

Charakterisierung von Tetraspanin 5-Splice- Varianten in murinen Gewebeproben und humanen Medulloblastomzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Jennifer Kapps geb. Lind

aus Adenau

2009

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan L. Baader
2. Gutachter: PD Dr. med. Joachim Kappler

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.04.2009

Aus dem Anatomischen Institut der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. Karl Schilling

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

*Meinen Eltern
und
Jürgen*

Inhaltsverzeichnis

1 Glossar der Abkürzungen	8
2 Einleitung	10
2.1 Tetraspanine	10
2.2 Tetraspanin 5	14
2.3 Medulloblastome	15
2.4 Splicing	16
2.5 Ziel dieser Arbeit	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Molekularbiologische Methoden	18
3.1.1 Verwendete Substanzen, Lösungen und Puffer	18
3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
3.1.3 Western Blot – Analyse	21
3.1.4 Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf Westernblot-Membranen	21
3.1.5 Coomassie Blue Gelfärbung	23
3.1.6 Silberfärbung modifiziert nach Heukeshofen et al.	23
3.1.7 Proteinextraktion aus verschiedenen Geweben	24
3.1.8 Proteinextraktion aus Zellkulturen	25
3.1.9 Proteinbestimmung	26
3.1.10 Total RNA – Isolation mit Trizol	26
3.1.11 cDNA Gewinn mit Dynabeads	27
3.2 Antikörperaufreinigung	28
3.3 Zellkultur	30
3.3.1 Zelllinien	30
3.3.2 Kultivierung und Konservierung der Zelllinien	30
3.4 Klonierung	31

3.4.1 Plasmid DNA Präparation nach Qiagen Plasmid Midi und Maxi Protokoll	31
3.4.2 Fotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	32
3.4.3 Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien mit Plasmid-DNA	33
3.4.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese	34
3.4.6 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	35
3.4.7 Ligation von DNA	35
3.4.8 Kolonie-PCR	35
3.4.9 Anlegen von Glycerinkulturen	38
4 Ergebnisse	39
4.1 Etablierung des Tetraspanin 5 Antikörpers im Western Blot	39
4.2 Spezifität des Tetraspanin 5 Antikörpers	46
4.3 Expression von Tetraspanin 5 in verschiedenen Organen der Maus	49
4.4 Vergleich der Expression von Tetraspanin 5 in gesundem cerebralen und cerebellären Gewebe und in unterschiedlichen Entwicklungsstufen	50
4.5 Expression von Tetraspanin-5 in verschiedenen Tumorzelllinien im Vergleich zu gesundem cerebralen Gewebe	53
5 Diskussion	58
5.1 Expression von Tetratspanin 5 in verschiedenen Mausorganen	58
5.2 Potentielle Bedeutung der Tetraspanin-5 Splicevarianten	59
5.3 Bedeutung von Splicevarianten für klinische Krankheitsbilder, insbesondere für die Tumorphathogenese	61
6 Zusammenfassung	64

7 Literaturangaben

66

Danksagung

71

1 Glossar der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Bidest	Doppelt destilliert
bP	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differention
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl-sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre DNA
DTT	Dithiothreitol
E10, E16	Embryonaltag 10, 16
EC	Extrazelluläre Domäne
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein
FCS	fetales Kälberserum
G	Schleuderziffer
g	Gramm
h	Stunde
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kD	Kilo Dalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M	Mol pro Liter

μ	Mikro
P0	Tag der Geburt
P8, P10, P15	8., 10., 15. Postnataltag
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS-Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	‚Potentia Hydrogenii‘ pH-Wert = negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration. Als Maß für die Stärke der sauren bzw. basischen Wirkung einer wässrigen Lösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
hn RNA	unprozessierte RNA
mRNA	Boten RNA
snRNP	small-nuclear Ribonucleoprotein
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tm4sf	4-Transmembranprotein superfamily
Tm4sf2	4-Transmembranprotein superfamily 2
Tspan	Tetraspanin
Tspan 5	Tetraspanin 5
UV-Licht	ultraviolettes Licht
WHO	World Health Organisation
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

2 Einleitung

Tetraspaninproteine regulieren die Zellmorphologie, beeinflussen die Zellmotilität, sie steuern die Zellfusion und modulieren die Differenzierung von Zellen. Trotz dieser vielfältigen physiologischen Funktionen findet diese Proteinfamilie immer noch wenig Anerkennung in der aktuellen Literatur. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass Tetraspanine keine typischen Rezeptoren für Liganden-induzierte Signalvermittlung darstellen, sondern definierte Ligand-Rezeptor Signalweiterleitung nur modulieren. Außerdem sind Tetraspanine experimentell sehr schwer zugänglich, da sie kaum spezifische immunogene Peptidsequenzen enthalten und es entsprechend bis auf wenige Ausnahmefälle nicht gelungen ist, spezifische Antikörper gegen definierte Tetraspanine zu entwickeln. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Antikörper gegen ein bestimmtes Tetraspanin gereinigt und charakterisiert, sowie erste Expressionsdaten damit erhoben.

2.1 Tetraspanine

Tetraspanine bilden eine Gruppe von etwa 200 bis 350 Aminosäuren langen Transmembranproteinen, die sich durch eine für sie charakteristische Sekundär- und Tertiärstruktur auszeichnen. Wie der Name implementiert, enthalten Tetraspanine als auffälligstes Kriterium vier hydrophobe transmembrane Domänen, die zunächst einmal dafür sorgen, dass Tetraspanine in die Membran integriert werden. Zwischen der ersten und zweiten, sowie der dritten und vierten Transmembranregion besitzen Tetraspanine zwei extrazelluläre Schleifen, die diverse Proteinbindungen ermöglichen. Eine kleine, 4-Aminosäuren lange, intrazelluläre Schleife findet sich zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne (Garcia-Frigola et al 2000). Die kurzen N- und C-Termini liegen beide intrazellulär und scheinen für intrazelluläre Signalvermittlung verantwortlich zu sein (Abb. 1) (Stipp et al., 2003).

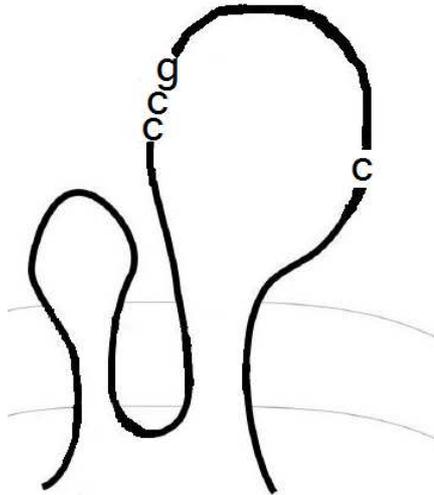


Abb. 1: Schematische Darstellung Tetraspanin-charakterisierender biochemischer Strukturen. Gezeigt sind die vier Transmembrandomänen, eine intra- und zwei extrazelluläre Schleifenstrukturen, sowie das T- und N-Terminale Ende. Das in 100 % konservierte CCG Motiv, sowie der in allen Tetraspaninen enthaltene Cystein-Rest im Bereich des 2. Extrazellulären Loops sind erkennbar (in Anlehnung an Hemler 2001).

Von grundlegender struktureller und funktioneller Bedeutung für Tetraspanine ist ihre zweite extrazelluläre Schleife (EC2-Schleife), die mit 69-129 Aminosäuren Länge die größere Schleifenstruktur darstellt. Diese enthält neben einem konstanten Abschnitt mit drei α -Helices einen variablen Abschnitt, der maximal zwei alpha-Helices bilden kann (Stipp et al. 2003). Während die konstante Region wahrscheinlich Homodimerisierungen vermittelt, binden an die variable Region andere Proteine oder Rezeptoren. Innerhalb dieser EC2 Schleife befinden sich zwischen vier und acht Cysteinreste, die durch Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen der Schleife eine charakteristische Tertiärstruktur verleihen. Merkmal aller Mitglieder der Tetraspaninfamilie sind hierbei ein CCG Motiv und ein weiterer Cystein Rest (Abb. 1). Ein Pro-Xaa-Xaa-Cys (PXXC)-Motiv kann in 94% aller Tetraspanine nachgewiesen werden. Bei 66% der Protein findet sich ein weiteres Cysteinpaar, welches eine dritte Disulfidbrücke formt (Stipp et al. 2003). Insgesamt können bis zu vier Disulfidbrücken gebildet werden. Dies lässt eine Einteilung der Tetraspanine in 3 Gruppen zu. Tetraspanine der ersten Gruppe sind die am einfachsten strukturierten Tetraspanine mit vier Cysteinresten. Zu dieser Gruppe gehört unter anderem CD 81. Die Tetraspanine der zweiten Gruppe erhalten ihre Struktur durch 3 Disulfidbrücken, entsprechend sechs Cysteinresten. Hierzu gehört Tm4sf2. Tetraspanine der dritten Gruppe haben in ihrem großen extrazellulären Loop vier Disulfidbrücken bei acht

Cysteinresten. Zu dieser Gruppe gehört Tetraspanin 5 (Seigneuret et al., 2001). Über die kleinere, weiter N-terminal gelegene extrazelluläre Schleife ist sehr wenig bekannt. Sie ist nur zwischen 13 und 30 Aminosäuren lang und in einigen Tetraspaninen offensichtlich glykosyliert, was Protein-Bindungseigenschaften beeinflussen kann (Stipp et al., 2003).

In den vier Transmembrandomänen zeigen sich die größten Homologien zwischen den verschiedenen Tetraspaninen. Hier bestehen, wahrscheinlich durch spezifische hydrophobe Interaktionen zwischen den Transmembrandomänen, wichtige Verbindungen unter den verschiedenen Tetraspaninen. Diese homomeren und heteromeren Interaktionen können dazu führen, dass sich Tetraspanine an einer bestimmten Stelle der Membran akkumulieren. Durch die Bindung von Rezeptormolekülen oder Liganden an die Tetraspanine kann es zur Bildung von Mikrodomänen in der Zellmembran kommen, die die strukturelle Basis für eine lokal verstärkte Signalweiterleitung darstellen (Stipp et al. 2003). Am besten untersucht ist heute die Interaktion von Tetraspaninen mit Integrinen, die entscheidend Einfluss auf die Adhäsivität der Tetraspanin-exprimierenden Zellen nehmen. Dieses netzartige Geflecht an Tetraspaninaggregaten auf der Zelloberfläche hat auch zu der Bezeichnung „Tetraspaninweb“ geführt (Boucheix und Rubinstein, 2001).

Die cytoplasmatischen Enden und die kleine intrazelluläre Schleife sind bei den verschiedenen Tetraspaninen nur zu 21-38 % identisch. Die Divergenz spricht für unterschiedliche Funktionen in den verschiedenen Tetraspaninen. Am besten untersucht ist die Interaktion des C-terminalen Endes der Tetraspaninklasse Tm4sf (z.B. CD81) mit Proteinkinase C und Phosphatidylinositol-4-kinase, welche extrazelluläre Signale ins Zellinnere vermittelt (Zhang et al., 2001; Berditchevski et al., 1997; Stipp et al., 2003).

Nahezu alle Tetraspanine weisen an einer der vier cytoplasmatischen, juxtamembranären Positionen eine Palmytylierungsstelle auf. Diese ist für die Ausbildung von Tetraspanin-Tetraspanin Interaktionen wichtig. Der Verlust der Palmytylierung führt zur Lockerung der lateralen Bindungen zwischen den einzelnen Tetraspaninen und zur Auflösung des Tetraspaninwebs. Die Palmytylierung nimmt auch Einfluss auf die Interaktion mit anderen Oberflächenproteinen, ist aber für diese keine ausreichende Voraussetzung (Stipp et al., 2003).

Die Vielfältigkeit dieses Tetraspaninwebs wird einem bewusst, wenn man sich vorstellt, dass bis heute 32 unterschiedliche Tetraspanine in Säugetieren, 35 in Fliegen und 20 in Würmern gefunden wurden (Hemler, 2003; Todres et al., 2000). Damit besteht die Familie der Tetraspanine in jeder bisher bekannten Spezies aus einer Vielzahl von Mitgliedern. Eine Zelle exprimiert nach heutigem Wissen wahrscheinlich mehrere Mitglieder der Tetraspanine, so dass durch homomere und heteromere Interaktionsmöglichkeiten von einer extrem hohen kombinatorischen Variabilität innerhalb eines Tetraspanin-Aggregates auszugehen ist.

Tetraspanine regulieren die Zellmorphologie, -motilität, -fusion und -signalgebung. Basierend auf den multiplen Funktionen von Tetraspaninen ist es nicht verwunderlich, dass einzelne Mitglieder mittlerweile auch in mutierter Form auf Tumoren gefunden wurden und dort die Invasivität des Gewebes beeinflussen (Hemler, 2005, Tarrant et al., 2003, Hemler, 2003, Boucheix und Rubinstein, 2001, Levy et al., 1998, Maecker et al. 1997). Ebenfalls durch Mutationsanalysen, konnte gezeigt werden, dass Tm4sf2 beim Menschen zu mentaler Retardierung führen kann. Eine physiologische Funktion für dieses Tetraspanin ist allerdings noch nicht gezeigt worden. Mutationen des Tetraspanins RDS führen beim Menschen zu Dystrophien der Retina. Beim humanen CD 151 führen Mutationen zu Fehlfunktionen im Bereich der Nieren, wie hereditäre Nephritis, der Haut, hier als prätibiale bullöse Epidermolyse, sowie zu Taubheit und β -Thalassämia minor. Auch bei Mäusen sind Auswirkungen verschiedener Fehlfunktionen von Tetraspaninen bekannt. So weiß man, dass der Ausfall von CD 9 bei der Maus die Fusion von Oozyte und Spermium verhindert. Eine Fehlfunktion von CD 81 führt zu Störungen der Immunregulation (Hemler 2005). Die Expression von Tetraspaninen kann ausserdem positiv (CO-029, PETA-3, SFA-1, SAS) oder negativ (CD 9, CD 63, CD 82) mit Tumorzellmetastasierung assoziiert werden (Maecker et al. 1997). Eine vertiefte Analyse der Tetraspaninexpression, -biochemie und Funktion hätte voraussichtlich auch größte Relevanz für die klinische Grundlagenforschung.

Sowohl für Expressionsanalysen als auch für biochemische und funktionelle Untersuchungen sind Antikörper ein unverzichtbares Hilfsmittel. Bisher ist es allerdings nur für einige wenige Tetraspanine gelungen, spezifische, hochaffine Antikörper herzustellen. Der Grund hierfür ist die relativ schwache Immunogenität der Tetraspanine. Sie besitzen nur kleine intrazelluläre Peptidsequenzen und in extrazellulären Domänen bestehen hohe Überlappungen zwischen

einzelnen Mitgliedern. Zudem werden einzelne Tetraspanine in vielen Organen exprimiert, so dass es oft schwierig ist, entsprechende Kontrollen zu finden. Innerhalb eines Organs konnten viele Tetraspanine aber nur in einzelnen Zelltypen nachgewiesen werden. So wird CD9, Tspan-2 und Tspan-3 primär in den Myelin-bildenden Zellen exprimiert, CD81 wurde auf Mikroglia und Astrozyten gefunden, und Tspan-5/Net-4 in kortikalen Strukturen. Dies ermöglicht zumindest auf zellulärer Ebene einen Nachweis für die Spezifität einer Antikörperbindung. Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich auf die Herstellung eines Tetraspanin-5 Antikörpers konzentriert, da dieses Tetraspanin das bisher einzige Tetraspanin darstellt, das in Neuronen nachgewiesen werden konnte (Garcia-Frigola et al. 2001).

2.2 Tetraspanin 5

Tetraspanin 5 hat eine hohe Expression im zentralen Nervensystem. Es wird jedoch auch in anderen Organen in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. So konnte mittels Northern Blot Analyse eine Tspan-5 Expression in Herz, Niere, Hoden, Lunge und Leber nachgewiesen werden (Gracia-Frigola et al. 2000).

Innerhalb des Kleinhirns von Mäusen ist eine Tspan-5 m-RNA Expression erstmals im Alter von E10 dokumentiert (Garcia-Frigola et al. 2001). Die Expression scheint hier auf kortikale Strukturen beschränkt zu sein. Genauere zelluläre Expressionsdaten konnten erstmals von Juenger et al. (2005) mittels in situ-Hybridisierung erhoben werden. In dieser Arbeit wird bei neugeborenen Mäusen eine schwache Tetraspanin 5 Expression in der äußeren Körnerzellschicht und in Purkinjezellen des Lobus posterior gezeigt. Die Expression der Tspan-5 mRNA steigt dann sowohl in den Körner- als auch den Purkinjezellen mit zunehmender Reifung der Neurone an. Die Reifung der Neurone ist insbesondere durch die Ausbildung von Dendriten charakterisiert, so dass die Parallelität in der Tspan-5 Expression und der Dendritogenese erste Hinweise für eine physiologische Funktion des Tetraspanin-5 bei der Dendritenreifung vermuten lässt.

2.3 Medulloblastome

Medulloblastome zählen zu den primitiven neuroektodermalen Tumoren. Dies sind embryonale Tumoren, die wahrscheinlich aus einer gemeinsamen Progenitorzelle des ZNS entstehen. Zu 88% gehen diese hoch malignen Tumoren vom Kleinhirn aus und werden dann Medulloblastome genannt. Das Medulloblastom ist der häufigste Hirntumor bei Kindern unter sieben Jahren und tritt mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem vierten und achten Lebensjahr auf (Muntau, 2004). Histologisch zeichnet sich der Tumor durch ausgeprägte Anaplasie und invasives Wachstum aus, so dass er zu den Grad IV Tumoren (WHO Klassifikation) zählt.

Die Histogenese von Medulloblastomen wird seit vielen Jahren kontrovers diskutiert und ist auch heute noch nicht abschließend geklärt. Eine These besagt, dass sie von primitiven neuroektodermalen Zellen in der Keimzellschicht im Bereich der Ventrikel ausgehen (Rorke, 1993, Hart et al., 1973). Eine andere These geht davon aus, dass der Tumor am ehesten aus proliferierenden Neuroblasten der cerebellären äußeren Körnerzellschicht hervorgeht (Kadin et al., 1970, Rubinstein, 1985). Es ist durchaus möglich, dass beide Lokalisationen als Ursprungsort für Medulloblastome in Frage kommen (Katsetos et al., 1995). Unabhängig vom Ursprungsort ist auffällig, dass viele humane Medulloblastome die cerebellären Marker p53 und PARP exprimieren (Eberhart, 2003).

Prinzipiell ist bei Medulloblastomen zwischen dem klassischen und dem desmoplastischen Typ zu unterscheiden. Gemäss der American brain Tumor Association imponiert das klassische Medulloblastom mikroskopisch durch dicht gepackte runde Zellen mit großem Nukleolus und ist der häufigste Typ unter den Medulloblastomen bei Kindern und Erwachsenen. Beim desmoplastischen Medulloblastom gelten Körnerzellvorläufer als Ursprungszellen (Kenney et al., 2003, Oliver et al. 2005). Histologisch ist hier eine charakteristische „biphasische“ Architektur des Tumors erkennbar, wobei die typischen undifferenzierten Medulloblastomzellen in ein dichtes interzelluläres Netz aus Retikulinfasern eingebettet sind, jedoch auch zahlreiche retikulinfreie Inseln mit verminderter Zelldichte erkennbar sind (Kleihues et al., 1993). Die Häufigkeit der desmoplastischen Medulloblastome liegt bei durchschnittlich 12 % (Hubbard et al., 1989; Hughes, 1984) wobei die desmoplastische Variante häufiger bei Erwachsenen als bei Kindern gefunden wird (Bloom et al., 1990, Carrie et al., 1994, Peterson und Walker, 1995).

2.4 Splicing

Als Splicing wird ein wichtiger Schritt in der Weiterverarbeitung der RNA bezeichnet, bei dem im Zellkern von Eukaryonten aus der prä-mRNA (hnRNA) die reife mRNA entsteht. Dies geschieht indem die Intronsequenzen, welche im späteren Protein nicht translatiert werden, entfernt und die angrenzenden Exone, welche regulatorische, nicht-translatierte und codierende Anteile enthalten, miteinander verknüpft werden. Das Splicing ist somit Teil der Proteinbiosynthese. Noch bevor die Transkription beendet ist, wird die transkribierte hnRNA von „Small nuclear Ribonukleoproteinen“ (snRNPs) auf Initiationsstellen des Splicings untersucht. Diese sind i.d.R. durch das Intron flankierende GU und AG Sequenzen charakterisiert. Genau an diesen Stellen wird die hnRNA hydrolysiert, das Intron entfernt und die beiden Enden der benachbarten Exone ligiert. Dieser Prozess des Splicing ist extrem gut konserviert und exakt reguliert. Jegliche Veränderung in diesem Splicing-Prozess könnte dazu führen, dass Leserasterverschiebungen auftreten, die dann entweder in funktionslosen oder Proteinen mit eingeschränkter Funktion resultieren könnten. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die β -Thalassämie, bei der durch Mutation eine zusätzliche Splice-Stelle in der β -Kette des Globins entsteht, wodurch das β -Globin in seiner Proteinsequenz verändert und entsprechend in seiner Funktion beeinträchtigt wird (Weatherall, 2001).

Das sogenannte „alternative Splicing“ stellt einen besonderen Typ des Splicing dar. Dabei werden beim Herausschneiden von Intronsequenzen aus der hnRNA gleichzeitig Exone mit entfernt. Durch die Wahl unterschiedlicher Exone, die herausgeschnitten bzw. in der mRNA verbleiben, können aus einem Gen unterschiedliche Proteine entstehen, die man dann als Splice-Varianten bezeichnet. Die Regulation des alternativen Splicings erfolgt wie oben über Splice-faktoren. Es können hierbei verschiedene Formen des alternativen Splicings unterschieden werden. Unter anderem kann es zum Überspringen von Exons oder auch zum Beibehalten von Introns kommen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein durch alternatives Splicing neu entstandenes Protein funktionsfähig ist, ist höher als bei einem durch Mutation der codierenden DNA-Sequenz entstandenen neuen Proteins. So liegt die Vermutung nahe, dass das vermehrte Vorkommen

bestimmter Splicevarianten bei Erkrankungen wie z.B. Krebsleiden eine entscheidende Rolle spielen könnte. Viele Forschungsarbeiten konzentrieren sich bereits auf diese Thematik.

2.5 Ziel dieser Arbeit

Tetraspanine scheinen in vielen Organismen und in vielen Organsystemen eine Rolle als modulatorische Membranproteine zu besitzen, die die strukturelle Integrität von Membranen z.T. entscheidend beeinflussen. Tetraspanin-5 ist ein Vertreter der Tetraspanine, der im ZNS besonders stark exprimiert wird, insbesondere in neuronalen Zellen. Funktionelle Studien wurden bisher allerdings noch nicht unternommen, was darauf zurückzuführen ist, dass der Nachweis des Tetraspanin-5 Proteins bisher nicht geglückt war. Das Problem hierfür scheint die sehr hohe Homologie zwischen den einzelnen Tetraspaninvertretern zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun ein Antiserum gegen Tetraspanin5 hergestellt und damit die Expression in unterschiedlichen Organen, sowie im Gehirn während der Entwicklung untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Verwendete Substanzen, Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit doppelt-deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur angesetzt.

BSA

Bovine Serum Albumin (Sigma, A8806)

TBS

150 mM NaCl

50 mM Tris

Der pH der Lösung wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

Der pH-Wert wurde mit HCL auf 7,4 eingestellt.

dNTP's

10 mM dNTP's (Amersham Biosciences, 27-2035-01) in H₂O

H₂O-DEPC

0,5 ml DEPC (Sigma D-5758) wurden in 1 l H₂O bei 37 °C über Nacht inkubiert, und dann für 40 min autoklaviert.

3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**Lösungen**

10,0 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

100 % N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

10,0 % Ammoniumpersulfat (APS)

Proteinproben-Puffer

62,5 mM Tris / HCl pH 6,8

25 % Glycerin

2 % SDS

0,001 % Bromphenolblau

2 % β-Mercaptoethanol (erst kurz vor Gebrauch zugeben)

Sammelgel-Puffer

0,5 M Tris / HCl, pH 6,8

Trenngel-Puffer

1,5 M Tris / HCl, pH 8,8

30 % Acrylamid Bis-Acrylamid

AccuGel 29:1 (National Diagnostics)

Acrylamid : Bis-Acrylamid

Die Lösung wurde bei RT gelagert.

Elektrophorese-Laufpuffer (10x)

250 mM Tris

1,92 M Glycin

1 % SDS

pH-Wert 8,3

Die Elektrophorese zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde mithilfe des Elektrophorese Systems „Minigel-Twin“ (Whatman-Biometra) durchgeführt. Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Es wurde nach folgendem Ansatz hergestellt.

Tabelle 1: Herstellung von Sammelgel und Trenngel für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelgel (4 ml)		Trenngel	10 %	12 %
Sammelgel-Puffer	0,5 ml	Trenngel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml
dd H ₂ O	2,64 ml	dd H ₂ O	4,06 ml	3,425 ml
Acrylamide (30%)	0,8 ml	Acrylamide (30%)	3,34 ml	4,0 ml
10% SDS	40 µl	10% SDS	100 µl	100 µl
10% APS	20 µl	10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	4 µl	TEMED	10 µl	10 µl

Zunächst erfolgte das Ansetzen des Trenngels, welches zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach der Polymerisation des Trenngels, diese dauert ca. 45 Minuten, wurde das Isopropanol entfernt, der Probenkamm eingefügt und das Sammelgel gegossen. Die Polymerisation dieses Gels dauert ca. 30 Minuten. Im Anschluß wurde der Probenkamm entfernt und das Gel mit 1x Elektrophorese-Laufpuffer überschichtet und die Probenaschen mit Puffer gespült. Vor dem Auftragen der Proteine in die Probenaschen, wurden die Proteine im Proteinproben-Puffer bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Die Trennung der Proteine im Gel erfolgte zunächst bei 30 mA mit konstanter Spannung. Nach durchlaufen des Sammelgels wurde die Spannung auf 40 mA erhöht. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „Precision Plus Protein Standard“ der Firma BioRad (161-0373) eingesetzt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert.

3.1.3 Western Blot - Analyse

Transfer-Puffer

25 mM Tris, pH 8,0

192 mM Glycin

20% Methanol

Membranen

Hybond Nitrozellulosemembran C-extra (Amersham Biosciences, RPN 203E).

Für den Transfer von Proteinen aus einem SDS-PAGE-Gel auf eine Membran wurde das kühlbare Tankblot-System von Whatman-Biometra verwendet. Zunächst wurden alle Filter und Membranen mit Transfer-Puffer getränkt und in folgender Reihenfolge aufeinandergelegt: 3 Lagen Whatman-Filterpapier, Trenngel, die nach Herstellerangaben vorbereitete Membran, erneut 3 Lagen Whatman-Filterpapier. Die Blottingapparatur wurde mit Transfer-Puffer gefüllt und die Transfereinheit eingesetzt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 400 mA für 2 h bei 4 °C. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

3.1.4 Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf Westernblot-Membranen

PBST

0,05 % Tween 20 in PBS

Milchpulver PBST

5,0 % Milchpulver (fettfrei) in PBST

Tabelle 2: Zur Western-Blot-Analyse verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
Tetraspanin 5 Serum #1076 nach 2. Boost		Kaninchen	Baader SL
Tetraspanin 5 Serum #1076 nach 3. Boost		Kaninchen	Baader SL
Präimmunserum #1076		Kaninchen	Baader SL
	Ziege α Kaninchen IgG / HRP	Ziege	Dako, P0448

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocelluläre-Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungen die Membran in 5 % Milchpulver PBST blockiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 min in PBST gewaschen. Zum Nachweis von verschiedenen Proteinen wurden die Membranen in separate Teile zerschnitten und getrennt mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Die primären Antikörper (Tabelle 2) wurden in 1% BSA/PBST oder in 5 % Milchpulver PBST verdünnt und die Membranen hiermit bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen mehrmals (5x für 5 min) in PBST gewaschen und für mindestens 1 h mit dem sekundären Antikörper (Tab. 2) inkubiert, der ebenfalls in 1% BSA/PBST oder 5 % Milchpulver PBST verdünnt wurde. Die Membranen wurden erneut fünfmal für 5 min gewaschen. Zur Detektion der Signale wurde das Chemilumineszenz „ECL+Plus Western Blotting Detection“ System (Amersham Bioscience, RPN2132) verwendet in Kombination mit Autoradiografie-Filmen von Kodak (X-OMAT AR XAR5, X-OMAT LS).

3.1.5 Coomassie Blue Gelfärbung

Coomassie Fixation

50 % Methanol

10% Essigsäure

Coomassie Färbung

0,05 % Coomassie Brilliant blue R250

50 % Methanol

10 % Essigsäure

Coomassie Entfärbung

40 % Methanol

10 % Essigsäure

Das Gel wurde für 1 Stunde in Coomassie Fixationslösung fixiert. Anschliessend wurde für 1 Stunde in der Farbe-Lösung gefärbt, und im letzten Schritt das Gel mehrmals in Entfärbungslösung über Nacht entfärbt. Die Gele wurden mit Zellstoff trocken getupft.

3.1.6 Silberfärbung modifiziert nach Heukeshofen et al.

Fixierlösung 1

30 % Ethanol

10 % Eisessig

Fixierlösung 2

30 % Ethanol

0,5 M Natriumacetat

0,5 % Glutardialdehyd

0,2 % Natriumthiosulfat

Silbernitratlösung

0,1 % Silbernitrat

0,02 % Formaldehyd

Entwicklerlösung

2,5 % Natriumcarbonat

0,01 % Formaldehyd

Stopplösung

0,05 M EDTA

Das zu färbende Gel wurde zunächst 40min in Fixierlösung 1 fixiert. Hiernach erfolgte eine 40 minütige Fixation in Fixierlösung 2. Im Anschluss wurde das Gel 3 mal für 20 Minuten in destilliertem Wasser gereinigt. Nun erfolgte die Färbung für 40 Minuten in Silbernitratlösung. Nach der Färbung wurde das Gel in destilliertem Wasser für 2 Minuten und einmalig in Entwicklungslösung ohne Formaldehyd gewaschen. Nun erfolgte die Fixation für 3-7 Minuten in Entwicklerlösung mit Formaldehyd. Im Anschluss wurde die Färbung für 15 Minuten in Stopplösung gestoppt. Im letzten Schritt erfolgte die nochmalige Waschung des Gels für 15 Minuten in destilliertem Wasser.

3.1.7 Proteinextraktion aus verschiedenen Geweben**Homogenisations-Puffer**

1x Tris / SDS

10% Sucrose

10 μ g / ml Aprotinin10 μ g / ml Leupeptin1 μ M Pepstetin

5mM EDTA

1mM PMSF

Das Cerebellum von Mäusen wurde präpariert und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Extraktion der Proteine aus dem Gewebe wurden 100 mg gefrorenes Gewebe mit 150 μ l Homogenisations-Puffer versetzt und in einem Glas Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde 2 h bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Der Proteingehalt wurde mit dem „BCA Protein reagent“ (Pierce, Perbio, Rockford, USA) in einem Mikroplattenspektrofotometer (μ Quant) bestimmt. 30 μ g Protein wurden in Proteinproben-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 10 % oder 12% SDS-Polyacrylamid Gel, mit einem anschließenden Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C extra, Amersham Biosciences, RPN 203E).

3.1.8 Proteinextraktion aus Zellkulturen

Proteinextraktions-Puffer

1x Tris / SDS

10% Sucrose

10 μ g / ml Aprotinin

10 μ g / ml Leupeptin

1mM PMSF

1 μ M Pepstatin A

5mM EDTA

Für die Extraktion von Proteinen aus Zellkulturen wurden jeweils 3 Kryoröhrchen eingefrorener Zellen mit 2 ml Extraktionspuffer im Glas-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 4 °C für 10 Minuten bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Die Proteinbestimmung wurde mithilfe des „Bio-Rad Protein Assay“ (500-0006) in einem Mikrotiterplattenspektrofotometer durchgeführt. Für die Westernblot-Analysen wurden 15 μ g Protein in Proteinproben-Puffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 12 % SDS-Polyacrylamid Gel. Anschließend wurden die

Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C extra, AmershamBiosciences, RPN 203E) transferiert.

3.1.9 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay von Pierce (23225) und einem BSA-Standard nach Angaben des Herstellers. Es wurde eine Eichreihe mit verschiedenen BSA Konzentrationen (50 – 1000 µg / ml) in Homogenisations-Puffer angesetzt. Von den Proben und den Standardlösungen wurden jeweils 10 µl mit 200 µl Reaktionsmixlösung gemischt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Für jeden Wert wurden Dreifachmessungen durchgeführt. Mit einem Mikrotiterplattenspektrofotometer (µQuant) wurde bei der Wellenlänge $\lambda = 562$ nm die Lichtabsorption gemessen. Mit Hilfe einer Eichkurve wurden die Konzentrationen der Proben ermittelt. Für Proben mit geringen Proteinkonzentrationen wurde das „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ (Bio-Rad, 500-0006) eingesetzt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Eichreihe mit verschiedenen BSA Konzentrationen (1,56 – 25 µg / ml) in H₂O (Ampuwa) hergestellt. Von den Proben wurden verschiedene Verdünnungen (1:200, 1:500) mit H₂O (Ampuwa) angesetzt. Für jeden Wert wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Das Reaktionsreagenz wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt. Von dem Reaktionsmix wurden 40 µl mit 160 µl Probenverdünnung gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Gemessen wurden die Proben in einem Mikrotiterplattenspektrofotometer (µQuant) bei der Wellenlänge $\lambda = 595$ nm. Die Konzentrationen der Proben wurden mithilfe einer Eichkurve bestimmt.

3.1.10 Total RNA Isolation mit Trizol

Die RNA Isolation erfolgte aus frisch präparierten Gewebe der Maus. Dieses wurde mit 1ml Trizol/50mg Gewebe gut gemischt. Je verwendetem ml Trizol wurden dann 0,2 ml Chloroform (CHCl₃) zugegeben und 30 sec geschüttelt. Das Gemisch wurde ca. 20 min bei 4600 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführen. Je ml verwendetem Trizol wurden hierzu nun jeweils 0,5 ml Isopropanol zugegeben

und die Mischung 3-10 Minuten inkubiert. Hierbei wurde die RNA ausgefällt. Das Gemisch wurde anschliessend 15 Minuten bei 4 °C mit 4600 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde mit je 1 ml 75 % ETOH-DEPC pro Milliliter verwendetem Trizol gewaschen. Im Anschluss wurde das Gemisch nochmals 10 Minuten mit 4600 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde bei Raumtemperatur luftgetrocknet und schließlich in einer kleinen Menge DEPC- H₂O resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.11 C-DNA Gewinnung mit Dynabeads

Die mit Trizol Isolation erhaltene RNA wurde hier zur c-DNA-Synthese verwendet. Vor Beginn wurden die verwendeten Dynabeads (Invitrogen) nach Vorgaben des Herstellers mit Lysepuffer gewaschen. Je Tube RNA wurden 20 µl Dynabeads (Invitrogen) zugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden nach Hersteller-Protokoll verschiedene Waschvorgänge angeschlossen. Hiernach wurden die Dynabeads in 20 µl DEPC- H₂O resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gestellt. Zur c-DNA Synthese wurden 5 µl RNA Dynabeads mit 2 µl Random Hexamers (30 ng/µl) und 5 µl DEPC-H₂O gemischt und für 5 Minuten bei 65 °C im PCR-Thermocycler inkubiert. Im Anschluß wurde das Gemisch sofort auf Eis gestellt. Nun wurden 4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP zugegeben. Das Gemisch wurde im PCR Cycler erneut inkubiert, zunächst für 10 Minuten bei 25 °C, dann 2 Minuten bei 42 °C. Anschliessend wurde 1 µl Superscript II zugegeben und das Ganze wieder im PCR-Thermocycler inkubiert bei 42 °C für 50 Minuten und 15 Minuten bei 70 °C. Die c-DNA wurde bei -24°C gelagert.

3.2 Antikörperaufreinigung

Die Aufreinigung des Antikörpers erfolgte nach einem Protokoll, das von Franken et al. (2003) genutzt und in Anlehnung an Harlow und Lane (1988) erstellt worden ist. Die hier genutzten Bezeichnungen der Puffer wurden aus diesen Publikationen übernommen.

Bindungspuffer

PBS entgast

Waschpuffer A

10 mM Tris/HCl pH 7,5

Waschpuffer B

10 mM Tris/HCl pH 7,5

500 mM NaCl

Waschpuffer D

10 mM Tris/HCl pH 8,8

Elutionslösung 1

100 mM Glycin pH 2,5

Elutionslösung 2

100 mM Triethylamin pH 11,5

Regenerationspuffer F

8 M Urea

10 mM Tris/HCl pH 7,5

Puffer N

1 M Tris pH 8,0

Zur Aufreinigung des Antikörpers wurde zunächst eine Aufreinigungssäule hergestellt. Hierzu wurden 250 mg Activated Thiol Sepharose abgewogen und in eine Glassäule gefüllt. Dieses wurde mit ca. 200ml H₂O Bidest gewaschen. Die Säule darf nie austrocknen. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml entgastem Bindungspuffer gewaschen. Hiernach wurden ca. 1,4 mg Peptid, mit welchem auch die Antikörperherstellung erfolgt war, auf die Säule gegeben, gelöst in 1 ml entgastem Bindungspuffer. Um eine optimale Peptidbindung an die Säule zu erreichen, wurde das Peptid eine Stunde auf der Säule inkubiert. Nach der Inkubation wurde das nicht gebundene Peptid mit 20 ml entgastem Bindungspuffer von der Säule gewaschen. Das Eluat wurde aufgefangen und je 2 ml nach der Microassay Prozedur zur Proteinbestimmung gemessen. Anhand der Messung konnte gesehen werden, dass ca. 1 mg Peptid an die Säule gebunden sind. Vor dem Antikörperkontakt wurde die Säule einmal mit jedem einzelnen, im weiteren verwendeten Puffer gewaschen, um eventuell noch vorhandenes nicht gebundenes Peptid von der Säule zu entfernen. Hierzu wurden je 20 ml der verwendeten Waschpuffer und 10 ml der Elutionspuffer verwendet. Im Anschluss erfolgte die Neutralisation mit 20 ml Waschpuffer A, bevor nun der aufzureinigende Antikörper auf die Säule aufgetragen wurde. Hierzu wurde das Antikörperserum nach dem 3. Boost, hier wurden 0,5 ml Serum verwendet, 1:10 mit sterilem Waschpuffer A verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Der Durchlauf wurde aufgefangen und ist später als Durchlauf 1-4 gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf wurde die Säule nach folgendem Schema mit mehreren Wasch- und Elutionspuffern gewaschen, die einzelnen Elutionen wurden nach dem Durchlauf aufgefangen und später einzeln analysiert.

1. 20 ml Waschpuffer A
2. 20 ml Waschpuffer B
3. 10 ml Elutionslösung 1, 100 mM Glycin pH 2,5. Hiermit wurde ein saurer pH-Sprung ausgelöst. Vor dem Auffangen der durchgeflossenen Eluate wurden pro Auffangbehälter je 0,5 ml Puffer N vorgelegt.
4. 20 ml Waschpuffer D
5. 10 ml Elutionslösung 2, 100mM Triethylamin pH 11,5 zum Auslösen eines basischen pH-Sprungs. Auch hier wurden je Auffangbehälter 0,5 ml Puffer N vorgelegt.
6. 10 ml Regenerationspuffer F
7. 20 ml Waschpuffer A zur Neutralisation der Säule.

Nach den einzelnen Wasch- und Elutionsschritten wurde die Säule mit H₂O Bidest gewaschen und zur Aufbewahrung mit 20 % Ethanol aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

Von den einzelnen Durchflüssen der Waschpuffer und Eluate wurde bei 280 nm die Extinktion gemessen. Die einzelnen Durchflüsse wurden außerdem im Western Blot gegeneinander aufgetragen.

3.3 Zellkulturen

DMEM Medium

DMEM (Gibco, 31966-021)

10 % Foetales Bovines Serum (FCS, Gibco, 10270-106)

1x Penicilin-Streptomycin (Gibco, 15140-122)

3.3.1 Zelllinien

Tabelle 3: In der Arbeit verwendete Zelllinien

Daoy	Humane desmoplastische cerebelläre Medulloblastom-Zelllinien	ATCC HTB-186
D283Med	Humane desmoplastische cerebelläre Medulloblastom-Zelllinien	ATCC HTB-185

3.3.2 Kultivierung und Konservierung der Zelllinien

Die Zelllinien wurden in 8 ml DMEM Medium in 10 cm Zellkulturschalen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei einer 90 %igen Konfluenz wurden die Zellen auf neue Kulturschalen umgesetzt. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml 1x

Trypsin/EDTA (Gibco, 15400-054) verdünnt in PBS von der Kulturschale abgelöst (2 Minuten bei 37 °C). Die in Trypsin-Lösung resuspendierten Zellen wurden mit 8 ml DMEM Medium versetzt und bei 230 g für 3 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml DMEM Medium resuspendiert und 100-400 µl Zellsuspension in neue Zellkulturschalen ausgesät.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen eingefroren. Die Zellen einer konfluenten Zellkulturschale wurden trypsinisiert und nach einer Zentrifugation in 700 µl DMEM Medium plus 10 % FCS resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 700 µl in ein Kryo-Röhrchen (Nunc, 377267) überführt. Anschliessend wurden 200 µl Fetales Kälberserum zugegeben und die Suspension mit 100 µl DMSO (Sigma, D-2651) gemischt. Danach wurde das Kryo-Röhrchen bei -80 °C eingefroren in flüssigem Stickstoff und zur Langzeitkonservierung in die Gasphase eines Stickstoffbehälters überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen kurz in einem 37 °C-Wasserbad erwärmt und dann in 5 ml DMEM Medium resuspendiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 230 G wurde das Zellpellet in 1 ml DMEM Medium resuspendiert und in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät.

3.4 Klonierung

Die Tetraspanine CD 81, Tm4sf2, Tetraspanin 5 der Maus und Tetraspanin 5 des Menschen sowie die Splicevariante des humanen Tetraspanin 5 wurden in ihrer gesamten kodierenden Länge in p-Bluescript-SK+ und verschiedene Expressionsvektoren kloniert.

3.4.1 Plasmid DNA Präparation nach Qiagen Plasmid Midi und Maxi Protokoll

Dieses Protokoll ist gültig für Präparationen bis zu 100 µg High- oder Low-copy Plasmiden oder Cosmid DNA bei Benutzung des Qiagen Plasmid Midi Kits, oder bis zu 500 µg bei Benutzung des Qiagen Plasmid Maxi Kit.

Tabelle 4: Zur Klonierung verwendete Vektoren, ihre Resistenzen und die verwendeten Schnittstellen

Vektor	Resistenz	Verwendete Schnittstellen
p-Bluescript SK+	Ampicillin	Bam H I
p-EGFP-N1	Kanamycin	Hind III, Xho I
p-IRES2-EGFP	Kanamycin	Hind III, Xho I
p-CDNA 3.1 Zeo+	Ampicillin	Bam H I; Hind III, Xho I

Zur Präparation wurde eine einzelne Kolonie von einer frisch bebrüteten Platte gepickt und mit dieser eine Startkultur von 2-5 ml LB-Medium beimpft, welches das verwendete selektive Antibiotikum enthielt. Die Inkubation erfolgte für ca. 8 h bei 37 °C im Schüttelinkubator bei ca. 300 rpm. Die Startkultur wurde nach der Inkubationszeit im Verhältnis 1/500 oder 1/1000 in Selectives LB-Medium überführt. Für High-copy Plasmide wurden 25 ml oder 100 ml Medium verwendet. Für Low-copy Plasmide wurden 100 ml oder 500 ml Medium inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 12-16 h bei 37 °C und 300 rpm Schütteln. Anschließend wurden die Bakterienzellen bei 6000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend nach dem Hersteller-Protokoll verwendet.

3.4.2 Fotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm in 5 mM Tris-Puffer bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem Spektralfotometer (μ Quant) in Mikrotiterplatten (Greiner, UV-Star, 655801). Die Absorption von 1,0 bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm entspricht 50 μ g / ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 μ g / ml RNA

3.4.3 Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien mit Plasmid-DNA

LB-Medium

1,0 % Trypton, 0,5 % Select Yeast Extrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glucose wurden gelöst und dann autoklaviert. Vor der Verwendung wurde in Abhängigkeit vom Resistenzgen der transformierten Plasmide ein Antibiotikum hinzugefügt.

Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg / ml

Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg / ml

Agar-Platten

1,5 % Bacto Agar, 1,0 % Trypton, 0,5 % Select Yeast Extrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glucose wurden gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde der Lösung ein entsprechendes Antibiotikum hinzugegeben und der noch flüssige Agar in Petrischalen gegossen.

Chemisch kompetente E.coli Bakterien (DH5 alaph) wurden 30 Minuten auf Eis aufgetaut. Von der Bakteriensuspension wurden 80 µl mit 1 µl Plasmid-Lösung (0,1 - 1,0 µg) vermischt. Der Ansatz wurde für 45 sec bei 42 °C inkubiert, anschließend 2 Minuten auf Eis gestellt und dann sofort mit 900 µl LB-Medium aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C unter Schütteln wurden 100 µl auf Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für den Vektor p-Bluescript-SK+ wurden die Agar-Platten zuvor mit je 50 µl X-Gal (50 mg/ml und 100 µl IPTG (0,1 M) behandelt.

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)

2 % in Diethylformamid gelöst, aliquotiert und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. 1/500 eingesetzt.

IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)

100 mM gelöst in H₂O Bidest. Das IPTG wurde durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert und in 1 ml Portionen aliquotiert und anschließend lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt und in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

3.4.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Reaktionsbedingungen und Puffer wurden nach den Angaben der Hersteller angewendet. Für einen analytischen Ansatz wurden 2 µl 10x Puffer und 10 U Restriktionsendonukleasen mit 1 µg DNA in 20 µl H₂O gemischt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Für einen präparativen Ansatz wurden 10 µg DNA in einem Reaktionsansatz von 200 µl über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

6x DNA-Ladepuffer

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol

40 % Sucrose in H₂O

10x TBE

0,5 M Tris pH 8,0

0,5 M Borsäure

10 mM EDTA

Die Gelelektrophorese wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente für analytische oder präparative Zwecke im elektrischen Feld aufzutrennen. In Abhängigkeit von der Fragmentgröße wurden Agarosegel mit verschiedenen Konzentrationen (0,5 – 2 %) in 1x TBE Puffer hergestellt. Nach dem Aufkochen wurde die flüssige Agaroselösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, wodurch später die Nukleinsäuren durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht wurden. Die DNA Proben wurden mit DNA-Ladepuffer gemischt und zur Auftrennung in die Ladetaschen des Gels aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten elektrischen Spannung von 5 Volt / cm (Elektrodenabstand).

3.4.6 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Für präparative Anwendungen wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus einem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und mithilfe des „PCR clean-up Gel extraction Kit“ (Machery & Nagel, 740609.50) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.4.7 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten in ein Vektor-Plasmid wurde mit einer T4-DNA Ligase (NEB) nach folgendem Ansatz durchgeführt. 50 ng Vector-DNA und Fragment-DNA, in einem 3:1 molaren Verhältnis von Fragment-DNA zu Vector-DNA, 2 µl T4 DNA Ligase Puffer (NEB) und 1 µl T4 DNA Ligase (NEB, M0202S). Mit H₂O wurde das Reaktionsvolumen auf 20 µl aufgefüllt. Die Ligation wurde bei 16 °C über Nacht durchgeführt. Von dem Ligationsansatz wurden 5 µl zur Transformation von E.coli Bakterien eingesetzt.

3.4.8 Kolonie-PCR

Nach der Klonierung eines neuen DNA-Konstruktes wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, um positive Bakterien-Klone zu identifizieren. Im Anschluss an eine Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor wurden die neu erzeugten Plasmide in E.coli Bakterien transformiert. Auf Agarplatten wurden Bakterienkolonien kultiviert und einzelne Kolonien wurden in einer 96er Mikrotiterplatte mit LB-Medium gesichert und dann in einen PCR-Ansatz überführt. Für die PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz hergestellt.

10x Puffer

75 mM Tris HCl

20 mM (NH₄)₂SO₄

0,01 % Tween 20

Tabelle 5: Rezept zum Ansatz der Kolonie-PCR

Mix 1	15 µl
H ₂ O	6,5 µl
c-DNA	1 µl
Primer 1	2,4 µl
Primer 2	2,4 µl
DMSO	0,8 µl
dNTP	0,4 µl
10x Puffer	1,5 µl
Mix 2	5 µl
H ₂ O	4,3 µl
10x Puffer	0,5 µl
Taq DNA Polymerase 5 U / µl (Fermentas, EP0402)	0,2 µl

Die verwendeten Primer (Tab. 6) wurden mit Hilfe von Oligo MS DOS konstruiert und mittels BLAST-search (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) nach möglichen weiteren Bindungspartnern gesucht, um deren Kreuzhybridisierungseigenschaften so gering wie möglich zu halten.

Bezogen wurden die Primer von Invitrogen Custom Primers oder Sigma-Genosys. Von den Primern wurden mit 10 mM Tris, pH 8,0 Stocklösungen mit einer Konzentration von 200 pmol/µl hergestellt, die dann bei -80 °C gelagert wurden. Die Gebrauchslösung wurde auf 20 pmol/µl verdünnt.

Tabelle 6: Zur PCR Verwendete Primer und ihre Restriktionsschnittstellen

Primer	Sequenz	Restriktionsschnittstelle
Tspan 5 human forward	GCT CTC GAG CAG AGG ATG TCC GGG AAG CA	Xho I
Tspan 5 human reverse	ACT AAG CTT AGC GGT TGC AGG GGG TCT AC	Hind III
Tspan 5 mouse forward	GCT CTC GAG GAT CCC AGA GGA TGT CCG GGA AGC A	Xho I, Bam H I
Tspan 5 mouse reverse	ACT AAG CTT GGA TCC GCA GTG GTC GCA GGG GTC TAC	Hind III, Bam H I
Tm4sf2 forward	GCT CTC CAG GGA GAA TGG AGA CCA AAC CTG	Xho I
Tm4sf2 reverse	GAT AAG CTT TCA GAG ATT GCG GCA GTT CC	Hind III
CD 81 forward	GAC CTC GAG CCA TGG GGG TGG AGG GCT G	Xho I
CD 81 reverse	GAC AAG CTT TGG TGC AAT GCA AAG GGC CTC A	Hind III

Das PCR-Temperaturprogramm enthält einen Pausenschritt, in dem der Reaktionsmix 2 in die PCR Gefäße hinzugefügt wurde.

Tabelle 7: Temperaturprogramm Kolonie-PCR

PTC 200		
94 °C	1 min	
80 °C	unendlich	Zugabe Mix 2
94 °C	1 min	x 40
55 °C	1 min	
72 °C	1,5 min	
72 °C	10 min	
4 °C	unendlich	

Nach der PCR-Reaktion wurden die Ansätze in einem Agarosegel analysiert. Aus der 96er Mikrotiterplatte wurden positive Bakterien-Klone amplifiziert und kryokonserviert. Zur Präparation der Plasmid-DNA wurde eine Kultur der Bakterien-Klone angesetzt und mithilfe von „Extraktions-Kit“ isoliert.

3.4.9 Anlegen von Glycerinkulturen

Nach dem Abzentrifugieren von 2 ml Bakterienkultur wurde das entstandene Pellet in 1,5 ml 15% Glycerin in LB-Medium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (Cryo.S Cellstar, Greiner Labortechnik) gegeben und in Flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des Tetraspanin 5 Antikörpers im Western Blot

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Expressionsanalyse von Tetraspanin-Splice-Varianten während der Entwicklung des Kleinhirns, und in verschiedenen Organen der Maus unter physiologischen Bedingungen. Mittels *in situ* Hybridisierung wurde bereits der Nachweis der Tspan-5 mRNA im Gehirngewebe geführt (Juenger et al. 2005). Arbeiten aus dem Labor von E. Soriano zeigten zudem die Tspan-5 mRNA Expression in Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Nieren und Hoden (Garcia-Frigola et al 2000.). Was bisher noch nicht gezeigt werden konnte, ist der Nachweis des Proteins in den verschiedenen Organen und eine Quantifizierung der Proteinexpression während der Entwicklung des Kleinhirns. Dazu musste zunächst ein Antikörper gegen Tspan-5 etabliert werden, der möglichst nur dieses Familienmitglied aus den bisher 32 (Hemler 2005) bekannten Tetraspaninen identifizieren kann. Die dafür nötige Immunisierung der Kaninchen und erste Analysen des Kaninchenserums erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Baader durch Katja Duffe und kann in Ihrer Dissertationsarbeit nachgelesen werden (Duffe, Dissertation, Med. Fakultät der Univ. Bonn, 2008 eingereicht). Da in dieser Arbeit sowohl Maus wie auch menschlichen Material experimentell genutzt wird, soll hier kurz auf die Homologien eingegangen werden. Diese sind in der Dissertationsarbeit von Duffe nicht im Detail beschrieben. Die gesamte Sequenz von Maus und Mensch auf Nukleinsäureebene sind zu 93 % identisch. Entsprechend sind die beiden Homologen auf Aminosäureebene zu 100% identisch. Dies bedeutet, dass unabhängig von der Wahl des immunisierenden Peptides der gewonnene Antikörper in Maus und Mensch equivalent funktionieren sollte.

1381	ggaaaaagaa	aaacaaaaca	agtgcgcaac	ttgctgagtc	aacgtgcagt	gaatctctac
1441	tgtagccgtg	gattggtggt	cggatggatg	ctaccagaag	ggggaagggg	ggaggttggg
1501	cacggcatgt	acttgaattt	ttggagaata	cagtgtctga	cacatcttgg	ctaaaacttg
1561	ggcccttagc	cgtcagggcc	aggtgtcttg	aaatctctca	aaccctttgc	atctgtcctc
1621	cagagaagaa	accagctgcc	ccctgtgttc	agattctgag	agaggtggag	cgggtcacga
1681	tacagcatgc	gcccttcac	ctgagtttgc	ccttaagaga	actgggcggt	tgcagtaaac
1741	tagggtgcca	gaggctgagc	tccacatttc	cacaggactg	ctctttcctc	tgagtggcca
1801	gcccgagcct	gagctctgtc	aatgacatcc	aaggagaaaa	tgaggttaat	gagagacatt
1861	aattaaacac	tccctcacc	caccgcacca	aaccagttgg	gttcttctga	tattctggaa
1921	tactctgggc	tatgttttat	gttttatctc	ttttttaatc	ggttgttatt	ttggttcttt
1981	ttttttttct	ttctttcttt	ttcttttttg	tctcccaaag	gaggctatga	cacagttctc
2041	ttggttctct	attcagcttg	aatagtaagt	ttttgtagac	ttgtcacctg	catgtactgt
2101	aacccccacc	ccacccccaa	atccaccatg	ttcttttcag	agagacattt	gagcgtgttc
2161	cttagtgttt	atgtcctagg	tatccagcct	tgagtggttg	tggagtgttg	tcttagccgc
2221	atctttgtat	gccctcagg	ctctctgtct	ctcctggcat	ccaattcagc	ttctgtccat
2281	tgcattga	gtggtagaaa	agcccagctc	caaagcaggg	tgacacagt	caaaaagcat
2341	ttcatgaggt	ttttctttct	ttcttttttc	ctcccttttt	gcaactttag	ttttgtcgta
2401	tattaaataa	aaaaccaagc	ctagtatagt	gcatgtgctc	gctgaggtga	cctcgggggtg
2461	gttacaagc	acaaatattt	gaggggctgc	gccgaagccc	agccaggggt	cagtgcagct
2521	aggtggaaaa	ccaccttcag	gttcttctcc	tgccctcgtgc	ccactgggag	gggtggacttt
2581	agccccagat	ccccccacc	ccagcttctg	ataaccctctg	gatgttgctt	tcacggggag
2641	cagatttagt	ttgtgggttt	gctgggaagg	ccccagcctc	tgcgaaaagc	agctccccat
2701	tggccagcca	gcagtctgcg	tcatgcagcc	cggttttcca	tttccgcagc	acgtgtgcgt
2761	tgccgtggct	gatgggcgct	gtctgctcag	agggaggtca	ggcactcctt	gggtttacgt
2821	ggctctgcat	gtttgtatcg	gtgtctgttt	ttaggtagag	atagtcattc	catacgtgga
2881	tgcgaggtca	cgtgacttca	cccctgtcca	taccacagcc	gtcgttctgtg	atgtccttca
2941	acatggacac	tcgtgctctc	ggattggcac	ttctgtcttc	tttattacct	cattctccag
3001	tgaactgcat	ctggccaatt	gattcagaat	cagacaggat	ccccaccccg	tggcacatcc
3061	agtgaaagcc	aaaacacaag	cccaagcgag	ttttaaattt	taatcacctt	ttatttttta
3121	cactcgagag	tgattgtaat	aaaagctgtc	attaataaac	tcggttctac	ct

Abb. 3: Gensequenz Tspan5 mus musculus, CDS 386-1192, Exon 1 gelb, Exon 2 grün, Exon 3 türkis, Exon 4 rosa, Exon 5 blau, Exon 6 grau, Exon 7violett, Exon 8 moosgrün, Anitkörper Peptidsequenz in roter Schrift. Rot markiert sind das Start- und Stopkodon.

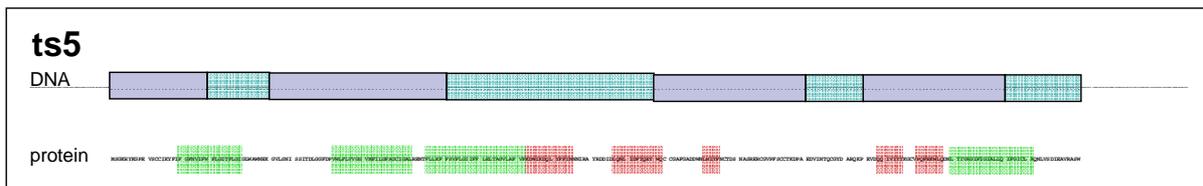


Abb . 4: Genomische (DNA) und Proteinsequenz mit Darstellung der Exonstruktur und der Transmembrandomänen der Peptidsequenz (grün), sowie der Subdomänstruktur der zweiten Extrazellulärdomäne (rot markiert).

Zur Immunisierung der Kaninchen wurde eine Peptidsequenz aus dem C-Terminus des Tetraspanin 5 der Maus verwendet (Abb. 2). Diese Sequenz ist genomisch zu 88,24 % homolog

zu der des Menschen, auf Proteinebene besteht eine 100 % ige Übereinstimmung der Sequenz. Die Sequenz wird bei der Maus im Exon 8 codiert (Abb. 3). Die Immunisierung erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Injektionen im Abstand von 2-4 Wochen. Sowohl vor (Präimmunserum) als auch nach jeder Injektion wurde etwa 1 ml Blut aus dem Kaninchen entnommen und das Serum gewonnen. Zum Nachweis von Tspan5 Antikörper in den einzelnen Seren wurde nun ein Western Blot durchgeführt, in dem definierte Mengen an Kleinhirn-Proteinextrakt aufgetragen und mit ungereinigtem Präimmunserum, Serum nach dem 2. Boost sowie Serum nach dem 3. Boost inkubiert wurde. Alle, auch das Präimmunserum führten zum Nachweis einer Reihe von Banden, was darauf hindeutet, dass das Kaninchen Antikörper gegen vielfältige Proteine im Blut besitzt, die eventuell auf vorangegangene oder begleitende Infektionen zurückgeführt werden können (Abb. 5).

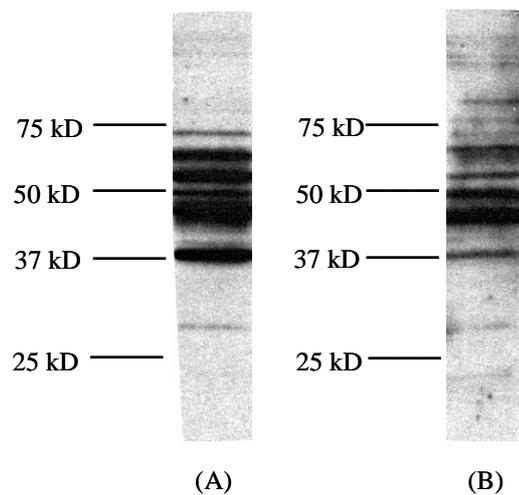


Abb. 5: Western Blot von 10 µg Kleinhirn-Extrakt mit (A) Präimmunserum 1:5000 verdünnt, (B) Serum nach dem 2. Boost 1:5000

Bereits in diesem initialen Experiment war zu erkennen, dass mit dem Serum nach der dritten Injektion eine Proteinbande in einem Kleinhirnextrakt nach Western Blotting im Bereich von 40 kD dargestellt werden konnte (Abb. 6).

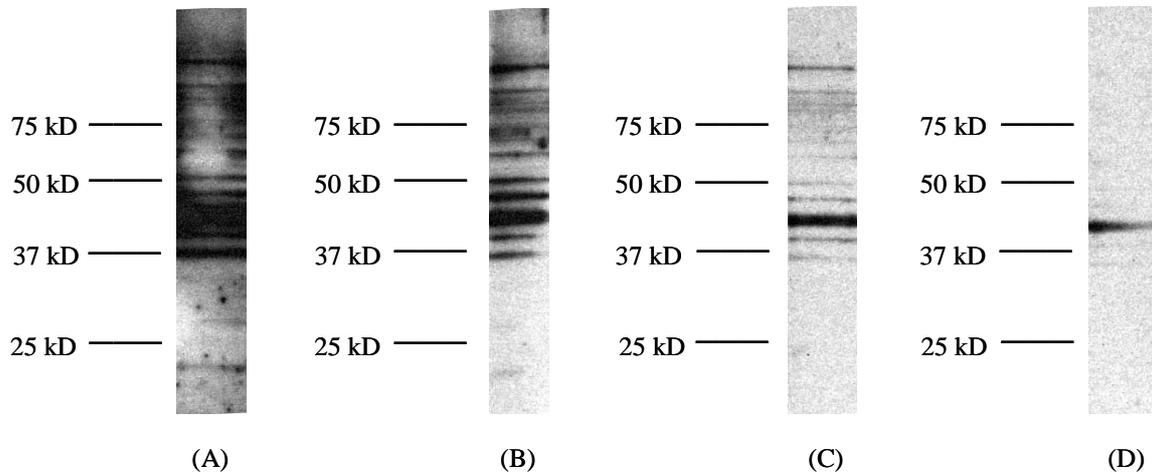


Abb. 6: Western Blot von 10 µg Kleinhirn-Extrakt mit Serum nach dem 3. Boost in unterschiedlichen Verdünnungen. (A) 1:2000, (B) 1:5000, (C) 1:10.000, (D) 1:20.000

Wurde das Serum aus der dritten Injektion in unterschiedlichen Verdünnungen im Western-Blot eingesetzt, war diese 40 kD Bande auch in der höchsten eingesetzten Serumverdünnung noch nachzuweisen (Abb.6). Dies spricht dafür, dass das immunisierte Kaninchen einen Antikörpertiter gegen ein Protein mit dem Molekulargewicht 40 kD besitzt. Da wir in Anbetracht der vielen unspezifischen Banden von einem Antikörpergemisch im Kaninchenserum ausgehen mussten, haben wir das Serum mittels einer Immunoaffinitätschromatographie aufgereinigt. Die einzelnen Elutionslösungen und Waschlösungen wurden anschließend im Western Blot und im Silber-Gel analysiert. Hierbei zeigte sich, dass anscheinend im 2. Elutionsschritt, hier wurde mit 100 mM Triethylamin mit einem pH von 11.5 ein basischer pH-Sprung ausgelöst, die größte Menge an Antikörper-haltiger Proteinlösung von der Säule gewaschen wurde (Abb. 7B). Auch in der ersten Elution, hier wurde mit 100mM Glycin mit einem pH von 2,5 ein saurer pH-Sprung ausgelöst, wurde eine geeignete Menge des Antikörpers von der Säule gelöst (Abb. 7A). Somit wurden die Antikörper des ersten und zweiten Elutionsschrittes für weitere Western Blots verwendet.

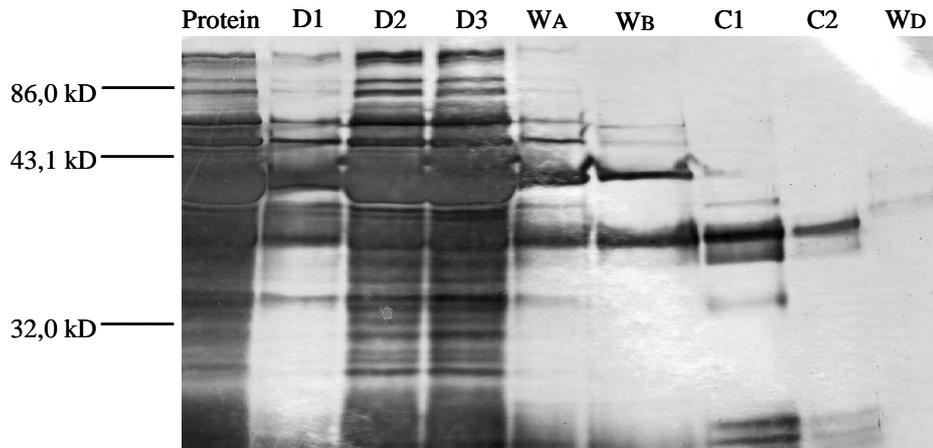


Abb. 7A: Silber-Gel der einzelnen Elutions- und Waschlösungen in gleicher Menge unverdünnt zur Bestimmung des Proteingehaltes in den einzelnen Elutionen. Zum Vergleich in der 1. Spur das ungereinigte Protein in einer Verdünnung von 1:10. D1-3: Durchfluss nach Auftragen des Antikörpers, WA: Durchlauf nach Waschen mit 10mM Tris/HCl pH 7,5 (Waschpuffer A), WB: Durchlauf nach Waschen mit 10mM Tris/HCl pH 7,5 500mM NaCl (Waschpuffer B), C1 und C2: Durchlauf nach Elution mit 100mM Glycin pH 2,5 (saurer pH-Sprung), WD: Durchlauf nach Waschen mit 10mM Tris/HCl pH 8,8 (Waschpuffer D).

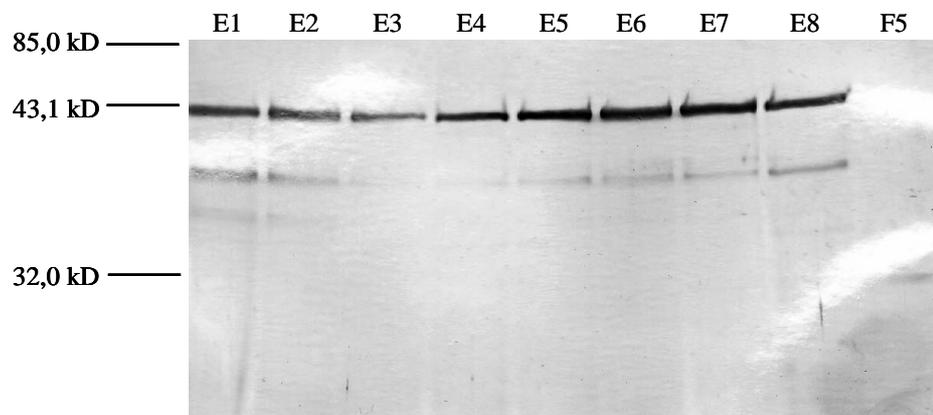


Abb. 7B: Silber-Gel der einzelnen Elutions- und Waschlösungen in gleicher Menge unverdünnt zur Bestimmung des Proteingehaltes in den einzelnen Elutionen. E1 bis E8: Durchlauf nach Elution mit 100mM Triethylamin pH 11,5 (basischer pH-Sprung), F5: Durchlauf nach Elution mit 8M Urea 10mM Tris/HCl pH 7,5 (Regenerationspuffer).

Eine Verdünnungsreihe des gereinigten Antikörpers zeigte, dass eine Verdünnung von 1:10 ein optimales Ergebnis im Western Blot lieferte (Abb.8).

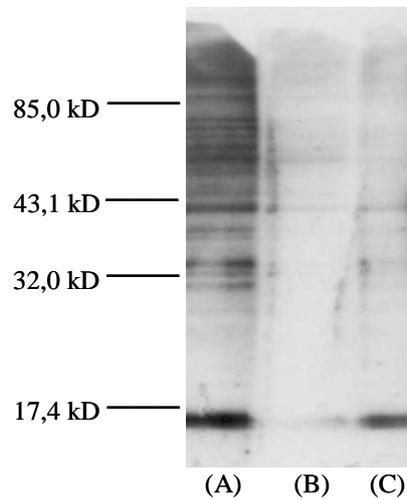


Abb. 8: Western Blot mit Antikörperverdünnungsreihe. Jeweils Einsatz von 10 μ g Kleinhirnextrakt und Antikörper aus Elution E 3 in Verdünnung (A) 1:10, (B) 1:100, (C) 1:500.

Aufsteigende Mengen an Protein machten aber deutlich, dass die Bedingungen für den Western Blot noch nicht optimal gewählt waren, da immer noch unspezifische Banden aufgrund von Kreuzreaktionen der Antikörperlösung mit spezifischen Proteinen des Kleinhirnextraktes auftraten. Wie in Abbildung 9 gezeigt ist, konnten diese Kreuzreaktionen durch Blockierung mit 5% Milchpulver komplett verdeckt werden.

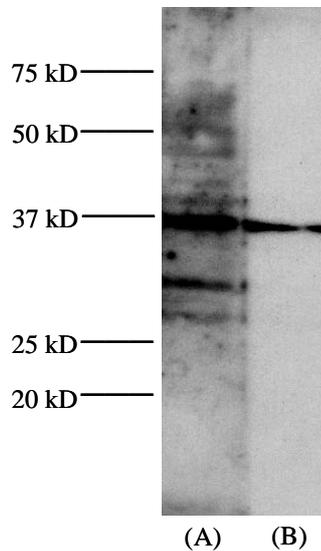


Abb. 9: Western-Blot, Einsatz von 10 μ g Kleinhirnextrakt, Antikörperverdünnung 1:10 (A) Antikörper verdünnt in 1% BSA/PBST, (B) Antikörper verdünnt in 5% Milchpulver in PBST.

Somit wurden die weiteren Western-Blots mit einer Antikörperverdünnung des Tetraspanin 5-Antikörpers von 1:10 verdünnt in 5% Milchpulver gelöst in PBST verwendet.

4.2 Spezifität des Tetraspanin 5 Antikörpers

Wie bereits einführend erwähnt, gibt es neben dem Tspan5 noch weitere 31 Mitglieder aus der Tetraspanin-Superfamilie in Säugetieren (Hemler 2005). Jedes Familienmitglied besteht aus 200-350 Aminosäuren (Hemler 2005). Tetraspanin 5 besteht sowohl bei der Maus, wie auch beim Menschen aus 268 Aminosäuren, was einem rechnerischen Molekulargewicht von 30 kD (Ensembl) entspricht. Da die meisten Proteine glykosyliert sind, liegt i.d.R. das tatsächliche Molekulargewicht über dem errechneten. Dies bedeutet, dass die gefundenen 40 kD eine vernünftige Annäherung an das tatsächliche Molekulargewicht des Tspan5 darstellt. Ein Beweis für den spezifischen Nachweis ist dies allerdings nicht. Dazu wurden zwei Ansätze durchgeführt:

Zum einen wurde durch Martin Holst der Western Blot in Anwesenheit des spezifischen Peptides durchgeführt, welches zur Immunisierung eingesetzt worden ist, und welches spezifisch für Tspan-5 ist (Holst, Disseration, Anatomisches Institut, Univ. Bonn, 2007). Hierbei zeigt sich, dass in der Western Blot-Analyse von Tetraspanin 5 in Zellkulturen von Daoy-Zellen eine spezifische Bande bei 40 kD sichtbar ist, welche bei Zugabe eines Epitop-spezifischen Peptids in 10-, und 100-fachem molaren Überschuss nicht mehr nachweisbar ist.

Um einen weiteren Hinweis über die Spezifität des Antikörpers zu erhalten, habe ich einen Abgleich der verwendeten Petidsequenz mit zahlreichen anderen Proteinen mittels Blast Search (NCBI) durchgeführt. Im Ergebnis sieht man, dass die verwendete Peptidsequenz spezifisch für Tetraspanin 5 ist. Das zur Antikörperherstellung verwendete Peptid ist jedoch in seiner Sequenz zu 82,4% homolog zur Peptidsequenz von Tetraspanin 17. Ebenfalls besteht eine Homologie von 59% für Tetraspanin 14. Die Homologie gilt jeweils für das humane Protein und das Protein der Maus welche in dieser Sequenz jeweils zu 100% übereinstimmen (Abb. 10). Einige andere Proteine zeigten ebenfalls eine geringe Homologie zu dem verwendeten Peptid, diese ist jedoch deutlich geringer als die der aufgeführten Proteine und wird daher hier nicht im Einzelnen erwähnt. Bei Tetraspanin 17 und Tetraspanin 14 liegt diese zur Peptidsequenz homologe Sequenz ebenfalls im Bereich des C-terminalen Endes mit Ausnahme des humanen Tetraspanin 17. Hier findet sich besagte Sequenz in der Mitte der Proteinsequenz.

(A)	Tetraspanin 5:	CLAQNLVSDIEAVRASW
	Tetraspanin 17:	CLAQNLVSDIKAVKANW
	Tetraspanin 14:	+LARTLISDIEAVKA++
(B)	Tetraspanin 5:	CLAQNLVSDIEAVRASW
	Tetraspanin 17:	CLAQNLVSDIKAVKANW
	Tetraspanin 14:	+LARTLISDIEAVKA++

Abb. 10: Zur Tetraspanin 5 Antikörper Herstellung verwendete Peptidsequenz und Homologe Sequenzen von Tetraspanin 17 und Tetraspanin 14 (A) bei der Maus und (B) beim Menschen. Farblich markiert in grün sind die Aminosäureabweichungen der Homologen zur originären Peptidsequenz.

Als weiteren Ansatz habe ich unterschiedliche Tetraspanine kloniert, welche später in Zelllinien transfiziert werden können. Auswahlkriterium für bestimmte Tetraspanine war hierbei die Expression im Kleinhirn bzw. Gehirngewebe. In Abschnitt Material und Methoden können Details zur Klonierungsstrategie entnommen werden. Mithilfe der PCR Klonierung wurden die gesamten kodierenden Sequenzen für Tspan5 der Maus, das humane Tspan5 aus den vorhandenen Tumorzellen sowie Tm4sf2 und CD81 erfolgreich kloniert und sequenziert. Die Klone sind aus technischen Gründen in verschiedene Expressionsvektoren, und zum Teil in p-Bluescript Vektoren kloniert worden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Klonierte Tetraspanine und Vektoren in welchen die Klonierung erfolgreich gelang

Tspan 5 mouse	p-cDNA 3.1 Zeo+
Tspan 5 mouse	p-EGFP-N1
Tspan 5 human	p-EGFP-N1
Tspan 5 human	p-IRES2-EGFP
Tm4sf2	p-cDNA3.1-Zeo+
Tm4sf2	p-EGFP-N1
CD 81	p-BS-SK+
CD 81	p-EGFP-N1
CD 81	p-cDNA3.1-Zeo+

Mit diesen Vektoren kann eine Transfektion und Analyse der Proteinextrakte aus transfizierten Zelllinien durchgeführt werden. Die Blockierung des Western Blot Signals mithilfe des Sequenzspezifischen Peptids gilt jedoch als guter Nachweis für die Spezifität des gereinigten Antikörperserums. Insofern wurde im Weiteren von einem spezifischen Nachweis des Tetraspanin-5 durch das hergestellte Immunsereum ausgegangen.

4.3 Expression von Tetraspanin 5 in verschiedenen Organen der Maus

Viele Tetraspanine werden ubiquitär exprimiert. Der Nachweis von Tetraspanin 5 im neuronalen Gewebe ist bereits mehrfach erbracht worden. Bei Garcia-Frigola et al. (2000) wird das Vorkommen von Tetraspanin 5 im Northern Blot in verschiedenen Organen dargestellt. Ich habe nun versucht, Tetraspanin 5 mittels Western Blot auf Proteinebene in unterschiedlichen Organen darzustellen. Um einen quantitativen Unterschied der verschiedenen Organe in der Tetraspaninexpression feststellen zu können, wurden hier äquivalente Mengen an Protein eingesetzt. Verglichen wurden Magen, Leber, Milz, Lunge, Colon, Herz, Gehirn, Niere, Muskel, Dünndarm, und Hoden jeweils von gesunden adulten Mäusen (Abb. 11).

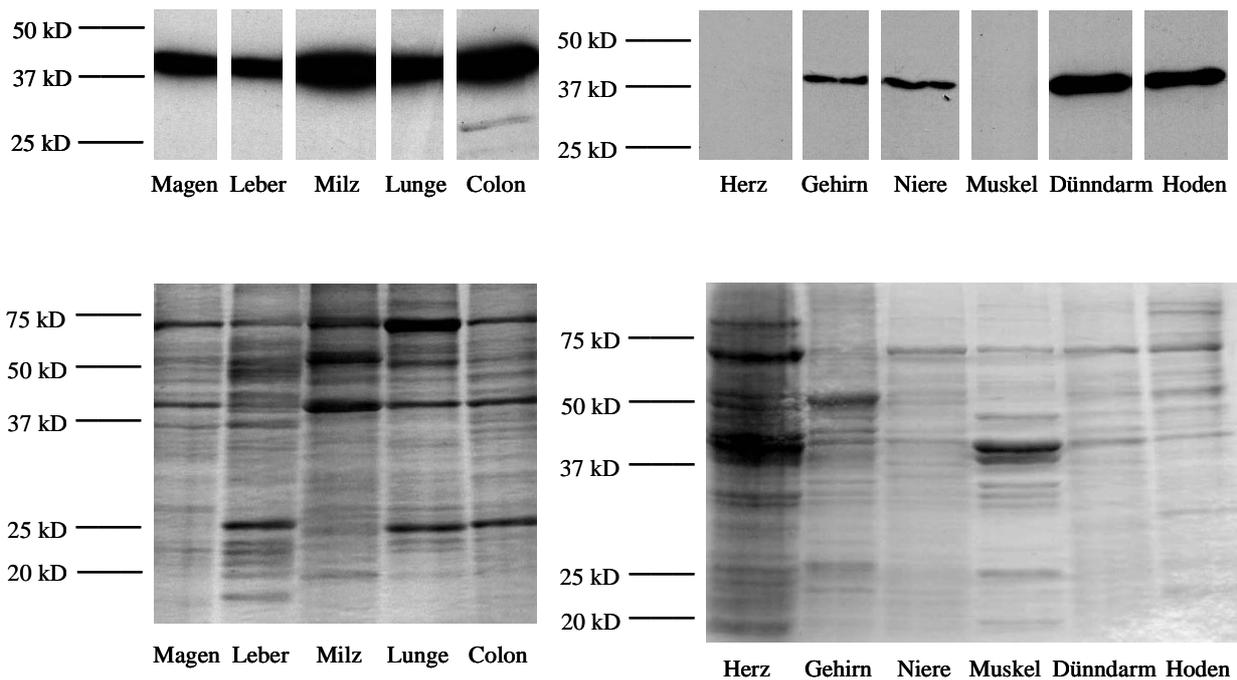


Abb. 11: Western Blot verschiedener Gewebe zum Nachweis von Tetraspanin 5 unter Einsatz äquivalenter Proteinmengen wie in der Coomassie Färbung der Western Blot Gele ersichtlich.

Wie in Abbildung 11 zu sehen wurden im Western Blot in etwa gleiche Mengen Protein aufgetragen. Beim Herzen wurde scheinbar mehr Protein verwandt, was aber das Ergebnis in seiner Aussagekraft nicht beeinträchtigte. Es zeigte sich im Western Blot eine sehr starke Tetraspanin 5 Expression in der Milz und im Colon. Eine geringfügig schwächere Expression zeigte sich in Magen, Leber, Lunge, Dünndarm und Hoden. Noch geringer war das Vorkommen von Tetraspanin hier in Gehirn und Niere. Im Herzen und im Skelettmuskel wurde kein Tetraspanin 5 exprimiert. Im Colon zeigte sich, neben der in den anderen Organen angezeigten Bande, eine zusätzliche, geringfügig kleinere Bande. Bei den restlichen Geweben traten keine zusätzlichen Banden auf.

4.4 Vergleich der Expression von Tetraspanin 5 in gesundem cerebralen und cerebellären Gewebe und in unterschiedlichen Entwicklungsstufen

Es ist bekannt, dass Tetraspanin 5 im Gehirn in unterschiedlichen Entwicklungsstadien in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wird. Außerdem weiß man, dass die Expression vor allem im Kleinhirn ausgeprägt ist (Juenger et al., 2005). Es wurden daher Cerebrum und Cerebellum getrennt mittels PCR Analyse auf die Expression von Tetraspanin 5 im Vergleich zueinander untersucht (Abb. 12).

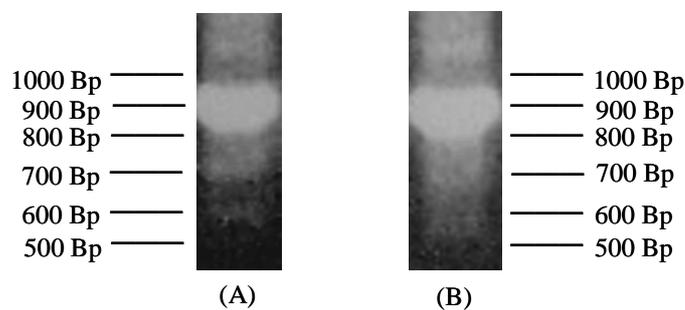


Abb. 12: Darstellung von Tetraspanin 5 in adultem Mausgewebe mittels PCR in (A) Cerebellum, (B) Cerebrum

In der Analyse zeigt sich jeweils eine deutliche Bande, welche für Tetraspanin 5 spezifisch ist, in ungefähr gleicher Stärke in Cerebellum und Cerebrum. Zusätzlich zeigt sich bei dem Gewebe aus dem Kleinhirn eine angedeutete weitere Bande in geringerer Laufhöhe als das abgebildete Tetraspanin 5. Im Cerebrum zeigte sich keine eindeutige zusätzliche Bande.

Im Anschluss wurde Gehirngewebe der Altersstufen P8 und P15 auf Expressionsunterschiede oder zusätzliche Banden in der PCR untersucht.

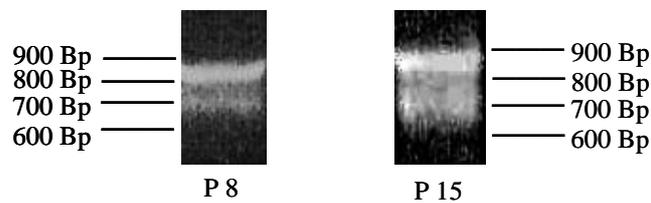


Abb. 13: PCR von Gehirngewebe in den angegebenen Altersstufen

Neben einer deutlichen Bande entsprechend Tetraspanin 5 zeigt sich in den Proben von P8 eine deutlich abgrenzbare zusätzliche Bande wie bereits vorher in der Probe des Kleinhirns. Bei P15 zeigt sich keine klar abgrenzbare zusätzliche Bande, lediglich eine diffuse und verbreiterte Bande wird angezeigt. Relative Mengenverhältnisse ließen sich aufgrund der technisch schlechten Qualität nicht bestimmen.

Zur Identifizierung der Bande wurde diese aus dem PCR-Gel herausgeschnitten und zur Sequenzierung bei Invitrogen eingeschickt. Die Sequenz war homolog zu der des Tetraspanin 5 jedoch mit einer Deletion von 171 Basenpaaren (664-834) (Abb. 13). Hierbei fiel auf, dass das komplette vierte Exon von insgesamt 8 Exonen fehlte (Abb. 14). Es wurde wahrscheinlich herausgespliced. Somit handelt es sich hier um eine Splicevariante von Tetraspanin 5. Es ergab sich durch die Deletion keine Verschiebung des Leserasters.

4.5 Expression von Tetraspanin-5 in verschiedenen Tumorzelllinien im Vergleich zu gesundem cerebralen Gewebe

Die in Abbildung 11 dargestellten Daten zeigen bereits, dass Tspan-5 auch als Protein im Zentralnervensystem exprimiert wird.

Für funktionelle Analysen des Tetraspanin-5 sind Zelllinien von entscheidendem Vorteil, da diese leicht manipulierbar, schnell und in nahezu beliebiger Menge zur Verfügung stehen. Um das Screening von Zelllinien zu erleichtern, wurde die PCR eingesetzt. Als Ausgangszelllinien wurden die Medulloblastomzelllinien Daoy und D283Med verwendet, die uns dankenswerterweise vom Institut für Neuropathologie der Universität Bonn zur Verfügung gestellt worden sind. Medulloblastome entstammen mit großer Wahrscheinlichkeit aus Zellen des Kleinhirns, genauer aus Körnerzellen des Kleinhirns. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass proliferierende Körnerzellen im Kleinhirn keine Tspan-5 mRNA exprimieren, so dass ich die Hoffnung hatte, dass Medulloblastome ebenfalls negativ für Tspan-5 sind. Dies hat sich überraschenderweise nicht bestätigt. Wie in Abb. 15 und 16 zu sehen ist, exprimieren beide Medulloblastomzelllinien große Mengen sowohl der mRNA (Abb. 16) als auch Proteine (Abb. 15).

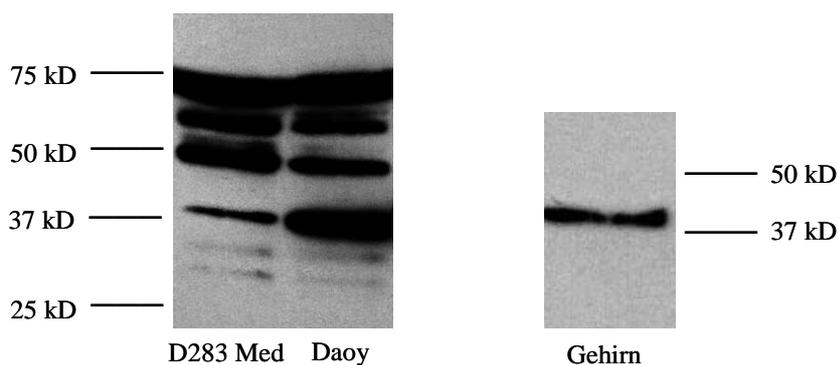


Abb. 15: Vergleich Western Blot von (A) D283Med und Daoy mit (B) Gehirnzellen einer gesunden Maus

Wie der Western Blot beweist, lässt sich mit dem hergestellten Antikörper auch der Nachweis von Tetraspanin5 in menschlichen Zellen führen. Dies beruht auf der hohen Sequenzhomologie zwischen dem Tetraspanin der Maus und des Menschen, wie in Abb.1 und 2 gezeigt.

Sowohl die PCR als auch die Proteinanalysen zeigten unerwartete Bandenmuster, die im folgenden genauer analysiert wurden. Auf Proteinebene erkennt der Tspan-5 Antikörper nicht nur die 40 kD Bande sondern noch zusätzliche 3 Banden im Bereich von 50 kD, 60 kD und 75 kD. Ganz schwach erkennt man sowohl bei den Daoy wie auch bei D283Med im Western Blot jeweils 2 Banden welche im Bereich von 37 kD und 35 kD liegen. Ausgehend von einer spezifischen Nachweis des tspan-5 spezifischen Peptidsequenz mit dem Antikörper, lässt dies vermuten, dass entweder Tspan-5 in unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen vorliegt, oder Protein-Protein-Wechselwirkungen eingeht, die die denaturierenden Bedingungen eines SDS-Gels überstehen. Dies soll später diskutiert werden.

Die Tumorzellpopulationen der Medulloblastomzelllinien wurden im Western Blot, zum Vergleich, mit Proteinextrakt von gesundem Gehirngewebe eingesetzt. Aus technischen Gründen konnte hier nur gesundes Hirngewebe der Maus gegen die humanen Tumorzellen aufgetragen werden, da keine gesunden menschlichen Gehirnzellen zur Verfügung standen. Wie in Abbildung 9 gezeigt, entspricht die Tetraspanin 5 Expression in D283Med quantitativ ungefähr der Expression in gesunden Gehirnzellen. Die Expression von Tetraspanin 5 in DAOY ist im Gegensatz zu gesunden Gehirnzellen quantitativ wesentlich deutlicher ausgeprägt als die normaler Gehirnzellen. Die zusätzlichen Banden welche bei den Medulloblastomzelllinien deutlich zu sehen sind, sind bei gesundem Gehirngewebe der Maus hier nicht sichtbar.

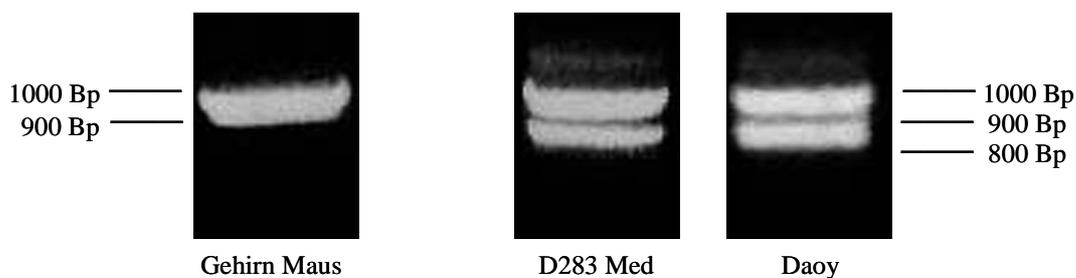


Abb. 16: PCR von äquivalenten mRNA Mengen aus dem Gehirn der Maus, D283 Med und Daoy

Für die PCR wurden, um etwaige Störfaktoren auszuschalten für die humanen Zelllinien Humanspezifische Primer benutzt, für das Gehirngewebe der Maus wurden weiterhin Mausspezifische Primer verwendet. Hiermit sollte gesichert werden, dass die Primer ganz spezifisch nur Tetraspanin 5 sowohl beim Menschen wie auch bei der Maus erkennen. Die PCR zeigt ebenfalls zusätzliche Banden zu der des Tetraspanin 5 (Abb. 16). Hier liegen die Banden, ähnlich den sehr schwach ausgeprägten Banden im Western Blot minimal unter der des Tetraspanin 5. Es muss sich um eine Sequenz handeln, welche minimal kleiner im Vergleich zu der des Tetraspanin 5 ist, jedoch eine große Homologie zu dieser Sequenz zeigt, da sie von den gleichen Primern erkannt und vervielfacht wurde.

Stellt man den gleichen Vergleich, Tumorzellen versus gesundes Gehirngewebe der Maus in der PCR, zeigt sich hier ein ähnliches Ergebnis (Abb. 16) wie im Western Blot. Hier ist bei den Tumorzellpopulationen wiederum eine zweite, etwas kleinere Bande und zwar gleichermaßen bei DAOY und Med 283, in nur minimal geringerem Anteil als Tspan 5 angezeigt. Die im Western Blot angezeigten Banden welche größere Proteine als Tetraspanin 5 abbilden, sind auf mRNA Ebene nicht mehr nachweisbar. Beim gesunden Gehirngewebe der Maus zeigt sich hier keine zusätzliche Bande.

Um die zusätzliche Bande der Medulloblastomzelllinien, welche sich in der PCR zeigt, zu identifizieren, wurde diese aus dem PCR-Gel ausgeschnitten und zur Sequenzierung bei Invitrogen eingeschickt. Das Ergebnis zeigt bei der verkürzten Bande der humanen Medulloblastomzelllinien die Sequenz von Tetraspanin 5 mit einer Deletion von 147 Basen. Es fehlt hierbei genau das dritte Exon von insgesamt 8 Exonen. Durch die Deletion ergibt sich keine Verschiebung des Leserasters.

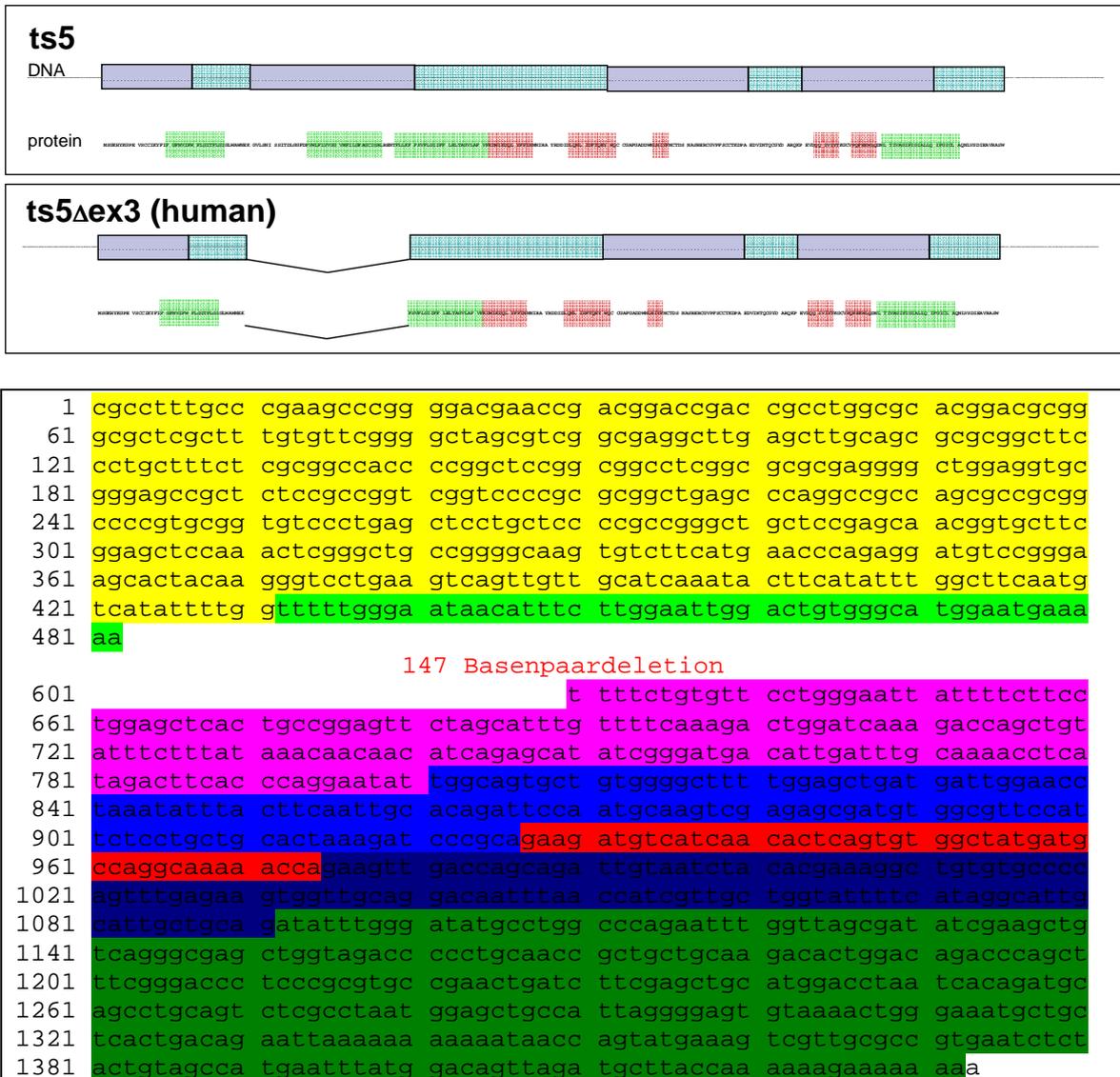


Abb. 17: Gensequenz der humanen Splicevariante mit Deletion von 147 Basenpaaren, entsprechend Exon 3. Exon 1 gelb, Exon 2 hellgrün, Exon 4 rosa, Exon 5 hellblau, Exon 6 rot, Exon 7 dunkelblau, Exon 8 dunkelgrün

Somit handelt es sich bei der identifizierten kurzen Bande ebenfalls um eine Splicevariante von Tetraspanin 5.

Die humane Splicevariante wurde analog zu Tetraspanin 5, CD81 und Tm4sf2 in unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert (Tab. 8), um diese später zur weiteren

Untersuchung in Zellen zu transfizieren. Die Klonierung der Splicevariante der Maus gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr.

Tabelle 8: Klonierte humane Splicevariante und Vektoren in welche die Klonierung erfolgreich gelang.

Tspan 5 human Splicevariante	p-cDNA 3.1 Zeo+
Tspan 5 human Splicevariante	p-IRES2-EGFP
Tspan 5 human Splicevariante	p-EGFP-N1

5 Diskussion

Zentrale Aufgabe dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung eines Antikörperserums, mit dem der Nachweis von Tetraspanin-5 möglich ist. Mit diesem Serum konnten im Rahmen dieser Arbeit initiale Versuche zur Expression von Tetraspanin-5 auf Proteinebene vorgenommen werden. Eine spannende Beobachtung war, dass Tetraspanin-5 offensichtlich in unterschiedlichen genetischen Splice-Varianten exprimiert wird, deren funktionelle Charakterisierung Einblicke nicht nur in die normale Entwicklung des Kleinhirns und die Rolle des Tetraspanin-5 beleuchten, sondern auch experimentelle Ansätze zur Tumorphagenese beim Medulloblastom oder anderen Tumoren eröffnen könnte.

5.1 Expression von Tetraspanin 5 in verschiedenen Mausorganen

Anhand dieser Arbeit konnte mithilfe des hergestellten Antikörperserums gezeigt werden, dass Tetraspanin 5 in den meisten Organen der Maus exprimiert wird. Dazu gehörten das Gehirn, Teile des Verdauungstrakts wie Magen, Dünndarm, Colon, und Leber, sowie Milz, Lunge, Niere, und Hoden. Keine Expression konnte dagegen im Herz und im Skelettmuskel gefunden werden. Diese Daten stimmen weitestgehend mit Beobachtungen von Garcia-Frigola et al. (2001) überein, in deren Arbeit die Tetraspanin-5 Expression auf mRNA Ebene untersucht wurde. Trotz der hohen Übereinstimmung zeigten sich jedoch auch Unterschiede in der Expression, die quantitativ auffällig waren. Dies betraf das Herz (mRNA > Protein), sowie die Milz (Protein > mRNA). Aufgrund von Untersuchungen an Hirngewebe (Wöllner, Dissertation, Univ. Bonn, 2007) wissen wir, dass die Expression des Tetraspanin-5 abhängig vom Alter sein kann. In meinen Studien wurden ausschliesslich adulte Tiere verwendet, während Garcia-Frigola et al. (2001) Gewebe von embryonalen Mäusen und ein- bis zwei Wochen alten Mäusen genutzt haben. Analog zu den Beobachtungen im Gehirn könnte folglich auch in anderen Organen eine altersabhängige Expression des Tetraspanin-5 auftreten. Gegen dieses Argument spricht, dass viele der untersuchten Organe zum Zeitpunkt der mRNA-Analysen ausdifferenziert waren. Alternative Erklärungen könnten sein, dass die Expression von Tetraspanin-5 post-transkriptionell reguliert wird und die mRNA infolgedessen keine wirkliche Maßgabe für die Menge an vorhandenem Protein darstellt.

Tatsächlich konnte in transgenen Tieren mit einer Reduktion der Purkinjezellendifferenzierung (L7En-2) gezeigt werden, dass die mRNA Expression reduziert war (Jünger et al. 2005). Auf Proteinebene war dieser Effekt aber nicht oder nur marginär nachzuweisen (Wöllner, Dissertation, Univ. Bonn, 2007). Eine weitere Möglichkeit für die Diskrepanz der mRNA und Proteinergebnisse könnte in der Spezifität liegen. In der aktuellen Genomdatenbank der Maus gibt es eine Gensequenz, die als Tetraspanin-5-ähnliche Sequenz beschrieben wird, aber nur zu 63% auf Nukleinsäureebene und zu 36 % auf Proteinebene homolog zum Tetraspanin-5 ist. Diese Kreuzreaktivität scheint folglich eher unwahrscheinlich. Zusammenfassend scheinen deshalb die beiden ersten Hypothesen wahrscheinlicher. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die experimentellen Voraussetzungen geschaffen, um diese Hypothesen weiter verfolgen zu können.

5.2 Potentielle Bedeutung der Tetraspanin-5 Splicevarianten

In Arbeiten von Jünger et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass Tetraspanin-5 im Kleinhirngewebe ausschließlich in nicht-proliferierenden Zellen exprimiert wird (siehe auch Wöllner, Dissertation, Univ. Bonn, 2007). Deswegen sind wir davon ausgegangen, dass auch in Tumorzelllinien kein Tetraspanin exprimiert wird. Umsomehr überraschten mich die experimentellen Befunde, dass menschliche Medulloblastomzelllinien eine deutliche Expression zeigten, sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene. Zusätzlich konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass in den verwendeten Zelllinien Daoy und Med283 zumindest eine Splicevariante des Tetraspanin-5 existiert. Da uns kein gesundes menschliches Gewebe zur Verfügung stand, haben wir die Expression der Splicevarianten im heterologen System zwischen Maus und Mensch verglichen. Hier zeigte sich, dass die Maus zwar ebenfalls eine Splicevariante im Kleinhirn exprimiert, in dieser aber ein anderes Exon fehlte als in den menschlichen Zelllinien. Ein direkter Vergleich der beiden Organismen scheint also nicht sinnvoll. Basierend auf diesen Daten können wir aber postulieren, dass es prinzipiell auch im normalen Gewebe Splicevarianten des Tetraspanin-5 gibt, eventuell aber in unterschiedlichen quantitativen Zusammensetzungen.

Dieser Befund wirft die Frage auf, welche Funktion diese Splicevarianten unter physiologischen und unphysiologischen Bedingungen haben könnten. Eine allgemein akzeptierte Funktion des alternativen Splicing ist die Produktion nicht-funktioneller Proteine.

Sinn dieser Überproduktion ist entweder die kompetitive Inhibition der Translationsmaschinerie, die dann zumindest zum Teil mit der Synthese des nicht-funktionalen Proteins beschäftigt ist. Alternativ könnten in diesen Proteinen funktionelle Domänen verändert sein, so dass sie zwar Proteinbindungen eingehen können, aber diese Bindungen nicht in funktionellen, z.B. katalytischen Aktivitäten resultieren (Lareau et al., 2004). Beschrieben ist auch, dass die alternativen Splicevarianten gar nicht translatiert, sondern auf mRNA Ebene abgebaut werden. Dieser Vorgang wird als Nonsense-vermittelter mRNA Abbau oder reguliertes unproduktives Splicing und Translatieren (RUST) bezeichnet (Lareau et al., 2004; Maquat, 2004). Sinn dieses alternativen Splicens ist folglich die Regulation der vorhandenen mRNA-Menge und damit die Synthese eines Proteins. Untersuchungen an EST Sequenzen haben gezeigt, dass diese Art des Splicens vor allem in Genen vorkommt, deren Splicestellen in entwicklungsgeschichtlich nahe verwandten Tieren unterschiedlich sind. Genau diese Beobachtung konnte ich für das Tetraspanin-5 machen, d.h. im Menschen tritt die Splicevariante $ts5\Delta Exon3$ und in der Maus die $ts5\Delta Exon4$ auf. Dies könnte also bedeuten, dass die Tetraspanin-5 Splicevarianten dazu dienen, die mRNA Menge, die zur Translation zur Verfügung steht, zu kontrollieren. Experimentelle Befunde zeigen jedoch, dass generell alternative Splicemuster in menschlichem und murinem Genom nur gering konserviert sind (Nurtdinov et al., 2003), so dass wir hier auch alternative funktionelle Erklärungen für das alternative Splicen des Tetraspanin-5 in Betracht ziehen müssen. Interessanterweise werden in den gespliceten Exonen zumindest Teile von Transmembrandomänen kodiert. Eine Deletion dieser Exone könnte also dazu führen, dass die intra- und extrazellulären Domänen der Splicevarianten auf der gegenüberliegenden Seite der Membran zu liegen kommen (Abb. 18).

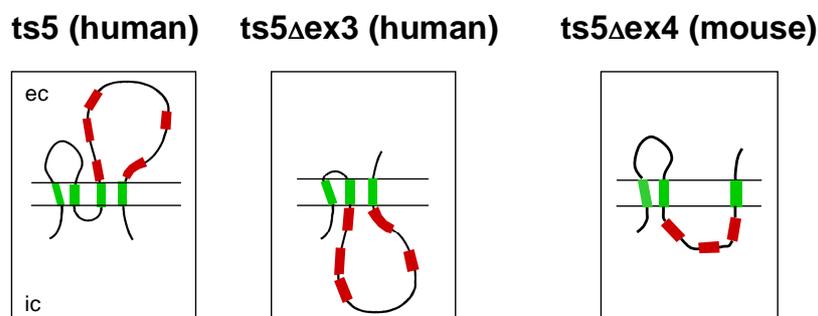


Abb. 18: Hypothetische Modelle für die Tertiärstruktur von Tetraspanin-Splicevarianten bei Maus und Mensch. Grüne Balken zeigen die Transmembranregionen, rote Balken die Domänen der EC2 Struktur. ec: extrazellulär, ic: intrazellulär

Durch das Fehlen von Exon 3 fehlt die zweite Transmembrandomäne. Dies könnte zur Folge haben, dass die EC2 Domäne ins Zellinnere verlagert wird, oder dass EC1 und EC2 Schleifen als große Schleife mit teilweise veränderter Tertiärstruktur außen liegen bleibt. Fehlt das Exon 4, das für die Transmembrandomäne 3 und Teile der EC2 Schleife kodiert, so könnte dies ebenfalls zu einer Verlagerung der Rest-EC2 Schleife ins Zellinnere führen.

Splicevarianten in Transmembrandomänen sind häufige Ereignisse (41 % der gesplizierten Transmembranproteine besitzen mutmaßlich eine Veränderung in der Transmembrandomäne (Xing et al., 2003)). Sie kommen insbesondere im Nervensystem vor, wo sie Kanalproteine und Rezeptoren beeinflussen (metabotropic glutamate receptor 3 (Sartorius et al., 2006), glutamate transporter EAAT2 (Hoogland et al., 2004), chloride channel ClC-6 (Eggermont et al., 1997), purinergic P2X receptors (da Silva et al., 2007)). Sehr häufig wird dieser Mechanismus dazu verwendet, um membranständige Proteine zu solubilisieren. Da Tetraspanine aber vier Transmembrandomänen besitzen, bleibt die Lokalisation in der Membran höchstwahrscheinlich bestehen. Eine Deletion vor allem der TM2 und TM3 könnte aber die Homo- und Heterooligomerisierung beeinflussen und dadurch die subzelluläre Aggregatbildung, die eingangs erwähnten Mikrodomänen, zerstören. Eine Zerstörung der Mikrodomänen wiederum könnte zu veränderter Adhäsion und Migration, oder zu veränderter Signalgebung führen. Eine Fehlpositionierung der proteinbindenden Regionen (EC2) würde mit Sicherheit die extrazellulären Bindungseigenschaften der Zelle beeinflussen, könnte aber auch die Funktion von intrazellulären unphysiologischen Bindungspartnern modulieren. Das hier gezeigte Splicemuster von Tetraspanin-5 bietet nicht nur die Möglichkeit, die Funktion des nativen Proteins zu untersuchen, sondern auch mögliche Konsequenzen multimembranärer Proteine zu analysieren.

5.3 Bedeutung von Splicevarianten für klinische Krankheitsbilder, insbesondere für die Tumorphagenese

Fehler im alternativen Splicing sind ein häufig beobachtetes Phänomen, das mit dem Auftreten der verschiedensten Krankheitsbilder einhergeht. Gewebs-spezifische Splicevarianten im Tyrosinphosphatase-ähnlichen Protein von Insulin-produzierenden Pankreaszellen verursachen eine Autoimmunantwort, die letztendlich zur Eliminierung der

Beta-Zellen und damit zum Diabetes Typ I führt (Diez et al., 2002). Alternatives Splicen der Thyroperoxidase prä-mRNA führt zu einer Veränderung der Proteinstabilität, was zur Akkumulation des Enzyms in Schilddrüsenzellen und damit zum Hyperthyreoidismus, speziell dem Basedow Syndrom führt (Niccoli-Sire et al., 2001). Weitere gut untersuchte Beispiele für Erkrankungen mit Defekten im alternativen Splicen sind die myotone Dystrophie; die spinale Muskelatrophie, die amyotrophe Lateralsklerose, die familiäre Wachstumshormondefizienz Typ II, frontotemporale Demenzen, bestimmte Parkinsonerkrankungen, die atypische zystische Fibrose, oder die Retinitis pigmentosa (Philips und Cooper, 2000; Faustino und Cooper, 2003). Krankheitsbilder können durch Mutationen in regulatorischen Prä-mRNA Sequenzen, in Regulatoren des Splicens, oder in Konzentrationsveränderungen von Splice Faktoren verursacht werden (Stamm et al., 2005).

Alternatives Splicen wird häufig und in manchen Fällen auch spezifisch in Tumorgeweben als Ursache oder Folge des Tumorwachstums und der Metastasierung angenommen. Am bekanntesten sind Splicevarianten des CD44 Rezeptors, eines transmembranären Glykoproteins und Rezeptors für Hyaluronan. Dieser Rezeptor scheint im Wesentlichen die Adhäsivität von Zellen zur extrazellulären Matrix zu vermitteln. Veränderungen in der Rezeptorstruktur durch alternatives Splicen werden entsprechend in metastasierenden pankreatischen Adenocarcinomen und Melanomen gefunden, nicht aber in rein proliferierenden Tumoren (Gunthert et al., 1991; Guo et al., 1994). Alternatives Splicen von Splice Faktoren wurde mit der Tumorprogression von Mammakarzinomen assoziiert (Stickeler et al., 1999). Ein klassisches Beispiel für eine Rolle des alternativen Splicens bei der Entstehung von Tumoren ist der Wilms Tumor mit Veränderungen im Tumor-Suppressorgen WT-1 (Johnstone et al., 1996). Dieses Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor und verursacht eine massive Zunahme des Zellwachstums nach entsprechenden Mutationen. In Tumoren der Hirnanhangsdrüse wurde eine Splicevariante des Thyroidhormonrezeptors gefunden, die die Affinität des Rezeptors gegenüber seinem Liganden TSH herabsetzt. Die Tumoren mit einer solchen Splicevariante zeigen sich entsprechend unsensitiv gegenüber einer Hormonbehandlung mit TSH (Ando et al., 2001). Zusammenfassend kann man erkennen, dass es eine Vielzahl von Möglichkeiten gibt, wie alternatives Splicen auf die Proteinfunktion Einfluss nimmt. Diese beinhalten eine reine Genexpressionsregulation (NMD, RUST), die Regulation der Proteinwechselwirkungen (von der kompletten Deletion bis hin zu Affinitätsänderungen), Regulation der subzellulären Lokalisation (Aggregatbildung

in bestimmten Organellen), sowie die Regulation der enzymatischen Aktivitäten (das Splicen selbst kann betroffen sein).

Ob das Auftreten von Tetraspanin-5 Splicevarianten in Medulloblastomzellen das Wachstumsverhalten und/oder die Wanderungs- oder Metastasierungseigenschaften der Zellen beeinflusst, ist derzeit unbekannt. Plausibel erscheint ein derartiges Modell aufgrund der in der Einleitung erwähnten potentiellen zellulären Funktionen, in die Tetraspanine involviert sind. Zudem machen Tetraspaninmutationen, die zu Tumorwachstum und Metastasierung führen, weitere Untersuchungen zum Tetraspanin-5 und seinen Splicevarianten in Mensch und Maus attraktiv. Vorarbeiten, wie die Klonierung von zwei Splicevarianten des Tetraspanin-5, sowie der Klonierung weiterer für das Zentralnervensystem interessanter Tetraspanine (CD 81 und Tm4sf2) wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

6 Zusammenfassung

Tetraspanine sind membranständige Modulatorproteine mit vielfältigen physiologischen Funktionen. Sie regulieren die Zellmorphologie, beeinflussen die Zellmotilität, sie steuern die Zellfusion und modulieren die Differenzierung von Zellen. Im sogenannten Tetraspaninweb ermöglichen sie die Homo- und Heterodimerisierung und fungieren als Aggregatbildner von vielfältigen Interaktionspartnern. Diese Mikrodomänen sorgen so für eine lokale Verstärkung von Signalübertragungsprozessen an der Zellmembran. Attraktiv erscheint die Analyse der Tetraspanine zudem durch das bereits bekannte Auftreten von Mutationen in Tetraspaninen, die mit erhöhtem Metastasierungsrisiko von Tumoren assoziiert wurden. Tetraspanin 5 ist ein Mitglied der Tetraspanin-Superfamilie, das als einziger Vertreter mit einer hohen Expression in Neuronen des zentralen Nervensystems beschrieben worden ist. Aufgrund von in situ Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass die Tetraspanin-5 mRNA Expression mit der Reifung von Neuronen einhergeht.

Funktionelle Aspekte des Tetraspanin-5 sind bisher also ausschließlich durch Korrelationsstudien erhoben worden. Diese konnten wiederum nur anhand der mRNA Expression analysiert werden, da bisher kein Tetraspanin-5 spezifischer Antikörper zur Verfügung stand. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ein Tetraspanin 5-spezifisches Antiserum im Kaninchen hergestellt, gereinigt und charakterisiert. Initiale Expressionsdaten zeigten, dass die mRNA und Proteinexpression in verschiedenen Organen weitgehend übereinstimmen. Allerdings konnten auch Unterschiede im Herzen und der Milz festgestellt werden. Diese Beobachtungen lassen erste Spekulationen über die Stabilität der Tetraspanin-5 mRNA bzw. des Proteins zu.

Obwohl Tetraspanin-5 bisher nur in postmitotischen Zellen nachgewiesen werden konnte, war mit dem Tetraspanin-5 spezifischen Antikörper auch in den menschlichen Medulloblastomzelllinien Daoy und D283Med eine deutliche Expression zu finden. Die Analyse der mRNA ergab, dass in beiden Zelllinien eine Splicevariante des Tetraspanin-5 exprimiert wurde, in dem das für eine Transmembrandomäne kodierende Exon 3 fehlte. Eine vergleichbare Splicevariante mit einer Deletion des Exon 4 konnte auch im nativen Kleinhirngewebe der Maus gefunden werden. Daraus können wir schliessen, dass

Tetraspanin-5 Splicevarianten sowohl in pathogenem als auch in nativem Gewebe vorkommen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zudem wichtige experimentelle Voraussetzungen erarbeitet werden, die es nun erlauben, nicht nur die Tetraspanin-5-Expression auf Proteinebene zu untersuchen, sondern auch funktionelle Analysen vorzunehmen, die auf die Klärung potentieller Funktionen des Tetraspanin-5 und seiner Splicevarianten während der Entwicklung des Zentralnervensystems abzielen.

7 Literaturangaben

Ando S, Sarlis NJ, Krishnan J, Feng X, Refetoff S, Zhang MQ, Oldfield EH, Yen PM. Abberant alternative splicing of thyroid hormone receptor in a TSH-secreting pituitary tumor is a mechanism for hormone resistance. *Mol Endocrinol* 2001; 15:1529-1538

Berditchevski F, Tolias KF, Wong K, Carpenter CL, Hemler ME. A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem* 1997; 272:2595-2598

Bloom HJG, Bessell EM. Medulloblastoma in adults. A review of 47 patients treated between 1952 and 1981. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1990; 18:763-772

Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins (Review). *Cell Mol Life Sci* 2000; 58:1189-1205

Carrie C, Lasset C, Alapetite C, Haie-Meder C, Hoffstetter S, Demaille MC, Kerr C, Wagner JP, Lagrange JL, Maire JP. Multivariate Analysis of prognostic factors in adult patients with medulloblastoma. Retrospective study of 156 patients. *Cancer* 1994; 74:2352-2360

Da Silva RL, Resende RR, Ulrich H. Alternative splicing of P2X6 receptors in developing mouse brain and during in vitro neuronal differentiation. *Exp Physiol* 2007; 92:139-145

Diez J, Park Y, Zeller M, Brown D, Garza D, Ricordi C, Hutton J, Eisenbarth GS, Pugliese A. Differential splicing of the IA-2 mRNA in pancreas and lymphoid organs as a permissive genetic mechanism for autoimmunity against the IA-2 type 1 diabetes autoantigen. *Diabetes* 2001; 50:895-900

Eberhart CG. Medulloblastoma in Mice Lacking p53 and PARP. *American Journal of Pathology* 2003; 162:7-10

Eggermont J, Buyse G, Voets T, Tytgat J, De SH, Droogmans G, Nilius B. Alternative splicing of CIC-6 (a member of the CIC chloride-channel family) transcripts generates three truncated isoforms one of which, CIC-6c, is kidney-specific. *Biochem J* 1997; 325:269-276

Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 2003; 17:419-437

García-Frigola C, Burgaya F, Calbet M, de Lecea L, Soriano E. Mouse Tspan-5, a member of the tetraspanin superfamily, is highly expressed in brain cortical structures. *Neuroreport* 2000; 11:3181-3185

García-Frigola C, Burgaya F, de Lecea L, Soriano E. Pattern of expression of the tetraspanin Tspan-5 during brain development in the mouse. *Mech Dev* 2001; 106:207-212

Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65:13-24

Guo Y, Ma J, Wang J, Che X, Narula J, Bigby M, Wu M, Sy MS. Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody. *Cancer Res* 1994; 54:1561-1565

Hart MN, Earle KM. Primitive neuroectodermal tumors of the brain in children. *Cancer* 1973; 32:890-897

Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion and fusion events, and define a novel type of membrane microdomain. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2003; 19:397-422

Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:801-811

Hoogland G, van Oort RJ, Proper EA, Jansen GH, van Rijen PC, van Veelen CW, van NO, Troost D, de Graan PN. Alternative splicing of glutamate transporter EAAT2 RNA in neocortex and hippocampus of temporal lobe epilepsy patients. *Epilepsy Res* 2004; 59:75-82

Hubbard JL, Scheithauer BW, Kispert DB, Carpenter SM, Wick MR, Laws ER Jr. Adult cerebellar medulloblastomas: the pathological, radiographic, and clinical disease spectrum. *J Neurosurg* 1989; 70:536-544

Hughes PG. Cerebellar medulloblastoma in adults. *J Neurosurg* 1984; 60:994-7

Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukkumar S, Englert C, Haber DA, Licht JD, Sugrue SP, Roberts T, Rangnekar VM, Shi Y. A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol Cell Biol* 1996; 16:6945-6956

Juenger CH, Holst MI, Duffe K, Jankowski J, Baader SL. Tetraspanin-5 (Tm4sf9) RNA Expression Parallels Neuronal Maturation in the Cerebellum of Normal and L7En-2 Transgenic Mice. *J Comp Neurol* 2005; 483:318-328

Kadin ME, Rubinstein LJ, Nelson JS. Neonatal cerebellar medulloblastoma originating from the fetal external granular layer. *J Neuropathol exp Neurol* 1970; 29:583-600

Katsetos CD, Herman MM, Krishna L, Vender JR, Vinos SA, Agamanolis DP, Schiffer D, Burger PC, Urich H. Calbindin-D28k in subsets of medulloblastomas and in the human medulloblastoma cell line D283Med. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119:734-743

Kenney AM, Cole MD, Roswith DH. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* 2003; 130:15-26

Kleihues P, Aguzzi A, Shibata T, Wiester OD. Immunohistochemical assessment of differentiation and DANN replication in human brain tumors. In: Fields WS, ed. *Primary brain tumors. A review of histologic classification*. New York: Springer Verlag, 1989:123-132

Lareau LF, Green RE, Bhatnagar RS, Brenner SE. The evolving roles of alternative splicing. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14:273-282

Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:89-109

Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997; 11:428-442

Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:89-99

Muntau Ania. *Intensivkurs Pädiatrie*. München: Urban & Fischer Verlag, 2004

Niccoli-Sire P, Fayadat L, Siffroi-Fernandez S, Malthierry Y, Franc JL. Alternatively spliced form of human thyroperoxidase, TPOzanelli: activity, intracellular trafficking, and role in hormonogenesis. *Biochemistry* 2001; 40:2572-2579

Nurtdinov RN, Artamonova II, Mironov AA, Gelfand MS. Low conservation of alternative splicing patterns in the human and mouse genomes. *Hum Mol Genet* 2003; 12:1313-1320

Oliver TG, Read TA, Kessler JD, Mehmeti A, Wells JF, Huynh TTT, Lin SM, Wechsler-Reya RJ. Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma. *Development* 2005; 132:2425-2439

Peterson K, Walker RW. Medulloblastoma / primitive neuroectodermal tumor in 45 adults. *Neurology* 1995; 45: 440-442

Philips AV, Cooper TA. RNA processing and human disease. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:235-249

Rorke LB. The cerebellar medulloblastoma and its relationship to primitive neuroectodermal tumors. *J Neuropathol exp Neurol* 1983; 42:1-15

Rubinstein LJ. Embryonal central neuroepithelial tumors and their differentiating potential: a cytogenetic view of a complex neuro-on-cological problem. *J Neurosurg* 1985; 62:795-805

Sartorius LJ, Nagappan G, Lipska BK, Lu B, Sei Y, Ren-Patterson R, Li Z, Weinberger DR, Harrison PJ. Alternative plicing of human metabotropic glutamate receptor 3. *J Neurochem* 2006; 96:1139-1148

Seigneuret M, Delaguillaumie A, Lagaudrière-Gesbert C, Conjeaud H. Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem* 2001; 276:40055-40064

Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H. Function of alternative splicing. *Gene* 2005; 344:1-20

Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins. *TIBS* 2003; 28:106-112

Stickeler E, Kittrell F, Medina D, Berget SM. Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. *Oncogene* 1999; 18:3574-3582

Tarrant JM, Robb L, van Spriel AB, Wringht MD. Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol* 2003; 24:610-617

Todres E, Nardi JB, Robertson HM. The tetraspanin superfamily in insects. *Insect Mol Biol* 2000; 9:581-590

Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet* 2001; 2:245-255

Xing Y, Xu Q, Lee C. Widespread production of novel soluble protein isoforms by alternative splicing removal of transmembrane anchoring domains. *FEBS Lett* 2003; 555:572-578

Zhang XA, Bontrager AL, Hemler ME. Transmembrane-4 Superfamily Proteins Associate with Activated Protein Kinase C (PKC) and Link PKC to Specific β 1 Integrins. *J Biol Chem* 2001; 276:25005-25013

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch Ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stephan L. Baader, für die sehr angenehme und gute Zusammenarbeit und für die vielen hilfreichen Anregungen. Auch über weite räumliche Distanzen hinweg hatte ich immer einen Ansprechpartner. Ausserdem danke ich den Mitarbeitern des Anatomischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für ein freundliches und kollegiales Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt hier Frau Alice Ihmer und Herrn Dr. Martin Holst, welche durch fachliche Anregungen und Hilfestellungen in besonderer Weise zum Gelingen meiner Forschungsarbeiten beitrugen. Ich danke den Mitarbeitern des Institutes für Physiologische Chemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung mehrerer Experimente. Hier gilt besonderer Dank Herrn PD Dr. Joachim Kappler, Herrn Dr. Sebastian Franken und Herrn Norbert Rösel. Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern, welche mir das Studium erst ermöglicht haben und mir jederzeit motivierend und unterstützend zur Seite standen. Ich bedanke mich außerdem bei meiner Schwester Frau Dr. Daniela Holst für die fachlichen und menschlichen Hilfestellungen. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Jürgen für seine Geduld und Unterstützung, ohne die mir diese Arbeit sehr viel schwerer gefallen wäre.