Hierzu wurden $3 - 6 \times 10^9$ mSCNBP[A]His₁₀-Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen. Die unlöslichen Proteine wurden von den löslichen Proteinen durch Zentrifugation abgetrennt (2.13.2). Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde über die Hitrapsäule gegeben.

Abbildung 3.20 A zeigt das Chromatogramm der Reinigung. Auf der Abszisse ist das Durchflussvolumen in ml, auf der Ordinate die Proteinabsorption ($\lambda = 280$ nm) in mAU (*milli absorbance units*) dargestellt. Der erste breite Peak (Abb. 3.20 A) zeigt den Durchfluss der Proteine, die nicht an die Säule binden. Anschließend wurde solange mit Waschpuffer gewaschen, bis keine Änderung der Absorption mit der Zeit festzustellen war (Waschschritt). Um herauszufinden, bei welcher Imidazolkonzentration das SCNBP eluiert, wurde die Imidazolkonzentration schrittweise auf 34,5 mM, 59 mM, 83,5 mM und schließlich 500 mM erhöht (Elution). Das Chromatogramm zeigt nach jeder Erhöhung der Imidazolkonzentration einen Peak (Abb. 3.20 B). Um herauszufinden, in welcher Elutionsfraktion SCNBP vorhanden ist, wurden von allen Fraktionen Proben entnommen und im Westernblot analysiert.

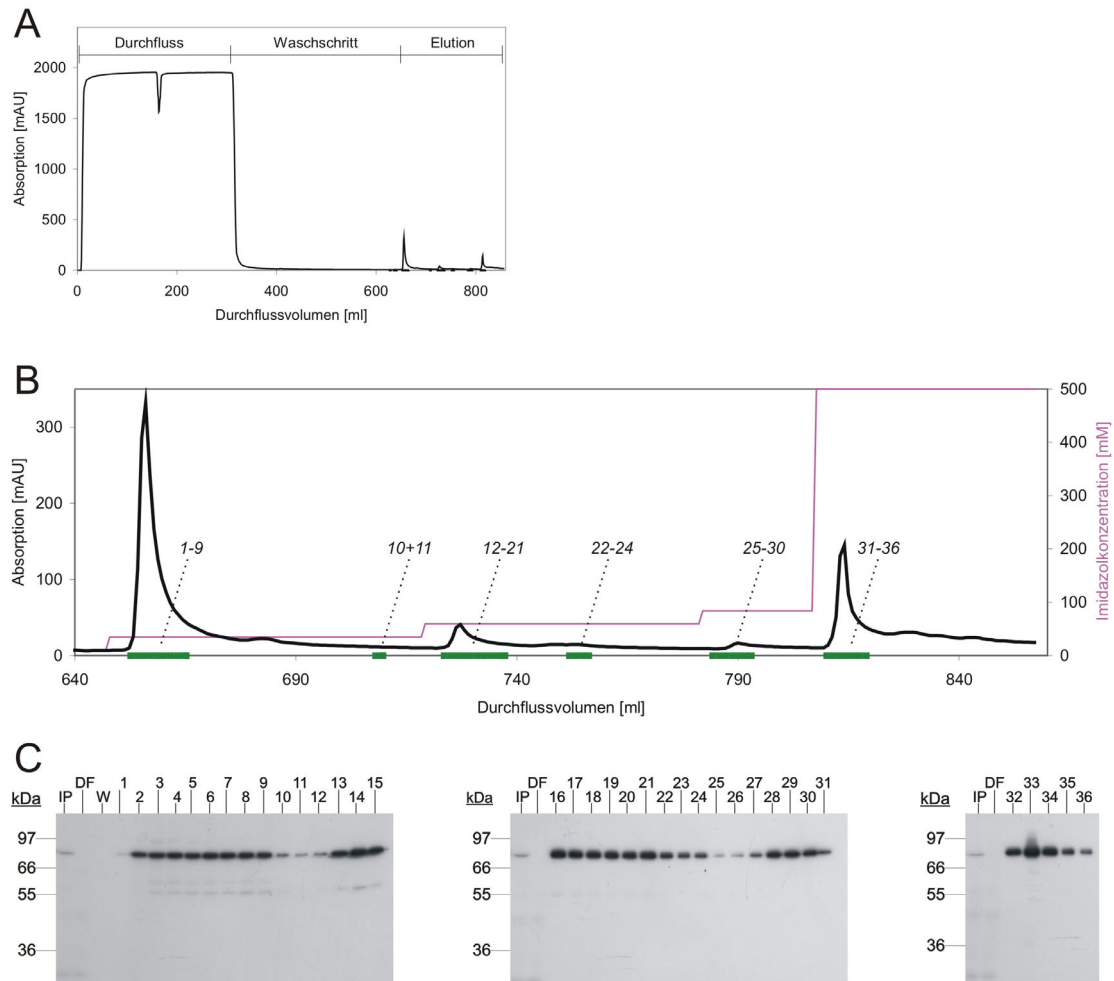


Abb. 3.20: Reinigung des SCNBP[A]His₁₀. (A/B) Chromatogramme der Reinigung des SCNBP[A]His₁₀ aus 6×10^9 Zellen. Die Abszisse zeigt das Durchflussvolumen in ml; die Ordinate zeigt die Absorption ($\lambda = 280$ nm) in mAU. In B ist das Elutionsprofil vergrößert dargestellt. Die grünen Balken und die Zahlen innerhalb des Chromatogramms bezeichnen die gesammelten Elutionsfraktionen. (C) Westernblot-Analyse der in B gekennzeichneten Fraktionen. Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem Antikörper VHKK-3H6 (Verdünnung 1:2). IP (Input): 0,00003 % des Auftrags; DF (Durchfluss): 0,00003 % des Durchflusses; W (Waschschrift): 0,00003 % des Waschschrattes; Spuren 1 - 36: jeweils 0,007 % der Elutionsfraktionen 1 - 36.

Der Antikörper VHKK-3H6 markiert mSCNBP[A]HA in der Inputfraktion (Abb. 3.20 C, IP). Das Protein wird weder im Durchfluss (DF) noch im Waschschrift nachgewiesen. Das bedeutet, dass es quantitativ an die Säule bindet. In den Spuren 1 - 36 sind die Elutionsfraktionen aufgetragen (Abb. 3.20 C). Die Spuren 1 - 11 enthalten die Fraktionen, die mit 34,5 mM Imidazol eluiert wurden, die Spuren 12 - 24 jene, die mit 59,0 mM Imidazol eluiert wurden, die Spuren 25 - 30 die Fraktionen, die mit 83,5 mM Imidazol eluiert wurden und die Spuren 31 - 36 enthalten die Fraktionen, die mit 500 mM Imidazol eluiert wurden. Nach jeder Erhöhung der Imidazolkonzentration eluiert ein Teil des gebundenen SCNBP von der Säule. Die Peakhöhe im Chromatogramm korreliert nicht mit der eluierten Menge an SCNBP. Die Amidoschwarz-Färbung der PVDF-Membran (vgl. Abb. 3.20 C) zeigt, dass mit

34,5 mM Imidazol noch sehr viele Proteine eluiert wurden, die unspezifisch an die Säule gebunden hatten und mit Waschpuffer nicht eluiert werden konnten (nicht gezeigt).

Um das SCNBP möglichst sauber und konzentriert vorliegen zu haben, wurde in den nachfolgenden Reinigungen nach dem Waschschrift in zwei Stufen „eluiert“. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 34,5 mM Imidazol entfernt. Anschließend wurde SCNBP mit 500 mM Imidazol eluiert. Abbildung 3.21 A zeigt das Chromatogramm einer solchen Reinigung. Abbildung 3.21 B zeigt die Elutionspeaks im Detail. Um die Reinigung zu dokumentieren, wurden nach jedem Schritt Proben entnommen und im Westernblot (2.12) bzw. durch Rapid Coomassie-Färbung (2.11.3) analysiert.

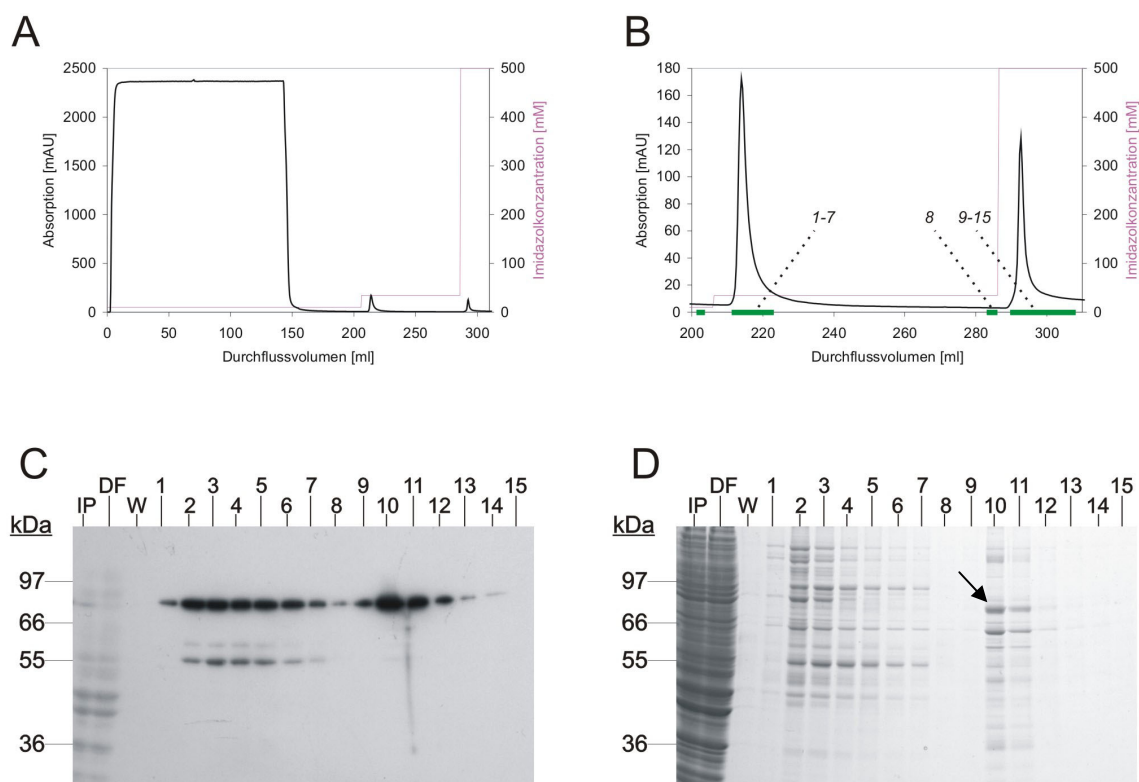


Abb. 3.21: Reinigung des SCNBP[A]His₁₀. (A/B) Chromatogramme der Reinigung des SCNBP[A]His₁₀ aus $4,6 \times 10^9$ Zellen. Die Abszisse zeigt das Durchflussvolumen in ml; die Ordinate zeigt die Absorption ($\lambda = 280$ nm) in mAU. In B ist das Elutionsprofil vergrößert dargestellt. Die grünen Balken und die Zahlen innerhalb des Chromatogramms bezeichnen die gesammelten Elutionsfraktionen. (C/D) Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und in (C) auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind jeweils links in kDa angegeben. (C) Westernblot-Analyse der in B gekennzeichneten Fraktionen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem Antikörper VHKK-3H6 (Verdünnung 1:2). (D) Rapid Coomassie-Färbung der in B gekennzeichneten Fraktionen. IP (Input): 0,00007 % des Auftrags; DF (Durchfluss): 0,00007 % des Durchflusses; W (Waschschrift): 0,0002 % des Waschschriftes; Spuren 1 - 15: jeweils 0,007 % der Elutionsfraktionen 1 - 15.

Da das SCNBP quantitativ an die Säule bindet, markiert der Antikörper VHKK-3H6 das mSCNBP[A]His₁₀-Protein in der Inputfraktion (Abb. 3.21 C, IP), aber nicht im Durchfluss (DF) oder im Waschschrift. Die Spuren 1 - 8 enthalten die Fraktionen, die mit 34,5 mM

Imidazol eluiert wurden, die Spuren 9 - 15 jene, die mit 500 mM Imidazol eluiert wurden. Ein Teil des gebundenen SCNBP wird mit 34,5 mM Imidazol eluiert. Das meiste Protein ist jedoch in den Fraktionen des zweiten Elutionspeaks (Spuren 9 - 15 in C und D) vorhanden. Die Rapid Coomassie-Färbung zeigt, dass im zweiten Elutionspeak neben dem SCNBP (Abb. 3.21 D, Pfeil) noch andere Proteine enthalten sind.

3.5.1 Größenausschlusschromatographie

Um das gereinigte SCNBP (3.5) weiter zu charakterisieren, wurde im Anschluss an die affinitätschromatographische Reinigung eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Hierzu wurde die analytische Gelfiltrationssäule Superdex 200 10/300 GL verwendet. Das Säulenvolumen (V_C) beträgt 24 ml, das Ausschlussvolumen (V_0) der Säule ist 7 ml. Die Säule wurde mit Proteinen bekannter Molmasse (13,7 - 669 kDa) kalibriert. Abbildung 3.22 zeigt die Elutionsprofile zweier Kalibrierungsläufe (in rot und blau dargestellt).

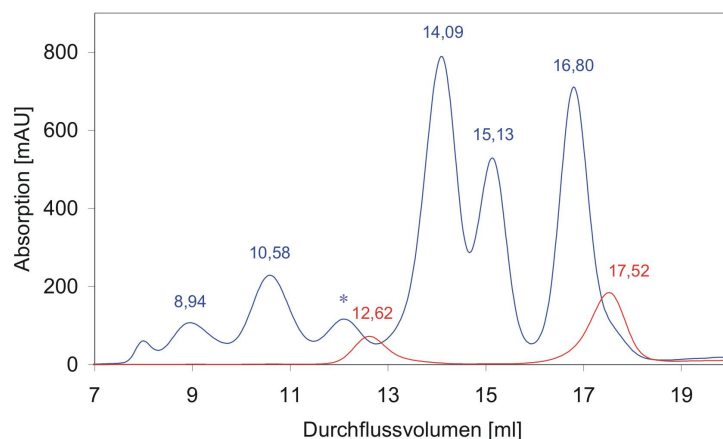


Abb. 3.22: Größenausschlusschromatographie mit Proteinen bekannter Molmasse. Die Abszisse zeigt das Durchflussvolumen in ml; die Ordinate zeigt die Absorption ($\lambda = 280$ nm) in mAU. Die Zahlen oberhalb der Peaks bezeichnen das jeweilige Elutionsvolumen. In dem Peak, der mit einem Stern (*) markiert ist, eluieren Proteinaggregate des BSA oder Chymotrypsinogen.

Für globuläre Proteine ist ihr Verteilungskoeffizient - der K_{av} -Wert - über einen weiten Bereich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse.

Der K_{av} -Wert wird folgendermaßen berechnet:

$$K_{av} = (V_E - V_0) / (V_C - V_0)$$

V_E = Elutionsvolumen des Proteins

V_0 = Ausschlussvolumen der Säule

V_C = Säulenvolumen

Aus den Elutionsvolumina der Kontrollproteine (vgl. Abb. 3.22) wurden die K_{av} -Werte berechnet. Tabelle 3.4 fasst die Ergebnisse der Kalibrierung zusammen. Zu jedem der verwendeten Proteine sind neben der Molmasse das Elutionsvolumen und der daraus berechnete K_{av} -Wert angegeben.

Tab. 3.4: Für die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superdex 200 10/300 GL verwendete Proteine.

Protein	MW [Da]	log MW	Elutionsvolumen [ml]	K_{av}
Thyroglobulin	669.000	5,83	8,94	0,114
Ferritin	440.000	5,64	10,58	0,211
Aldolase	158.000	5,20	12,62	0,331
BSA	67.000	4,83	14,09	0,417
Ovalbumin	43.000	4,63	15,13	0,478
Chymotrypsinogen	25.000	4,40	16,80	0,576
RNase	13.700	4,14	17,52	0,619

Abbildung 3.23 zeigt die Kalibrierungsgerade, die mit Hilfe der Parameter aus Tab. 3.4 erstellt wurde. Auf der Abszisse ist der Logarithmus der Molmasse (MW) aufgetragen, auf der Ordinate die zugehörigen K_{av} -Werte.

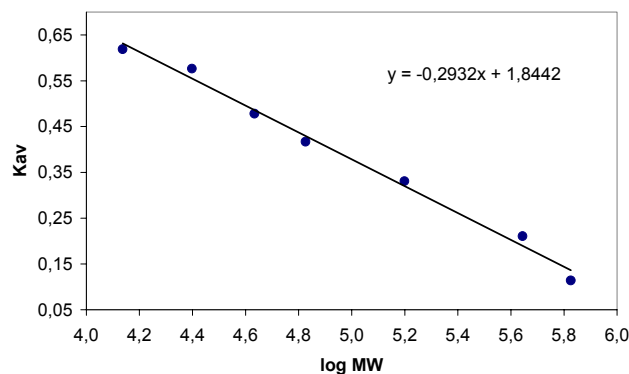


Abb. 3.23: Kalibrierungsgerade für die Gelfiltrationssäule Superdex 200 10/300 GL. Abszisse: Logarithmus der Molmasse der Markerproteine; Ordinate: K_{av} -Werte (s. Tab. 3.4). Mit linearer Regression wurde an die Datenpunkte eine Ausgleichsgerade angepasst (durchgezogene Linie). Die Geradengleichung ist im Diagramm angegeben.

Die ersten fünf Fraktionen der Elution mit 500 mM Imidazol der affinitätschromatographischen Reinigung (3.5) wurden vereinigt und mit einer Centricon 30-Membran (Millipore) nach Herstellerangaben auf $\sim 700 \mu\text{l}$ eingengt. Eine Probe ($250 \mu\text{l}$) wurde zur Größenausschlusschromatographie verwendet. Die Elutionsfraktionen wurden in

einer Vakuumzentrifuge eingengt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Abbildung 3.24 zeigt das zugehörige Chromatogramm und den Westernblot.

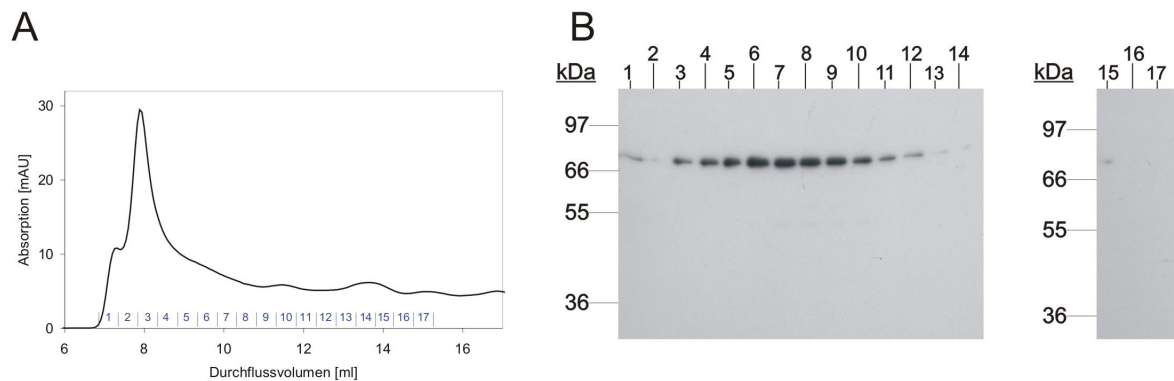


Abb. 3.24: Größenausschlusschromatographie von gereinigtem SCNBP[A]His₁₀. (A) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie. Die Abszisse zeigt das Durchflussvolumen in ml; die Ordinate zeigt die Absorption ($\lambda = 280$ nm) in mAU. Die Zahlen innerhalb des Chromatogramms bezeichnen die jeweiligen Elutionsfraktionen. (B) Westernblot-Analyse der in A gekennzeichneten Fraktionen. Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der Nachweis erfolgte mit dem Antikörper VHKK-3H6 (Verdünnung 1:2). Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben. Spuren 1 - 17: 50 % der Elutionsfraktionen 1 - 17.

Das Chromatogramm zeigt im Wesentlichen einen Elutionspeak bei 7,9 ml Durchflussvolumen (Abb. 3.24 A). Das SCNBP wird vom Antikörper VHKK-3H6 in den Fraktionen 1 - 15 markiert (Abb. 3.24 B). Das deutet darauf hin, dass ein Teil des gereinigten SCNBP mit dem Ausschlussvolumen der Säule eluiert. Dieser Anteil muss demnach in hochmolekularen Aggregaten vorliegen, die das Trennvermögen der Gelfiltrationssäule überschreiten. In den Fraktionen 6 - 9 ist das Antikörpersignal am stärksten. Der Kalibrierung zufolge (Abb. 3.23) eluieren in diesen Fraktionen Proteine mit einer Molmasse zwischen 266 kDa (Fraktion 6) und 670 kDa (Fraktion 9). Die Antikörpermarkierung nimmt in den Fraktionen 10 - 15 an Intensität ab. In Fraktion 15 eluieren Proteine mit einer Molmasse zwischen 67 und 83 kDa. In Fraktion 15 könnte das SCNBP als Monomer vorliegen, da die errechnete Molmasse von mSCNBP[A]His₁₀ 79,9 kDa beträgt. In den Fraktionen 16 und 17 wird das SCNBP nicht mehr nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, dass der größte Anteil des gereinigten SCNBP nicht als Monomer, sondern in höhermolekularer Form vorliegt. Es wäre möglich, dass das SCNBP Multimere bildet oder als Bestandteil großer Proteinkomplexe gereinigt wird. Es ist aber auch vorstellbar, dass das SCNBP während der affinitätschromatographischen Reinigung aggregiert. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde eine Größenausschlusschromatographie der löslichen Proteine aus mSCNBP[A]His₁₀-Zellen ohne Reinigung über die Hitrap-Säule durchgeführt. Hierzu wurden lösliche Proteine

aus 4×10^8 Zellen präpariert und über eine Centricon 30-Membran (Millipore) nach Herstellerangaben eingengt. Eine Probe (250 μ l, entspricht Protein aus $5,6 \times 10^7$ Zellen) wurde für die Gelfiltration eingesetzt. Die Proteine, die von der Säule eluieren, wurden in Fraktionen aufgefangen, in der Vakuumzentrifuge eingengt und im Westernblot analysiert. Abbildung 3.25 zeigt das Chromatogramm und die zugehörige Westernblot-Analyse.

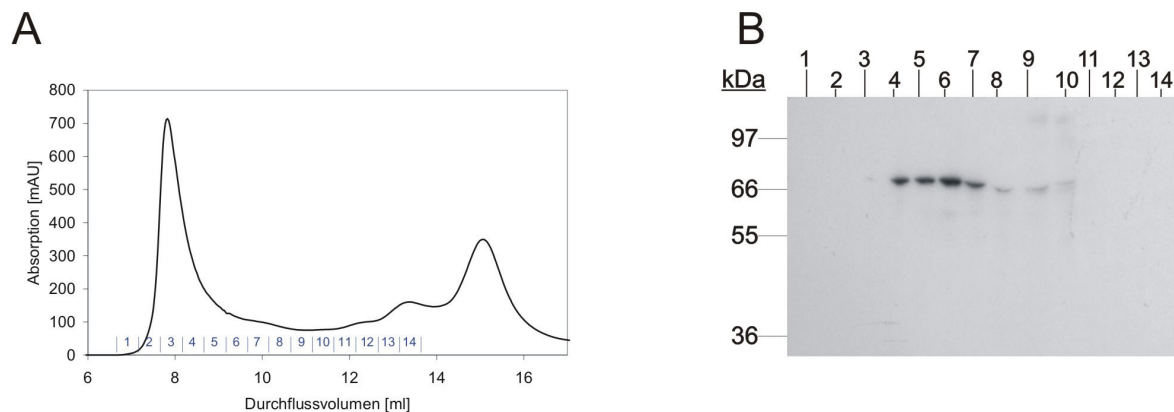


Abb. 3.25: Größenausschlusschromatographie löslicher Proteine aus mSCNBP[A]His₁₀-Zellen. (A) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie. Die Abszisse zeigt das Durchflussvolumen in ml; die Ordinate zeigt die Absorption ($\lambda = 280$ nm) in mAU. Die Zahlen innerhalb des Chromatogramms bezeichnen die jeweiligen Elutionsfraktionen. (B) Westernblot-Analyse der in A gekennzeichneten Fraktionen. Die Proteine wurden in einem 10 %igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der Nachweis erfolgte mit dem Antikörper VHKK-3H6 (Verdünnung 1:2). Die Molmassen der Proteine des Größenstandards sind links in kDa angegeben. Spuren 1 - 14: 50 % der Elutionsfraktionen 1 - 14.

Das SCNBP wird in den Fraktionen 4 - 10 detektiert (Abb. 3.25 B). Vermutlich liegt das SCNBP bereits in mSCNBP[A]His₁₀-Zellen nicht als Monomer vor. Es konnte noch nicht geklärt werden, ob es sich bei den gereinigten Proteinen um Multimere, um SCNBP-Aggregate unterschiedlicher Molmassen oder um Komplexe mit anderen Proteinen handelt. Für eine biochemische Charakterisierung des Proteins - z.B. die Bestimmung der Affinität für zyklische Nukleotide - muss das Protein homogen vorliegen. Gegebenfalls muss bei der Reinigung ein Detergenz eingesetzt werden, welches die Aggregate/Proteinkomplexe auflöst. Dies war im Rahmen meiner Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr möglich.

4 Diskussion

Das SCNBP (*soluble cyclic nucleotide-binding protein*) ist ein neues, uncharakterisiertes Protein mit einer Bindestelle für zyklische Nukleotide. In 17 verschiedenen Spezies - vom marinen Invertebraten bis zum Menschen - findet man Gene, die zum Maus-SCNBP ortholog sind (Krähling, 2006). Der Diskussionsteil gliedert sich in fünf Abschnitte. Zunächst werde ich die möglichen Varianten des SCNBP-Proteins im Maushoden besprechen. Im zweiten Abschnitt gehe ich auf die zelluläre Lokalisation des SCNBP im Maushoden ein. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Identifizierung möglicher Interaktionspartner des SCNBP diskutiere ich im dritten Abschnitt. Im vierten Abschnitt gehe ich auf Ergebnisse zweier Arbeitsgruppen im Zusammenhang mit der Expression des SCNBP in anderen Geweben als dem Maushoden ein. Abschließend zeige ich im Ausblick weiterführende Experimente auf.

4.1 Welche SCNBP-Varianten werden im Maushoden exprimiert?

Datenbanken zufolge werden in der Maus sechs verschiedene Varianten des SCNBP vorhergesagt (SCNBP A bis F, vgl. 1.2.1). In Northernblot-Experimenten wurde mit zwei unterschiedlichen Sonden im Maushoden nur eine Bande von ~2,1 kB Größe nachgewiesen (Utzerath, 2003; Krähling, 2006). Die Größe dieser Bande entspricht in etwa der Größe der annotierten Transkripte für die SCNBP-Varianten A (2,3 kB) und B (2,1 kB). Die verwendeten Sonden hybridisieren theoretisch auch mit den Transkripten der SCNBP Varianten C bis E, die laut Datenbank zwischen 1,6 und 1,9 kB groß sind. Banden dieser Größe wurden nicht nachgewiesen. Das deutet zunächst darauf hin, dass nur die Varianten A und/oder B im Maushoden vorkommen. Da Transkripte im 5'- und 3'- Bereich untranslatierte Nukleotidsequenzen unterschiedlicher Länge aufweisen können und sowohl eine computergestützte als auch manuelle Annotierung von Genprodukten fehlerhaft sein kann, ist es möglich, dass auch andere SCNBP-Transkripte mit ähnlicher Größe im Maushoden vorkommen. In dieser Arbeit konnte ich zwei SCNBP-Varianten identifizieren, die tatsächlich im Maushoden exprimiert werden, nämlich die Varianten A und C. Die vorhergesagten Molmassen der Varianten A und C sind 77,9 kDa und 63,8 kDa. Im Westernblot wurde nur eine einzige Proteinbande mit einer Molmasse von ~79 kDa markiert. In dieser Bande wurden

die Peptide identifiziert, die in den annotierten Varianten A bzw. C vorkommen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Variante C abweichend von der Annotierung in der Datenbank einen längeren N-terminalen Bereich besitzt und sich von Variante A einzig durch das Fehlen von 12 Aminosäureresten unterscheidet (vgl. Abb. 3.16).

Die annotierte SCNBP-Variante B konnte weder im Westernblot noch massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Experimente mit heterolog exprimiertem SCNBP deuteten an, dass der Antikörper CPRH-2E10 vielleicht nur bedingt zur Immunpräzipitation der Varianten A und B geeignet ist (3.2.2.1). Betrachtet man jedoch die Westernblot-Analyse der Immunpräzipitation aus Maushoden (Abb. 3.14), wird deutlich, dass der Antikörper CPRH-2E10 etwa die gleiche Menge SCNBP präzipitiert wie der Antikörper PADK-4F9 - die markierten Banden in den Eluatn besitzen eine vergleichbare Signalintensität. Ich vermute daher, dass Variante B im Maushoden nicht vorkommt.

Um zu untersuchen, ob die Varianten D und E im Maushoden vorkommen, müssten sie zunächst heterolog exprimiert und die Antikörper VHKK-3H6, VHKK-4B2 und PADK-4F9 im Westernblot getestet werden. Die Antikörper VHKK-3H6 und VHKK-4B2 sind gegen ein Epitop gerichtet, das in beiden Varianten, D und E, enthalten ist. Der Antikörper PADK-4F9 ist gegen ein Epitop gerichtet, das nur in der Variante D enthalten ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde darüber hinaus versucht, einen monoklonalen Antikörper herzustellen, der gegen ein Epitop in der Bindestelle für zyklische Nukleotide gerichtet ist und vielleicht alle SCNBP-Varianten erkennen könnte. Mit diesem Antikörper hätte ich auch überprüfen können, ob Variante F im Maushoden vorkommt. In ersten Tests mit heterolog exprimiertem SCNBP A und B markierte dieser Antikörper im Westernblot keine Bande.

4.2 In welchen Zellen des Maushodens kommt das SCNBP vor?

Im Rahmen von zwei Diplomarbeiten wurde bereits versucht, das SCNBP zellulär im Maushoden zu lokalisieren. Abbildung 4.1 zeigt den Hodenquerschnitt in einer lichtmikroskopischen Aufnahme (4.1 A) bzw. schematisch (4.1 B und C). In Säugetieren besteht das Hodengewebe aus einem intertubulären Bindegewebsraum und dem Samenkanal-Kompartiment. Der Bindegewebsraum umfasst Leydigzellen, Makrophagen, Bindegewebszellen, Blutgefäße, Nerven und Lymphräume. Die Samenkanäle sind von einer Basalmembran (*Lamina propria*) umgeben und enthalten neben den Sertolizellen, die als Stützzellen für das Keimepithel dienen und nutritive und koordinative Funktionen besitzen,

nur noch die Keimzellen. Die Keimzellentwicklung und -differenzierung (Spermatogenese) findet ausgehend von der Basalmembran zum Lumen der Samenkanäle statt. Dabei entwickeln sich die Spermatogonien (Stammzellen) zu Spermien, die dann in das Lumen der Samenkanäle abgegeben und schließlich in den Nebenhoden transportiert werden. Dort erlangen die Spermien während eines Reifungsprozesses die Fähigkeit zur Fortbewegung und Befruchtung. Im Verlauf der Keimzellentwicklung lassen sich unterschiedliche, charakteristische Entwicklungsstufen unterscheiden. In einem Hodenquerschnitt findet man Samenkanalsegmente in unterschiedlichen Entwicklungsstufen.

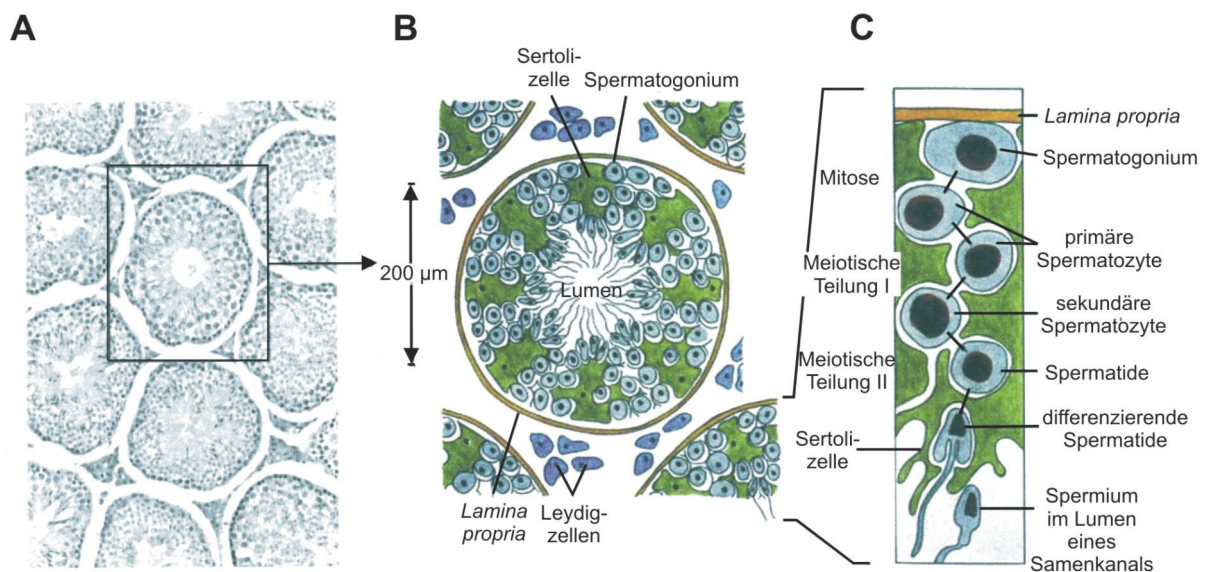


Abb. 4.1: Darstellung des Hodengewebes. A) Lichtmikroskopische Aufnahme eines Hodenschnitts (aus Maronpot et al., 1999: Pathology of the mouse). B) Schematischer Querschnitt eines Samenkanals. C) Schematischer Verlauf der Keimzellentwicklung in einem Samenkanal ausgehend von der Basalmembran (*Lamina propria*) zum Lumen hin. Weitere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

In Gewebeschnitten von Mensch- und Maushoden färbten polyklonale Antikörper gegen eine N-terminale Domäne der SCNBP-Variante A Spermatozyten und Spermatischen in allen Samenkanälen (Utzerath, 2003). Im Gegensatz dazu wurde im Maushoden die SCNBP-mRNA mittels *in situ* Hybridisierung nur in Spermatozyten von einigen wenigen Samenkanälen nachgewiesen. Mit zwei unabhängigen Sonden wurden die gleichen Strukturen angefärbt (Krähling, 2006). Letzteres Ergebnis deutet darauf hin, dass die SCNBP-mRNA sehr spezifisch in einer bestimmten Entwicklungsstufe der Spermatozyten exprimiert wird. Es schließt aber nicht aus, dass SCNBP-mRNA auch in weiter differenzierten Keimzellen vorhanden, dort aber schlechter zugänglich und deshalb nicht nachweisbar ist. Da noch keine Mauslinie existiert, in der das SCNBP-Gen ausgeschaltet ist, ist es schwierig zu beurteilen, wie spezifisch diese Färbungen sind. Der Nachweis des SCNBP-Proteins im Maushoden

konnte in diesen Arbeiten nicht erbracht werden. Ich konnte mit Hilfe der Immunpräzipitation zeigen, dass das SCNBP im Maushoden vorkommt. Dies konnte massenspektrometrisch bestätigt werden. Sollte das SCNBP keimzell- bzw. spermienpezifisch exprimiert werden, muss das SCNBP schon in Spermatozyten, Spermatiden oder zumindest in Spermien im Lumen der Samenkanäle vorhanden sein. Es ist mir nicht gelungen, das SCNBP aus angereicherten Keimzellen des Maushodens zu präzipitieren. Wie ist dies zu erklären? Es ist schwierig zu beurteilen, wie gut einzelne Zellpopulationen, die sich in unterschiedlichen Stadien der Keimzellentwicklung befinden, angereichert werden. Während der Inkubation des Hodengewebes mit Collagenase (2.9.2.1) wird das Bindegewebe dissoziiert, das die Samenkanäle umgibt. Schon in diesem Schritt werden viele Zell-Zell-Kontakte zwischen Keimzellen und Sertolizellen aufgelöst. Diese Keimzellen werden in das Lumen der Samenkanäle und zum Teil in das umgebende Medium gespült (Bellvé et al., 1977). Es ist nicht ausgeschlossen, dass das SCNBP erst in späten Stadien der Keimzellentwicklung exprimiert wird, wie etwa in differenzierenden Spermatiden bzw. Spermien im Lumen des Samenkanals. Möglicherweise geht ein großer Teil dieser Zellen während der Inkubation mit Collagenase verloren und wird nicht angereichert. Es müsste überprüft werden, ob das SCNBP aus dem Überstand des Inkubationsschrittes mit Collagenase (2.9.2.1) präzipitiert werden kann, gegebenenfalls muss das Protokoll zur Anreicherung von Keimzellen modifiziert werden. Ob das SCNBP in Nebenhodenspermien vorhanden ist, muss noch endgültig geklärt werden. Hierzu müsste zur Immunpräzipitation deutlich mehr Protein eingesetzt werden. Möglicherweise wird das SCNBP aber auch posttranslational so modifiziert, dass es in Nebenhodenspermien von dem Antikörper PADK-4F9 nicht mehr erkannt wird. Ein Beispiel für ein Protein in der Maus, welches keimzellspezifisch exprimiert und posttranslational modifiziert wird, ist Cyttestin (Linder et al., 1995). In Keimzellen lässt sich das Protein mit einer apparenten Molmasse von ~110 kDa nachweisen. Erst in Nebenhodenspermien wird N-terminal ein Bereich von ca. 55 kDa abgespalten. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob auch das SCNBP im Nebenhoden posttranslational N-terminal modifiziert wird, müssten auch die Antikörper CPRH-2E10 und VHKK-3H6 zur Immunpräzipitation von SCNBP aus Nebenhodenspermien eingesetzt werden. Um zu bestätigen, dass das SCNBP nicht in Leydig- oder Sertolizellen exprimiert wird, müssten Immunpräzipitationen mit Proteinen aus diesen Zellen durchgeführt werden. Immortalisierte Sertoli- und Leydigzelllinien sind kommerziell erwerblich. Mit Hilfe von verschiedenen Antikörpern muss die Expression des Proteins mit immunzytochemischen und immunhistochemischen Methoden genauer untersucht werden.

Northernblot-Experimente deuten auf ein hohes Expressionsniveau der SCNBP-mRNA im Maushoden hin (Utzerath, 2003). Unabhängig davon, in welchen Zelltypen das SCNBP exprimiert wird, scheint es im gesamten Maushoden nur in sehr geringen Mengen vorzukommen. Das SCNBP kann erst dann im Westernblot nachgewiesen werden, wenn es zuvor mittels Immunpräzipitation angereichert wurde. Wie kann man das erklären? Die Menge an mRNA muss nicht zwingend mit der Menge an translatiertem Protein korrelieren. In Keimzellen kann es sich sogar umgekehrt verhalten. Ein Beispiel dafür ist SNURF/RNF4. SNURF/RNF4 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen eigene Transkription und Translation in Keimzellen entwicklungspezifisch reguliert werden. In runden Spermatiden ist das Expressionsniveau der SNURF/RNF4-mRNA im Vergleich zu Spermatozyten stark erhöht. Gleichzeitig kann in Spermatiden immunzytochemisch aber deutlich weniger Protein nachgewiesen werden als in Spermatozyten. Zudem ist das Transkript mit 1,6 kB in Spermatiden deutlich kürzer als in Spermatozyten (3,0 kB) (Pero et al., 2003). Der physiologische Sinn solcher Regulationsmechanismen ist unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich geschlechtsreife Mäuse untersucht, die mindestens acht Wochen alt waren. Es müsste überprüft werden, ob die Translation der SCNBP-mRNA in Spermatozyten möglicherweise während bestimmter Entwicklungsstadien des Maushodens hochreguliert wird. Vielleicht lässt sich das SCNBP in Proteinpräparationen aus Hoden jüngerer Mäuse, die noch nicht geschlechtsreif sind, in größeren Mengen nachweisen.

4.3 Interaktionspartner des SCNBP im Maushoden und mögliche Funktionen, die sich für das Protein ergeben

Die physiologische Funktion des SCNBP ist bisher nicht bekannt. Der spezifische Nachweis der SCNBP-mRNA in Keimzellen des Maushodens deutet auf eine Funktion des Proteins in der Spermatogenese oder beim Befruchtungsvorgang. Um konkrete Hinweise auf die Funktion des SCNBP zu erhalten, habe ich Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Mögliche Interaktionspartner des SCNBP wurden massenspektrometrisch identifiziert. Bisher wurden 105 Proteine im Maushoden als Interaktionspartner identifiziert (Tab. 3.1). Wie ist diese verhältnismäßig große Zahl an potentiellen Interaktionspartnern zu bewerten? Zum einen muss man bedenken, dass auch so genannte „Falschpositive“ unter den Proteinen in der Liste vorhanden sein können. Beispielsweise werden Proteine gefunden, die an die konstanten

Domänen der verwendeten Antikörper binden. Um diese Proteine als Falschpositive zu identifizieren, müsste eine Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern aus Ratte durchgeführt werden, die nicht gegen das SCNBP gerichtet sind.

Überraschenderweise wurde auch in den Kontrollexperimenten, bei denen lösliche Proteine aus Maushoden mit einer Säulenmatrix ohne immobilisierten Antikörper inkubiert worden waren, das SCNBP im Eluat nachgewiesen (3.3.1). Daher kann ich nicht ausschließen, dass sich in diesen Eluaten auch Proteine befanden, die mit dem SCNBP interagieren. Diese Proteine wurden aus der Liste möglicher Interaktionspartner ausgeschlossen. Allerdings konnte ich im Westernblot bei Kontrollexperimenten das SCNBP im Eluat nie nachweisen. Selbst wenn das SCNBP unspezifisch mit Protein G-Sepharose wechselwirkt und dadurch massenspektrometrisch in den Kontrolleluaten nachgewiesen wird, so wäre diese Interaktion wesentlich schwächer als die spezifische Bindung an die Antikörper. Aus den bisher durchgeführten massenspektrometrischen Analysen können leider nur qualitative Schlussfolgerungen gezogen werden. Ob ein Protein spezifisch bindet und somit in der Probe angereichert vorliegt oder aber aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen nur in geringen Mengen, konnte nicht festgestellt werden. Wenn ein Protein spezifisch mit dem SCNBP interagiert, gleichzeitig aber - wenn auch viel schwächer - an Protein G-Sepharose bindet, wird es als möglicher Interaktionspartner ausgeschlossen. Es gibt aber Möglichkeiten, quantitativ zu überprüfen, ob ein Protein im Vergleich zur Kontrolle in höheren Mengen vorliegt und somit eine Interaktion spezifisch ist. Hierzu müssten zunächst die Immunpräzipitationsexperimente wie bereits beschrieben durchgeführt werden. Die aufgetrennten Proteine aus einer Immunpräzipitation und des dazugehörigen Kontrollexperimentes müssen wieder in jeweils einem Arbeitsschritt aus dem Gel geschnitten werden, so dass die Proteine, die in jeweils beiden Spuren vorkommen, auch in diesen „Banden“ erscheinen (vgl. 3.3). Bei der anschließenden enzymatischen Spaltung werden die Proteine der beiden Banden durch Zugabe von schwerem Wasser zu einer der beiden Proben unterschiedlich markiert. Bei der Spaltung mit Trypsin wird in die entstehenden Peptide das stabile Sauerstoffisotop ^{18}O (statt ^{16}O) eingebaut. Diese Markierung ermöglicht es, beide Proben gleichzeitig massenspektrometrisch zu analysieren und trotzdem zu unterscheiden aus welcher Probe (Immunpräzipitation oder Kontrollexperiment) ein identifiziertes Protein stammt. Der quantitative Vergleich der Mengen dieses Proteins aus beiden Proben zeigt dann, ob eine Bindung spezifisch erfolgte. In diesem Fall würde im Vergleich zum Kontrollexperiment deutlich mehr des betreffenden Proteins nachgewiesen. Mit dieser

Technik wurden Proteine identifiziert, deren Phosphorylierungszustand sich nach einer Aktivierung des Erythropoietin-Rezeptors ändert (Körbel et al., 2005).

Auch wenn die Liste putativer Interaktionspartner des SCNBP möglicherweise noch unvollständig ist und „falschpositive“ Proteine enthalten sind, werde ich nachfolgend einige Prozesse aufzeigen, in denen die identifizierten Proteine eine Rolle spielen und an welchen das SCNBP beteiligt sein könnte.

Unter den möglichen Interaktionspartnern befinden sich 11 Proteine, die im Rahmen der Genomannotation lediglich vorhergesagt werden oder deren Funktion noch unbekannt ist. 18 Proteine binden an DNA oder RNA bzw. sind an der Transkription oder Translation beteiligt. Möglicherweise übernimmt das SCNBP eine Funktion in der transkriptionellen oder translationellen Regulation der Expression bestimmter Gene im Maushoden. Es wurden auch Proteine identifiziert, für die bekannt ist, dass sie im Maushoden wichtig für die Differenzierung von Keimzellen und somit die Fertilität der Mäuse sind. Während der Spermatogenese sind große morphologische Veränderungen der sich differenzierenden Keimzellen zu beobachten. Die Reorganisation des Zytoskeletts spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Cofilin (#99 in Tab. 3.1) ist ein Protein, das zumindest *in vitro* an der Depolymerisation von Aktin beteiligt ist. Cofilin wird von der LIM-Kinase (LIMK) phosphoryliert und somit inhibiert. Mäuse, in denen das Gen für die Lim-Kinase 2 ausgeschaltet wurde, besitzen einen verkleinerten Hoden und die Keimzellen dieser Mäuse degenerieren (Takahashi et al., 2002). Cofilin wird ebenfalls von der Serin/Threonin-Kinase TESK-1 (*testicular protein kinase 1*) durch Phosphorylierung inhibiert. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass auch das α -Parvin (#37 in Tab. 3.1) als möglicher Interaktionspartner des SCNBP identifiziert wurde. Wenn unphosphoryliertes α -Parvin an die TESK-1 bindet, wird die Kinase ihrerseits inhibiert und Cofilin kann Aktin depolymerisieren (Übersicht: Sepulveda & Wu, 2006). Möglicherweise spielt das SCNBP in Prozessen eine Rolle, die zur Umstrukturierung des Zytoskeletts führen. Das Protein Fkbp6 (FK506 binding protein 6, #62 in Tab. 3.1) wird in der Maus hodenspezifisch exprimiert und kommt in Zytoplasma und Zellkern von Spermatozyten vor. Dieses Protein ist ein Bestandteil synaptonemaler Komplexe - Strukturen, die während der Meiose die Paarung homologer Chromosomen vermitteln. Fkbp6 wird zwar auch in meiotischen Keimzellen weiblicher Mäuse detektiert, aber interessanterweise führt die Inaktivierung des FKbp6-Gens nur bei männlichen Mäusen zur Infertilität (Crackower et al., 2003). Auch hier ist eine Funktion des SCNBP denkbar. PHGPx (*phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*, #97 in Tab. 3.1) ist ein Selenocystein enthaltendes Enzym, das in Keimzellen mehrere Funktionen

übernimmt. Die biophysikalischen Eigenschaften von PHGPx verändern sich während der Spermatogenese. Während PHGPx in Spermatiden enzymatisch aktiv und löslich ist, ist es in Spermien enzymatisch inaktiv und unlöslich. PHGPx reduziert Phospholipidhydroperoxide und schützt Keimzellen somit vor oxidativen Schäden (Ursini et al., 1999). Des Weiteren ist das Protein für die Kondensation von Chromatin während der Spermatogenese essentiell (Pfeifer et al., 2001). In reifen Spermien ist PHGPx wichtig für die Erhaltung der Zellstruktur: bei Selenmangel werden morphologische Missbildungen des Midpiece von Spermien beobachtet (Wu et al., 1979).

Im Zusammenhang mit der posttranslationalen Modifizierung (vgl. 4.2) ist interessant, dass die NRD-Konvertase - eine Endoprotease - auch als möglicher Interaktionspartner identifiziert wurde. Die NRD-Konvertase hydrolysiert Peptidbindungen N-terminal von Argininresten und wird im Maushoden ausschließlich in späten Spermatiden nachgewiesen (Chesneau et al., 1996).

Das SCNBP könnte in diversen zellulären Prozessen der Keimzellentwicklung von Bedeutung sein. Ich habe in meiner Arbeit 105 Proteine identifiziert, die mit dem SCNBP interagieren könnten. Die massenspektrometrische Analyse der Koimmunpräzipitationen ist ein sehr guter Ausgangspunkt. Wie schon erwähnt, sind die Experimente jedoch noch nicht abgeschlossen. Mit weiteren massenspektrometrischen Analysen können falschpositive Proteine identifiziert und möglicherweise einige weitere Interaktionspartner gefunden werden. Mit unabhängigen Methoden müssen diese Interaktionen dann überprüft werden.

4.4 SCNBP in anderen Geweben

Möglicherweise ist das Maus-SCNBP an der Differenzierung von Keimzellen zu reifen Spermien beteiligt. In Northernblot-Experimenten wurde gezeigt, dass die annotierte mRNA, die für die Varianten A und/oder B kodiert, in der Maus nur im Hoden vorkommt (Utzerath, 2003; Krähling, 2006). Diesem Ergebnis zufolge scheint das SCNBP ein hodenspezifisches Protein zu sein. Zwei aktuelle Arbeiten liefern aber Hinweise darauf, dass das SCNBP auch in anderen Geweben vorkommt.

Im Rahmen eines Screenings zur Identifizierung phosphorylierter Proteine in der Mausleber wurde massenspektrometrisch ein Peptid identifiziert, das eindeutig dem SCNBP zuzuordnen ist (Dai et al., 2007, *supplemental data*). Das Peptid beinhaltet die Aminosäurereste 47 bis 66 der SCNBP-Variante A. Das Protein, dem das Peptid zugeordnet wird, wird in der

Mouse International Protein Index protein sequence database (www.ebi.ac.uk/IPI) unter der Zugangsnummer IPI00108484 geführt. Dieses Protein entspricht ab der Aminosäureposition 117 dem annotierten SCNBP C, ist im N-terminalen Bereich aber identisch mit der SCNBP-Variante A und entspricht somit der Variante C, die in dieser Arbeit im Maushoden nachgewiesen wurde. Dies bestätigt, dass Variante C länger ist als in der Vega-Datenbank annotiert (vgl. 3.3.2 und 4.1). Abbildung 4.2 zeigt die Aminosäuresequenz des identifizierten Peptides und die möglichen Phosphorylierungsstellen.

47 **SDTTESKSESGSDSRSEEDK** 66

Abb. 4.2: SCNBP-Phosphopeptid. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des von Dai et al. (2007) identifizierten Phosphopeptides der SCNBP-Variante A bzw. C aus der Mausleber (Aminosäuren 47 bis 66). Das Peptid enthält insgesamt zwei Phosphatreste. Ein Phosphatrest befindet sich an Serin 62 (rot unterlegt), der zweite Phosphatrest befindet sich entweder an Serin 47, Threonin 49, Threonin 50 oder Serin 52 (grau unterlegt).

Das identifizierte Peptid enthielt zwei Phosphatgruppen (Abb. 4.2). Der Serinrest an Position 62 konnte mit Sicherheit als Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Welche Aminosäure des Peptids noch phosphoryliert vorliegt, ist nicht eindeutig. Das Programm NetPhosK 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) sagt für den Serinrest an der Aminosäureposition 62, aber auch an den Positionen 47 und 52 eine mögliche Phosphorylierung durch die Casein-Kinase II (CKII) vorher. Für die beiden Threonine an den Positionen 49 und 50 werden keine Phosphorylierungsstellen vorhergesagt. Möglicherweise wird die Funktion des SCNBPs - so wie vieler anderer Proteine auch - über Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Interessanterweise scheint die CKII im Maushoden wichtig für die Keimzellentwicklung zu sein. Die CKII besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten (α oder α') und zwei regulatorischen β -Untereinheiten. Mäuse, in denen das Gen für die katalytische Untereinheit α' der CKII ausgeschaltet wurde, produzieren im Vergleich zum Wildtyp weniger Spermien und die Spermienköpfe sind deformiert. Diese Mäuse sind infertil (Xu et al., 1999).

Eine Arbeit von Jeon et al. (2007, *supplemental data*) zeigt, dass das SCNBP auch im Herz exprimiert wird. Diese Gruppe hat ebenfalls mit Hilfe der Massenspektrometrie nach Proteinen gesucht, die im Mausherz ubiquitiniert werden. Ubiquitin ist ein kleines Protein, das posttranslational mit dem N-Terminus oder mit Lysinresten anderer Proteine konjugiert wird und als Signalmolekül für den Abbau dieser Proteine dient (Übersicht: Kirkin & Dikic, 2007). In einem identifizierten SCNBP-Peptid fand man zwei Lysinreste, die ubiquitiniert werden (Abb. 4.3).

68 **SPASIK^{KE}IK^{AE}TPQ^{PK}DR** 85

Abb. 4.3: SCNBP-Peptid. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des von Jeon et al. (2007) identifizierten Peptides der SCNBP-Variante A bzw. C aus dem Mausherz (Aminosäuren 68 bis 85). Das SCNBP enthält mindestens zwei Lysinreste, die im Herz ubiquitiniert werden können (gelb unterlegt).

Das identifizierte Peptid beinhaltet die Aminosäurereste 68 bis 85 des SCNBPs mit der Zugangsnummer IPI00108484 (s.o).

Dass das SCNBP nicht, wie zunächst angenommen, hodenspezifisch exprimiert wird, schließt nicht aus, dass es in Keimzellen oder Spermien eine wichtige Funktion übernimmt. Es gibt Beispiele von Proteinen, die nicht ausschließlich im Hoden vorkommen aber an cAMP-Signalwegen beteiligt und wichtig für die Spermatogenese oder den Befruchtungsvorgang sind. Dazu gehören der Transkriptionsfaktor CREM (Nantel et al., 1996; Blendy et al., 1996), die Proteinkinase A (Skålhegg et al., 2002), die Adenylatzyklase III (Livera et al., 2005) und die lösliche Adenylatzyklase (Esposito et al., 2004; Hess et al., 2005).

Jedoch eröffnet die Identifizierung des SCNBPs in anderen Geweben als dem Maushoden neue Möglichkeiten. Vielleicht werden unterschiedliche SCNBP-Varianten (vgl. 1.2.1) gewebespezifisch exprimiert und das SCNBP ist an diversen zellulären Prozessen beteiligt. Mit den vorhandenen SCNBP-spezifischen Antikörpern muss überprüft werden, ob das SCNBP neben Leber, Herz und Hoden auch in anderen Geweben exprimiert wird und um welche Varianten es sich handelt.

4.5 Ausblick

In meiner Arbeit konnte ich nachweisen, dass zwei unterschiedliche SCNBP-Varianten im Maushoden exprimiert werden. Nun ist wichtig herauszufinden, in welchen Zellen des Maushodens das SCNBP vorkommt. Durch Koimmunpräzipitationsexperimente und massenspektrometrische Analysen habe ich mögliche Interaktionspartner des SCNBPs identifiziert. Mit unabhängigen Methoden müssen diese bestätigt werden. Hierzu können u.a. *Pulldown*-Experimente mit dem heterolog exprimiertem SCNBP durchgeführt werden. Diese Experimente zusammen mit einer SCNBP *Knock-out* Mauslinie werden die Funktion des SCNBPs schließlich aufklären. Des Weiteren muss das SCNBP biochemisch genau charakterisiert werden. Mit dem heterolog exprimierten Protein können nun die Bindungsaffinitäten des SCNBPs für zyklische Nukleotide bestimmt werden. So lässt sich klären, welches zyklische Nukleotid der natürliche Ligand für das SCNBP ist. Interessant

wäre ein Vergleich der Bindungsaffinitäten im ganzen Protein und in der isolierten Bindestelle für zyklische Nukleotide.

5 Literaturverzeichnis

- Barton, K., Muthusamy, N., Chanyangam, M., Fischer, C., Clendenin, C., Leiden, J.M. (1996): Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature* **379**, 81-85.
- Bellvé, A.R., Millette, C.F., Bhatnagar, Y.M., O'Brien, D.A. (1977): Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *J. Histochem. Cytochem.* **25**, 480-494.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Blendy, J.A., Kaestner, K.H., Weinbauer, G.F., Nieschlag, E., Schütz, G. (1996): Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking of CREM gene. *Nature* **380**, 162-165.
- Bonifacino, J.S., Dell'Angelica, E.C., Springer, T.A. (1999): Immunoprecipitation. *Current Protocols in Protein Science Suppl.* **18**, 9.8.1-9.8.28.
- Bos, J.L. (2006): Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 680-686.
- Bourtchuladze, R., Frenquelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., Silva, A.J. (1994): Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* **79**, 59-68.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987): XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-378.
- Burns, M.E. & Arshavsky, V.Y. (2005): Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron* **48**, 387-401.
- Busby, R.H. & Ebright, R.H. (1999): Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* **293**, 199-213.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752.
- Chesneau, V., Prat, A., Segretain, D., Hospital, V., Dupaix, A., Foulon, T., Jégou, B., Cohen, P. (1996): NRD convertase: a putative processing endoprotease associated with the axoneme and the manchette in late spermatids. *J. Cell Sci.* **109**, 2737-2745.

- Crackower, M.A., Kolas, N.K., Noguchi, J., Sarao, R., Kikuchi, K., Kaneko, H., Kobayashi, E., Kawai, Y., Kozieradzki, I., Landers, R., Mo, R., Hui, C.C., Nieves, E., Cohen, P.E., Osborne, L.R., Wada, T., Kunieda, T., Moens, P.B., Penninger, J.M. (2003): Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science* **300**, 1291-1295.
- Dai, J., Jin, W.-H., Sheng, Q.-H., Shieh, C.-H., Wu, J.-R., Zeng, R. (2007): Protein phosphorylation and expression profiling by Yin-yang multidimensional liquid chromatography (Yin-yang MDLC) mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **6**, 250-262.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., Bos, J.L. (1998): Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.
- DiFrancesco, D. (1993): Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 455-472.
- Diller, T.C., Madhusudan, M., Xuong, N.-H., Taylor, S.S. (2001): Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: Crystal structure of the type II β regulatory subunit. *Structure* **9**, 73-82.
- Esposito, G., Jaiswal, B.S., Xie, F., Krajnc-Franken, M.A.M., Robben, T.J.A.A., Strik, A.M., Kuil, C., Philipsen, R.L.A., van Duin, M., Conti, M., Gossen, J.A. (2004): Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2993-2998.
- Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S., Lyubarsky, A.L. (1985): Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**, 310-313.
- Francis, S.H. & Corbin, J.D. (1999): Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **36**, 275-328.
- Francis, S.H., Noblett, B.D., Todd, B.W., Wells, J.N., Corbin, J.D. (1988): Relaxation of vascular and tracheal smooth muscle by cyclic nucleotide analogs that preferentially activate purified cGMP-dependent protein kinase. *Mol. Pharmacol.* **34**, 506-517.
- Frings, S. (2001): Chemoelectrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air-breathing vertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 510-519.
- Heery, D.M., Gannon, F., Powell, R. (1990): A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Gen.* **6**, 173.
- Hess, K.C., Jones, B.H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T.S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J.H., Kopf, G.S., Suarez, S.S., Levin, L.R., Williams, C.J., Buck, J., Moss, S.B. (2005): The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev. Cell* **9**, 249-259.
- Jeon, H.B., Choi, E.S., Yoon, J.H., Hwang, J.H., Chang, J.W., Lee, E.K., Choi, H.W., Park, Z.-Y., Yoo, Y.J. (2007): A proteomics approach to identify the ubiquitinated proteins in mouse heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 731-736.
- Jin, X.H., Siragy, H.M., Carey, R.M. (2001): Renal interstitial cGMP mediates natriuresis by direct tubule mechanism. *Hypertension* **38**, 309-316.

- Josselyn, S.A. & Nguyen, P.V. (2005): CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **4**, 481-497.
- Kaneko, M. & Takahashi, T. (2004): Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation. *J. Neurosci.* **24**, 5202-5208.
- Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H., Seino, S. (2001): Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **276**, 46046-46053.
- Kaupp, U.B. & Seifert, R. (2002): Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* **82**, 769-824.
- Kaupp, U.B. & Seifert, R. (2001): Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 235-257.
- Kirkin, V. & Dikic, I. (2007): Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 199-205.
- Körbel, S., Schümann, M., Bittorf, T., Krause, E. (2005): Relative quantification of erythropoietin receptor-dependent phosphoproteins using in-gel 18O-labeling and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 2259-2271.
- Krähling, M. (2006): Experimente zur Charakterisierung eines Bindeproteins für zyklische Nukleotide. Diplomarbeit Universität zu Köln.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Linder, B., Bammer, S., Heinlein, U.A. (1995): Delayed translation and posttranslational processing of cyritestin, an integral transmembrane protein of the mouse acrosome. *Exp. Cell Res.* **221**, 66-72.
- Livera, G., Xie, F., Garcia, M.A., Jaiswal, B., Chen, J., Law, E., Storm, D.R., Conti, M. (2005): Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoon function. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1277-1290.
- Lüthi, A. & McCormick, D.A. (1998): H-current: Properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* **21**, 9-12.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
- Mullis, K.B., Faron, F.A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263-273.
- Nakamura, T. & Gold, G.H. (1987): A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**, 442-444.
- Nantel, F., Monaco, L., Foulkes, N.S., Masquillier, D., LeMeur, M., Henriksen, K., Dierich, A., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P. (1996): Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* **380**, 159-162.

- Nielsen, J.N. & Richter, E.A. (2003): Regulation of glycogen synthase in skeletal muscle during exercise. *Acta Physiol. Scand.* **178**, 309-319.
- Oestreich, E.A., Wang, H., Malik, S., Kaproth-Joslin, K.A., Blaxall, B.C., Kelley, G.G., Dirksen, R.T., Smrcka, A.V. (2007): Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca²⁺ mobilization in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **282**, 5488-5495.
- Pero, R., Lembo, F., Chieffi, P., Del Pozzo, G., Fedele, M., Fusco, A., Bruni, C.B., Chiariotti, L. (2003): Translational regulation of a novel testis-specific RNF4 transcript. *Mol. Reprod. Dev.* **66**, 1-7.
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W., Behne, D. (2001): Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J.* **15**, 1236-1247.
- Ramachandran, C., Goris, J., Waelkens, E., Merlevede, W., Walsh, D.A. (1987): The interrelationship between cAMP-dependent alpha and beta subunit phosphorylation in the regulation of phosphorylase kinase activity. Studies using subunit specific phosphatases. *J. Biol. Chem.* **262**, 3210-3218.
- Rangarajan, S., Enserink, J.M., Kuiperij, H.B., de Rooij, J., Price, L.S., Schwede, F., Bos, J.L. (2003): Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J. Cell Biol.* **160**, 487-493.
- Rehmann, H., Prakash, B., Wolf, E., Rueppel, A., de Rooij, J., Bos, J.L., Wittinghofer, A. (2003): Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 26-32.
- Robinson, R.B. & Siegelbaum, S.A. (2003): Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 453-480.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sepulveda, J.L. & Wu, C. (2006): The parvins. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 25-35.
- Servillo, G., Penna, L., Foulkes, N.S., Magni, M.V., Della Fazio, M.A., Sassone-Corsi, P. (1997): Cyclic AMP signalling pathway and cellular proliferation: induction of CREM during liver regeneration. *Oncogene* **14**, 1601-1606.
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A., Huse, W.D. (1988): λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7583-7600.
- Skålhegg, B.S., Huang, Y., Su, T., Idzerda, R.L., McKnight, G.S., Burton, K.A. (2002): Mutation of the C α subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol. Endocrinol.* **16**, 630-639.

- Takahashi, H., Koshimizu, U., Miyazaki, J., Nakamura, T. (2002): Impaired spermatogenic ability of testicular germ cells in mice deficient in the LIM-kinase 2 gene. *Dev. Biol.* **241**, 259-272.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., Flohé, L. (1999): Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* **285**, 1393-1396.
- Utzerath, S. (2003): Identifizierung eines löslichen zyklisch-Nukleotid-Binde-Proteins. Diplomarbeit Universität zu Köln.
- Weber, I.T. & Steitz, T.A. (1987): Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **198**, 311-326.
- Wong, C., Sridhara, S., Bardwell, J.C.A., Jakob, U. (2000): Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. *BioTechniques* **28**, 426-432.
- Wu, A.S., Oldfield, J.E., Shull, L.R., Cheeke, P.R. (1979): Specific effect of selenium deficiency on rat sperm. *Biol. Reprod.* **20**, 793-798.
- Wu, H., Zhou, Y., Xiong, Z.Q. (2007): Transducer of regulated CREB and late phase long-term synaptic potentiation. *FEBS J.* **274**, 3218-3223.
- Xu, X., Toselli, P.A., Russel, L.D., Seldin, D.C. (1999): Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat. Genet.* **23**, 118-121.
- Zagotta, W.N., Olivier, N.B., Black, K.D., Young, E.C., Olson, R., Gouaux, E. (2003): Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* **425**, 200-205.
- Zoraghi, R., Corbin, J.D., Francis, S.H. (2004): Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins. *Mol. Pharmacol.* **65**, 267-278.

6 Anhang

6.1 Klonierung des Konstruktes pcDNA3.1(+) mSCNBP[B]His₆

Zur Herstellung des Konstruktes pcDNA3.1(+) mSCNBP[B]His₆ wurde eine PCR (2.6) mit den Primern #4334 und #4335 auf dem Konstrukt pcA-mSCNBP[B]HA (3.1) durchgeführt (PCR1). Der Primer #4334 bindet im Bereich einer endogenen NcoI-Schnittstelle. Der Primer #4335 fügt 3'-wärts die Basensequenz für eine Thrombinschnittstelle und einen Teil des Hexahistidintags ein. Das amplifizierte Fragment war 604 Bp groß. Das Fragment wurde gelelektrophoretisch isoliert (2.4.4, 2.4.6) und diente als Matrize für die nachfolgende PCR2 mit den Primern #4334 und #4337. Der Primer #4337 hybridisiert mit den letzten 18 Nukleotiden des Produktes aus PCR1. Er fügt 3'-wärts die Basensequenz für vier weitere Histidine, ein Stoppkodon sowie eine NotI-Schnittstelle ein. Das amplifizierte Fragment war 636 Bp groß. Es wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und NotI geschnitten (2.5.1), in den NcoI/NotI-geschnittenen Vektor pBluescript SKext ligiert (2.5.2.1) und sequenziert (2.7). Zur Konstruktion des vollständigen Klons pcDNA3.1(+) mSCNBP[B]His₆ wurde zunächst der Klon pcA-mSCNBP[B]HA mit KpnI und NcoI geschnitten (2.5.1) und ein 1113 Bp großes Restriktionsfragment gelelektrophoretisch isoliert (2.4.4, 2.4.6). Dieses Fragment entspricht den Nukleotidpositionen -16 bis 1097 im vollständigen mSCNBP[B]His₆-Klon. Das sequenzierte PCR-Fragment #4334/#4337 wurde mit NcoI und NotI aus dem Vektor pBluescript SKext geschnitten und ein 616 Bp großes Restriktionsfragment gelelektrophoretisch isoliert (2.4.4, 2.4.6). Anschließend wurden die beiden Fragmente in den KpnI/NotI-geschnittenen Vektor pcDNA3.1(+) ligiert (2.5.2.1). Dieser pcDNA-Klon wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft.

6.2 Sequenzen und Hybridisierungsbereiche aller verwendeten Primer

Die Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in 5'→3'-Richtung angegeben. Die in Kleinbuchstaben geschriebenen Nukleotide hybridisieren nicht mit der Matrizen-DNA. Eingefügte bzw. verwendete Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Für die Primer, die in einer SCNBP-Sequenz hybridisieren, sind die genauen Positionen in der cDNA angegeben. Das erste Nukleotid des Startkodons ATG ist dabei die Position +1.

Primer	Sequenz 5'→3'	Hybridisierungsbereich	Verwendung
#4334	AAATGTT <u>CCATGGT</u> CAACACC	Bp 1090 - 1110 (mSCNBP[B]HA bzw. mSCNBP[B]His ₆)	PCRs zur Herstellung der Konstrukte pcDNA3.1(+) mSCNBP[B]His ₆ und pcDNA3.1(+) mSCNBP[A]His ₁₀
#4335	gATgATggctGcCGcgcgCacc... ...agAATAAGGACCCCTGCATTCTT	Bp 1648 - 1693 (mSCNBP[B]HA)	PCR zur Herstellung des Konstruktes pcDNA3.1(+) mSCNBP[B]His ₆
#4337	ttttcctttt <u>cgggccg</u> ctcagtgatgatgg... ...tgaTGATGGCTGCCGCGCG	Bp 587 - 601 (PCR-Produkt _{#4334/#4335})	
#4419	CCcCTcGA <u>g</u> TCagtgGtggtg... ...gtgGTGATGATGGTGATGATG	Bp 1708 - 1749 (mSCNBP[B]His ₆)	PCR zur Herstellung des Konstruktes pcDNA3.1(+) mSCNBP[A]His ₁₀
#9001	TAATACGACTCACTATAGGG	T3-Promotor pBluescript SK ⁻	Sequenzierung von pBluescript SK ⁻ -Derivaten
#9002	TAGAAGGCACAGTCGAGG	T7-Promotor pBluescript SK ⁻	

6.3 Mögliche Interaktionspartner des Maus-SCNBP

In der nachfolgenden Tabelle sind die als Interaktionspartner in Frage kommenden Proteine aufgelistet. Zu jedem Protein sind eine Zugangsnummer und die Bezeichnung des jeweiligen Proteins aufgeführt. Proteine, die in der NCBI-Datenbank unter mehreren Zugangsnummern zu finden sind, sind gruppiert.

#	NCBI Acc. Nr	Protein
1	94390964	PREDICTED: hypothetical protein LOC69926
2	124486933	Extraembryonic development protein

3	38424077	Protein kinase, lysine deficient 1
4	94400269	PREDICTED: hypothetical protein
5	7710042	IQ motif containing GTPase activating protein 1
5	28204944	IQ motif containing GTPase activating protein 1
5	37359752	Mkiaa0051 protein
6	62122363	Jsap2a
6	70887772	Sperm associated antigen 9 isoform 1
6	94717649	C-jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4 (JNK-interacting protein 4)
7	27369782	Gem (nuclear organelle) associated protein 5
7	47847430	Mflj00137 protein
7	74138042	Unnamed protein product
7	123223408	Gem (nuclear organelle) associated protein 5
8	20073094	Nardilysin, N-arginine dibasic convertase, NRD convertase 1
8	123255681	Nardilysin, N-arginine dibasic convertase, NRD convertase 1
9	82997081	PREDICTED: similar to YTH domain containing 2
10	16740643	Dhx30 protein ; DEAH-box helicase DHX30
10	19111156	Helg
10	74150511	Unnamed protein product
11	94730677	WD repeat protein 19
12	28972622	Mkiaa1108 protein
12	37538012	TBC1 domain family member 1
12	74192855	Unnamed protein product
12	120587003	TBC1 domain family, member 1
13	51555858	Strawberry notch homolog 1
13	94375435	PREDICTED: similar to sno, strawberry notch homolog 1
13	94376788	PREDICTED: similar to sno, strawberry notch homolog 1
13	124487087	Sno, strawberry notch homolog 1
14	13492031	Arsenite-resistance protein 2b, splice variant removing 12 bp from exon 18
14	13492032	Arsenite-resistance protein 2c, splice variant removing 21 bp from exon 19
14	13492033	Arsenite-resistance protein 2d, variant splicing out 12 bp and 21 bp from exons 18 and 19 respectiv
14	13937395	Arsenate resistance protein 2
14	17512287	Ars2-pending protein
15	46195739	RNA polymerase III subunit RPC2
16	22122717	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3 ; central to the regulation of mrna metabolism
17	2495342	Heat shock 70 kda protein 4 (Heat shock 70-related protein APG-2)
17	13277753	Heat shock protein 4
17	60360216	Mkiaa4025 protein
17	112293266	Heat shock protein 4

18	109966	Hexokinase (EC 2.7.1.1), tumor - mouse
18	309289	Hexokinase (EC 2.7.1.1)
18	5542103	Chain a, rat brain hexokinase type i complex with glucose and inhibitor glucose-6-phosphate
18	6754206	Hexokinase 1
18	30316354	Hexokinase-1 (Hexokinase type I) (HK I) (Hexokinase, tumor isozyme)
18	49117745	Hk1 protein
18	74150648	Unnamed protein product
18	74195468	Unnamed protein product
18	74207854	Unnamed protein product
19	3834675	Interleukin enhancer binding factor 3
19	62512127	Interleukin enhancer-binding factor 3
19	111607430	Interleukin enhancer binding factor 3 isoform 1
19	111607432	Interleukin enhancer binding factor 3 isoform 2
19	111607434	Interleukin enhancer binding factor 3 isoform 3
19	111607436	Interleukin enhancer binding factor 3 isoform 4
20	6754444	Kinesin-associated protein 3
20	20532094	Kinesin-associated protein 3 (KAP3)
20	74228967	Unnamed protein product
21	13638207	6-phosphofructokinase, muscle type (Phosphofructokinase 1) (Phosphohexokinase)
22	85701985	Hypothetical protein LOC381738
23	26325884	Unnamed protein product
23	115385966	Transportin 1 isoform 2
23	115385968	Transportin 1 isoform 1
24	40068493	DEAD box polypeptide 17 isoform
24	93587673	DEAD box polypeptide 17 isoform 4
25	74151347	Unnamed protein product
25	74183454	Unnamed protein product
26	20982845	Pigpen
26	26252108	Fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human)
26	74145855	Unnamed protein product
26	74226636	Unnamed protein product
27	6753518	Insulin-like growth factor 2, binding protein 1
27	26336871	Unnamed protein product
27	30354044	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1
28	12746442	Eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA-specific
28	13124518	Selenocysteine-specific elongation factor (Elongation factor sec)
28	74190904	Unnamed protein product
29	3860189	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2 protein homolog
29	26347461	Unnamed protein product
29	33859652	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2 homolog
29	74222323	Unnamed protein product

30	23396902	Vacuolar protein sorting-associated protein 33B
30	30017383	Vacuolar protein sorting 33B
31	6567178	Mdj11
31	12848273	Unnamed protein product
31	31980994	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7
31	74217032	Unnamed protein product
32	13385798	Dynactin 4
32	13879394	Dctn4 protein
32	78100038	Dynactin subunit 4 (Dynactin subunit p62)
33	11230780	Tumor susceptibility gene 101 protein
33	74226691	Unnamed protein product
34	7657607	Sperm associated antigen 6
35	9789893	BRG1/brm-associated factor 53A
35	23396474	Actin-like protein 6A (53 kda BRG1-associated factor A) (Actin-related protein Baf53a)
35	74141943	Unnamed protein product
36	1350831	Programmed cell death protein 2 (Zinc finger protein Rp-8)
36	39754749	Programmed cell death protein 2
36	47117852	Programmed cell death protein 2 (Zinc finger protein Rp-8)
36	120407033	Programmed cell death 2
37	8918812	Unnamed protein product
37	26346240	Unnamed protein product
37	31982526	Parvin, alpha
38	16716445	Allantoicase
39	14285504	Immunoglobulin-binding protein 1b (CD79a-binding protein 1b) (Alpha 4-b protein) (Alpha4-b)
39	113866007	Immunoglobulin (CD79A) binding protein 1b
40	16741389	Rtd1 protein
40	74185282	Unnamed protein product
40	74204179	Unnamed protein product
40	74212450	Unnamed protein product
41	33942104	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1
41	40555847	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1
42	22122515	AHA1, activator of heat shock 90kda protein ATPase homolog 1
42	26345022	Unnamed protein product
42	74177617	Unnamed protein product
43	13385434	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase
43	15214218	Multifunctional protein ADE2
44	9789887	ARP10 actin-related protein 10 homolog
44	12805503	ARP10 actin-related protein 10 homolog

45	6016389	Plasma serine protease inhibitor precursor (PCI) (Protein C inhibitor) (Serpin A5)
45	26352698	Unnamed protein product
45	27370468	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 5
46	2895588	TFII-I protein long form; p128
46	2895590	TFII-I protein short form; p128
46	94375711	PREDICTED: similar to General transcription factor II-I (GTFII-I) (TFII-I)
46	124001570	General transcription factor II I isoform 4
46	124001572	General transcription factor II I isoform 2
46	124001574	General transcription factor II I isoform 1
46	124001576	General transcription factor II I isoform 3
46	124001578	General transcription factor II I isoform 5
47	21703948	Replication factor C (activator 1) 4
47	74150977	Unnamed protein product
48	12850523	Unnamed protein product
48	13195602	Hsp70-interacting protein
48	78098997	Hsp70-binding protein 1 (hsbp1) (Heat shock protein-binding protein 1)
49	9790019	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1
49	74142229	Unnamed protein product
49	74197997	Unnamed protein product
49	74214525	Unnamed protein product
50	4092671	KH domain RNA binding protein QKI-5A
50	12837500	Unnamed protein product
50	108860917	Quaking protein
51	19882207	Farnesyl diphosphate synthetase
51	56789674	Farnesyl diphosphate synthetase
51	74141499	Unnamed protein product
51	74183868	Unnamed protein product
52	38083783	PREDICTED: similar to mortality factor 4 like 1 isoform b
52	74146975	Unnamed protein product
52	74181375	Unnamed protein product
52	82998543	PREDICTED: similar to mortality factor 4 like 1 isoform b
52	94401156	PREDICTED: similar to mortality factor 4 like 1 isoform b
52	94406757	PREDICTED: similar to mortality factor 4 like 1 isoform b
53	13385328	Fibronectin type 3 and ankyrin repeat domains 1
54	12025542	Arsa (bacterial) arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1
55	28201956	RAE1 RNA export 1 homolog
55	74222102	Unnamed protein product
56	31982373	Fibrillarin
56	74226877	Unnamed protein product
57	595917	Capping protein alpha 1 subunit

57	33468887	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1
57	55716090	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1
57	74185551	Unnamed protein product
58	19353472	Jtv1-pending protein
58	20071244	Jtv1-pending protein
58	22122695	Jtv1
59	117606409	WBP2 N-terminal like
60	7710036	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
61	18044843	Cab39 protein
61	22137752	Cab39 protein
61	31982582	MO25 protein
62	15809008	FK506 binding protein 6
62	23396593	FK506-binding protein 6 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) (ppiase) (Rotamase)
62	26354863	Unnamed protein product
63	4584979	Palmitoyl-protein thioesterase precursor
63	17225441	Palmitoyl-protein thioesterase precursor
63	74143839	Unnamed protein product
63	74152637	Unnamed protein product
63	74181614	Unnamed protein product
63	74185280	Unnamed protein product
63	121674797	Palmitoyl-protein thioesterase 1
64	3342500	Protein phosphatase type 2A catalytic subunit alpha isoform
65	3169732	Hematopoietic lineage switch 7
65	88196767	Myeloid leukemia factor 1 isoform a
65	88196769	Myeloid leukemia factor 1 isoform b
66	6678235	Transcription elongation factor A protein 2
66	29437299	Tcea2 protein
66	41351345	Tcea2 protein
66	74210421	Unnamed protein product
67	51765108	PREDICTED: hypothetical protein LOC77305 isoform 1
68	12849020	Unnamed protein product
68	13277350	WD repeat domain 61 isoform a
68	26345856	Unnamed protein product
68	74150336	Unnamed protein product
69	2498846	Replication protein A 32 kda subunit (RP-A) (RF-A) (Replication factor-A protein 2) (p32)
69	13435424	Replication protein A2
69	110625961	Replication protein A2
70	13278567	Psm8 protein
70	20978554	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 (26S proteasome regulatory subunit S14)
70	26341828	Unnamed protein product

70	26371077	Unnamed protein product
70	27229063	Proteasome 26S non-ATPase subunit 8
70	74204612	Unnamed protein product
70	74213337	Unnamed protein product
71	12854070	Unnamed protein product
71	42475954	Atpase, H ⁺ transporting, V1 subunit E-like 2 isoform 2
72	12963799	Atpase, H ⁺ transporting, V1 subunit D
72	74138730	Unnamed protein product
73	12839675	Unnamed protein product
74	12659144	Mage-g2
75	21313192	Hypothetical protein LOC76411
75	21961655	1700019E19Rik protein
75	24416496	1700019E19Rik protein
75	119368563	Uncharacterized protein c14orf179 homolog
76	20149310	Ovary-specific MOB-like protein
77	21313424	Dr1 associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)
77	94405753	PREDICTED: similar to Dr1 associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha) isoform 2
78	3201958	Eif4e-like protein 4E-LP
78	85677508	Eukaryotic translation initiation factor 4E member 2 isoform 2
78	85677510	Eukaryotic translation initiation factor 4E member 2 isoform 1
79	123295852	Peroxiredoxin 4
80	16359342	Cab39l protein
80	31541826	Calcium binding protein 39-like
81	3142331	Calcyclin binding protein
81	33468885	Calcyclin binding protein
82	7021537	U2 small nuclear ribonucleoprotein A'
82	31077178	U2 small nuclear ribonucleoprotein A' (U2 snrnp-A')
82	94380652	PREDICTED: similar to U2 small nuclear ribonucleoprotein A (U2 snrnp-A)
83	548879	Ras suppressor protein 1 (Rsu-1) (RSP-1)
83	12850216	Unnamed protein product
83	12852780	Unnamed protein product
83	31982028	Ras suppressor protein 1
83	123233233	Ras suppressor protein 1
84	38083795	PREDICTED: proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 8 isoform 1
85	1698570	Proteasome activator PA28 alpha subunit
85	6755212	Proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha
85	12842740	Unnamed protein product
85	18202600	Proteasome activator complex subunit 1 (Proteasome activator 28-alpha subunit)

86	12858256	Unnamed protein product
86	29144998	Eif4e2 protein
86	34877568	PREDICTED: similar to Eukaryotic translation initiation factor 4E type 3 (eif4e type 3)
86	74206151	Unnamed protein product
86	85677506	Eukaryotic translation initiation factor 4E member 2 isoform 3
87	6755196	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 4
87	74151744	Unnamed protein product
87	74177575	Unnamed protein product
88	10946940	RAB2, member RAS oncogene family
88	26335369	Unnamed protein product
89	21312044	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 12
90	20987342	Dtymk protein
91	6677781	Ribosomal protein L29
92	21313158	RAB, member of RAS oncogene family-like 4
93	22122663	Tudor domain containing 7
93	123123576	Tudor domain containing 7
94	25092662	Vacuolar protein sorting 25
94	73920461	Vacuolar protein sorting-associated protein 25 (ELL-associated protein of 20 kda)
95	539918	Bcl-2-associated protein x - mouse
95	2493273	Apoptosis regulator BAX, membrane isoform alpha
95	6680770	Bcl2-associated X protein
95	21217733	Bcl2-associated X protein kappa isoform
95	74192814	Unnamed protein product
96	4323148	Dynactin light chain
96	31980821	Dynactin 3
96	90108454	Dynactin subunit 3 (Dynactin light chain p24)
97	3075478	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX4
97	3114602	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
97	13124257	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial precursor (phgpx) (GPX-4)
97	14971095	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
97	22022301	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
97	31076659	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, nuclear (GPX-4)
97	31076717	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, nuclear (GPX-4)
97	74204272	Unnamed protein product
97	90903233	Glutathione peroxidase 4 isoform 1 precursor
97	90903235	Glutathione peroxidase 4 isoform 2 precursor
97	93215895	Gpx4 protein
98	31560517	Ribosomal protein L27a
98	82885877	PREDICTED: similar to ribosomal protein L27a
98	94370586	PREDICTED: similar to ribosomal protein L27a

99	6680924	Cofilin 1, non-muscle
100	12859724	Unnamed protein product
100	20987292	Ube2v2 protein
100	26324680	Unnamed protein product
100	31543918	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
101	82922589	PREDICTED: similar to ribosomal protein L36
101	94385943	PREDICTED: similar to ribosomal protein L36
102	12842823	Unnamed protein product
103	26337731	Unnamed protein product
103	82889713	PREDICTED: similar to small nuclear ribonucleoprotein D2
104	116643146	Peroxiredoxin 6-related sequence 1
105	21594169	Ribosomal protein S9

6.4 Zugangsnummern aller annotierten Maus-SCNBP-Varianten

In der Tabelle sind die *Ensembl* bzw. *Vega Peptide-IDs* aller annotierten Maus-SCNBP-Varianten und die dazugehörigen NCBI-Zugangsnummern angegeben.

Variante	Ensembl Peptide- ID	Vega Peptide- ID	NCBI Acc Nr.
SCNBP A		OTTMUSP000000017200	123212047
			123233569
			148674244
SCNBP B	ENSMUSP000000041268		25090006
SCNBP C		OTTMUSP000000017201	123212049
			123233571
			20073171
SCNBP D	ENSMUSP000000073598		74193888
SCNBP E		OTTMUSP000000017202	123212048
			123233570
SCNBP F	ENSMUSP000000085945		49900126

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Neurowissenschaften und Biophysik, Abteilung Zelluläre Biophysik (INB-1) des Forschungszentrums Jülich angefertigt. Ich danke **allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern** für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

- Herrn Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Überlassung des Themas und seine stetige Diskussionsbereitschaft,
- Herrn Dr. R. Seifert für die wissenschaftliche Betreuung, die hilfreichen Diskussionen und wertvollen Ratschläge, sowie für seine Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit,
- Herrn J. Gätgens für die Anleitung bei der Fermentation von CHO-Zellen, seine ständige Hilfsbereitschaft und immer gute Laune,
- Herrn Dr. E. Krause und Herrn Dr. M. Schümann für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen,
- Herrn PD Dr. A. Baumann für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge, sowie für seine Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit,
- Herrn Dr. H.G. Körschen für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge,
- Herrn Dr. W. Bönigk für seine Hilfe in allen molekularbiologischen Fragen,
- Herrn A. Franzen und Herrn C. Aretzweiler für ihre große Hilfsbereitschaft im Labor,
- Astrid und Joachim für die nette Zeit (mit Euch würde ich immer wieder ein Büro teilen!),
- Dagmar, Anja, Sebastian, Timo, Miriam, Petra und Friederike für eine gute Zeit und ihre Unterstützung in allen möglichen Belangen,
- Herrn D. Grammig für die Unterstützung bei allen computertechnischen Fragen,
- Frau A. Eckert für ihre herzliche Art, ihren Humor und die freundliche Hilfe bei allen verwaltungstechnischen und organisatorischen Problemen,
- Herrn R. Esser für sein sonniges Gemüt, die Versorgung mit allerlei Desserts und seine aufopfernde Hingabe bei der Pflege unserer Büropflanzen.

Herrn Prof. Dr. P. Kloppenburg möchte ich für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität zu Köln danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Qui und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben und mein Leben bereichern.

Jül-4260
Januar 2008
ISSN 0944-2952