

Aus dem GSF-Institut für Molekulare Immunologie
Vorstand Prof. Dr. rer. nat. Dolores Schendel

**Monoklonale Antikörper für die Analyse
der Genexpression in neuronalen Geweben**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Anna Malamid

aus

Saratow

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Ralph Mocikat
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. J.-A. Büttner-Ennever
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	09.06.2005

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Modellorganismen	2
1.2	Monoklonale Antikörper	4
1.3	Proteomanalyse	5
1.4	Genexpressionssysteme	6
1.5	Fragestellung	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Geräte	9
2.1.2	Einmalartikel	10
2.1.3	Chemikalien, Medien, Seren und Bakterienstämme	10
2.1.4	Antibiotika	16
2.1.5	Medien für die Zellkultur	17
2.1.6	Kulturmedien für Bakterien	18
2.1.7	Antikörper	18
2.2	Methoden	20
2.2.1	Tiere und Organe	20
2.2.2	Immunisierung der Ratten	20
2.2.2.1	Immunisierung mit Gehirnen des Zebrafisches	20
2.2.2.2	Immunisierung mit Parkinprotein	21
2.2.3	Zellkultur	21
2.2.3.1	Myelomzelllinie	21
2.2.3.2	Hybridomzelllinien	21
2.2.3.3	Massenproduktion von Antikörpern	22
2.2.3.4	Astrozytenzelllinie	22
2.2.4	Hybridom-Technik	22
2.2.4.1	Fusion	22
2.2.4.2	Selektion der Klone für das Primärscreening	23
2.2.4.3	Primärscreening der Fusion	23
2.2.4.4	Reklonierung	23
2.2.4.5	Auftauen der Zellen	24
2.2.4.6	Kryokonservierung der Hybridome	24
2.2.5	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	24
2.2.5.1	Titrierung der Antikörper	25
2.2.5.2	Austestung von Antikörpern nach Biotinylierung	25
2.2.5.3	Austestung der primären Überstände auf IgG und IgM	25
2.2.5.4	Subklassentest	26
2.2.5.5	Überprüfung der Biotinylierungseffizienz	26
2.2.5.6	Parkin-ELISA	26

2.2.6	Immunhistochemie	26
2.2.6.1	Einfrieren von Hirngewebe und Zellkulturen	26
2.2.6.2	Herstellung von Kryostatgewebeschnitten	27
2.2.6.3	Fixierung von Kryostatgewebeschnitten	27
2.2.6.4	Anfärbung von Kryostatgewebeschnitten	27
2.2.7	Immunpräzipitation	28
2.2.7.1	Herstellung des Antigensolubilisats	28
2.2.7.2	Immunpräzipitation mit biotinylierten Antikörpern	28
2.2.7.3	Immunpräzipitation unter Verwendung von Protein G	29
2.2.8	Markierung von Antikörpern mit Biotin	29
2.2.9	Reinigung von Antikörpern (Affinitätschromatographie mit Protein G)	29
2.2.10	Proteinbestimmung	30
2.2.11	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.2.12	Westernblot	31
2.2.12.1	Analytische Darstellung von Proteinen	31
2.2.12.2	Präparative Darstellung von Proteinen	32
2.2.13	Silberfärbung	32
2.2.14	Genexpressionsbank	32
2.2.14.1	Vorbereitung von Medien und Platten für bakterielle Kulturen	33
2.2.14.2	Bakterienkulturen	33
2.2.14.3	Anlegen der primären Screeningsplatten	33
2.2.14.4	Ausschluss unspezifisch reagierender Antikörper	34
2.2.14.5	Übertragung von Plaques auf Nitrozellulose-Filter	34
2.2.14.6	Inkubation mit primären Antikörpern	35
2.2.14.7	Inkubation mit sekundären Antikörpern	35
2.2.14.8	Entwicklung der Farbreaktion	35
2.2.14.9	Entnahme von positiven Kolonien von der Originalplatte	35
2.2.14.10	Wechsel von Wirtsbakterien mit dem Ziel der Plasmidisolierung	36
2.2.14.11	Bestimmung der Länge der DNA-Abschnitte in den Phagen	36
2.2.14.12	DNA-Sequenzierungen	36
3	Ergebnisse	37
3.1	ZEGE-Antikörper	37
3.1.1	ZEGE 4B9, ZEGE 3H9, ZEGE 6F1, ZEGE 6G1, ZEGE 7A6, ZEGE 2C9	40
3.1.1.1	Immunhistochemie	40
3.1.1.2	Immunpräzipitation, Gel-Elektrophorese und Western-Blot unter Verwendung eines Avidin/Biotin-Systems	41
3.1.1.3	Immunpräzipitation, Gel-Elektrophorese und Western-Blot unter Verwendung von Protein G	44
3.1.1.4	Präparative Immunpräzipitation	47
3.1.1.5	LC-MS und Sequenzanalyse	48

3.1.2	ZEGE 8F8	53
3.1.2.1	Immunhistochemie	53
3.1.2.2	Western-Blot-Analyse	53
3.1.2.3	Immunpräzipitation unter Verwendung von Protein G, Gel-Elektrophorese	53
3.1.2.4	Massenspektrum von ZEGE 8F8	54
3.1.3	ZEGE 8D12	56
3.1.3.1	Immunhistochemie	56
3.1.3.2	Expressionsgenbank	56
3.1.4	ZEGE 8D5 und ZEGE 2F12	57
3.1.4.1	Immunhistochemie	57
3.1.4.2	Espressionsgenbank	57
3.1.5	ZEGE 7D7	58
3.1.5.1	Immunhistochemie	58
3.1.6	ZEGE 2A8	58
3.1.6.1	Immunhistochemie	58
3.1.7	ZEGE-Antikörper, die mit Gehirnen anderen Spezies nicht kreuzreagieren	58
3.1.7.1	Immunhistochemie	58
3.2	Antikörper, die gezielt gegen bestimmte Antigene hergestellt worden sind	59
3.2.1	VIII-41-Gruppe	60
3.2.1.1	Immunhistochemie	60
3.2.2	EPS-Gruppe	61
3.2.2.1	Immunhistochemie	61
3.2.3	PP2A-Gruppe	61
3.2.3.1	Immunhistochemie	61
3.2.4	P9H-Gruppe	62
3.2.4.1	Immunhistochemie	62
3.2.5	PUR-Gruppe	62
3.2.5.1	Immunhistochemie	62
3.3	Parkin	63
3.3.1	Immunhistochemie	63
3.3.2	Western-Blot	64
4	Diskussion	65
4.1	Tenascin	69
4.1.1	Tenascin C (TN-C)	70
4.1.2	Tenascin R (TN-R)	71
4.1.3	Tenascin X (TN-X)	72
4.1.4	Tenascin Y und Tenascin W	72
4.2	Plasticin	72
4.3	TOP _{AP}	74
4.4	VAT-1-Protein	75

4.5	Kreuzreagierende Monoklonale Antikörper	76
4.6	Parkin	77
4.6.1	α -Synuclein (PARK1)	77
4.6.2	Parkin (PARK2)	78
4.6.3	Ubiquitin-C-terminale Hydrolase (PARK5)	78
4.7	Generelle Beurteilung der Versuche	79
5	Literaturverzeichnis	80
6	Abkürzungsverzeichnis	94
7	Anhang	95
8	Zusammenfassung	121

1 Einleitung

Fortschritte im Verständnis, der Ätiologie, der Diagnostik und der Therapie von Krankheiten sind untrennbar mit neuen Entwicklungen und Erkenntnissen auf dem Gebiet der Naturwissenschaften verbunden. Wissenszugewinn hier ermöglicht neue Denkansätze in der Medizin. Umgekehrt stoßen ungelöste medizinische Fragestellungen oft Forschungsansätze auf den der Medizin verwandten naturwissenschaftlichen Sektoren an. Auf diese Weise bahnte die, in den letzten Jahrzehnten, zunehmende Erkenntnis, dass genetische und molekularbiologische Vorgänge die Entstehung und den Verlauf von Krankheiten in vielfältiger Weise beeinflussen, Forschungen den Weg, tiefere Einblicke in die genetischen Vorgänge und Bedingtheiten des Lebens zu gewinnen. Aus diesem Wunsch wurde 1990 das Vorhaben definiert, das menschliche Genom im Laufe von 15 Jahren vollständig zu entschlüsseln. Ziel dieses immensen Projektes war es, alle im menschlichen Organismus wirksamen Gene, Gensegmente und ihre Lokalisation auf den Chromosomen zu bestimmen. Man erhoffte sich aus diesen Daten neue Erkenntnisse über den evolutionären Ursprung und die Herkunft der Spezies, die Adaption an sich verändernde Umwelteinflüsse, Mutationen, Reproduktionsmechanismen und die Steuerung dieser Abläufe. Aus medizinischer Sicht hoffte man durch die Entschlüsselung der DNA-Sequenz und die Lokalisierung der Gene auf eine bessere Früherkennung und Diagnostik von Krankheiten, neue Therapieansätze sowie eine verbesserte Diagnostik.

Die Zuordnung von Funktionen zu einzelnen Genen wird sehr erleichtert, wenn Genome anderer Organismen zum Vergleich herangezogen werden können. Diesem Zweck dient die komparative Genetik. Dabei hat die Kartierung von Genomen das Ziel, Gene mit bekannten Eigenschaften zu lokalisieren. Das verschafft eine Vorstellung über die Organisation und Reihenfolge der Gene. Die komparative Genetik erlaubt durch die Analyse der Genkarten, die Organisation und Funktionsweise der Genome besser zu verstehen (O'Brien et al., 1999). Genkarten existieren zurzeit für den Menschen, die Maus und mehrere andere, meist einzellige Spezies. Bereits 1995 wurde das Genom des Bakteriums *Haemophilus influenzae* entschlüsselt (Fleischmann et al., 1995). Vollständig sequenziert sind ebenfalls die Genome des Bakteriums *Borellia burgdorferi* (Fraser et al., 1997), des Erregers der von Zecken übertragenen Lyme-Krankheit und der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al., 1997).

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms wurde durch die Konkurrenz zwischen dem Internationalem Humangenomprojekt (HUGO) und der privaten amerikanischen Firma Celera sehr beschleunigt. Bereits im Jahr 2001 teilte der Präsident der Firma Celera Craig Venter mit, 99% des menschlichen Genoms entschlüsselt zu haben (Venter et al., 2001). Wenig später im gleichen Jahr teilte das Internationale Konsortium zur Sequenzierung des menschlichen Genoms mit, dass eine erste, nahezu vollständig sequenzierte Version des menschlichen Erbgutes veröffentlicht sei (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Die vorliegenden Sequenzen lieferten eine Vielzahl von neuen Erkenntnissen und Informationen über die Gesamtzahl der Gene, die Charakteristika von Genfamilien und die lokale Architektur des Genoms. Das humane Genom enthält 30 000 bis

40 000 Gene. Es bestehen deutliche Unterschiede in der Zahl der Genomteile (Gene, transposable Elemente, CpG-Motive) (Lander et al., 2001). Mehr als 99% der Erbinformation ist bei allen Menschen gleich. Die Gene des Menschen sind sehr komplex aufgebaut, d.h. die Möglichkeit differenziellen Spleißens kann zu völlig unterschiedlichen Genprodukten führen, die die numerische Anzahl der Gene übertreffen können. Überraschend ist auch, dass wahrscheinlich Hunderte von Genen im menschlichen Genom durch horizontalen Transfer von Bakterien erworben wurden (Genereux und Logsdon, 2003). Noch bleiben jedoch in der zurzeit vorliegenden humanen Gensequenz eine Reihe von Fragen offen. So sind Sequenzen innerhalb des Genoms falsch positioniert oder nicht vollständig. Deswegen ist eine mehrmalige Überprüfung der Sequenz erforderlich. Die genaue Genlokalisierung ist derzeit erst für vier der 23 menschlichen Chromosomen erarbeitet. Die Funktion der einzelnen Gene ist noch recht lückenhaft bekannt.

1.1 Modellorganismen

Die Aufklärung der Funktion einzelner Gene würde sich als sehr schwierig erweisen, wenn nur die Nukleotidsequenz des menschlichen Genoms bekannt wäre.

Schon seit den Anfangszeiten der naturwissenschaftlich experimentellen Medizin wurden Modellorganismen in die physiologische, biochemische oder pharmakologische Forschung einbezogen. Dabei spielen vor allem Kaninchen, Meerschweinchen und Maus eine große Rolle. Auch bei der Funktionsanalyse im Rahmen des Humangenomprojekts werden Versuchstiere eingesetzt. Aber anstelle der traditionellen Modellorganismen treten Spezies, deren Genome kleiner und einfacher organisiert sind als das menschliche, wie z.B. die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* oder der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Gene, die für Proteine mit lebenswichtigen Funktionen kodieren, sind sehr konserviert und haben sich im Laufe der Evolution nur wenig geändert, weshalb ihnen in verschiedenen Spezies mit hoher Wahrscheinlichkeit eine ähnliche Funktion zukommt. In der Medizin spielt noch ein anderer Gesichtspunkt eine wesentliche Rolle. Genmutationen können pathologische Phänotypen erzeugen. Bei hohen Homologien zwischen den Genen des Modellorganismus und des Menschen kann durch eine gezielte Mutation des Gens im Modellorganismus ein abweichender Phänotyp induziert werden. Somit kann auf die Funktion des menschlichen Gens geschlossen werden.

Auch die Maus dient seit langem als Modellorganismus in der Genforschung (Bedell et al., 1997a und 1997b). Besonders seit im Jahre 2001 die Firma Celera Genomics auch die komplette Genomsequenz der Maus entschlüsselt hat, wurde festgestellt, dass Mensch und Maus ein sehr ähnliches Erbgut haben. Defekte homologer Gene führen bei Maus und Mensch oft zu ähnlichen Erkrankungen. Inzwischen wurden mehr als hundert Mutationen im Genom der Maus beschrieben, die pathogenetisch bedeutsam sind. Mausmutanten dienen als Modelle menschlicher Erkrankungen der Sinnesorgane (Auge, Ohr), des kardiovaskulären Systems, bestimmter Muskeldystrophien und für Wachstumsstörungen.

Es gibt bestimmte Anforderungen, die ein Modellorganismus zu erfüllen hat. Die Haltung solcher Organismen muss einfach sein, wenig Raum beanspruchen und billig sein. Von Vorteil sind kleine Organismen, deren Entwicklung und Differenzierung sich in jedem Stadium gut beobachten lässt. Kurze Generationszeiten, eine schnelle Entwicklung und viele Nachkommen begünstigen eine schnelle Durchführung und Auswertung von Versuchen. Für die Entwicklungsbiologie sind daneben auch noch die Entwicklung der Nachkommen außerhalb der Muttertiere, Durchsichtigkeit und das Vorhandensein bestimmter Organe und Organsysteme wichtig. In der Molekularbiologie haben sich bestimmte Organismen, wie die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der Krallenfrosch *Xenopus laevis*, die Hausmaus *Mus musculus* und der Zebrafisch *Danio rerio* besonders bewährt und werden für viele Studien eingesetzt.

Von den oben genannten Modellorganismen wurden für einige Experimente, die in dieser Arbeit beschrieben sind, Zebrafische benutzt, da die GSF über eine eigene Zucht dieser Fische verfügt. Zebrafische sind tropische Süßwasserbewohner, die weltweit für systematische zelluläre und genetische Analysen der Vertebratenentwicklung genutzt werden (Driever et al., 1994 und 1996). Zebrafische sind sehr widerstandsfähig und können das ganze Jahr über im Labor gezüchtet werden. Die Haltung ist mit einer hohen Dichte lebender Tiere möglich, ohne dass Vermehrung und Entwicklung beeinträchtigt werden. Die Laichablage der Tiere ist vom Lichtzyklus abhängig und damit steuerbar. Die Reproduktionsrate ist hoch und die Embryonen entwickeln sich außerhalb des Muttertieres und sind völlig durchsichtig. Auf diese Weise lässt sich auch die Entwicklung von Organen und Geweben, die sonst tief im Körper liegen und direkter Sicht entzogen sind, am lebenden Embryo beobachten (Strähle und Ingham, 1992). Inzwischen liegen auch genetische Karten des Zebrafischgenoms vor (Postlethwait et al., 1994, 1997, Knapik et al., 1996, 1998). Mutationen lassen sich inzwischen auch an haploiden homozygoten Embryonen durchführen (Streisinger et al., 1981). Da die Embryonen klein sind, lassen sich durch Mutationen erzeugte Phänotypen im gesamten Organismus histologisch oder immunhistologisch auf einem Objektträger untersuchen. Der Ablauf der Embryonalentwicklung ist je nach Temperatur in 2-4 Tagen abgeschlossen. Die endo-, meso- und ektodermalen Zelllagen entstehen in 6-10 Stunden während der Gastrulation. Die Segmentierung erfordert 10-24 Stunden und nach nur einem Tag ist ein vollständiger Wirbeltierembryo erkennbar. (Kimmel et al., 1995, Brand und Wittbrodt, 1999). Mutationen lassen sich durch Röntgenbestrahlung oder Mutagene auslösen (Müller und Hassel, 1999). Auch Transplantationen oder die Erzeugung transgener Tiere sind möglich (Brand und Wittbrodt, 1999). Ein wesentlicher Vorteil des Modellsystems Zebrafisch ist es, dass die Sterblichkeit von Embryonen genau beobachtet werden kann. Dies ist z.B. bei Mäusen nicht möglich, da die Entwicklung unsichtbar im Mutterleib erfolgt. Neben diesem Nachteil unterliegen Mäuse als genetische Modellsysteme auch noch einer Reihe anderer Einschränkungen (Driever et al., 1996). Unter Abwägung aller genannten Gesichtspunkte haben wir daher für einige Experimente in dieser Arbeit den Zebrafisch als Modellsystem gewählt.

1.2 Monoklonale Antikörper

Zur Aufklärung der Funktion eines bestimmten Gens ist es erforderlich, die Genprodukte auf zellulärer Ebene nachzuweisen. Schon seit langem dienen neben enzymatischen Reaktionen Antikörper auf Grund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität diesem Zweck. Bei der Entwicklung der Technik wurden in der Anfangszeit Tiere mit mehr oder weniger hochgereinigtem Antigen immunisiert und die Antikörperfraktion aus dem Serum dieser Tiere, meist Kaninchen, gewonnen. Vom immunologischen Standpunkt aus betrachtet sind diese Antikörper polyklonalen Ursprungs. Die hohe Affinität dieser Antikörper und ihre relativ einfache Herstellung sind ein Vorteil. Jedoch gibt es auch eine Reihe von Nachteilen. Der Gehalt an spezifischen Antikörpern im Serum ist gering. Die Menge an Antiserum ist limitiert. Eine Standardisierung der Qualität ist kaum möglich. Durch die geringe Epitopspezifität eignen sich polyklonale Antikörper zwar hervorragend zur Immunpräzipitation, zeigen jedoch auf der anderen Seite auch eine bedauerlich hohe Rate von Kreuzreaktionen, die sich meist nur durch kostenintensive und titersenkende Absorptionsschritte unterdrücken lässt. Außerdem ist es erforderlich, relativ große Mengen gereinigten Antigens zur Immunisierung zu verwenden (Goding, 1983), was bei der Untersuchung von Proteinen, die in Zellen oder Organen nur in geringen Spuren exprimiert werden, größte Schwierigkeiten bereiten kann. Deshalb war die Entwicklung der Technik durch Köhler und Milstein (Köhler und Milstein, 1975), monoklonale Antikörper *in vitro* zu erzeugen, ein epochales Ereignis. Die Methode beruht auf der Verschmelzung von immunkompetenten B-Zellen, die meist aus der Milz immunisierter Tiere isoliert werden, mit immortalisierten Myelomzellen. Damit war es möglich, Antikörper mit definierten Affinitäts- und Bindungseigenschaften *in vitro* in praktisch unbegrenzter Menge herzustellen. Erst die hiermit gegebene Spezifität und Standardisierbarkeit ermöglichte die Entwicklung vielfältiger Immunreagenzien, die heute eine herausragende Rolle in der medizinischen Diagnostik spielen. Antigene zur Herstellung monoklonaler Antikörper benötigen keinen hohen Reinheitsgrad (Pirofsky et al., 1990), da die antikörperproduzierenden Klone selektiert werden. Außerdem kann eine gute Immunisierung mit kleinen Antigenmengen erreicht werden. Natürlich haben monoklonale Antikörper auch einige Nachteile. Da sie nur gegen ein Epitop gerichtet sind, werden zur Durchführung von Immunpräzipitationsreaktionen oft sekundäre Antikörper oder andere Hilfsmittel wie Protein A oder G benötigt. Auch erfordert die Herstellung monoklonaler Antikörper die Erfahrung eines spezialisierten Labors, das über die notwendige Erfahrung und Logistik im Umgang mit den erzeugten antikörperproduzierenden Klonen verfügt. Trotzdem sind monoklonale Antikörper heutzutage unverzichtbare Reagenzien zur Identifizierung, Charakterisierung und zum Funktionsnachweis von Genprodukten. Da das Institut für Molekulare Immunologie der GSF über ein spezialisiertes Labor zur Herstellung monoklonaler Antikörper verfügt, werden in dieser Arbeit monoklonale Antikörper dieses Labors zum Ausgangspunkt der Untersuchungen gemacht.

1.3 Proteomanalyse

Nach der kompletten Entzifferung des Genoms sind bei weitem noch nicht alle Genprodukte in ihrer Funktionsweise entschlüsselt. Dies hat seine Ursache in dem schon erwähnten differenziellen Spleißen der Gene, aber auch in den vielfältigen posttranslationalen Modifikationen der Proteine, wie Glykosylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung (Jackson et al., 1975), um nur einige der Möglichkeiten zu erwähnen. Insgesamt wird dem Genom das Proteom gegenübergestellt, wobei man unter diesem 1995 vorgeschlagenen Begriff die Gesamtheit der durch das Genom kodierten Proteine versteht. Innerhalb einer Zelle ist nie das gesamte Genom exprimiert, sondern je nach Differenzierungsgrad und Funktionszustand der Zelle immer nur ein Teil. Die Proteine innerhalb einer Zelle wirken auf vielfältige Weise aufeinander ein. Physiologische, aber auch pathologische Vorgänge werden von Multiproteinkomplexen (Alberts, 1998) gesteuert und beeinflusst. Daher ist es für das Verständnis von physiologischen Vorgängen und von Abweichungen unter krankhaften Fehlsteuerungen sowie für sich eventuell aus diesem Verständnis neu ergebende therapeutische Eingriffsmöglichkeiten so wichtig, die Expression, Funktion und Wechselwirkung miteinander verschalteter Proteine auf der Basis eines Genoms (funktionale Genomik) zu entschlüsseln. Untersuchungen dieser Art werden heute unter dem Oberbegriff „Proteomik“ subsumiert. Zur Zeit arbeiten viele Forscher und Unternehmen daran, die Funktionen einzelner Proteine in Proteinkomplexen zu definieren. Ein Hilfsmittel dabei ist die proteomweite Kartierung von Proteinkomplexen, die an einigen Modellorganismen wie der Hefe, *Saccharomyces cerevisiae*, schon recht weit gediehen ist (Gavin et al., 2002, Ho et al., 2002).

Methodisch ist die Analyse um einiges schwieriger als die Sequenzierung des Genoms. Im Laufe der Jahre hat sich ein Standardverfahren herausgebildet, dessen Ziel es ist, eine möglichst große Zahl der in einem Proteingemisch (Zelle, Körperflüssigkeit) enthaltenen Proteine zu identifizieren. Dabei kommen physikalische, biochemische und immunologische Methoden zur Anwendung. Zunächst ist es das Ziel, besonders bei membranständigen Proteinen, die Moleküle in Lösung zu bringen. Bei Zellen bedient man sich dazu hypo-osmolarer Lösungen, denen Detergentien zugefügt sind. Seit den siebziger Jahren hat die 2D-Elektrophorese eine zentrale Bedeutung für die Trennung von Proteingemischen (Kaltschmidt und Wittmann, 1970, Klose und Spielmann, 1975). Das Proteingemisch wird dabei in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung nach seiner Ladung (isoelektrische Punkte) und in der zweiten Dimension nach Größe in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im angefärbten Gel ergibt sich dann ein Fleckenmuster, das die Identifizierung individueller Proteine zulässt. Einzelne Flecken können ausgeschnitten und weiteruntersucht werden. Hierzu werden heute massenspektrometrische Verfahren eingesetzt. Nach Reduktion und Alkylierung des aus einem oder mehreren Flecken isolierten Proteins erfolgt ein proteolytischer Abbau, für den meistens Trypsin verwendet wird, um eine definierte Anzahl kleinere Bruchstücke zu erzeugen. Diese werden dann in einer geeigneten Lösung, entweder direkt oder in Kombination mit einer Mikro-HPLC in ein Massenspektrometer eingespritzt, wobei die Peptidfragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes ionisiert werden (Elektro Spray Ionisation = ESI). Die Masse der Fragmente wird dann im Massenanalysator bestimmt.

Ende der achtziger Jahre wurde von Hillenkamp und Karas (Karas und Hillenkamp, 1988) eine Ionisierung der Peptidfragmente, die in eine Matrix eingebettet sind, durch Beschuss der Kristalle im Hochvakuum erreicht. Die Masse der Fragmente wird dabei in Abhängigkeit von der Flugzeit in einem sogenannten Flugrohr bestimmt. Heutzutage ist man sogar in der Lage, mit einer Kombination der eben beschriebenen Typen von Massenspektrometern mit bestimmten Versuchsanordnungen Mikrosequenzierungen im unteren Femtomolbereich zu bewerkstelligen. Bei beiden Methoden lassen die Massen der Peptidfragmente einen Schluss auf das Ausgangsprotein zu, da sie für jedes Protein individuelle Zusammensetzungen haben, die von der zugrundeliegenden Aminosäuresequenz abhängig sind. Sowohl der Vergleich von Fleckenmustern in der 2-D-Elektrophorese als auch die massenspektrometrische Analyse und die damit gekoppelte Suche in ausgedehnten Datenbanken ist ohne den Einsatz hochleistungsfähiger Rechner und der zugehörigen Programme nicht möglich. Ob die Entwicklung von „Proteinchips“ (Zhu, 2001) eine weitere Verbesserung in der Sensitivität der Methodik bringt, wird sich erst erweisen müssen.

1.4 Genexpressionssysteme

Zur Funktionsanalyse von Genomen lassen sich auch molekularbiologische Methoden heranziehen. So können DNA-Genbanken konstruiert werden, die das gesamte Genom des Organismus enthalten. Die DNA besteht dabei aus Fragmenten, die in Vektoren eingebaut sind und innerhalb eines Wirtsorganismus repliziert werden. Zu diesem Zweck wird die mRNA einer Zellpopulation oder eines Gewebes isoliert und mittels viraler reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Beim Konstruieren einer cDNA-Genbank ist darauf zu achten, dass das vollständige Genom eines Organismus möglichst ohne Verzerrungen enthalten ist. Da es nicht möglich ist, ein Genom zu reproduzieren, muss die cDNA mit Restriktionsenzymen geschnitten und in handhabbare Fragmente zerlegt werden. Diese Fragmente werden dann in einen Vektor eingebaut, in einen geeigneten Wirtsorganismus eingeschleust und zur Expression gebracht. Bei diesem Prozess ist es wichtig, dass das Genom der Wirtszelle einerseits das Einsetzen fremder DNA erlaubt, ohne in seiner Stabilität gefährdet zu werden (Young und Davies, 1983). Andererseits soll die Wirtszelle die Expression der inklonierten DNA auf hohem Niveau, d.h. in vielen Kopien ermöglichen. Oft werden in die Vektoren Marker und Resistenzgene mit inkloniert, die z.B. ein selektives Wachstum der rekombinanten Klone in antibiotikahaltigen Nährlösungen erlauben oder Kolonien, die exprimierte rekombinante Klone enthalten, durch Blaufärbung markieren.

Gut eingeführte Expressionssysteme stützen sich auf E.coli als Wirtsorganismen, wobei die zu exprimierende DNA entweder über Bakteriophagen (meist λ -Bakteriophagen) oder Plasmide als Vektoren in die Zellen eingeführt wird. Der Unterschied zwischen Bakteriophagen und Plasmiden besteht in ihrer Replikation in der Zelle, die bei Plasmiden extrachromosomal erfolgt, während die DNA der Bakteriophagen in die DNA des Wirtsorganismus eingebaut wird und dort über viele Generationen verbleiben kann (Thomas et al., 1974). Die Menge der klonierten DNA liegt beim λ -Bakteriophagen bei ca. 25 kb. Kommerziell werden daher heute viele Systeme angeboten, die auf dem λ -Bakteriophagen aufbauen. In der vorliegenden Arbeit wurden λ TriplExTM-Phagen der Firma Clontech verwendet.

1.5 Fragestellung

Monoklonale Antikörper werden benötigt, um Proteine in histologischen Schnitten zu identifizieren oder um Proteine zu charakterisieren, um auf diese Weise Genfunktionen aufzuklären. Dabei wird als Modellorganismus oft der Zebrafisch gewählt, weil er gut zu handhaben ist und eine schnelle Entwicklung der durchsichtigen Embryonen außerhalb des Muttertieres aufweist.

Die Experimente wurden in drei verschiedene Richtungen geführt:

- a. Zum einen wurden Ratten mit Gehirnlysaten aus Zebrafisch immunisiert. Die aus den Fusionen isolierten monoklonalen Antikörper wurden an histologischen Schnitten auf spezifische Bindung untersucht. Organspezifische Antikörper wurden etabliert. Die von den Antikörpern erkannten Proteine wurden entweder mittels Gelelektrophorese und Massenspektrometrie oder über eine Expressionsgenbank identifiziert (s. Abbildung 1-1).
- b. Zum anderen wurden monoklonale Antikörper, die in der Arbeitsgruppe E. Kremmer mit anderen Zielen entwickelt wurden, am Gewebe von Zebrafisch auf ihre Kreuzreaktivität untersucht.
- c. Als gezielter Ansatz zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde mit einem Fusionskonstrukt immunisiert, das Teile des menschlichen Parkins enthielt.

Die im Rahmen dieser Vorgaben erzielten Ergebnisse werden in dieser Arbeit im Einzelnen dargestellt.

Einleitung

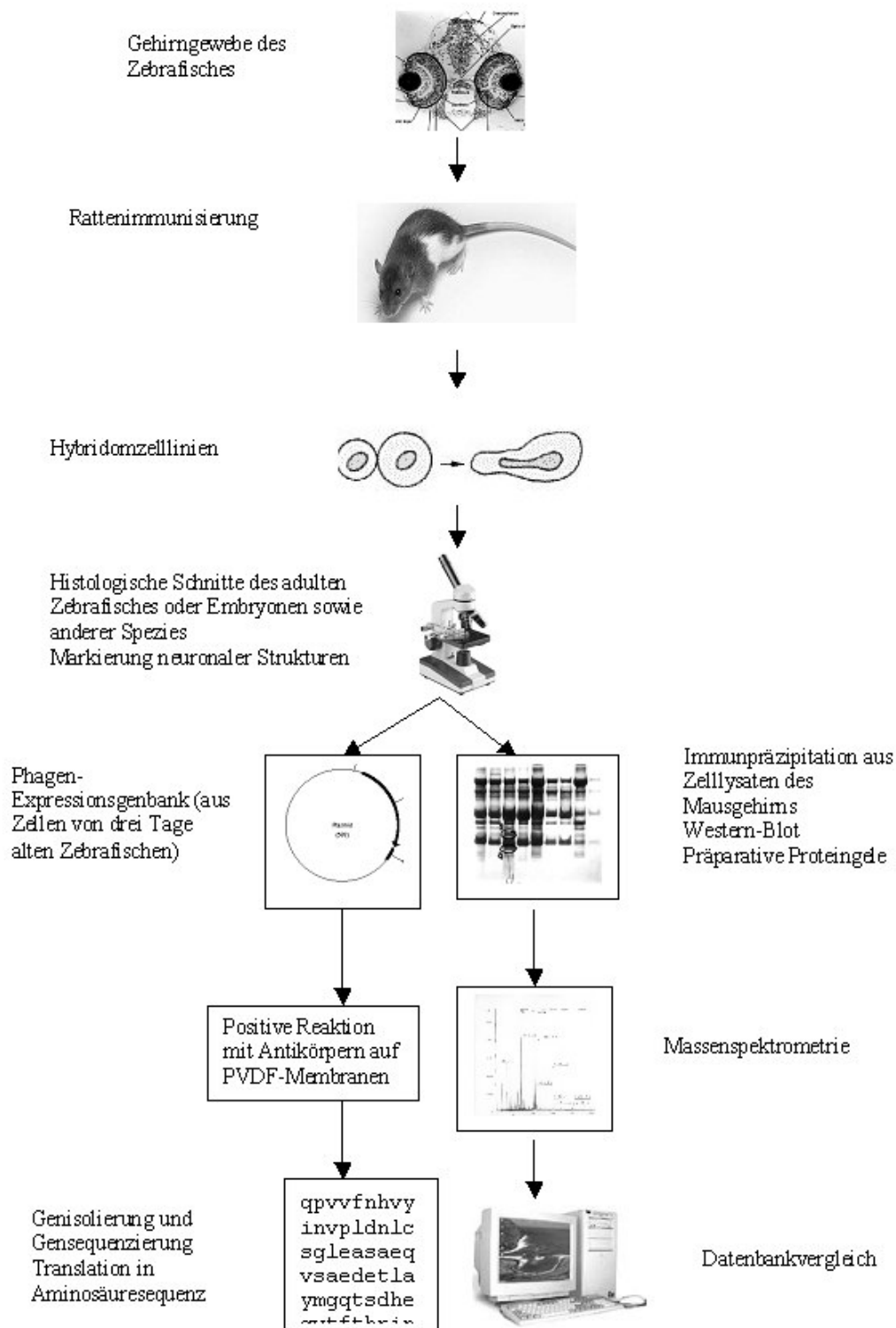


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Experimentreihenfolge.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- Analysenwaage AE 200 (Mettler, Giessen)
- Brutschrank, Cytoperm2 (Heraeus, Osterode)
- Brutschrank (Mettler, Schwabach)
- Digitale Kamera Fujix HC-300Z (AVT HORN, Aalen)
- Digitales Photosystem Gel Print 2000i
- Drucker Digital Graphic Printer UP-D860E (Sony, Köln)
- Elektrophorese System NuPAGE[®], bestehend aus Xcell II Mini-Cell, Xcell Blot Module und Power Ease[®] 500 ((Invitrogen, Karlsruhe)
- Elisareader Sunrise (Tecan, Crailsheim)
- Finnpipette[®], 8-Kanal Multistepper, 200 µl (Labystems, Helsinki, Finnland)
- Finnpipette[®], 12-Kanal-Pipette, 50-300 µl (Labystems, Helsinki, Finnland)
- Gasbrenner Fireboy (Integra Biosciences, Fernwald)
- Gasbrenner Fireboy plus (Integra Biosciences, Fernwald)
- Glasgefäße -Bechergläser, Kolben und Standzylinder- (Schott, Mainz)
- Invert[™] Mikroskop (Leica, Bensheim)
- Kryomikrotom, Frigocut Jung CM 3000 (Leica, Bensheim)
- Kühlzentrifuge IEC 6000B (Nunc, Wiesbaden)
- Laborglasschalen, 21x14x5 cm (Neolab, München)
- Lichtmikroskop Axioskop, Okular D-Pl 10x/20, Objektive Plan-Neofluar 2,5x/0,075, Plan-Neofluar 10x/0,30, Plan-Neofluar 20x/0,50 (Zeiss, Göttingen)
- Mikrowelle (Sharp Hamburg)
- Multipette Eppendorf (Eppendorf, Hamburg)
- pH-Meter 766 Calimatic (Knick Berlin)
- Pipettierhilfe, Pipetboy acu (Integra Biosciences, Fernwald)
- Sicherheitswerkbank (Laminar Air Flow) (Gelaire, Australien)
- Spektrophotometer UV Beckman DU[®] 640 (Beckman, München)
- Stahlhandsieb (GSF, Werkstatt, München)
- Stickstoff (Linde[®], München)
- Schüttelgerät mit Inkubationshaube TR 125 (Infors AG, Bottmingen)
- Schüttlertisch Rocky (Fröbel Labor Geräte)
- Schüttelwasserbad GFL 1083 (GFL, Burgwedel)
- Tischinkubator für Petrischalen (Heraeus, Hanau)
- Tischzentrifuge, 5415C (Eppendorf, Hamburg)
- Transluminator, IL 360 (Ltf Labortechnik, Wasserburg/Bodensee)
- Vortex MS2 Minishaker IKA[®] (Neolab, München)
- Zentrifuge Rotanta RP, Rotor 5094 (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen)

2.1.2 Einmalartikel

- 24-Loch-Gewebekulturplatte TC (Greiner, Nürtingen)
- 96-Loch-Gewebekulturplatte (Greiner, Nürtingen)
- 96-Loch-ELISA-Platte, (Nunc, Wiesbaden)
- Absaugpumpe Vacusafe mit Vacuboy und 8-Kanal-Kamm (Integra Biosciences, Fernwald)
- Aluminiumfolie M (Roth, Karlsruhe)
- Combitips[®] Pipettenspitzen, 5 ml (Eppendorf, Hamburg)
- Deckgläser für die Mikroskopie, 24x50 mm oder 24x32 mm (Menzel, Braunschweig)
- Einfrierröhrchen, Nunc Cryotube[™] 1 ml (Nunc, Wiesbaden)
- Faltenfilter 595^{1/2}, 185 mmØ (Schleicher & Schuell, Dassel)
- Fettstift Immunogen Calbiochem (Merck, Darmstadt)
- Hybond[™] ECL[™] Nitrozellulosemembran, RPN303D (Amersham Bioscience, Freiburg)
- Kunststoff-Einwegpipetten, 10 ml, 25 ml (Greiner, Nürtingen)
- Kunststoffwännchen, 8-Kanal-Reservoir (Integra Biosciences, Fernwald)
- Neubauer-Zählkammern (Brand, Wertheim)
- Nitrozellulose-Filter, ø82 mm und ø132 mm Protran[®] Art.-Nr.: 10401116 (Schleicher & Schuell, Dassel)
- Nitrozellulose-Filter, ø142 mm, 0,22 µm, Art.-Nr.: GSWP14250 (Millipore, Schwalbach)
- Nitrocellulosemembran Hybond[™]ECL[™], RPN 2020D (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Objektträger, SuperFrost[®] Plus, 25x75x1,0 mm, Art.-Nr. 041300 (Menzel, Darmstadt)
- Parafilm M[®] (Amerikan Can Company Greenwich, CT, USA)
- Pasteurpipetten, Glas, gestopft (Neolab, München)
- Petrischalen 92x140 (Neolab, München)
- Pipetten, 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen, Biopur, 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
- Reaktionsgefäße mit Deckelverriegelung, Safe-Lock, 1,5 ml und 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg)
- Skalpelle, (Neolab, München)
- Saugpapier 580x600 mm, GB58 (Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg)
- Zentrifugenröhrchen: 15 ml und 50 ml (Neolab, München)
- Zellkulturflaschen 200 ml, 600 ml (Nunc, Wiesbaden)
- Zellschaber (Neolab, München)

2.1.3 Chemikalien, Medien, Seren und Bakterienstämme

- 2-Methylbutan, Uvasol[®], Art.-Nr.:106056 (Merck, Darmstadt)
- 3-Amino-9-Ethylcarbazol (ca. 90%), Art.-Nr.: A-5754 (Sigma, Deisenhofen)
- 3-Aminobenzoessäureethylester, MS222, Methansulfonatsalz, Art.-Nr.: A-5040, (Sigma, Deisenhofen)

- 8-Azaguanin (50x), Art.-Nr.: A-5284 (Sigma, Deisenhofen)
- Aceton, p. a., Art.-Nr.: 100014 (Merck, Darmstadt)
- Agar, select, Art.-Nr.: A-5054, (Sigma, Deisenhofen)
- Agarose, Electrophoresis Grade, Art.-Nr.: 15510-019 (Invitrogen, Karlsruhe)
- Aqua-bidest. (Schubert, München)
- β_2 -Humanmikroglobulinklon gereinigt in λ TriplEx ($>10^8$ pfu/ml in 1x Lambda-Verdünnungspuffer und 7% DMSO) 50 μ l Clontech (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA)
- BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indonylphosphat), Art.-Nr.: S3771 (Promega, Mannheim)
- Bis-Tris Gel 8x8 cm, Kat.-Nr.: NP0301 NuPAGE[®] (Invitrogen, Karlsruhe)
- Bovines Albumin (Fraktion V, mind. 96%), Art.-Nr.: A-2153 (Sigma, Deisenhofen)
- Chloralhydrat, Art.-Nr.: 159121 (Merck, Darmstadt)
- Coomassie Simply Blue[™] Safe Stain Art.-Nr.: LC6060 (Invitrogen, Karlsruhe)
- Dimethylformamid, p. a., Art.-Nr.: 103053 (Merck, Darmstadt)
- DMSO, Dimethylsulfoxid, Art.-Nr.: D-2650 (Sigma, Deisenhofen)
- E. coli XL1-Blue (in 25% Glycerol) 0,5 ml Clontech (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA)
- E.coli BM25.8 (in 25% Glycerol) 0,5 ml Clontech (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA)
- Essigsäure, Art.-Nr.: 10047 (Merck, Darmstadt)
- Ethanol, Art.-Nr.: 108067 (Merck, Darmstadt)
- Fötales Kälberserum, Art.-Nr.: A15-043 (PAA Laboratories, Linz, Österreich)
- Freundsches Adjuvans, inkomplett, Art.-Nr.: F-5881 (Sigma, Deisenhofen)
- Genbank-Lysate (in 1x Lambda-Verdünnungspuffer + 7% DMSO) 0,2 ml Clontech (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA)
- Glycerin, Art.-Nr.: G-5516 (Sigma, Deisenhofen)
- Guanidinhydrochlorid (4 M), Art.-Nr.: 50935 (Sigma, Deisenhofen)
- Hämatoxylin, Art.-Nr.: 4305 (Merck, Darmstadt)
- HAT Media Supplement (50x), Art.-Nr.: H-0262 (Sigma, Deisenhofen)
- HT Media Supplement (50x), Art.-Nr.: H-0137 (Sigma, Deisenhofen)
- Instant-Magermilchpulver (Fink, Herrenberg)
- IPTG (10 mM in H₂O) Isopropyl β -D-Thiogalctopyranosid Art.-Nr.: I-5502 (Sigma, Deisenhofen)
- Kaisers Glyzeringelatine (für die Mikroskopie), Art.-Nr.: 109242 (Merck, Darmstadt)
- Kaliumaluminiumsulfat p. a., Art.-Nr.: 150847 (Merck, Darmstadt)
- Kaninchen-Anti-human- β_2 -Mikroglobulin-Serum polyklonal (250 μ g/ml) 20 μ l Clontech (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA)
- Laufpuffer MES SDS NuPAGE[®], Kat.-Nr.: NP0002 (20x) 500 ml (Invitrogen, Karlsruhe)
- Laufpuffer MOPS SDS NuPAGE[®], Kat.-Nr.: NP0001 (20x) 500 ml (Invitrogen, Karlsruhe)
- LB Agar (Lennox L Agar), Art.-Nr.: 22700-017 (Invitrogen, Karlsruhe)
- LB Broth Base, Art.-Nr.: 12780052 (Invitrogen, Karlsruhe)
- L-Glutamin 200 mM, Art.-Nr.: 5230123 (Invitrogen, Karlsruhe)
- Maltose Art.-Nr.:M-9171 (Sigma, Deisenhofen)
- Marker See blue pre-stained Standard Art.-Nr.: LC 5625 (Invitrogen, Karlsruhe)
- Meerrettich-Peroxidase-Avidin D, Kat.-Nr.: A-2004 (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA., U.S.A.)

- Methanol, Art.-Nr.: 106004 (Merck, Darmstadt)
- MgCl₂, Art.-Nr.: M-8266 (Sigma, Deisenhofen)
- MgCl₂·6H₂O, Art.-Nr.: M-2393 (Sigma, Deisenhofen)
- MgSO₄, Art.-Nr.:M-2643 (Sigma, Deisenhofen)
- MgSO₄·7H₂O, Art.-Nr.: M-2773 (Sigma, Deisenhofen)
- MultiMark™ Multi-Colored Standard (1x), 500 µl, Kat.-Nr.: LC5725 (Invitrogen, Karlsruhe)
- Natrium-Azid, Art.-Nr.: (S-4404) (Sigma, Deisenhofen)
- Natriumbikarbonat, Art.-Nr.: S-8875 (Sigma, Deisenhofen)
- Natriumchlorid, Art.-Nr.: 106404 (Merk, Darmstadt)
- Natriumjodat p. a., Art.-Nr.: 6525 (Merck, Darmstadt)
- Natriumkarbonat, wasserfrei, Art.-Nr.: S-2127 (Sigma, Deisenhofen)
- Natrium-Pyruvat 100 mM, Art.-Nr.: 11360088 (Invitrogen, Karlsruhe)
- NBT (Nitroblau- Tetrazolium Chloride), Art.-Nr.: S3771 (Promega, Mannheim)
- Nichtessentielle Aminosäuren MEM, Art.-Nr.: 11140035 (Invitrogen, Karlsruhe)
- o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid Tabletten (OPD), 60 mg/Tablette, Art.-Nr.: P-1063 (Sigma, Deisenhofen)
- Paraformaldehyd, krist., Art.-Nr.: P-6148 (Sigma, Deisenhofen)
- PBS Dulbecco INSTAMED, Art.-Nr.: L182-10 (Biochrom KG, Berlin)
- Polyethylenglycol 1500 (PEG), steril, Art.-Nr.: 783641 (Roche, Mannheim)
- Probenpuffer NuPAGE® SDS (sodium dodecyl sulfate), Kat.-Nr.: NP0003 (4x) 10 ml (Invitrogen, Karlsruhe)
- Protein G-Sepharose-Beads 4 Fast flow, Art.-Nr.: 17-0618-03, (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Reduktionsmittel NuPAGE® (0,5 M DTT (Dithiothreitol)), Kat.-Nr.: NP0005 (10x) (Invitrogen, Karlsruhe)
- RPMI 1640 ohne Glutamin, Art.-Nr.: 31870025 (Invitrogen, Karlsruhe)
- Salzsäure, Art.-Nr.: 100322 (Merck, Darmstadt)
- SilverQuest Silver Staining Kit Invitrogen Kat-Nr.: LC6070 (Invitrogen, Karlsruhe)
- Tissue-Tec O.C.T. Compound, 4583 (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande))
- Transferpuffer NuPAGE®, Kat.-Nr.:NP0006 (20x) 125 ml (Invitrogen, Karlsruhe)
- tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Art.-Nr.: 6430 (Merk, Darmstadt)
- Tris, Art.-Nr.: T-1503 (Sigma, Deisenhofen)
- Tween®-20 (Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate), Art.-Nr.: P-1379 (Sigma, Deisenhofen)
- Wasserstoffperoxyd 30%, Perhydrol®, Art.-Nr.:107210 (Merck, Darmstadt)
- Zitronensäure Monohydrat, Art.-Nr.:C-7129 (Sigma, Deisenhofen)
- Zitronensäure, Art.-Nr.: C-7129 (Sigma, Deisenhofen)

- AP-Puffer

	10x	1x
Tris-HCl (pH 9,5)	1,0 M	100 mM
NaCl	1,0 M	100 mM
MgCl ₂	50 mM	5 mM

- BCIP-Lösung

100 µl in 70% Dimethylformamid

- Beschichtungspuffer
(Carbonatpuffer) 0,2 M Natriumbikarbonat
 0,2 M Natriumkarbonat
 Natriumbikarbonatlösung mit
 Natriumkarbonatlösung titrieren, bis pH 9,5

- Blockierungslösung 1% (w/v) Milchpulver
 in PBS

- Carbazollösung
 Stammlösung Dimethylformamid
 8 mM 3-Amino-9-Ethylcarbazol

- Gebrauchslösung 6% (v/v) Stammlösung
 50% (v/v) Tris/NaCl-Waschpuffer
 0,006% (v/v) Wasserstoffperoxyd
 in Aqua dest.

- Citrat-Puffer für Antikörperreinigung pH 2,7
 Zitronensäure/
 tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,1 M

- Entwicklungslösung 10 ml Substratpuffer
 für ELISA 5,5 mM OPD
 0,0033% H₂O₂ (30%)

- Entwicklungslösung 100 ml AP-Puffer
 für Western-Blot 660 µl NBT
 330 µl BCIP

- Fixierungslösung PBS
 für Kryostat-Gewebeschnitte 6% (w/v) Paraformaldehyd

- Hämatoxylinlösung
 - 3 mM Hämatoxylin
 - 1 mM Natriumjodat
 - 100 mM Kaliumaluminiumsulfat
 - 300 mM Chloralhydrat
 - 5 mM Zitronensäure, kleinkrist.
 - in Aqua dest.

 - IPTG-Lösung:
 - 10 mM in H₂O_{deion.}
 - Steril filtriert, bei -20°C gelagert.

 - Lambda-Phagen-Verdünnungs-
puffer 10x:
 - NaCl 1,0 M
 - MgSO₄·7H₂O 0,1 M
 - Tris-HCl (pH 7,5) 0,35 M

 - Lysepuffer RIPA
 - 500 ml
 - 1x PBS 490 ml
 - 1% NP-40 5 ml
 - 0,5% Na-Deoxycholate 2,5 g
 - 0,1% SDS 5 ml (10%)

 - Lysepuffer NP-40
 - 1% NP-40 in PBS

 - 20% Maltose-Lösung:
 - 20 g Maltose in 100 ml H₂O_{deion.}
 - Die Lösung wird filtersterilisiert und bei 4°C gelagert.

 - MgSO₄-Lösung (1 M):
 - 24,65 g MgSO₄·7H₂O
 - 100 ml deionisiertes Wasser
 - MgCl₂-Lösung (1 M):
 - 20,3 g von MgCl₂·6H₂O
 - 100 ml deionisiertes Wasser
- MgSO₄- und MgCl₂-Lösungen werden 20 min. bei 121°C autoklaviert.

- | | | |
|---|------------|--------------------------------|
| - | NBT-Lösung | 200 µl in 70% Dimethylformamid |
|---|------------|--------------------------------|
- | | | |
|---|----------------------------------|---|
| - | Substratpuffer
(Citratpuffer) | 0,1 M Zitronensäure
0,1 M Tris
Tris mit Zitronensäure titrieren, bis pH 5,0 |
|---|----------------------------------|---|
- | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------------|--|--------|--|-----|----|--|-------------------|-------|-------|--|------|-------|--------|
| - | TBS-Puffer | <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;"></td> <td style="width: 35%;"></td> <td style="width: 35%; text-align: center;">10x</td> <td style="width: 15%; text-align: center;">1x</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Tris-HCl (pH 8,0)</td> <td style="text-align: center;">0,1 M</td> <td style="text-align: center;">10 mM</td> </tr> <tr> <td></td> <td>NaCl</td> <td style="text-align: center;">1,5 M</td> <td style="text-align: center;">150 mM</td> </tr> </table> | | | 10x | 1x | | Tris-HCl (pH 8,0) | 0,1 M | 10 mM | | NaCl | 1,5 M | 150 mM |
| | | 10x | 1x | | | | | | | | | | | |
| | Tris-HCl (pH 8,0) | 0,1 M | 10 mM | | | | | | | | | | | |
| | NaCl | 1,5 M | 150 mM | | | | | | | | | | | |
- | | | |
|---|-------------|--------------------------|
| - | TBST-Lösung | 1x TBS + 0,05% Tween®-20 |
|---|-------------|--------------------------|
- | | | |
|---|-------------------------------|--|
| - | Tris/NaCl-Waschpuffer, pH 7,4 | 0,5 M Tris
1,5 M NaCl
in Aqua dest.; pH 7,4;
mit 2 M HCl einstellen |
| | Stammlösung | |
| | Gebrauchslösung | Stammlösung
0,9% (w/v) NaCl |
- | | | |
|---|--|--|
| - | Verdünnungslösung für Antikörper (Immunhistologie) | |
| | Stammlösung | Tris/NaCl-Waschpuffer
5% (w/v) BSA |
| | Gebrauchslösung | Tris/NaCl-Waschpuffer
0,05% (w/v) BSA |

Expressionsvektor:

- λTriplEx (Clontech)
Phagen-Expressionsvektor mit einer Kapazität von bis zu 20 kb. Die Klonierungsstelle liegt innerhalb des lacZ-Gens. Der Vektor eignet sich für die Erstellung von cDNA-Expressionsbanken. Mittels der Blau-Weiß-Selektion auf einem IPTG-haltigen Medium lassen sich die phagenenthaltende Bakterien isolieren. IPTG ist Induktor der β-Galaktosidaseproduktion. X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-Galaktosid), wird von der β-Galaktosidase hydrolysiert und es entsteht unter Sauerstoffeinfluss ein wasserunlöslicher Indigofarbstoff, der in den Bakterien ausfällt und die Kolonien blau färbt.

- E.coli XL1-Blue (Wood et al., 1985)
Genotyp: endA1, gyrA96, hsdR17, lac⁻, recA1, relA1, supE44, thi-1, [F' lacI^qZ ΔM15, proAB, Tn10],
Tn 10 verleiht Resistenz gegenüber Tetracyclin.
Dieser Stamm der Firma CLONTECH dient als Empfängerstamm für die Phagen und gewährleistet reguläre Expression der klonierten Gene. Dieser Stamm wird für die Screeningvorgänge eingesetzt. (Clontech).

- E.coli BM25.8 (Palazzolo et al., 1990)
Genotyp: supE44, thi Δ(lac-proAB) [F' traD36, proAB⁺, lacI^qZ ΔM15] λimm434 (kan^R)P1 (cam^R) hsdR (r_{k12}-m_{k12}-)
BM25.8 ist lysogen für Phagen λ und P1 und wird zum Herausschneiden von Plasmiden benutzt. Der Stamm enthält einen lysogenen Lambda-Phagen (selektierbar durch Kanamycin-Resistenz, vermittelt Resistenz gegen Lambda-Phagen) und einen lysogenen P1-Phagen (markiert durch Chloramphenicol-Resistenz, exprimiert das Cre-Gen). (Clontech).

2.1.4 Antibiotika

- Kanamycin, Art.-Nr.: K-0879 (Sigma, Deisenhofen)
- Tetracyclin, Art.-Nr.: T-7660 (Sigma, Deisenhofen)
- Chloramphenicol, Art.-Nr.: C-0378 (Sigma, Deisenhofen)
- Carbenicillin, Art.-Nr.: C-3416 (Sigma, Deisenhofen)
- Penicillin-Streptomycin, Art.-Nr.: 15140130 (Invitrogen, Karlsruhe)

- Kanamycin-Lösung: 25 mg/ml in H₂O_{deion.}
Endkonzentration im Medium: 50 µg/ml

- Tetracyclin-Lösung: 15 mg/ml in H₂O_{deion.}
Endkonzentration im Medium: 15 µg/ml

- Chloramphenicol-Lösung: 34 mg/ml in 100% Ethanol
Endkonzentration im Medium: 34 µg/ml
- Carbenicillin: 50 mg/ml in H₂O_{deion.}
Endkonzentration im Medium: 50 µg/ml

Die Stammlösungen werden bei -20°C gelagert. Alle Antibiotika-Lösungen werden dem autoklavierten Medium nach Abkühlung auf 50°C zugegeben.

2.1.5 Medien für die Zellkultur:

- Basismedium RPMI 1640
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
1% (v/v) Glutamin
1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren
1% (v/v) Pyruvat
- Azaguanin-Medium Basismedium
2% (v/v) 50x Azaguanin
5% (v/v) FCS
- HAT-Medium Basismedium
20% (v/v) FCS
2% (v/v) 50x HAT-Medium
- HT-Medium Basismedium
10% (v/v) FCS
2% (v/v) 50x HT-Medium
- Normalmedium Basismedium
10% (v/v) FCS
- Einfriermedium 90% (v/v) FCS
10% (v/v) DMSO

2.1.6 Kulturmedien für Bakterien

Alle Kulturmedien werden 20 min. bei 121°C autoklaviert.

- LB-Medium: 20 g LB Broth Base
1 l destilliertes Wasser
- LB/MgSO₄ –Medium: 10 ml 1 M MgSO₄ in 1 l LB-Medium
- LB/MgSO₄ Agarplatten: 10 ml 1M MgSO₄
15 g Agar
1 l LB-Medium
- LB/MgSO₄ Agarose: 10 ml 1M MgSO₄
7,2 g Agarose
1 l LB-Medium
- LB/MgSO₄/Maltose-Medium: 10 ml von 20% Maltose-Lösung
in 1 l LB/MgSO₄-Medium
- LB/Agar-Selektionsmedien:

Alle Antibiotika-Lösungen werden je nach Resistenz der zu züchtenden Stämme dem autoklavierten Medium nach Abkühlung auf 50°C bis zum Erreichen der Endkonzentration zugegeben.

Kanamycin:	Endkonzentration 50 µg/ml
Tetracyclin:	Endkonzentration 15 µg/ml
Chloramphenicol:	Endkonzentration 34 µg/ml
Carbenicillin:	Endkonzentration 50 µg/ml

2.1.7 Antikörper

Maus-anti-Ratte-κ Monoklonaler Antikörper der Zelllinie RG7/7.6.HL (TIB 172, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA); der Antikörper ist gegen die κ-Kette von Immunglobulinen der Ratte gerichtet.

Maus-anti-Ratte- λ	Monoklonaler Antikörper, der gegen die λ -Kette von Immunglobulinen der Ratte gerichtet ist (dieser Antikörper wurde in der Arbeitsgruppe hergestellt).
Maus-anti-Ratte-IgG1	Monoklonaler Antikörper der Zelllinie RG11/39.4 (TIB 170, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA); der Antikörper erkennt den Fc-Teil von Antikörpern der IgG1-Subklasse.
Maus-anti-Ratte-IgG2a	Monoklonaler Antikörper der Zelllinie RG7/1.30 (TIB 173, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA); der Antikörper erkennt den Fc-Teil von Antikörpern der IgG2a-Subklasse.
Maus-anti-Ratte-IgG2b	Monoklonaler Antikörper der Zelllinie RG7/11.1 (TIB 174, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA); der Antikörper erkennt den Fc-Teil von Antikörpern der IgG2b-Subklasse.
Maus-anti-Ratte-IgG2c	Monoklonaler Antikörper, der den Fc-Teil von Antikörpern der IgG2c-Subklasse erkennt (dieser Antikörper wurde in der Arbeitsgruppe hergestellt).
Maus-anti-Ratte-IgG, (H+L)	Polyklonaler Maus-Antikörper: Der Antikörper ist gegen die schwere und die leichte Kette von Ratten-IgG gerichtet. Der Antikörper ist mit Peroxidase markiert (Art.-Nr.: 212-035-082) oder unmarkiert (Art.-Nr.: 212-005-168) (Dianova, Hamburg).
Ziege-anti-Ratte-IgG+IgM, (H+L)	Polyklonaler Ziege-Antikörper: Der Antikörper ist gegen die schwere und die leichte Kette von Ratten-IgG und IgM gerichtet. Der Antikörper ist mit Peroxidase (Art.-Nr.: 112-035-068) oder mit alkalischer Phosphatase (Art.-Nr.: 112-055-068) markiert (Dianova, Hamburg).

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere und Organe

Ratten: Die Immunsierungen für die Generierung von monoklonalen Antikörpern erfolgten in Ratten des Stammes Lou/c. Die Immunsierungen waren durch die Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 211-2531.6-4/99 genehmigt.

Mäuse: Für Organentnahmen wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 aus den Beständen der Tierhaltung der GSF verwendet.

Zebrabärblinge: Adulte Fische sowie Embryonen und Larven von Zebrabärblingen wurden uns durch Dr. Ela Knapik und Dr. Laure Bally-Cuiff (GSF – Institut für Entwicklungsgenetik) zur Verfügung gestellt.

Organe: Die Gehirne von Säugetieren stammten aus Altbeständen des Instituts für Immunologie (Prof. Gertrud Hoffmann-Fezer) oder wurden uns freundlicherweise durch Prof. Schmahl (Institut für Tierpathologie der Universität München, Allgemeine Pathologie und Neuropathologie, LMU, München) zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Immunisierung der Ratten

Prinzip: Bei der Herstellung von Antikörpern wird die natürliche Abwehrreaktion des Körpers gegenüber immunogenen Fremdmolekülen ausreichender Größe (Antigenen) ausgenutzt. Korpuskuläre Antigene, wie ganze Bakterien oder Zellen, aber auch Zellwandfraktionen erzielen in der Regel auch ohne Adjuvansverwendung die gewünschte Wirkung. Dagegen sind Adjuvantien meist nötig, wenn mit nativen oder löslichen Antigenen (Proteine, Peptide, Polysaccharide) immunisiert wird, ebenso wenn das Antigen nur in sehr begrenzter Menge vorliegt.

Unterschiede im Aufbau von bakterieller oder viraler DNA (sogenannte CpG-Motive) im Vergleich zur Wirbeltier-DNA ermöglichen es dem Immunsystem, diese potenziellen Krankheitserreger aufgrund ihrer DNA-Struktur zu erkennen. CpG-Motive sind nichtmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen. Synthetische Oligonukleotide (ODN), die solche CpG-Motive enthalten, imitieren die Anwesenheit von mikrobieller DNA und induzieren ein charakteristisches Aktivierungsmuster von Immunzellen (Krieg et al., 1995). ODN 2006, stabilisiert durch Phosphorothioate, sind in der Ratte aktiv und können Mycobacterium Tuberculosis als Adjuvans ersetzen (Prof. Klaus Pfeffer, persönliche Mitteilung).

2.2.2.1 Immunisierung mit Gehirnen des Zebrabärblings

Nach dem Töten der Zebrabärblinge in einem Betäubungsbad (1% MS222) wurden die Gehirne entnommen und durch ein feinmaschiges Sieb in 4 ml PBS passiert. Gehirne von 20 Zebrabärblingen ergaben eine ausreichende Menge an Antigen. Danach erfolgte eine

Homogenisierung mittels Ultraschall. 1 ml Homogenisat wurde zur Grundimmunisierung verwendet, der Rest wurde bis zum Zeitpunkt der Auffrischimmunisierung bei -20°C gelagert. Zur Grundimmunisierung wurden die Ratten mit 500 μl Totallysat ohne Adjuvans subkutan und 500 μl Totallysat intraperitoneal gespritzt. Nach einem Mindestabstand von sechs Wochen erfolgte eine Auffrischimmunisierung. Wie bei der Grundimmunisierung wurden 500 μl subkutan und 500 μl intraperitoneal gegeben.

2.2.2.2 Immunisierung mit Parkinprotein

Für die Immunisierung der Ratten zur Herstellung von Antikörper gegen Parkin wurde als Antigen ein Fusionsprotein, das aus Parkin und 6 Histidinen, die sich am N-Terminus des Proteins befanden, verwendet. Das Protein lag in 8 M Harnstoff vor, die Konzentration betrug etwa 2,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Zur Grundimmunisierung erhielten die Ratten 40 μg Parkin (ein lösliches Molekül) mit inkompletem Freundschens Adjuvans (500 μl) und 30 μg CpG 2006. Das Gemisch wurde mit PBS auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Kurz vor Injektion wurde das Gemisch gut geschüttelt, damit eine einfache Wasser-in-Öl-Emulsion entstand. Davon wurden 500 μl subkutan und 500 μl intraperitoneal injiziert. Nach einem Mindestabstand von sechs Wochen erfolgte eine Auffrischimmunisierung. Die Ratten erhielten 40 μg Parkin mit 30 μg CpG 2006 in 1 ml PBS. Davon wurden wieder 500 μl subkutan und 500 μl intraperitoneal gespritzt.

Die Tötung der Tiere und die Milzentnahme erfolgten 4 Tage nach der Auffrischimmunisierung.

2.2.3 Zellkultur

Unter geeigneten Bedingungen lassen sich Zellen, welche zur Zellteilung befähigt sind, in Kultur exponentiell vermehren und somit für weitere Studien verwenden.

2.2.3.1 Myelomzelllinie

Zur Verwendung kam die Maus-Myelom-Zelllinie P3X63-Ag8.653. Diese Zellen haben einen Enzymdefekt. Sie können das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) nicht synthetisieren, das für die Wiederverwertung der Purinbasen im Nukleotidstoffwechsel verantwortlich ist. Die Zelllinie wurde in Medium kultiviert, das 8-Azaganin, ein toxisches Guanin-Analog, enthielt.

Außerdem haben die Myelomzellen eine gute Fusionsfrequenz und keine eigene Ig-Kettensynthese. Die Myelomzellen wurden eine Woche vor der Fusion auf Normalmedium umgestellt. Dann erfolgte die Fusion mit den Ratten-Milzzellen.

2.2.3.2 Hybridomzelllinien

Die Hybridome wurden zunächst in HAT-Medium (20% FCS) kultiviert. Nach 10 Tagen wurde das HAT-Medium gegen HT-Medium (20% FCS) ausgetauscht. Dieses wurde schrittweise durch Normalmedium mit absteigender Konzentration an FCS ersetzt.

2.2.3.3 Massenproduktion von Antikörpern

Die Gewinnung erfolgte im Normalmedium (5% FCS). Die Zellen wurden zuerst von 96-Loch-Platten auf 24-Loch-Platten überführt; dann schrittweise in immer größeren Kulturflaschen hochgezüchtet und in großen Kulturflaschen expandiert. Das Medium enthielt Phenolrot als Indikator für den pH-Wert. Deswegen schlug die Farbe der Flüssigkeit von Rot (alkalisch) nach Gelb (sauer) um, wenn das Medium verstoffwechselt war. Die Zellkulturüberstände, die die monoklonalen Antikörper enthielten, wurden durch Zentrifugation gewonnen und mit Natrium-Azid als Bakteriostatikum versetzt.

2.2.3.4 Astrozytenzelllinie

Die Astrozytenzelllinie U373 stellt eine adhärente Zelllinie dar. Die Zellen haften fest an der Unterlage der Kulturgefäße. Die Kultivierung erfolgte im Normalmedium. Die Gewinnung der Zellen erfolgte durch Abschaben vom Flaschenboden.

2.2.4 Hybridom-Technik

Prinzip: Die B-Zellen aus der Milz einer vorher immunisierten Ratte werden mit einer Myelomzelllinie unter Verwendung von Polyethylenglycol fusioniert und auf 96-Loch-Gewebekulturplatten mit HAT-Medium verteilt (Köhler und Milstein, 1975).

Um die Hybridome leicht selektieren zu können, wurde eine Myelomzelllinie verwendet, der das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) fehlt und daher Purinbasen nicht wiederverwerten kann. B-Zellen aus der Milz dagegen können dies (*salvage pathway*). Nach erfolgter Fusion wurde die Primärkultur mit einem Medium behandelt, das den Folsäure-Antagonisten Aminopterin enthielt. Aminopterin blockiert die *De-novo*-Purin- und Pyrimidinsynthese. Damit werden beide Stoffwechselwege der Purinsynthese in den Myelomzellen blockiert und sie sterben ab. Da in den Hybridomzellen der Enzymdefekt durch HGPRT aus den B-Zellen kompensiert wird, können Hybridomzellen mit dem HAT-Medium, welches neben Aminopterin Hypoxanthin und Thymidin enthält (HAT-Medium), den Purinstoffwechsel aufrecht erhalten und überleben.

2.2.4.1 Fusion

Die Ratte wurde mit Hilfe von CO₂ getötet. Die folgenden Arbeitsschritte wurden alle unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurden ein Stahlhandsieb und eine Petrischale mit 10 ml Basismedium benötigt. Die Milz wurde entnommen und in zwei Stücke geteilt. Das Gewebe wurde auf das Sieb gelegt und mit Hilfe eines Stempels aus einer Plastikspritze in die Petrischale mit Basismedium gepresst. Nach Entfernen von gröberen Gewebestücken wurden die Zellen auf 100x10⁶ pro ml eingestellt. Zu den 50x10⁶ pro ml Myelomzellen wurden die Milzzellen zugegeben und auf 50 ml mit Basismedium aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 600xg 7 min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen. Anschließend wurde 1 ml Polyethylenglykol (PEG) zugegeben. Das Zellsediment wurde vorsichtig resuspendiert. Dann wurde Basismedium unter sanftem Schwenken wie folgt zugegeben:

in der ersten Minute alle 20 sec. 100 μ l,
in der zweiten Minute alle 15 sec. 100 μ l,
in der dritten Minute alle 10 sec. 100 μ l,

Dann wurde das Zentrifugenröhrchen mit HAT-Medium auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. 25 ml davon wurden mit HAT-Medium auf 125 ml verdünnt und damit sechs 96-Loch-Gewebekulturplatten mit jeweils 200 μ l pro Loch beschickt. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Die verbliebenen 25 ml Zellsuspension wurden im Zentrifugenröhrchen im Brutschrank bis zum nächsten Tag inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (200xg, 5 min.), das Zellsediment in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen können so in flüssigem Stickstoff gelagert werden und bei Bedarf wieder in Kultur genommen werden.

2.2.4.2 Selektion der Klone für das Primärscreening

Im Primärscreening mittels Immunhistologie wurden nur Klone, die Antikörper einer IgG-Subklasse synthetisierten, getestet. Eine Woche nach der Fusion wurden die Platten unter dem Mikroskop betrachtet. Kavitäten mit einem Klon wurden markiert. Danach wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Das vorhandene Medium wurde vollständig abgesaugt und durch jeweils 200 μ l pro Loch frisches HAT-Medium ersetzt.

Da IgM-Antikörper häufig unspezifisch binden und schwer zu reinigen sind, wurden für das Primärscreening nur die Antikörper der IgG-Subklassen (IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG2c) vorgesehen. Dazu wurden die Überstände mit Hilfe eines ELISA getestet. Die primären Überstände wurden auf Produktion von Antikörper der IgG- oder IgM-Klasse getestet.

2.2.4.3 Primärscreening der Fusion

Die zuvor ausgewählten Überstände (Klone, die Antikörper der IgG-Klasse produzierten) wurden in der Immunhistochemie getestet. Es wurde nach Antikörpern gesucht, die auf Gewebe des Zebrafischgehirns banden. Antikörper, die in der Immunhistochemie positiv waren (braune Färbung des Carbazols im histologischen Schnitt), wurden weiter charakterisiert, und die Hybridomzellen wurden eingefroren. Zur weiteren Charakterisierung der Antikörper wurde der IgG-Subtyp im ELISA bestimmt.

2.2.4.4 Reklonierung

Ziel: Stabilisieren der Antikörperproduktion von Hybridomen.

Da die Hybridomzellen keinen stabilen Chromosomensatz besitzen, können einzelne Chromosomen im Laufe der Teilungen aus der Zelle ausgestoßen werden. Falls sich das Gen, das für die Produktion des spezifischen Antikörpers zuständig ist, auf dem ausgestoßenen Chromosom befindet, erlischt die Antikörperproduktion. Für ZEGER-Antikörper galt: es wurde so lange rekloniert, bis jeder Subklon im subklassenspezifischen ELISA-Test die gleiche Subklasse hatte und 4 Parallelklone identische Bilder in der Histologie aufwiesen. Für Antikörper, die gegen das Parkinprotein gerichtet waren, galt: es wurde so lange rekloniert, bis jeder Subklon auf dem Antigen in einem ELISA-Test positiv ist. Für die Reklonierung wurden die Zellen auf 1 Zelle/200 μ l mit HAT-Medium eingestellt. Eine 96-Loch-Platte wurde mit 200 μ l pro Loch befüllt. Aus allen Reklonierungsschritten wurden zur Sicherung vier Hybridome aus verschiedenen Näpfen eingefroren.

2.2.4.5 Auftauen der Zellen

Ein Kryoröhrchen wurde aus dem Stickstoffbehälter entnommen und in einem Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schwenken aufgewärmt. Dort wurde es solange geschwenkt, bis sich nur noch ein etwa linsengroßer Eiskristall in der Suspension befand. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, auf ein Volumen von 12 ml mit HAT-Medium langsam aufgefüllt und anschließend bei 200xg für 7 min. zentrifugiert. Dann wurde der Überstand vollständig entfernt und das Zellsediment mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig in HAT-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden auf eine 24-Loch-Gewebekulturplatte transferiert und von dort aus zur Gewinnung von Kulturüberstand expandiert unter Verringerung der Serumkonzentration durch Zugabe von Normalmedium. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

2.2.4.6 Kryokonservierung der Hybridome

Ziel: Um Verluste von Klonen zu vermeiden und die Antikörperproduktion zu sichern, werden die Zelllinien eingefroren. Das Einfrieren von Zellen findet in verschiedenen Stadien statt: Während der Etablierungsphase zur Sicherung, damit im Falle des Verlustes eines antikörperproduzierenden Klons auf die Reserve zurückgegriffen werden kann. Von den etablierten Klonen wird eine Masterbank angelegt. Zellen lassen sich im flüssigen Stickstoff (-196°C) praktisch unbeschränkt halten. Um Schäden zu vermeiden, friert man die Zellen in Gegenwart eines Frostschutzmittels (Dimethylsulfoxyd, DMSO 10%, in fötalem Kälberserum) ein.

Durchführung: Die einzufrierenden Zellen befanden sich in einer exponentiellen Wachstumsphase. Vor dem Einfriervorgang wurden die Zellen auf Vitalität im Phasenkontrastmikroskop überprüft. Die Zellen wurden mit einer sterilen Pasteurpipette aus dem Napf einer 24-Loch-Platte genommen und in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 200xg und Raumtemperatur für 10 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Dann wurden die Zellen mit einer sterilen Pasteurpipette in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrieröhrchen überführt. Die Einfrieröhrchen wurden langsam auf -80°C heruntergekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte im flüssigen Stickstoff bei -196°C.

2.2.5 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Prinzip: Es wird mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion an einer Festphase der qualitative oder quantitative Nachweis einer Substanz geführt. Das Ausmaß der immunologischen Reaktion wird durch den Substratumsatz eines Markerenzym angezeigt (Engvall und Perlmann, 1971, 1972). Es kommt zur Bildung von gefärbten Produkten, die durch photometrische Messung bestimmt werden.

Durchführung: Am Vortag der Durchführung eines ELISAs wurde eine 96-Loch-ELISA-Mikrotiterplatte mit einem Protein (z.B. Maus-anti-Ratte-kappa-Antikörper) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dafür wurde das Protein auf 5 µg/ml in Carbonatpuffer (pH 9,5, 0,1 M) eingestellt und die ELISA-Platte mit 100 µl pro Loch beschichtet. Die Nachbeschichtung erfolgte am folgenden Tag. Es wurde einmal mit PBS gewaschen und mit 1% Milchpulver in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die Nachbeschichtung dient zur Absättigung von unbeschichteten Flächen in den Näpfen, um spätere, unerwünschte Adsorptionen aus dem Überstand zu vermeiden. Die Milchpulverlösung wurde abgeklopft. Ein Antikörper (z.B. Ratten-Antikörper) wurde aufgetragen. Alle Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler statt. Die Platte wurde 30 min. inkubiert. Danach wurde einmal mit PBS gewaschen und ein Nachweisantikörper in einer getesteten Verdünnung (z.B. 1:1000) in Verdünnungslösung aufgetragen. Dieser Antikörper war ein biotinylierter mono- oder polyklonaler anti-Ratten-Antikörper. Die Platte wurde 30 min. inkubiert und einmal mit PBS gewaschen. Dann wurde Avidin-Peroxidase, in einer Verdünnung von 1:2000, aufgetragen. Die Platte wurde 30 min. inkubiert und danach fünfmal mit PBS gewaschen. In der Zwischenzeit wurde eine Reaktionslösung für die Peroxidase vorbereitet. Es wurden 10 mg Orthophenylendiamin in 10 ml Substratpuffer gelöst und 3,3 µl H₂O₂ als Peroxidasesubstrat zugegeben. Die Platte wurde nach dem letzten Waschvorgang trocken geklopft und mit 100 µl OPD-Lösung/Loch befüllt. O-Phenylendiamin (OPD) wird zu einem farbigen Oxidationsprodukt umgesetzt. Nach 5-10 Minuten konnte die Extinktion im ELISA-Photometer bei 405 nm gemessen werden.

2.2.5.1 Titrierung von Antikörpern

Die Mikrotiterplatte wurde am Vortag mit anti-κ- und anti-λ-Antikörper (3 µg/ml) beschichtet. Der zu testende Antikörper wurde in einer linearen Verdünnungsreihe (1:10) aufgetragen. Als Detektionssystem wurden polyklonale biotinylierte Maus-anti-Ratte-Antikörper verwendet.

2.2.5.2 Austestung von Antikörpern nach Biotinylierung

Die Mikrotiterplatte wurde am Vortag mit anti-κ- und anti-λ-Antikörper (3 µg/ml) beschichtet. Z.B. wurde für die Austestung von anti-Ratte-IgG1-biotinyliert eine Reihe der Platte mit einem mAk der Subklasse IgG1 beschickt, eine weitere Reihe mit einem mAk einer irrelevanten Subklasse. Der zu testende Antikörper wurde in einer linearen Verdünnungsreihe (ab 1:100) aufgetragen und mit Avidin-Peroxidase detektiert. In weiteren Versuchen wurde die Verdünnung von anti-Ratte-IgG1-biotinyliert so gewählt, dass keine unspezifische Bindung nachweisbar war und ein deutliches, spezifisches Signal erkennbar war.

2.2.5.3 Austestung der primären Überstände auf IgG und IgM

Die Mikrotiterplatte wurde am Vortag mit anti-κ- und anti-λ-Antikörper (3 µg/ml) beschichtet. Die zu testende Kulturüberstände wurden auf zwei Platten aufgetragen. Für eine Platte wurde als sekundärer Antikörper ein monoklonaler biotinylierter Maus-anti-Ratte-IgM-Antikörper verwendet, für die andere Platte ein Gemisch aus monoklonalen biotinylierten Maus-anti-Ratte-Antikörpern gegen IgG-Subklassen (Maus-anti-Ratte-IgG-Mix).

Nur Antikörper, die eine IgG-Subklasse zeigen, wurden in der Histologie getestet. Wenn diese Antikörper in der Histologie positiv waren, wurden die entsprechenden Hybridome eingefroren und aus den Kulturüberständen die spezifische IgG-Subklasse bestimmt.

2.2.5.4 Subklassentest

Die Überstände von den Zelllinien, die in der Histologie positiv waren, wurden auf IgG-Subklassen getestet. Die Mikrotiterplatte wurde am Vortag mit polyklonalen Maus-anti-Ratte-IgG-Antikörpern (3 µg/ml) beschichtet. 100 µl jedes Überstands wurden in einer Reihe 8 mal aufgetragen. Als Nachweisantikörper wurden jeweils in einen Napf anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG2c, anti-IgM, anti-kappa, anti-lambda oder anti-IgG gegeben. Jeder Klassen-/Subklassendetektionsantikörper lag als biotinylierter monoklonaler anti-Ratten-Antikörper vor und wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Gebundene biotinylierte Antikörper wurden mit Avidin-Peroxidase visualisiert.

2.2.5.5 Überprüfung der Biotinylierungseffizienz

Die Mikrotiterplatte wurde am Vortag mit anti-κ- und anti-λ-Antikörper beschichtet. Es wurde eine lineare Verdünnungsreihe (ab 1:100) aus dem zu testenden biotinyliertem Antikörper hergestellt und mit Avidin-Peroxidase detektiert.

2.2.5.6 Parkin-ELISA

Die Mikrotiterplatte wurde am Vortag mit Parkin-Protein in einer Verdünnung von 10 µg Protein in 1 ml Carbonat-Puffer beschichtet. Es wurden 100 µl Kulturüberstand pro Plattenvertiefung aufgetragen. Da das Parkin-Protein in E.coli hergestellt worden ist, diente als negative Kontrolle im ELISA-Test ein E.coli-Lysat. Als Nachweissystem wurden polyklonale biotinylierte Maus-anti-Ratte-Antikörper und Avidin-Peroxidase verwendet.

2.2.6 Immunhistochemie

2.2.6.1 Einfrieren von Hirngewebe und Zellkulturen

Für das Einfrieren von Hirngewebe wurden möglichst bald nach der Entnahme des Gehirns 5-6mm dicke Blöcke mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten und vorsichtig auf ein Kartonstück (mit einer dazu gehörenden Nummer versehen) gelegt. Eine Kartonecke wurde mit einer Pinzette geknickt. Auf den Gewebeblock wurde Tissue Tec[®] gegeben, bis das Hirngewebe vollständig vom Tissue Tec[®] bedeckt war. Die Gewebestücke wurden mit Hilfe von gekühltem 2-Methylbutan eingefroren. Dazu wurde ein Plastikbecher mit 2-Methylbutan zur Hälfte gefüllt und in einen Styroporbehälter mit flüssigem Stickstoff gestellt. Es musste abgewartet werden, bis der Boden des Becherglases durch einen Niederschlag weißlich erschien. Dann wurden die vom Tissue Tec[®] bedeckten Blöcke an der geknickten Kartonecke mit Hilfe einer Pinzette gefasst und in 2-Methylbutan getaucht. Nachdem das Tissue Tec[®] eine weiße Farbe angenommen hatte, konnten die Blöcke herausgenommen werden. Dann wurden sie in Alufolie gewickelt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Herstellung von

Gefrierschnitten einer Zellkultur (Astrozytenzelllinie) wurden die Zellen mit einem sterilen Schaber von den Wänden der Kulturflasche abgelöst und danach zweimal mit PBS gewaschen. Auf ein dafür vorgesehenen Kartonstück wurde Tissue Tec[®] getropft. Die Zellen wurden in Tissue Tec[®] eingebettet. Danach führte man die gleichen Schritte wie beim Einfrieren des Hirngewebes durch.

2.2.6.2 Herstellung von Kryostatgewebeschnitten

Mit Hilfe eines Kryomikrotoms wurden 5 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und danach fixiert.

2.2.6.3 Fixierung von Kryostatgewebeschnitten

Die Objektträger mit Hirngewebe wurden in Aceton 10 min. fixiert. Die Objektträger mit Fischeschnitten wurden mit 6% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Dazu wurde Paraformaldehyd bei 90-95°C unter Rühren in PBS gelöst. Danach wurde die Lösung bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Schnitte wurden für 10 min. in die Lösung gestellt und danach dreimal je 5 min. mit Tris/NaCl-Waschlösung gespült.

2.2.6.4 Anfärbung von Kryostatgewebeschnitten

Auf die fixierten Gewebeschnitte wurde der primäre Antikörper aufgetragen. Als primäre Antikörper wurden nur unverdünnte Kulturüberstände, die Rattenantikörper enthielten, verwendet. Die Schnitte mussten vollständig vom primären Antikörper bedeckt sein und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden. Danach wurde die Flüssigkeit in ein Becherglas abgekippt und der Objektträger wurde vorsichtig mit Hilfe einer Spritzflasche mit Tris/NaCl-Waschlösung gespült. Dann wurde der Objektträger in ein mit Tris/NaCl-Waschlösung gefülltes Gefäß getaucht und anschließend in eine mit Waschlösung gefüllte Küvette gestellt. Die Waschlösung wurde zweimal jeweils nach 5 min. ausgetauscht.

Danach wurde als sekundärer Antikörper Ziege-anti-Ratte-IgG und -IgM aufgetragen, welcher mit Meerrettich-Peroxidase markiert war. Der sekundäre AK wurde 1:150 mit Tris/BSA verdünnt. Die Gewebeschnitte wurden wieder eine Stunde inkubiert. Danach wurde wieder dreimal 5 min. mit Tris/NaCl-Waschlösung gewaschen. Zum Färben wurden die Objektträger in eine mit Carbazol-Gebrauchslösung gefüllte Küvette gestellt und 25 min. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Als Substrat der Peroxidase wurde H₂O₂ benutzt. Das Reaktionsprodukt bildete mit Carbazol einen unlöslichen Farbkomplex, der die Antikörperbindung auf dem Gewebeschnitt markiert. Die Objektträger wurden nach 25 min. aus der Carbazollösung herausgenommen und in eine Küvette mit Leitungswasser gestellt. Dann wurde das Wasser ausgetauscht. Die Objektträger wurden für 30 sec. in die Hämatoxylinlösung getaucht. Nach dem Färben mit Hämatoxylin wurde so oft mit Leitungswasser gewaschen bis keine blaue Farbe von den Objektträgern mehr abging. Dann folgte die Eindeckung mit Eindeckmittel oder Glyzeringelatine.

2.2.7 Immunpräzipitation

Prinzip: Die Immunpräzipitation von Proteinen erlaubt die Isolierung/Aufreinigung einzelner Proteine oder Proteinkomplexen aus Gesamtzelllysaten über an Partikel gebundene Antikörper.

Hierzu wurde zunächst das Gewebe mittels eines Siebs zerkleinert und anschließend in einen Lysepuffer gegeben. Im Lysepuffer sind Detergenzien enthalten, die die Zellmembranen aufbrechen und damit intrazelluläre Proteine freisetzen. Membranproteine werden ebenfalls in Lösung gebracht, indem Protein-Detergenz-Komplexe entstehen. Detergenzien können geladen (ionisch, z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS)) oder ungeladen (nicht ionisch, z.B. Triton X100) sein. SDS denaturiert Proteine, während nicht ionische Detergenzien Proteine meist in ihrem nativen Zustand belassen. Nach Lyse der Zellen wurden die nicht gelösten Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Es erfolgte die Zugabe des Antikörpers, der an ein Trägermaterial (z.B. Agarose) gebunden war. Gebundene Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Zentrifugation und durch Waschschrte mit salinen Lösungen vom Gesamtlysat getrennt. Die Elution des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte unter geeigneten Bedingungen.

Die Bedingungen für die Immunpräzipitation müssen für jede Antigen-Antikörper-Reaktion neu definiert werden.

2.2.7.1 Herstellung des Antigensolubilisats

In eine Schale wurden 5 ml Lysepuffer (RIPA-Puffer) gegeben. Drei Mäuse wurden mit Hilfe von CO₂ getötet und Gehirne wurden entnommen. Die Gehirne wurden durch ein feinmaschiges Handsieb im Lysepuffer passiert und anschließend 10 min. sonifiziert. Dann wurde das Lysat eine Stunde auf Eis geschüttelt. Die dann noch nicht gelösten Bestandteile wurden hochtourig (20000g) bei 5°C 10 min. lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment wurde verworfen. Die Proben wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.7.2 Immunpräzipitation mit biotinylierten Antikörpern

100 µl Streptavidin-Agarose-Partikel wurden mit PBS gewaschen und mit 50 µg biotinyliertem Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wurden nicht gebundene Antikörper durch Abzentrifugieren und Waschen der Streptavidin-Agarose mit PBS entfernt. Zu dem Sediment wurde Lysat gegeben, das zuvor 1:10 mit PBS verdünnt worden war, um die Konzentration an Detergenzien zu vermindern. Die Mischung aus Antigen im Lysat und Streptavidin-Agarose-gebundenem Antikörper wurde zwei Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert.

Zur Abtrennung von Streptavidin-Agarose mit gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexen vom übrigen Lysat wurden Säule mit Fritten benutzt. Die Agarose verblieb in der Säule, die Flüssigkeit floss durch. Es wurde 5-mal mit jeweils 3 ml PBS gewaschen. Die Gewinnung des Antigens erfolgte unter sauren oder alkalischen Bedingungen. Für die Elution im sauren Bereich wurden 100 µl Citratpuffer (0,1 M, pH 2,7), für die Elution im alkalischen Bereich wurden 100 µl Carbonat-Puffer (0,1 M, pH 9,5) verwendet. Anschließend wurden die Eluate mittels SDS-Elektrophorese und Westernblot getestet.

2.2.7.3 Immunpräzipitation unter Verwendung von Protein G

100 µl Protein G-Agarose wurden mit PBS gewaschen und mit ca. 100 µg Antikörper aus Kulturüberstand bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wurden nicht gebundene Antikörper durch Abzentrifugieren und Waschen der Protein G-Agarose mit PBS entfernt. Zu dem Sediment wurde Lysat gegeben, das mit Protein G vorbehandelt wurde, um murine Immunglobuline und die an Agarose unspezifisch bindenden Proteine zu entfernen. Die Mischung aus Antigen im Lysat und an Protein G-Agarose gebundenem Antikörper wurde zwei Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Zur Abtrennung von Protein G-Agarose mit gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexen vom übrigen Lysat wurden ebenfalls kleine Säulen mit Fritten benutzt. Es wurde zunächst 5-mal mit jeweils 3 ml PBS gewaschen. Die Gewinnung der Antigene erfolgte schrittweise. Zunächst wurden zweimal 100 µl 1% NP40 auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Dann wurden zweimal 100 µl RIPA-Puffer aufgetragen. Auch dieses Eluat wurde in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Als letztes Elutionsmittel wurde Citratpuffer (0,1 M, pH 2,7) zweimal aufgetragen. Unter diesem Puffer war sichergestellt, dass auch das gesamte Antigen eluiert wurde, da unter diesen Bedingungen der Antikörper von Protein G getrennt wird. Alle Eluate wurden aliquotiert, um analytische und präparative Gele durchführen zu können

2.2.8 Markierung von Antikörpern mit Biotin

Prinzip: Biotin (Vitamin H) ist eine gut wasserlösliche Verbindung, die mit einer der höchsten in der Natur bekannten Affinitäten ($k_d = 10^{-15}$ M) nicht-kovalent an Avidin, ein Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß, und an Streptavidin, ein nicht-glykosyliertes Protein aus Streptokokken, bindet (Updyke et al., 1986). Durch eine einfache und schnelle Markierung mit Biotinmolekülen wird der Einsatz von Antikörpern in vielen Tests effizienter. So kommt es zu einem verstärkten Signal im ELISA und zu einer Bindung von Antigen-Antikörperkomplexen an Avidin-Agarose in der Immunpräzipitation.

Durchführung: Der zu biotinylierende Antikörper wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in Natriumcarbonat-Puffer (0,1 M, pH 9,5) gelöst. Das Biotin-Reagenz wurde mit DMF gelöst (5 mg ad 1 ml DMF). Zu 1 ml Antikörperlösung wurden 50 µl gelöstes Biotin gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Dann wurde die Lösung gegen PBS dialysiert. Anschließend erfolgte die Stabilisierung der Antikörper mit einer Lösung aus BSA (Endkonzentration 1%). Natriumazid (Endkonzentration 0,1%) wurde als bakterizide Substanz zugegeben.

2.2.9 Reinigung von Antikörpern (Affinitätschromatographie mit Protein G)

Ziel: Antikörpervorbereitung zur weiteren Modifizierung

Prinzip: Das aus Bakterien stammende Protein G oder Protein A (Bjorck und Kronvall, 1984)

wird an Agarose gekoppelt, welches in Form kleiner Kügelchen in eine Säule gefüllt wird. Protein G oder Protein A bindet spezifisch und mit hoher Affinität an den Fc-Teil von Antikörpermolekülen. Lässt man Kulturüberstand über diese Säule laufen, werden Immunglobuline gebunden. Diese können anschließend mittels eines sauren Puffers eluiert werden. Während Protein A nur einen Teil aller IgG-Isotypen bindet, ist Protein G universeller einsetzbar, da es ein breiteres Bindungsspektrum für Immunglobuline hat (Akerstrom et al., 1985).

Durchführung: Die Kulturüberstände wurden mittels eines Filters steril filtriert, um Partikel größer als 0,22 µm zu entfernen. Die Säule wurde vor Gebrauch mit PBS gespült. Der filtrierte Kulturüberstand wurde mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/min. mittels einer Schlauchpumpe auf die Säule, die mit Protein G „Sephacrose4 Fast Flow“ gefüllt war, aufgetragen. Danach wurde die Säule extensiv mit PBS gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wurden die Antikörper mit Citrat-Puffer (pH 2,7) eluiert und sofort gegen PBS dialysiert.

Die Antikörperfraktion wurde mit einem UV-Monitor detektiert, mit dessen Hilfe die Extinktion bei 280 nm gemessen wird. Die Säule wurde anschließend mit PBS gespült und mit Guanidinhydrochlorid (4 M) regeneriert. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in PBS mit Natriumazid-Zusatz.

2.2.10 Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde mit Hilfe eines UV-Spektrometers vorgenommen. Dafür wurden die Extinktionen bei 280 nm und 235 nm gemessen. Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Methode sind klare Lösungen, da Trübungen in dem verwendeten Wellenlängenbereich zu fehlerbehafteten Extinktionswerten führen können. Die Methode basiert auf der Extinktion der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bei 280 nm.

Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach folgender Formel (Whitaker et al., 1980):

$$\text{Antikörper (mg/ml)} = E_{235} - E_{280} : 2,51 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Prinzip: Mit Hilfe der SDS-PAGE werden die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. SDS ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (1,4 g SDS pro 1 g Protein). Dadurch wird gewährleistet, dass nur die Größe (molare Masse) des Proteins als Trennkriterium wirkt.

Durchführung: Zum Test kamen Gewebelysate oder Eluate, die durch Immunpräzipitation gewonnen wurden. Gele, Lösungen und Kammern wurden über Invitrogen bezogen und nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt.

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet:

Probe	x	µl
NuPAGE [®] LDS Probenpuffer (4x)	5	µl
NuPAGE [®] Reduktionsmittel (10x)	2	µl
Wasser	ad	20 µl

Die Proben wurden 10 min. bei 70°C im Wasserbad erhitzt und anschließend 10 min. auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden in einem NuPAGE[®] Bis-Tris Gel mit 10 Taschen aufgetrennt. In eine Tasche wurde der Molekulargewichtsmarker (7 µl) aufgetragen, die 9 anderen Taschen wurden mit Proben gefüllt (20 µl). Als Laufpuffer wurde NuPage[®]-MOPS-LDS-Puffer verwendet. An die Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 200 V angelegt. Die Laufzeit betrug durchschnittlich 50 min.

Die aufgetrennten Proteine konnten anschließend durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht oder in einem Western-Blot-Experiment weiter verarbeitet werden.

2.2.12 Westernblot

Prinzip: Beim Westernblot werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran (Nitrocellulosemembran) transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Nach dem elektrophoretischen Transfer von Protein auf Nitrocellulose müssen zunächst die freien Bindungsstellen der Membran blockiert werden. Da Antikörper Proteine sind, würden sie sich sonst an jeder freien Bindungsstelle der Membran anheften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen. Um die spezifische Antikörper-Antigen-Bindung nachzuweisen, muss der Antikörper mit einem Enzym gekoppelt sein, das eine Farbreaktion auslösen kann.

Durchführung:

2.2.12.1 Analytische Darstellung von Proteinen

Nach Auftrennung der Proteinproben im SDS-PAGE wurde das Gel aus der Kammer entnommen und in eine Transferkassette überführt. Der Proteintransfer erfolgte im vertikalen "SemiDry"-Verfahren auf Nitrocellulosemembranen für 60 min. bei 30 V und einer

Anfangsstromstärke von 170 mA (Endstromstärke 110 mA) im NuPAGE-Transfer-Buffer. Nach Ablauf des Transfers wurde die Membran 30 min. in 1% Milchpulver/PBS gelegt zur Absättigung der noch freien Bindungsstellen und anschließend mit einem Skalpell in vertikale Streifen geschnitten. Die Inkubation mit den primären Antikörpern (Kulturüberstand, unverdünnt) erfolgte 60 min. bei Raumtemperatur. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 1% Milchpulver/PBS, versetzt mit 0,3% Tween 20[®], entfernt. Als Sekundärantikörper wurde ein mit Alkalischer Phosphatase konjugierter Ziege-Anti-Ratte-Antikörper (IgG+IgM, H+L) verwendet. Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in 1% Milchpulver/PBS eingesetzt. Es folgte eine einstündige Inkubation. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 1% Milchpulver/PBS, versetzt mit 0,3% Tween 20[®], entfernt. Der letzte Waschschrift vor Substratzugabe erfolgte in AP-Puffer. Die Entwicklung der Membran wurde mit einem Substrat für die Alkalische Phosphatase (NBT/BCIP) durchgeführt. Nach ca. 5 bis 20 min. erschienen auf dem Blot blauviolett gefärbte Banden, die die durch primäre und sekundäre Antikörper detektierten Proteine repräsentieren. Nachdem die Banden gut zu sehen waren, wurde die Entwicklungslösung abgegossen. Der Blot wurde in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

2.2.12.2 Präparative Darstellung von Proteinen

Die präparative Darstellung von Proteinen führte Herr Erik Blazek (GSF, Institut für Molekulare Immunologie, Abteilung Genexpression) durch.

2.2.13 Silberfärbung

Für die Silberfärbung der NuPAGE-Gele wurde der „SilverQuest Silver Staining“-Kit von Invitrogen[®] verwendet.

Die Fixierung der Gele erfolgte 20 min. in einem Gemisch aus 40% Ethanol, 10% Essigsäure und 50% Wasser (aqua bidest.). Danach wurde mit 30% Ethanol gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten nach Vorschrift der Herstellers mittels einer Sensibilisierungslösung, einer Färbelösung und einer Entwicklungslösung.

2.2.14 Genexpressionsbank

Prinzip:

Aus Gewebe oder Zellkulturzellen wird in einem ersten Schritt die RNA gewonnen und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wird in einen Phagen eingebracht, der Bakterien, meist E.coli, infizieren kann. Die Bakterien produzieren das durch die cDNA kodierte Protein.

Die Genexpressionsbank aus 3 Tage alten Zebrafischlarven wurde für unsere Arbeitsgruppe von der Firma CLONTECH[®] hergestellt.

2.2.14.1 Vorbereitung von Medien und Platten für bakterielle Kulturen

Für die Zubereitung von LB-Medium wurden 20 g LB Broth Base in 1 l destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde als Grundlage für das LB/MgSO₄-Medium und das LB/MgSO₄/Maltose-Medium gebraucht. Nach dem Zusatz von MgSO₄ wurde die Lösung autoklaviert. Maltose wurde zu dem sterilisierten LB/MgSO₄-Medium erst nach dem Abkühlen auf 50°C zugegeben.

Für die Vorbereitung von Agarplatten wurden 20 g LB-Pulver und 15 g Agar (für die Zubereitung von LB/MgSO₄-Agarplatten auch 10 ml 1 M MgSO₄) in 1 l destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Zu der auf 50°C abgekühlten Lösung wurden Antibiotika bis zum Erreichen der jeweiligen Konzentrationen zugesetzt. Die Platten wurden unter der Sicherheitswerkbank gegossen und abgedeckt. Nachdem der Agar fest geworden war, wurden die Platten in der Sterilbank geöffnet, und es wurde gewartet, bis das kondensierte Wasser auf den Deckeln verdampft war. Die Platten wurden in Parafilm[®] gewickelt und im Kühlschrank mit dem Deckel nach unten aufbewahrt (bei 4°C).

Für die Zubereitung von LB/MgSO₄-Agarose wurden zu 1 l LB-Medium 10 ml 1 M MgSO₄ und 7,2 g Agarose zugesetzt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung wurde die Lösung in der Mikrowelle aufgewärmt.

2.2.14.2 Bakterienkulturen

Die E. coli-Subtypen XL1-Blue und BM25.8 lagen als Vorrat in LB-Medium mit 25% Glycerol. So konnten sie ein Jahr lang bei -70°C gelagert werden.

Für *die Primärplatten* wurde eine kleine Portion (≈5 µl) aus dem gefrorenen Vorrat entnommen und auf LB-Agar-Platten mit Antibiotikum und ohne MgSO₄ ausplattiert.

Für XL1-Blue wurden LB/tet-Platten benutzt, für BM25.8 werden LB/kan/cam-Platten benutzt. Die Platten wurden über Nacht bebrütet:

XL1-Blue bei 37°C

BM25.8 bei 31°C

Die Platten wurden in Parafilm[®] eingewickelt und konnten im Kühlschrank bei 4°C bis zu 2 Wochen gelagert werden.

Für *die Arbeitsplatten* wurde eine isolierte Kolonie von einer Primärplatte genommen und auf eine LB/MgSO₄-Platte mit Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bebrütet:

XL1-Blue bei 37°C

BM25.8 bei 31°C

Die Platten wurden in Parafilm[®] eingewickelt und konnten ebenfalls im Kühlschrank bei 4°C bis zu 2 Wochen gelagert werden. Diese Platten dienten als Quelle für frische Kolonien für die Beimpfung der löslichen Kulturen und für die Vorbereitung der nächsten Arbeitsplatten.

2.2.14.3 Anlegen der primären Screeningsplatten

Von einer Arbeitsplatte mit XL1-Blue-Kolonien wurde eine isolierte Kolonie genommen und zum Beimpfen von 15 ml LB/MgSO₄/Maltose-Medium in einem 20 ml-Gefäß benutzt. Das Medium wurde bei 37°C unter Schütteln (140 rpm) über Nacht inkubiert. Dann wurde die Kultur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in 7,5 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert.

Von CLONTECH® wurden 5 ml (10^{10} Phagen/ml) Genbank-Phagen bezogen. Die Genbank wurde mit 1x Lambda-Verdünnungspuffer 1:10000 verdünnt.

Tabelle 1: Komponenten und ihre Mengen für die Herstellung von Screeningsplatten.

Komponenten	Für eine 100-mm-Platte	Für eine 150-mm-Platte
Bakterienkultur	200 µl	500 µl
Phagen (verdünnt)	5 µl	5 µl
Geschmolzene LB/MgSO ₄ Agarose	4 ml	8 ml

Bakterien und Phagen wurden in einem Eppendorfgemisch und bei 37°C 15 min. inkubiert. Geschmolzene LB/MgSO₄-Agarose wurde in einem Wasserbad bei 58°C warm gehalten (höhere Temperaturen töten Bakterien ab). Die Platten mit LB/MgSO₄ wurden auf 37°C aufgewärmt (die Oberfläche des Agars muss trocken sein). Die Phagen-Bakterien-Mischung wurde zu der LB/MgSO₄-Agarose zugegeben, mit Hilfe eines MS2-Minischüttlers IKA® gemischt und schnell auf die entsprechend gekennzeichnete Platte gegossen und gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Die Platten wurden 10 min. bei Raumtemperatur gehalten, bis der Agar fest wurde. Dann wurden die Platten 3-4 Stunden bei 40-42°C inkubiert, anschließend mit dem Deckel nach unten in den Brutschrank gestellt und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.2.14.4 Ausschluss unspezifisch reagierender Antikörper

Um unspezifisch reagierende monoklonale Antikörper auszuschließen, wurde ein Phage mit der Spezifität humanes β_2 -Mikroglobulin in Bakterien exprimiert. Alle Antikörper, die auf der Proteinexpressionsbank getestet werden sollten, wurden zuerst auf Filtern, die von diesen Platten abgezogen wurden, getestet. Antikörper, die positiv reagierten, wurden als unspezifisch verworfen. Als Positivkontrolle diente ein polyklonales Kaninchen-anti-human- β_2 -Mikroglobulin-Serum (250 µg/ml), als Negativkontrolle wurde Milchpulverlösung eingesetzt.

2.2.14.5 Übertragung von Plaques auf Nitrozellulose-Filter

Es wurden 132-mm-Filter für 150-mm-Platten oder 82-mm-Filter für 100-mm-Platten benutzt. Die Filter wurden mit einem Kugelschreiber den Platten entsprechend beschriftet und mit Strichen am Filterrand markiert. Dann wurden die Filter in IPTG-Lösung für 15-20 min. gelegt, anschließend wurden sie getrocknet, bis sie unter einem Lampenlicht nicht mehr glänzten. Die Platten wurden aus dem Brutschrank genommen und die Filter wurden so auf die Platten gelegt, dass keine Luftblasen zwischen dem Filter und der Agaroberfläche entstanden. Dazu wurde der Filter von der Mitte der Platte zu den Rändern hin gelegt, die Ränder wurden dann mit der behandschuhten Hand vorsichtig auf das Agar gedrückt. Die Orientierungsstriche wurden mit einem Permanentmarker auf den Plattenboden übertragen. Die Platten wurden dann zurück in den Brutschrank gestellt und bei 37°C 3-5 Stunden

inkubiert. Dann wurden die Petrischalen für 10 min. im Brutschrank geöffnet, anschließend wurden die Filter mit einer sterilen Pinzette von den Platten abgenommen und in TBST-Lösung 3-5 mal jeweils 5min. auf einem Schüttler gewaschen.

Die Filter wurden über Nacht in einer 1% Milchpulverlösung bei 4°C blockiert und vor der Inkubation mit dem primären Antikörper mit PBS gewaschen. Die Baktereinkulturen wurden in Parafilm® eingewickelt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.2.14.6 Inkubation mit primären Antikörpern

Als primärer Antikörper wurde zuerst eine Mischung aus monoklonalen Antikörpern benutzt. Die monoklonalen Antikörper sind zu gleichem Anteil in der Mischung enthalten. Später, wenn die Mischlösung ein positives Signal ergab, wurden die Antikörper einzeln getestet, dabei wurden sie 1:10 mit Milchpulverlösung verdünnt. Der Filter für die Testung von 10 verschiedenen Antikörpern wurde in 12 Streifen von 4-6 mm Dicke mit einem sterilen Skalpell auf einer Glasscheibe geschnitten. Die Filter wurden mit dem primären Antikörper 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Dabei diente als positive Kontrolle die Reaktion mit der Antikörpermischung und als negative Kontrolle Milchpulverlösung. Die Filter durften nicht austrocknen, da trockene Filter Antikörper unspezifisch binden können. Danach wurden die Filter 3-5 mal jeweils 5 min. mit einer 1% Milchpulverlösung + 0.3% Tween® gewaschen. Vor dem Inkubieren mit dem sekundären Antikörper wurden die Filter mit PBS gespült.

2.2.14.7 Inkubation mit sekundären Antikörpern

Als sekundäre Antikörper wurden Alkalische-Phosphatase-konjugierte Ziege-anti-Ratte- und Maus-anti-Ratte-Antikörper benutzt. Die Antikörper wurden mit 1% Milchpulverlösung 1:1000 verdünnt. Die Filter wurden mit dem sekundären Antikörper 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Filter wieder mit Milchpulverlösung + 0,3% Tween® 3-5 mal jeweils 5 min. gewaschen. Vor der Entwicklung wurden die Filter mit AP-Puffer gespült.

2.2.14.8 Entwicklung der Farbreaktion

Für die Entwicklungslösung wurden unmittelbar vor der Anwendung 330 µl NBT und 165 µl BCIP in 50 ml AP-Puffer gelöst. Die Filter wurden in die Substratlösung so gelegt, dass sie vollständig bedeckt waren. Die Entwicklung wurde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt und dauerte 15-30 min. Dann wurde die Reaktion durch Abschütten der Lösung und Waschen mit Wasser gestoppt. Die Filter konnten anschließend getrocknet werden.

2.2.14.9 Entnahmen von positiven Kolonien von der Originalplatte

Die Filter wurden entsprechend der Markierung auf den äußeren Plattenboden aufgebracht, die positiven Plaques wurden auf dem Boden der Platte mit einem Permanentmarker markiert und mit Hilfe einer abgeschnittenen und sterilisierten Pipettenspitze (1000 µl) vollständig mit dem Medium entnommen. Das Mediumstück wurde in ein Reaktionsgefäß mit Deckelverriegelung (2,0 ml), das schon 500 µl 1x Lambda-Verdünnungspuffer enthielt, gegeben. Dann wurde es mit Hilfe eines MS2 Minischüttlers IKA® gemischt, damit die

Phagen freigesetzt wurden. Die Gefäße wurden über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gehalten, der Prozess der Freisetzung wurde dabei fortgesetzt.

Primäre positive Areale enthalten meistens verschiedene Klone, daher mussten die positiven Klone rekloniert und nachgeprüft werden.

Mit den freigesetzten Phagen wurden erneut E.coli-XL1-Blue-Kulturen beimpft und ausplattiert. Die Bindungsfähigkeit der Antikörper wurde geprüft. Von positiven Plaques wurden erneut Phagen genommen, bis die bakterielle Kulturplatte nur die positiven Plaques aufwies.

2.2.14.10 Wechsel von Wirtsbakterien mit dem Ziel der Plasmidisolierung

Von einer Arbeitsplatte mit E.coli BM25.8 wurde eine Kolonie entnommen und zum Beimpfen von 10 ml LB-Medium in einem 50ml-Gefäß benutzt. Die Kultur wurde bei 31°C unter Schütteln (150 rpm) über Nacht inkubiert. Dann wurden 100 µl 1 M MgCl₂-Lösung zu der BM25.8-Kultur zugegeben (MgCl₂-Konzentration 10 mM). Von einer Platte mit positiven Plaques wurde eine gut isolierte Kolonie entnommen und in 350 µl 1x Lambda-Verdünnungspuffer gegeben. Nach einer Inkubationzeit von 3-4 Stunden bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) wurden 200 µl BM25.8-Zellkultur mit 150 µl Phagen-Lösung in einem Eppendorfgefäß gemischt und für 30min. bei 31°C ohne Schütteln inkubiert. Dann wurden 400 µl LB- Medium zugegeben und bei 31°C 1 Stunde unter Schütteln (225 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 10 µl aus der Kultur genommen und mit einem sterilen Glasstäbchen auf einer LB/Carbenicillin-Platte ausplattiert, um gut isolierte Kolonien zu bekommen. Diese wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Dann wurden einzelne gut isolierte Kolonien entnommen und für die Plasmidisolierung oder für die PCR benutzt.

2.2.14.11 Bestimmung der Länge der DNA-Abschnitte in den Phagen

Die Länge von Zebrafisch-DNA-Abschnitten in den positiven Klonen wurde durch DNA-Isolierung, PCR und Elektrophorese bestimmt. Diese Arbeiten wurden von Frau Dr. Christine Hennard (GSF, Institut für Molekulare Immunologie) durchgeführt.

2.2.14.12 DNA-Sequenzierungen

Mit den DNA-Sequenzierungen wurde die Firma Sequiserve, Dr. Willi Metzger in Vaterstetten beauftragt.

3 Ergebnisse

3.1 ZEGE-Antikörper

Für die Gewinnung der ZEGE-Antikörper wurden Ratten mit einem Lysat aus mehreren Gehirnen von Zebrafärbungen immunisiert. Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei Fusionen durchgeführt. Nach der Bestimmung der Immunglobulinklasse/-subklasse wurden die Antikörper der IgG-Klasse weiter in der Immunhistologie untersucht. Zebrafische wurden als Testsystem eingesetzt. Es wurden nur diejenigen Klone eingefroren, deren Antikörper auf den Schnitten des ganzen Zebrafisches das Gehirn markierten. Klone, die komplett den ganzen Zebrafisch markierten, wurden als unspezifisch betrachtet und verworfen. Antikörper, die selektiv oder besonders stark das Zebrafischgehirn in der Immunhistologie markierten, wurden durch Einzelzellverdünnungen rekloniert. Manche Klone verlieren bei den Zellteilungen das für die Antikörperproduktion verantwortliche Chromosom und werden damit zu Nicht-Produzenten. Nur Klone, die eine stabile Antikörperproduktion zeigten, wurden etabliert und in der vorliegenden Arbeit verwendet. Alle im flüssigen Stickstoff gelagerten Klone können bei Bedarf aufgetaut und wieder expandiert werden. Die Antikörper der etablierten Klone wurden weiter auf eine mögliche Kreuzreaktivität mit den Gehirnen anderer Spezies getestet. Eine Übersicht über die Anzahl der getesteten und etablierten Klone gibt die Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht über ZEGE-Fusionen und getestete Klone

	Fusion 1	Fusion 2	Fusion 3
Getestet auf Immunglobulinklasse	800	800	800
Anzahl der Klone, die Immunglobuline der IgG-Klasse produzieren	72	87	45
Anzahl der Klone, die Immunglobuline der IgM-Klasse produzieren	83	142	84
Anzahl der in der Immunhistochemie getesteten Klone	72	87	45
Anzahl der Klone mit einem positiven Signal in der Immunhistochemie	19	9	10
Anzahl der eingefrorenen Klone	19	9	10
Anzahl der reklonierten und etablierten Klone	16	8	2

Eine Übersicht über die Antikörper, die spezifisch am Zebrafischgehirn binden, über die Immunglobulinklassen/-subklassen und über das Vorhandensein von Kreuzreaktionen gibt die Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht über die Immunglobulinklassen/-subklassen der beschriebenen ZEGE-Antikörper und deren Bindung an Gehirne verschiedener Spezies.

Fusion	Klon	Subklasse	Bindung nur an Zebrafischgehirn	Bindung an Zebrafischgehirn und an Gehirne von anderen Spezies
1	ZEGE 1E12	IgG2a	ja	
1	ZEGE 1H4	IgG2a	ja	
1	ZEGE 2F12	IgG2a	ja	
1	ZEGE 3F3	IgG2a	ja	
1	ZEGE 4B9	IgG2a		ja
1	ZEGE 5D6	IgG2a	ja	
1	ZEGE 6F1	IgG2a		ja
1	ZEGE 6G1	IgG2c		ja
1	ZEGE 7A6	IgG2a		ja
1	ZEGE 7A8	IgG2a	ja	
1	ZEGE 7B11	IgG2a	ja	
1	ZEGE 8D12	IgG2a	ja	
1	ZEGE 8D5	IgG2a	ja	
1	ZEGE 8F8	IgG1		ja
1	ZEGE 8G1	IgG2a	ja	
1	ZEGE 8H10	IgG2a	ja	
2	ZEGE 3A12	IgG2a	ja	
2	ZEGE3B10	IgG2a	ja	
2	ZEGE 3D4	IgG2a	ja	
2	ZEGE 3H9	IgG2a		ja
2	ZEGE 4A3	IgG2c	ja	
2	ZEGE 4B7	IgG2b	ja	
2	ZEGE 4F9	IgG2a	ja	
2	ZEGE 7D7	IgG2a		ja
3	ZEGE 2A8	IgG2a		ja
3	ZEGE 2C9	IgG2c		ja

Eine Übersicht über die Kreuzreaktionen der beschriebenen ZEGE-Antikörper mit Gehirnen anderer Spezies gibt die Tabelle 4.

Tabelle 4: Kreuzreaktionen der beschriebenen ZEGE-Antikörper mit Gehirnen verschiedener Spezies.

	Klon	Huhn	Maus	Kaninchen	Hund	Katze	Rind	Schwein	Ratte	Astrozytenzelllinie U373
1	ZEGE 1E12	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	ZEGE 1H4	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	ZEGE 2F12	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	ZEGE 3F3	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	ZEGE 4B9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
1	ZEGE 5D6	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	ZEGE 6F1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
1	ZEGE 6G1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1	ZEGE 7A6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
1	ZEGE 7A8	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	ZEGE 7B11	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	ZEGE 8D12	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	ZEGE 8D5	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	ZEGE 8F8	-	-	+	+	+	+	+	-	+
1	ZEGE 8G1	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	ZEGE 8H10	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	ZEGE 3A12	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	ZEGE3B10	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	ZEGE 3D4	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	ZEGE 3H9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
2	ZEGE 4A3	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	ZEGE 4B7	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	ZEGE 4F9	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	ZEGE 7D7	++	++	++	++	++	-	-	-	+
3	ZEGE 2A8	-	-	-	-	-	-	-	++	+
3	ZEGE 2C9	++	++	++	++	++	++	+++	++	-

3.1.1 ZEGE 4B9, ZEGE 3H9, ZEGE 6F1, ZEGE 6G1, ZEGE 7A6, ZEGE 2C9

3.1.1.1 Immunhistochemie

Reaktivität mit Zebrafischembryonen und adultem Zebrafisch

ZEGE 3H9, ZEGE 4B9, ZEGE 6F1 und ZEGE 7A6 zeigten in Zebrafischembryonen schon am ersten Tag der embryonalen Entwicklung in begrenzten Regionen eine Bindung im Bereich der Gehirn-/Rückenmarksanlage (s. Abbildungen 7-7, 7-22 und 7-37). Ab dem 2. Tag war die Markierung voll ausgeprägt und auf das Gehirn, das Rückenmark und die Retina beschränkt (s. Abbildungen 7-8, 7-23 und 7-38). Die Antikörper dieser Gruppe markierten im Zebrafischembryo keine Chondrozyten, jedoch färbten die Antikörper ZEGE 3H9 und ZEGE 6F1 in Maus- und Ratteembryonen sowie in menschlichen Embryonen Chondroblasten/Chondrozyten. Die starke Anfärbung von Geweben neuronalen Ursprungs (Gehirn, Rückenmark und Retina) blieb in wachsenden Larven und adulten Fischen bestehen (s. Abbildungen 7-9, 7-10, 7-24, 7-39, 7-40).

ZEGE 2C9 und ZEGE 6G1 markierten schon bei einem ein Tag alten Zebrafischembryo kleine Bereiche im Gehirn. Die Färbung von 3 und 5 Tage alten Embryonen war auf das Gehirn und Rückenmark beschränkt und war insgesamt etwas schwächer als die Färbung, die durch die Verwendung von ZEGE 3H9, ZEGE 4B9, ZEGE 6F1 oder ZEGE 7A6 entstand (s. Abbildungen 7-1 bis 7-4).

Reaktivität mit Maus- und Ratteembryonen

Die Austestung auf den Ratten- und Mausembryonen ergab ebenfalls eine starke Färbung, die auf die Regionen des Gehirns, des Rückenmarks und der Retina beschränkt war. Außerdem waren einzelne Chondroblasten/Chondrozyten (am deutlichsten durch ZEGE 3H9) ebenfalls angefärbt (s. Abbildungen 7-11, 7-12, 7-25, 7-42 und 7-43). ZEGE 6F1 markierte keine Chondrozyten. Die Anlage des Rückenmarks und des Gehirns zeigte schon bei einem 12 Tage alten Mausembryo ein positives Signal (s. Abbildung 7-41). Antikörper ZEGE 3H9, ZEGE 4B9 und ZEGE 6F1 markierten auch Teile des peripheren Nervensystems. Diese Markierung war am stärksten auf den mit dem Antikörper ZEGE 6F1 behandelten Schnitten ausgeprägt. Auf der Abbildung 7-43 erkennt man einige kleine rundliche Formationen entlang der Wirbelsäule, die den Nervenwurzeln entsprechen könnten.

Reaktivität mit Gehirngewebe anderer Spezies

Die Antikörper ZEGE 4B9, ZEGE 3H9, ZEGE 6F1, ZEGE 6G1, ZEGE 7A6 und ZEGE 2C9 reagierten mit Gehirnen aller getesteten Spezies und führten zu einer starken Anfärbung. Auf den Kleinhirnschnitten wurden Molekularschicht, Körnerschicht und einzelne strichförmige Strukturen in den Laminae albae angefärbt. Am stärksten wurde jedoch die Molekularschicht angefärbt (s. Abbildungen 7-15, 7-26, 7-28 und 7-44). Anhand einiger Schnitte des Kleinhirns war zu erkennen, dass die Zellen unmarkiert sind und es konnte vermutet werden, dass die Markierung hauptsächlich im extrazellulären Raum lokalisiert ist. Dieses Färbemuster war im Kleinhirn einer Maus deutlich zu sehen (s. Abbildungen 7-13, 7-14). Auf den Kleinhirnschnitt-

ten eines Schweins sah man jedoch am besten, dass die Markierung in der Körnerschicht außerhalb der Zellen liegt (s. Abbildung 7-27). Im Kleinhirn eines Rindes färbten sich Purkinje-Zellen an (s. Abbildungen 7-29, 7-45). Auf den Schnitten des Großhirns ergab sich eine diffuse Markierung (s. Abbildungen 7-15, 7-30 bis 7-32, 7-46). Diese Färbearreicherung entsprach auch am ehesten den extrazellulären Strukturen. Am Beispiel der Katze sah man diffuse wellenförmige Färbearreicherungen im Großhirn (s. Abbildungen 7-30, 7-31).

ZEGE 2C9 und ZEGE 6G1 zeigten in den Reaktionen mit Gehirnen verschiedener Spezies ein schwächeres Signal als die Antikörper ZEGE 3H9, ZEGE 4B9, ZEGE 6F1 und ZEGE 7A6 (z.B. Kaninchen, s. Abbildung 7-6), wobei die Bindung von ZEGE 2C9 am Gehirn des Schweines anscheinend eine gleich starke Markierung hervorrief (s. Abbildung 7-5).

Reaktivität mit menschlichen Embryonen

Die Antikörper ZEGE 3H9, ZEGE 4B9 und ZEGE 6F1 wurden von Prof. Dr. John Nicholls (Hongkong) auf eine mögliche Reaktivität mit dem neuronalen Gewebe eines menschlichen Embryos getestet. Diese Antikörper markierten ebenfalls Anteile des Gehirns, das Rückenmark und die Retina (s. Abbildungen 7-17, 7-18, 7-21, 7-33, 7-34, 7-47, 7-49). Antikörper ZEGE 3H9 und ZEGE 4B9 färbten auch die Chondroblasten/Chondrozyten an (s. Abbildungen 7-18, 7-20, 7-33, 7-36), wobei der Antikörper ZEGE 6F1 kein positives Signal im Knorpelgewebe zeigte. Bei Betrachtung der Retina und des Rückenmarkes bei stärkerer Vergrößerung erkannte man, dass die Zellkerne und möglicherweise die Zellen selbst von der Markierung ausgespart sind (s. Abbildungen 7-19, 7-21, 7-35, 7-48, 7-50).

Reaktivität mit der menschlichen Astrozytenzelllinie U373

Die Antikörper ZEGE 4B9, ZEGE 3H9, ZEGE 6F1, ZEGE 6G1, ZEGE 7A6, ZEGE 2C9 wurden auf der humanen Astrozytenzelllinie U373 getestet. Es konnte keine Färbung nachgewiesen werden. Somit konnte diese Zelllinie nicht verwendet werden, um das Antigen weiter zu analysieren.

3.1.1.2 Immunpräzipitation, Gel-Elektrophorese und Western-Blot unter Verwendung eines Avidin/Biotin-Systems

Die Antikörper ZEGE 4B9, ZEGE 3H9, ZEGE 6F1, ZEGE 6G1, ZEGE 7A6 und ZEGE 2C9 zeigten ein ausgesprochen interessantes und im Wesentlichen auf neuronale Strukturen begrenztes Färbemuster in der Immunhistochemie. Sie wurden daher biochemisch weiter charakterisiert. Da die Antikörper auch murine neuronale Proteine erkennen, wurden die Analysen an Gehirnen von C57BL/6-Mäusen auf Grund der besseren Verfügbarkeit durchgeführt. Als erster Schritt wurde eine Immunpräzipitation aus dem Gehirnlisat von Mäusen mit dem biotinylierten ZEGE 4B9-Antikörper durchgeführt. Der Antikörper wurde an Avidin-Agarose gebunden und die Lysate wurden damit inkubiert. Die Elution der Proteine erfolgte bei saurem oder alkalischem pH. Es wurde damit geprüft, ob der Antikörper sein Antigen unter einer dieser Bedingungen freigibt.

Die Eluate wurden einer SDS-Elektrophorese zugeführt. Die anschließende Western-Blot-Analyse mit ZEGE 4B9 zeigte eine deutliche Anreicherung des Proteins nach saurer Elution gegenüber dem alkalischen Eluat, wo kein Antigennachweis möglich war (s. Abbildung 3-1). Während man beim Gesamtlysate eine deutliche Doppelbande im hochmolekularen Bereich nachweisen kann, ist die größere Bande im sauren Eluat nur noch schwach detektierbar. Die Bande bei ca. 55 kDa im Gesamtlysate wurde als schwere Kette von Maus-Immunglobulinen interpretiert, da ZEGE 4B9 mit einem Peroxidase-markierten Antikörper abgegriffen wurde, der mit Maus-Immunglobulinen kreuzreagierte (Ziege-anti-Ratte-IgG+IgM, nicht adsorbiert gegen Maus-Immunglobuline).

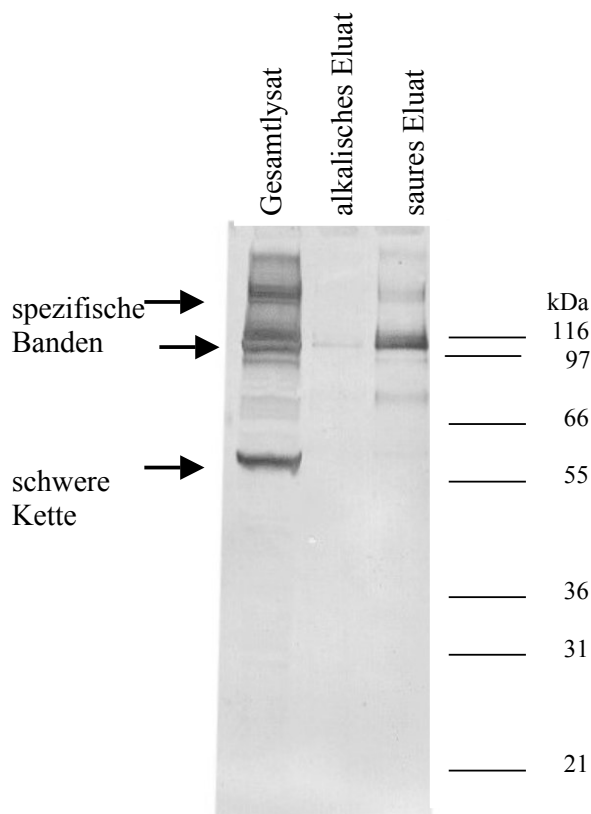


Abbildung 3-1: Western-Blot mit ZEGE 4B9. Es wurden Lysate und Eluate aus Gehirnen von zwei Mäusen eingesetzt.

Die Reinheit der Eluate wurde in einem Gel getestet neben einer Spur mit Gesamtlusat (s. Abbildung 3-2). Nach Silberfärbung zeigte sich, dass bei Elution im sauren Bereich niedermolekulare Proteine deutlich abgereichert wurden. Im hochmolekularen Bereich sind jedoch zu viele Banden sichtbar, so dass diese Präparation ungeeignet war, um Banden auszuschneiden und einem tryptischen Abbau für die Identifizierung in der Massenspektrometrie zuzuführen.

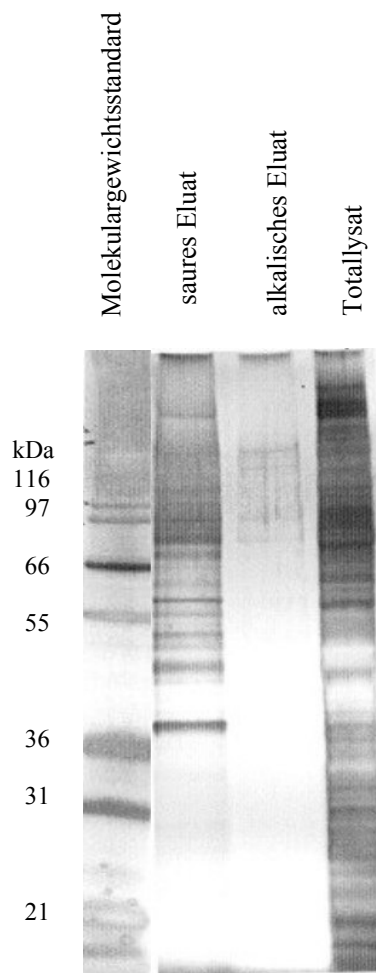


Abbildung 3-2: SDS-PAGE mit ZEGE 4B9. Es wurden Lysate und Eluate aus Gehirnen von zwei Mäusen eingesetzt.

3.1.1.3 Immunpräzipitation, Gel-Elektrophorese und Western-Blot unter Verwendung von Protein G

Um größere Mengen des Antigens zu erhalten, wurde ein anderes Verfahren der Immunpräzipitation ausgetestet. Als Trägersubstanz wurde Protein G-Agarose verwendet, die Rattenantikörper mit hoher Affinität bindet, aber auch unspezifisch Proteine absorbieren kann. Daher wurde das Gesamtlysate zuerst über unbehandelte Protein G-Agarose gegeben. Dadurch wurden Immunglobuline und unspezifisch an Protein G-Agarose bindende Proteine aus dem Gesamtlysate adsorbiert. Die Antikörper ZEGE 4B9, ZEGE 6F1 und ZEGE 3H9 wurden an Protein G-Agarose gebunden und mit dem depletierten Lysate inkubiert. Nach extensiven Waschungen mit PBS wurde zunächst mit einem Puffer eluiert, der 0,1% NP40 enthielt. Als zweiter Elutionspuffer wurde ein RIPA-Puffer verwendet. Die Elution des Antikörpers von der Protein G-Agarose erfolgte bei pH 2,7; damit war sichergestellt, dass der Antikörper/Proteinkomplex vollständig von der Säule eluiert wurde (s. Abbildungen 3.3-3.5). Die nachfolgenden Analysen aller Fraktionen zeigten, dass die Vorbehandlung mit Protein G-Agarose, an die kein Antikörper gekoppelt war, zu keinem nennenswerten Verlust an Antigen führte (Spur 2 gegen Spur 1). Im Eluat, das durch Behandlung mit einem Puffer gewonnen wurde, der 0,1% NP40 enthielt, waren geringe Mengen des Antigens nachweisbar (Spur 3). Das Antigen wurde hingegen nahezu vollständig durch RIPA-Puffer vom Antikörper dissoziiert (Spur 4). Die Elution mit Citratpuffer pH 2,7 enthält vor allem die Immunglobuline (Spur 5). Ein Vergleich der Resultate, die mit den drei Antikörpern erzielt wurden, zeigt, dass ZEGE 4B9 und ZEGE 3H9 besser als ZEGE 6F1 das Antigen im Western-Blot erkennen und dass die beiden ersten Antikörper das Antigen besser aus dem Gesamtlysate immunpräzipitieren. Der Western-Blot in der Abbildung 3-6 wurde nur mit Peroxidase-markierten anti-Ratte-Antikörpern abgegriffen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Banden von ca. 50 kDa um Immunglobulinbanden handelt.

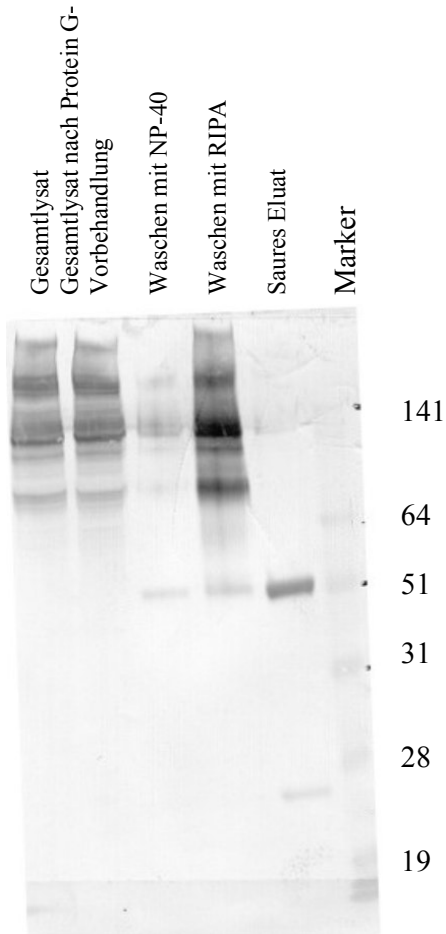


Abbildung 3-3: Westernblotanalyse mit ZEGE 4B9. Es wurden 20 μ l vom Gesamtlysat oder 20 μ l von der jeweiligen Immunpräzipitation oder Waschflüssigkeit aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem gleichen Antikörper.

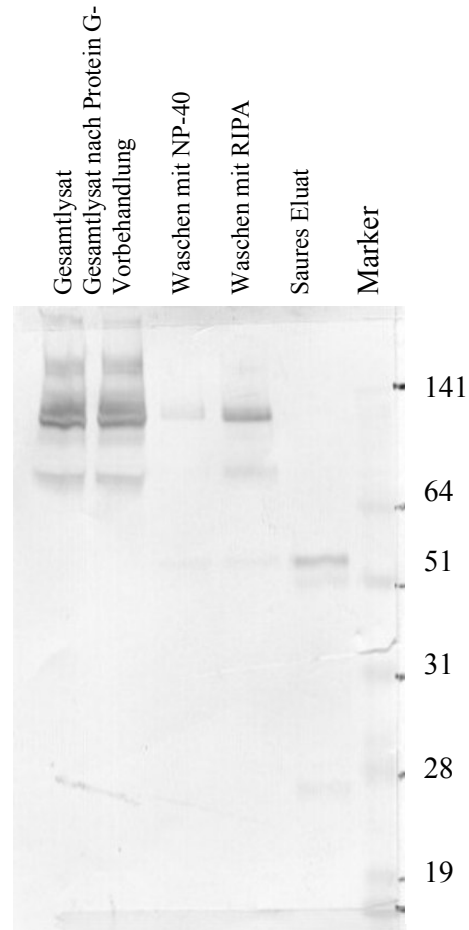


Abbildung 3-4: Westernblotanalyse mit ZEGE 6F1. Es wurden 20 μ l vom Gesamtlysat und 20 μ l von der jeweiligen Immunpräzipitation oder Waschflüssigkeit aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem gleichen Antikörper.

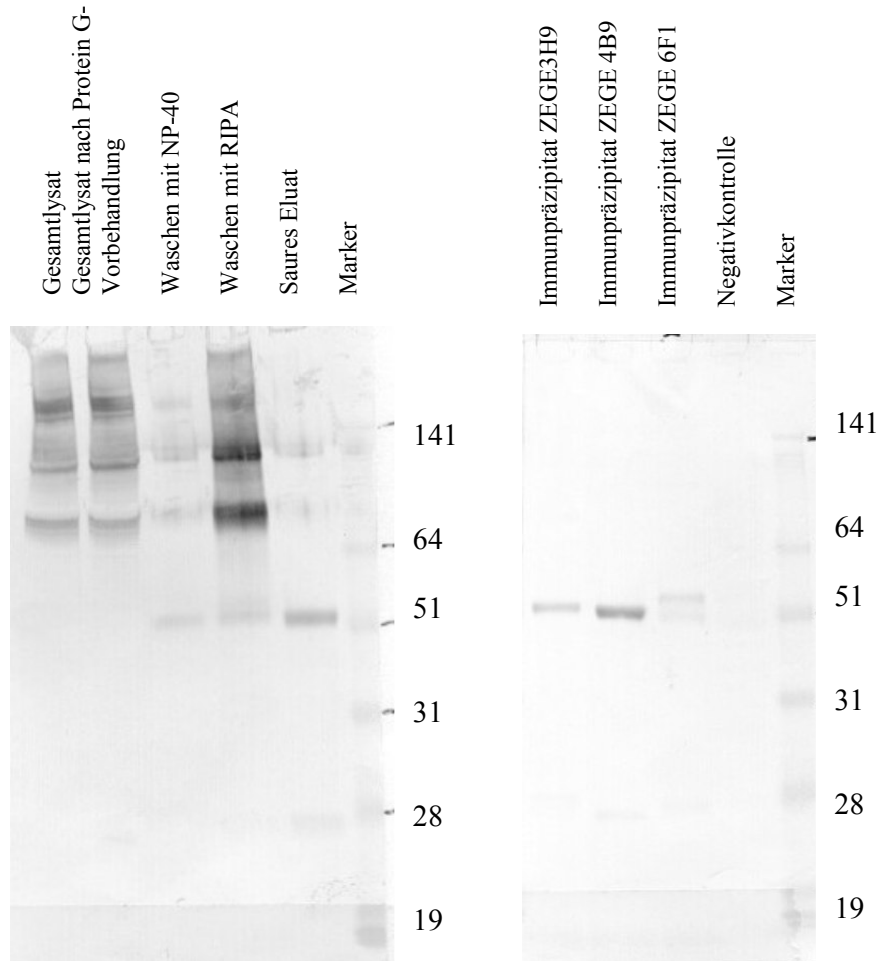


Abbildung 3-5: Westernblotanalyse mit ZEGE 3H9. Es wurden 20 μ l vom Gesamtlysat oder 20 μ l von der jeweiligen Immunpräzipitation oder Waschflüssigkeit aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem gleichen Antikörper.

Abbildung 3-6: Westernblotanalyse, Negativkontrolle nur mit dem sekundären Antikörper. Es wurden 20 μ l des sauren Eluats aufgetragen.

3.1.1.4 Präparative Immunpräzipitation

Zur Gewinnung größerer Mengen an Protein wurden mit dem Eluat, das mit RIPA-Puffer von der Säule geholt wurde, präparative Gele angefertigt. Diese Arbeiten wurden von Erik Blazek, GSF – Institut für Molekulare Immunologie, Abteilung Genexpression durchgeführt. Die Immunpräzipitationen mit ZEGE 4B9 und ZEGE 3H9 zeigten deutliche Banden in der Silberfärbung (s. Abbildung 3-7a). Das Immunpräzipitat von ZEGE 6F1 ist in der Silberfärbung kaum nachweisbar. Da bei der präparativen Gelelektrophorese die Laufstrecke für die Proteine ca. 15 cm betrug, wurden auch die schweren und leichten Ketten entsprechend aufgetrennt. Da monoklonale Antikörper geringfügig unterschiedliche Molekulargewichte zeigen, liegen die schweren und leichten Ketten nicht genau auf gleicher Höhe. Die korrespondierenden Westernblots bestätigen das Ergebnis (s. Abbildung 3-7b).

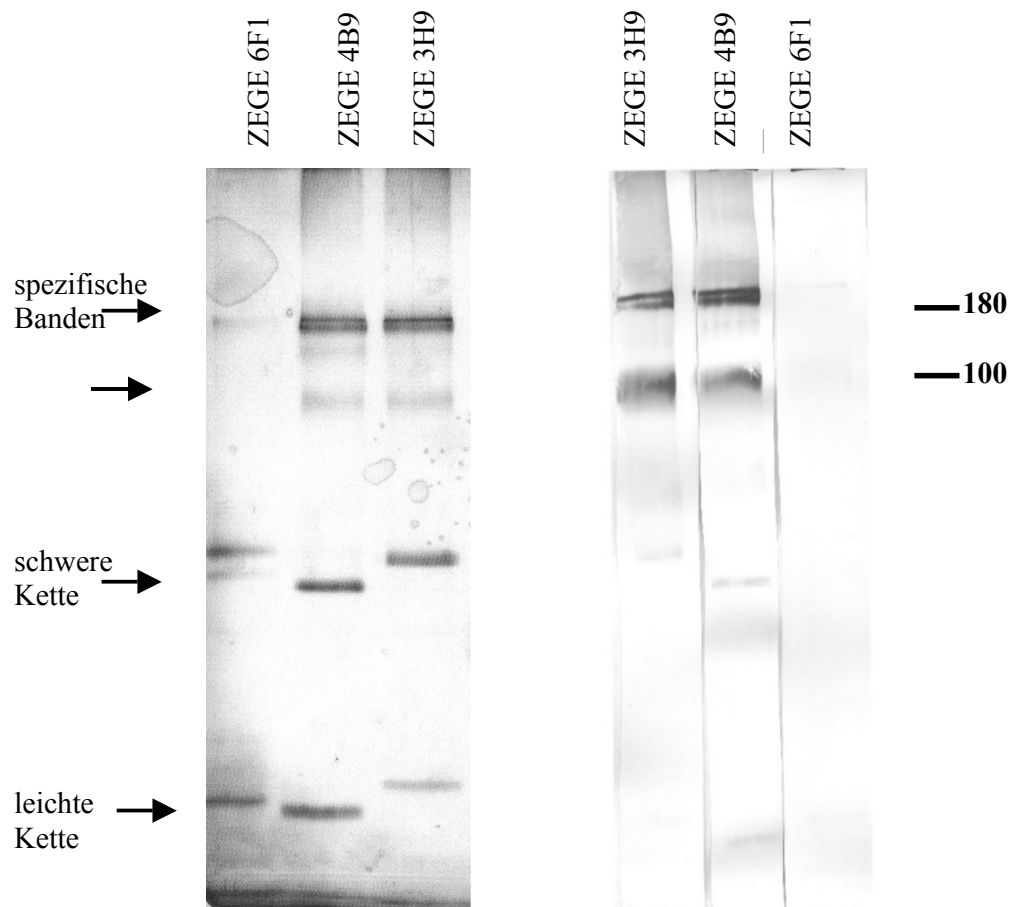


Abbildung 3-7: Gel-Elektrophorese (a) und Westernblot (b) mit ZEGE 4B9, ZEGE 6F1 und ZEGE 3H9. (a) Gel-Elektrophorese und Silberfärbung. (b) Westernblot nach Immunpräzipitation von Mäusehirnlysat und Elution mit RIPA-Puffer. Zur Detektion wurde der gleiche Antikörper eingesetzt, mit dem auch immunpräzipitiert wurde. Spezifische Banden sind im Bereich von 100 und 180 kDa sichtbar.

Die Banden von ZEGE 4B9 und ZEGE 3H9 wurden aus dem Gel ausgeschnitten und am Institut für Humangenetik der GSF von Dr. Marius Üffing und Christian Glöckner einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen. Leider waren die Proteinmengen nicht ausreichend, um das Protein an einem MALDI-Massenspektrometer zu identifizieren. Daher wurde eine neue Immunpräzipitation durchgeführt. Die Produkte des tryptischen Abbaus wurden anschließend einer sensitiveren Massenspektrometrie zugeführt.

3.1.1.5 LC-MS und Sequenzanalyse

Die spezifischen Banden aus dem Gel in der Abbildung 3-8 wurden von Dr. Albert Sickmann am Medizinischen Proteom-Zentrum der Ruhr-Universität in Bochum mittels einer Ionenfallen (Ion-Trap)-MS/MS in Kombination mit einer vorgeschalteten Nanoflüssigkeitschromatographie (nanoLC) analysiert. Die Auftrennung und Vorbereitung der Proben wurden von Dr. Marius Üffing und Dr. Christian Glöckner vom Institut für Humangenetik der GSF durchgeführt.

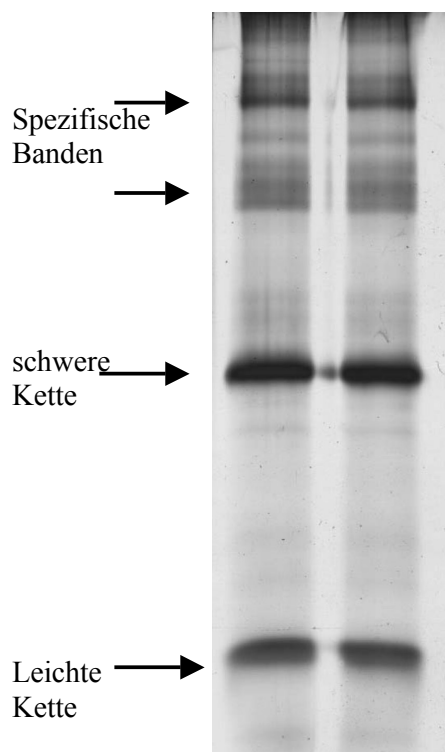


Abbildung 3-8: Gel-Elektrophorese und Silberfärbung. Immunpräzipitation von Mäusehirnlysat mit ZEGE 4B9, Elution mit RIPA-Puffer.

Die Auswertung der durch die Massenspektrometrie gefundenen Peptide erfolgte durch eine Datenbanksuche mit Hilfe des Mascot-Programms. Neben Keratin, das durch viele Peptide definiert wurde, konnte mit einem hohen Wahrscheinlichkeitswert Tenascin R definiert werden. Keratin wird durch Hautschuppen in die Präparation der Proben eingebracht.

Die Aminosäuresequenz des sequenzierten Proteins zeigt eine hohe Übereinstimmung mit der Sequenz vom Tenascin R Protein (Fuss et al., 1993). Dieses Protein ist auch bekannt unter dem Namen J1-160/180 (Pesheva et al., 1989) oder Restrictin (Rathjen et al., 1991). Die aufgeführten Sequenzen von humanem Tenascin R, Tenascin R der Ratte, der Maus und des Zebrafisches stammen aus PUBMED (Datenbank des NIH). Die fett hervorgehobenen Abschnitte entsprechen den gefundenen übereinstimmenden Sequenzen. Zwischen dem humanen Tenascin R und dem Tenascin R eines Huhns oder einer Ratte/Maus besteht eine 75%ige bis 93%ige Übereinstimmung der Aminosäurenabfolge (Carnemolla et al., 1996). In den Peptiden kyglvggegk und vvyst lageqyhevl vpk ist in der Sequenz des humanen Tenascin R Lysin (k) gegen Arginin (r) (rosa markiert) ausgetauscht (s. Abbildungen 3-9 und 3-10).

Aminosäuresequenzen von humanem Tenascin R (NP 003276, schwarz, oben), Tenascin R der Ratte (NP 037177, blau, Mitte) und der Maus (XP 129561, grün, unten).

```

1 mgadgetvvl knmligvnli llgsmikpse cqlevtterv qrqsveeegg ianyntsske
1 mgiegetvvl knmligvnli llgsmlkpse crlevtterv qrqtveeegg assyntsske
1 mgidgetvvl knmligvnli llgsmlkpse crlevttera qrqtveeegg assyntsske

61 qpvvfnhvyn invpldnlcs sgleasaeqe vsaedetlae ymgqtsdhes qvtfthrinf
61 qpmvfnhvyn invpleslcs sgleasaeqd vsaedetlae ytgqtsdhes qvtfthkinl
61 qpmvfnhvyn invpleslcs sgleasaeqd msaeddetlae yigqtsdhes qvtfthkinl

121 pkkacpcass aqvlqellsr iemlerevsv lrdqcnancc gesaatgqld yiphcshghn
121 pkkacpcass aqvlqellsr iemlerevsv lrdqcntncc gesaatgqld yvphcshghn
121 pkkacpcass sqvlqellsr iemlerevsl lrdqcntncc gesaatgqld yvphcshghn

181 fsfescgcic negwfgkncs epycplgcss rgvcvdgqci cdseysgddc selrcptdcs
181 fsfescgcic negwfgkncs epycplgcss rgvcvdgqci cdseysgddc selrcptdcs
181 fsfescgcic negwfgkncs epycplgcss rgvcvdgqci cdseysgddc selrcptdcs

241 srglcvdgec vceepytged crelrcpgdc sgkgrcangt clceegyvge dcgqrqclna
241 srglcvdgec vceepytged crelrcpgdc sgkgqcangt clcqegyage dcsqrrclna
241 srglcvdgec vceepytged crelrcpgdc sgkgqcangt clcqegyage dcsqrrclna

301 csgrgqceeg lcvceegyqg pdcsavappe dlrvagisdr sielewdgpm avteyvisyq
301 csgrghcqeg lciceegyqg pdcsavtpe dlrvagisdr sielewdgpm avteyvisyq
301 csgrghcqeg lciceegyqg pdcsavappe dlrvagisdr sielewdgpm avteyvisyq

361 ptalgglqlq qrvpgdwsqv titelepglt ynisvyavis nilslpitak vathlstpqq
361 pslgglqlqq rvpgdwsqvt itelepglty nisvyavisn ilslpitakv athlstpqq
361 ptalgglqlq qrvpgdwsqv timelepplt ynisvyavis nilslpitak vathlstpqq

```

Ergebnisse

421 **lqfk**titett vevqwepfsf sfdgweisfi pknneggvia qvpsdvtsfn qtglkpgeey
421 **qfk**titettv evqwepfsfs fdgweisftp knneggviaq lpsdvtsfnq tglkpgeeyi
421 **lqfk**titett vevqwepfsf sfdgweisfi pknneggvia qlpsdvtsfn qtglkpgeey

481 ivnvvalkeq arspptsasv stvidgptqi lvrdivsdvta fvewipprak vdfill**kygl**
481 vnvvalkeqa rgpptsasvs tvidgptqil vrdvsvdvaf vewtpprakv dfill**kyglv**
481 ivnvvalkeq arspptsasv stvidgptqi lvrdivsdvta fvewtpprak vdfill**kygl**

541 **vggegg**r^rttf rlqpplsqys vqalrpgsry evsvsavr^rgt nesdsattqf tteidapkn^rl
541 **ggegg**k^kttfr lqpplsqysv qalrpgsrye vsisavr^rgtⁿ esdasstqft teidapkn^rl
541 **vggegg**k^kttf rlqpplsqys vqalrpgsry evsisavr^rgt neseasstqf tteidapkn^rl

601 rvgsrtatsl dlewdnseae vqeyk**vvyst** **lageqyhevl** **vp**r^rgigp^rttr atlt^rdlvp^rgt
601 vgsrtatsld lewdnseaea qeyk**vvystl** **ageqyhevlv** **pk**gigp^rttkt tlt^rdlvp^rgt
601 rvgsrtatsl dlewdnseae aqeyk**vvyst** **lageqyhevl** **vp**k^kgigp^rttk tlt^rdlvp^rgt

661 eygvgisavm nsqqs^rpatm narteldspr dlmvtasset sisliwtk**as** **gp**idhyrit^rf
661 ygvgisavmn skqsipatmn arteldspr^r lmv^rtassets isliwtk**asg** **pid**hyrit^rft
661 eygvgisavm nskqsipatm narteldspr dlmvtasset sisliwtk**as** **gp**idhyrit^rf

721 tpssgiasev tvpkdrtsyt ltdlepgaey iisvtaergr qqslestvda ftgfrpishl
721 pssgissevt vprdrtsytl tdlepgaeyi isitaergrq qslestvdaf t^rgfrpishl^r
721 tpssgissev tvprdrtsyt ltdlepgaey iisitaergr qqslestvda ftgfrpishl

781 hfshvtsssv nitwsdpssp adrlilnysp rdeeeem^rmev sldatkrhav lmg^rlq^rpatey
781 fshvtsssvn itwsdp^rspa drlilnyspr deeeem^rmevl ldatkrhav^rl mg^rlq^rpateyi
781 hfshvtsssv nitwsdpssp adrlilnysp rdkeed^rmlev lldatkrhav lmg^rlq^rpatey

841 ivnlvavhgt vtsepivgsi ttgidppkdi tisnvtkds^rv mvswsppvas fdyyrvsyrp
841 vnlvavhgtv tsepivgsit tgidppknit isnvtkds^rl vswsppvapf dyeypidhp
841 ivnlvavhgt vtsepivgsi ttgidppkni tisnvtkds^rl tvswsppvap fdyyrvsyrp

901 tqvgrldssv vpntvtefti trlnpateye isl^rnsvrgre eserictlvh tamdn^rpv^rdli
901 sgrldssvvp ntvteftitr lypasqyeis l^rnsvrgrees erictlvhta mdsp^rmdliat
901 tqvgrldssv vpntvtefai trlypateye isl^rnsvrgre eserictlvh tamds^rpm^rdli

961 atnitpteal lqwkapvgev enyv^rvlthf avagetilvd gvseefrlvd llpsth^rtyat
961 nitpteallq wkapmgeven yv^rvlthfam agetilvdgv seefqlvdll pr^rth^rtyvt^rmy
961 atnitpteal lqwkapmgev enyv^rvlthf aiagetilvd gvseefqlvd llpsth^rtyvt

1021 myatngplts gtistnfstl ldppanltas evtr**qsalis** **wqpprae**ien yv^rltyk^rst^rdg
1021 atsgplvsgt iatnfstl^rld ppanltasev tr**qsaliswq** **ppraa**ienyv ltyk^rst^rdg^rs
1021 myatsgplms gtiatnfstl ldppdnltas evtr**qsalis** **wqppraa**ien yv^rltyk^rst^rdg

```

1081 srkelivdae dtwirlegll entdytvllq aaqdttwssi tstafttggr vfphpqdcaq
1081 kelivdaedt wirleglsen tdytvllqaa geatrsslts tifttggrvf shpqdcaqhl
1081 srkelivdae dtwirlegls entdytvllq aageatrssl tstvfttggr vfshpqdcaq

1141 hlmngdtlsg vypiflmgel sqklqvycdm ttdgggwivf qrrqngqtdf frkwadyrvg
1141 mngdtlsgvy tiftlmgelsh klqvycdmtt dgggwivfqr rqngqtdffr kwadyrvvgf
1141 hlmngdtlsg vytiftlmgel shklqvycdm ttdgggwivf qrrqngqtdf frkwadyrvg

1201 fgnvedefwl gldnihrits qgryelrvdm rdgqeaafas ydrfsvedsr nlykkrigsy
1201 nledefwlgd dnyhritagq ryelrvdmrd gqeaavfayd kfavedsrsl ykkriggynq
1201 fgnledefwl gldnihrita qgryelrvdm rdgqeaavfay ydkfavedsr slykkrigsy

1261 ngtagdsly hqgrpfted rdndvavtnc amsykgawwy knchrtnlmg kygesrshsq
1261 tagdslyhq grpftedrd ndvavtncam sykgawwykn chrtnlmgky gesrshsqin
1261 ngtagdsly hqgrpfted rdndvavtnc amsykgawwy knchrtnlmg kygesrshsq

1321 inwyhwkghe fsipfvemkm rpyhrlmag rkrqslqf
1321 wyhwkghefs ipfvemkmp yihrltagrk rralkf
1321 inwyhwkghe fsipfvemkm rpyihrltag rkrralkf

```

Abbildung 3-9: Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen von humanem Tenascin R (NP 003276, schwarz, oben), Tenascin R der Ratte (NP 037177, blau, Mitte) und der Maus (XP 129561, grün, unten). Die durch die Massenspektrometrie identifizierten Peptide sind fett markiert. In den Peptiden **kyglvggggk** und **vvyst lageqyhevl vpk** ist in der Sequenz des humanen Tenascins R Lysin (k) gegen Arginin (r) (rosa markiert) ausgetauscht.

Aminosäuresequenz vom *Tenascin R* des Zebrafischs (*AAP37046*, rot) und identifizierte Peptide aus der Aminosäuresequenz vom *Tenascin R* der Maus (*XP 129561*, grün).

```

1 mwgctmaiqq svvslallff giqavpspts klvrttrvrr qvpeggdpad nmqmpmvfnh
61 vyninvpves lcsvdldavt gpetnktasg sdkmpteyte etvdsdsqvt fthrinipkq
121 acacpsatti eqlasrieml erevslrrtq cssccgess vmgrldfvpq cghgtfsmev
181 cgcvcceegi gkncteprec ddcsgggici egdcvcdnrf ggencseprec psdcdrqlc
241 idgecvceea fagedcslgr clndcsdqga cvngscqcrs gflgedcsli fcanncsqrg
301 vckegfcvcq egytgddcts vlppmnlrvr gvsentidlq wegpailtdy lityepttpg
361 gvqlemrvpg nvtnitikgl npgleyvnnv yavidniiss pmntlvstyl snpdglfks
vathl stpgqlqfk

```

421 imetsvevqw qpldylfdgw eisfipkdnd ggmtaqlpst itsfhqtgk pgeeytvnlv

481 alkdqgrslp vtatvttlid gpiqlivr di sdtvafvews ppkakvdqii **ryglvgveg**
kyglvggek

541 **pk**ttfrlqpt lsqyslqvlr pgstyevsvs gvrngtesgv isteftteid apknlrvlsk
gg

601 tsislelewd nseadvegys **vvystlagdq ydkvivpr**nd gpstkttlne lmpgteygig
vvystlageq yhevlvpk

661 isavlganqs tpatmnartg ldvpldlvt astdntitll wgt**vqgp**idh **yr**vtytsssg
asgpidh **yr**

721 vtteitvpkd vttttltslq pteytitva aqrgrqqsta atidaftgfr pitqlffsev

781 ssdsltvaws spappadafi lnysaqdsse dseialdgs tritltglmp srryatltv

841 mhgnvtskpv vgsvntgmdp prditvlyvt eesvtitwiq plalldyyrm syqsskgrmd

901 svvidsdinn ytltslhpat eyeiklnavr gsqueskvitt tvftaidmpa eltalnvtpq

961 gallrnppa ssvdnyvltv trnqvtadtf lvegnkqeyq lsqlipstty svalyatkgp

1021 ltsgtvisnf vtpmdapqnl tasein**rsa liswqppi**ad idnymltyka adgsrkelil
qsa liswqppr

1081 daedtwirle glaetteyvt rlqvarglet svivstsftt gnrlfptpn caqhllnget

1141 lggiytiyvn rdlsqgvqvy cdmttdgggw ivfqqrrngl tdfsrkwdy kigfgslede

1201 fwlglldnihk iaagryelr idmkgqesv yanydrfsig dskslyklri geysgtagds

1261 lsyhqsrpfs tkdkndiav tncalsykga wwyknchran lngkygesrh sqginwyhwk

1321 ghefsipfve mkmrpfnyrs isgkrrrsah

Abbildung 3-10: Identifizierung der gefundenen Peptide (Tenascin R der Maus, XP 129561, grün) im Tenascin R des Zebrabärblings (AAP37046, rot).

3.1.2 ZEGE 8F8

3.1.2.1 Immunhistochemie

In einem ein Tag alten Zebrafischembryo wies der Antikörper ZEGE 8F8 eine diffuse und starke Markierung auf (s. Abbildung 7-51). Die Anfärbung von Gehirn, Rückenmark und Retina war auf dem Schnitt eines 3 Tage alten Zebrafischembryo deutlich schwächer, gleichzeitig gab es ein schwaches Signal im Bereich der Muskulatur (s. Abbildungen 7-52 und 7-53). ZEGE 8F8 zeigte keine Kreuzreaktivität mit Gehirngewebe von Ratte, Huhn und Maus. In Gehirnen anderer Spezies zeigte ZEGE 8F8 (im Vergleich mit ZEGE 3H9 oder ZEGE 6F1) eine schwache diffuse Färbung, die in der Molekular- und Körnerschicht des Kleinhirns des Schweins am deutlichsten ausgeprägt war (s. Abbildung 7-54). Auf den Schnitten des Kleinhirns vom Rind wurden außerdem die Purkinje-Zellen markiert (s. Abbildungen 7-55 und 7-56).

3.1.2.2 Western-Blot-Analyse

Western-Blot-Analysen mit ZEGE 8F8 zeigten keine spezifischen Banden im Zebrafisch-Gesamtlysat.

3.1.2.3 Immunpräzipitation unter Verwendung von Protein G, Gel-Elektrophorese

Die Immunpräzipitation wurde mit an Protein G gebundenen Antikörpern aus Zebrafisch-Gesamtlysat durchgeführt. Die Elution erfolgte mit Citratpuffer pH 2,7. Die Proben wurden in einem NuPAGE[®]-Bis-Tris-Gel mit 10 Taschen aufgetrennt und die Proteinbanden durch Silberfärbung sichtbar gemacht (s. Abbildung 3-11). In den übrigen Spuren des Gels sind Immunpräzipitate von Antikörpern aufgetragen, bei denen sich keine spezifischen Banden darstellen ließen und daher nicht weiter verfolgt wurden.

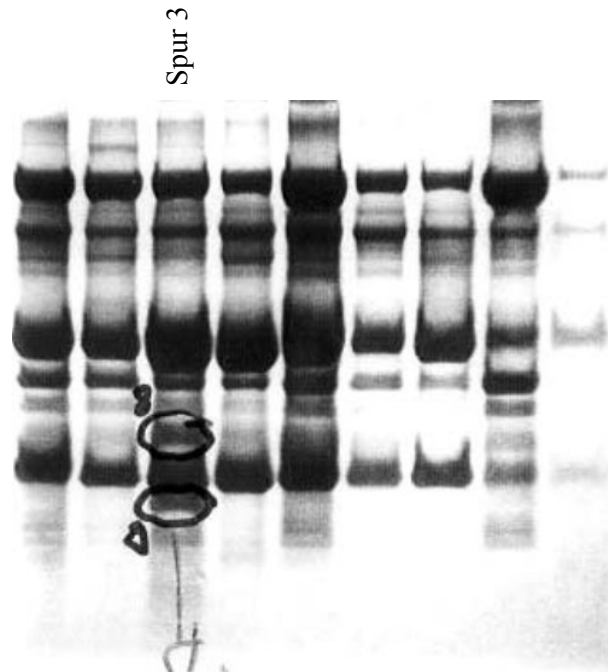


Abbildung 3-11: Gelelektrophoretische Auftrennung von Immunpräzipitaten aus Zebrafischgesamtlysat. Spur 3 enthält das Immunpräzipitat von ZEGE 8F8.

3.1.2.4 Massenspektrum von ZEGE 8F8

Aus der Auftrennung des Immunpräzipitats von ZE-GE 8F8 wurden 2 Banden ausgeschnitten und einem tryptischen Abbau unterworfen. Die untere Bande ergab ein typisches Massenspektrum (s. Abbildung 3-12).

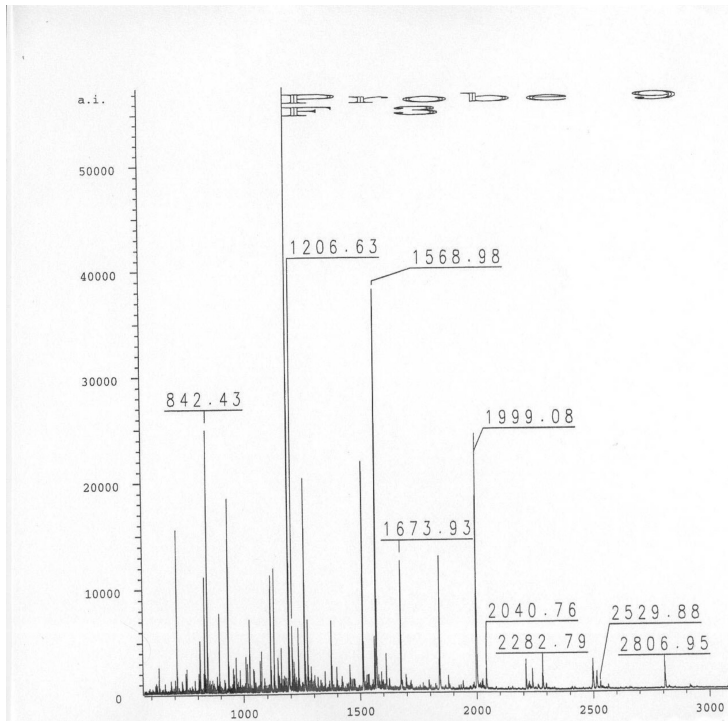


Abbildung 3-12: Massenspektrum von ZEGE 8F8.

Die Auswertung der gefundenen Massen zeigte, dass das Protein, das mit ZEGE 8F8-Antikörper immunpräzipitiert und aufgereinigt wurde, eine hohe Übereinstimmung mit der Sequenz von Plasticin des Zebrafisches (Asch et al., 1998) aufwies. In der unten aufgeführten Sequenz des Zebrafischplasticins (NP 571129) entsprechen fett hervorgehobene Abschnitte den gefundenen Peptiden (s. Abbildung 3-13).

Aminosäuresequenz des Zebrafischplasticins (NP 571129)

```

1  mshysyrtsh hrsygtpsvs sriggrytss ipsrpvdfrs rssapaprls ydkvdfslae
61  avnqeflatr snekrelqel ndrfasfiek vryleqqnsr ltqelgqfke qqqgpgsrglg
121 dlcqgemrel rrqlelmgkd rdqmverdn laedvallkq rlneemqkre eaennltlfr
181  kvddatlar lelekkiesl mdeieflkkm hdeeiqdvqv svqsqqmkme vmetstrpdl
241  taalrdirsq yesiasknmq eseewykskf adltdsakrn aeamrqsqkd ndlrrqiqq
301  qncdievlks tneallrqmr emeeqftlea gnyqdavgrl eeeirhlkee msrhlreyqd
361  llnvkmaldi eiatyrkile gesriavpi mkmpsmsghs gdygqfsdpa pgkkvviktv
421  eirdgevrrs dkaty
    
```

Abbildung 3-13: Aminosäuresequenz des Zebrafischplasticins (NP 571129).

Die Untersuchungen am Massenspektrometer und die Auswertung der gefundenen Massen wurden von Dr. Manfred Eulitz durchgeführt.

3.1.3 ZEGE 8D12

3.1.3.1 Immunhistochemie

ZEGE 8D12 zeichnete sich durch eine starke komplette Markierung von einem 1 Tag alten Zebrafischembryo aus (s. Abbildung 7-57). In einem 2 Tage und in einem 3 Tage alten Zebrafischembryo markierte der Antikörper nur das Gehirn, das Rückenmark und die Retina (s. Abbildungen 7-58, 7-59, 7-60). In den älteren Fischen wurden ebenfalls nur diese Organe gefärbt (s. Abbildungen 7-61, 7-62). Dieser Antikörper zeigte keine Kreuzreaktivität mit den Gehirnen der anderen Spezies.

3.1.3.2 Expressionsgenbank

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Antikörper wurden auf einer Proteinexpressionsgenbank getestet. Dazu wurde RNA aus Zebrafisch gewonnen, in cDNA umgeschrieben und in Phagen eingebracht. Mit den Phagen wurden Bakterien infiziert, die dann die entsprechenden Proteine produzierten. Nach Übertragung der Proteine auf Nitrozellulosemembranen konnten die Proteine durch die ZEGE-Antikörper detektiert werden. Nach Isolierung der Phagen wurde die kodierende DNA sequenziert. Mittels dieser Technik konnte festgestellt werden, dass ZEGE 8D12 ein Zielprotein erkennt, das auf Aminosäuresequenzebene eine 99%ige Ähnlichkeit mit einem Protein der Zebrafischretina aufweist. Dieses Protein hat eine hohe Homologie mit dem TOP-AP-Protein (AAA68637) (Savitt et al., 1995). Die gefundenen Sequenzen wiesen auch eine 40%ige Homologie mit dem humanen sarkolemmaassoziierten Protein (NP 009090) auf (Wigle et al., 1997) (s. Abbildungen 3-14 und 3-15).

Aminosäuresequenz des TOP-AP-Proteins (AAA68637) des Huhns

```

1 mddqdlnepi akvallkdel qgaqseteak qeiqqhlkel ieaqelarts kqkcfelqal
61 leeerrayrv qveesnkqin vlqaqlqrlq edienlreek eseisstrne lvsagneils
121 lqqvaekaas erdtdisalq eelqtvrael erwkdasy ekeivslqas fqlrcqqcee
181 qhkeeatrlk geleklkaew svleaecvtl rkentslase lqrqekelss sqkqslalts
241 nisvlemsrk eledqmgsrl ekhqdaasl ksqliseaesq akdvqkeyer tqtvlselka
301 kyemaeqekq siteelkqck enklklqekg nnpsilqpvp avfiglilaf lywcygplw

```

Abbildung 3-14: Aminosäuresequenz des TOP-AP-Proteins (AAA68637) des Huhns (*Gallus gallus*).

Aminosäuresequenz des humanen sarkolemmaassoziierten Proteins (NP 009090)

```

1 meekeqelqa kiealqadnd ftnerltalg enqtrakesd fsdtlpske kssddttdaq
61 mdeqdlnepl akvsllkddl qgaqseieak qeiqhlrkel ieaqelarts kqkcfelqal
121 leeerkeyrn qveestkqiq vlqaqlqrhl idtenlreek dseitstrde llsardeill
181 lhqaaakvas erdtdiaslq eelkkvrael erwrkaasey ekeitslqns fqlrcqqced
241 qqreeatrlq geleklrkew naletechsl krenvllsse lqrqekelhn sqkqslelts
301 dlsilqmsrk elenqvgslk eqhlrdsadl ktllskaenq akdvqkeyek tqtvlselkl
361 kfemteqekq sitdelkqck nnkllrekg nnpsilqvpv arihrpipgf pdmvirsive
421 rkkpwpwmpm laalvqvta vlyvpglara sp

```

Abbildung 3-15: Aminosäuresequenz des humanen sarkolemmaassoziierten Proteins (NP 009090).

3.1.4. ZEGE 8D5 und ZEGE 2F12

3.1.4.1 Immunhistochemie

Auf dem Schnitt eines 1 Tag alten Zebrafischembryo zeigte ZEGE 8D5 eine am Rand betonte Färbung der Anlage des Gehirns und des Rückenmarks mit einer angedeuteten Segmentierung (s. Abbildung 7-63). ZEGE 2F12 zeigte bei einem 1 Tag alten Zebrafischembryo ebenfalls eine Anfärbung im Bereich der Gehirn-/Rückenmarksanlage (s. Abbildung 7-66). Ältere Embryonen, Larven und Fische zeigten eine auf Gehirn, Retina und Rückenmark beschränkte Markierung (s. Bilder 7-64, 7-65, 7-67, 7-68). Beide Antikörper wiesen keine Kreuzreaktionen mit Gehirnen anderer Spezies auf.

3.1.4.2 Expressionsgenbank

Die beiden Antikörper erkannten auf der Expressionsgenbank ein Protein, das auf dem Niveau der Aminosäuresequenz eine große Ähnlichkeit mit dem humanen VAT-1-Homolog (Q99536) der synaptischen Vesikelmembran hat (s. Abbildung 3-16). Das Gen des humanen VAT-1-Homologs wurde auf dem Locus 17q21 lokalisiert, in der Nähe des BRCA1-Gens (Friedman et al., 1995).

Aminosäuresequenz des humanen VAT-1-Homologs (Q99536)

```

1 marqglydrl pplpvtpgme gagvviavge gvdrkagdr vmlnrsgmw qeevtvpsvq
61 tflipeamtf eeaaallvny itaymvlfdf gnlqpghsvl vhmaaggvgm aavqlcrtve
121 nvtvfgtasa skhealkeng vthpidyhtt dyvdeikkis pkgvdivmdp lggsdtakgy
181 nllkpmgkvv tygmanlltg pkrnlmalar twwnqfsvta lqllqanrav cgfhlgylgdg
241 evelvsgvva rllalynqgh ikphidsvwp fekvadamkq mqekknvgkv llvpgpekqn

```

Abbildung 3-16: Aminosäuresequenz des humanen VAT-1-Homologs (Q99536).

3.1.5 ZEGE 7D7

3.1.5.1 Immunhistochemie

Eine sehr starke und diffuse Markierung zeigte sich bereits auf den Schnitten eines 1 Tag alten Zebrafischembryos (s. Abbildung 7-69). Diese Markierung ging in älteren Embryonen und Larven in eine ebenfalls sehr starke Markierung von Geweben neuronalen Ursprungs (Gehirn, Rückenmark und Retina) sowie in eine schwache Anfärbung von Muskulatur über (s. Abbildungen 7-70-7-72). Von den getesteten Spezies reagierte der ZEGE 7D7-Antikörper mit den Gehirnen von Rind und Ratte nicht kreuzreaktiv. Die Anfärbung des Schweinehirns war sehr schwach. Es wurden Zellen der Körnerschicht markiert (s. Abbildungen 7-73, 7-74). In allen anderen Spezies markierte der Antikörper ZEGE 7D7 einzelne Zellen und Zellgruppen im Bereich sowohl des Groß- als auch des Kleinhirns (s. Abbildungen 7-75 bis 7-80).

3.1.6 ZEGE 2A8

3.1.6.1 Immunhistochemie

In einem ein Tag alten Zebrafischembryo war die Farbanreicherung im Bereich des Kopfes und des Rumpfes nur sehr schwach ausgeprägt (s. Abbildung 7-81). Mit steigendem Alter der Embryonen und Larven wurde die Markierung stärker und war dann nur auf Gehirn, Rückenmark und Retina beschränkt (s. Abbildungen 7-82 bis 7-84). Von den getesteten Spezies reagierte der Antikörper ZEGE 2A8 nur mit dem Gehirn der Ratte kreuzreaktiv. Dabei wurden einzelne Zellen angefärbt (s. Abbildungen 7-85 und 7-86).

3.1.7 ZEGE-Antikörper, die mit Gehirnen anderer Spezies nicht kreuzreagieren

3.1.7.1 Immunhistochemie

Viele der getesteten ZEGE-Antikörper, die auch am Zebrafischgehirn ein starkes Signal zeigten, reagierten nicht kreuzreaktiv. So war der Antikörper ZEGE 7B11 bereits in einem ein Tag alten Zebrafischembryo positiv mit Anfärbung im Bereich des Kopfes und des Rumpfes (s. Abbildung 7-87). Bei älteren Embryonen und Larven ergab sich eine starke Markierung von Gehirn, Rückenmark und Retina (s. Abbildungen 7-88 bis 7-90).

3.2 Antikörper, die gezielt gegen bestimmte Antigene hergestellt worden sind

Verschiedene von unserer Arbeitsgruppe unabhängig von dieser Dissertation hergestellte Antikörper wurden auf Kreuzreaktionen mit Gehirngewebe von mehreren Tierspezies untersucht. Es wurden nur diejenigen Antikörper untersucht, die am Zebrafischgehirn ein positives Signal ergaben. Aus insgesamt 170 getesteten Antikörper wurden 16 zusammengestellt und in dieser Dissertation beschrieben. Als Einschlusskriterien dienen Kreuzreaktivität mit mehreren Spezies und interessantes Färbemuster in der Histologie. Die in Rahmen dieser Dissertation beschriebenen Antikörper, ihre Immunglobulinklassen/-subklassen und die entsprechenden Antigene sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Eine Übersicht über die Kreuzreaktivität der beschriebenen Antikörper mit Gehirnen von verschiedenen Spezies gibt die Tabelle 6.

Tabelle 5: Übersicht über die beschriebenen nicht ZEGE-Antikörper, über die Antigene, die bei der Gewinnung dieser Antikörper eingesetzt wurden, und über die Immunglobulinklassen/-subklassen dieser Antikörper.

Klon	Antigen	Subklassen
VIII-41 6E7	ZBP-89 (human)	IgG2a
VIII-41 8B4	ZBP-89 (human)	IgM
VIII-41 8G7	ZBP-89 (human)	IgG2a
EPS 1A8	Proteinkinase C (ϵ -Kette) (human)	IgG2a
EPS 2B9	Proteinkinase C (ϵ -Kette) (human)	IgG2a
PP2A 2E6	Proteinphosphatase 2A (human)	IgG2a
PP2A 6F9	Proteinphosphatase 2A(human)	IgG2a
P9H 1C8	PAX9 (human)	IgM
P9H 4D7	PAX9 (human)	IgG2a
P9H 5E12	PAX9 (human)	IgG2a
P9H 6E4	PAX9 (human)	IgM
P9H 8F1	PAX9 (human)	IgM
PUR 11A3	PUR α (human)	IgM
PUR 1D7	PUR α (human)	IgM
PUR 1F1	PUR α (human)	IgM
PUR 9G11	PUR α (human)	IgM

Tabelle 6: Übersicht über die Bindung der beschriebenen nicht ZEGE-Antikörper an Gehirne von verschiedenen Spezies.

Klon	Huhn	Hund	Kaninchen	Katze	Maus	Ratte	Rind	Schwein
VIII-41 6E7	+	+	+	+	+	+	+	+
VIII-41 8B4	+	+	+	+	+	+	+	+
VIII-41 8G7	+	+	+	+	+	+	+	+
EPS 1A8	+	+	+	+	+	+	+	+
EPS 2B9	+	+	+	+	+	+	+	+
PP2A 2E6	+	+	+	+	+	+	+	+
PP2A 6F9	+	+	+	+	+	+	+	+
P9H 1C8	+	+	+	+	+	+	+	+
P9H 4D7	+	+	-	+	+	+	+	+
P9H 5E12	+	+	+	+	+	+	+	+
P9H 6E4	-	+	+	+	+	+	+	+
P9H 8F1	-	-	+	-	+	+	+	+
PUR 11A3	+	+	+	+	+	+	+	+
PUR 1D7	+	+	+	+	+	+	+	+
PUR 1F1	+	+	+	+	+	+	+	+
PUR 9G11	+	+	+	+	+	+	+	+

3.2.1 VIII-41-Gruppe

Antikörper der VIII-41-Gruppe wurden gezielt gegen das ZBP-89-Protein hergestellt. ZBP-89 ist ein zellulärer Transkriptionsfaktor. Dieses Protein stimuliert die Replikation der Virus-DNA. Das geschieht durch eine unmittelbare Bindung an die DNA und/oder durch eine Interaktion mit der viralen DNA-Polymerase (Baumann et al., 1999).

3.2.1.1 Immunhistochemie

Antikörper VIII-41 6E7, VIII-41 8B4, VIII-41 8G7 reagierten mit Gehirnen aller Tierarten, die in dieser Dissertation zum Einsatz kamen. Alle Antikörper der VIII-41-Gruppe markierten auf den Schnitten des Kleinhirns einzelne Zellen in der Molekularschicht (Stratum moleculare) und viele Zellen in der Körnerschicht (Stratum granulosum) (s. Abbildungen 7-91 bis 7-94). Außerdem wurde die Molekularschicht insgesamt schwach angefärbt. Im Bereich der Großhirnrinde wurden ebenfalls einzelne Zellen angefärbt (s. Abbildung 7-95 und 7-96). Das Signal auf den mit dem Antikörper VIII-41 8B4 reagierenden Schnitten war im Vergleich zu den anderen Antikörpern dieser Gruppe (VIII-41 6E7 und VIII-41 8G7) stärker. Aufgrund der vorliegenden Bilder könnte vermutet werden, dass der Antikörper VIII-41 8B4 eine größere Affinität zum Antigen besitzt.

3.2.2 EPS-Gruppe

Bei der Herstellung von Antikörper EPS 1A8 und EPS 2B9 kam als Antigen die ϵ -Kette der humanen Proteinkinase C zum Einsatz. Es wurde gezeigt, dass ein hohes Expressionsniveau der ϵ -Kette zur einen neoplastischen Transformation beiträgt (Mischak et al., 1993).

3.2.2.1 Immunhistochemie

Antikörper der EPS-Gruppe ergaben auf histologischen Schnitten von Gehirnen aller getesteten Spezies ein positives Signal. EPS 1A8 und EPS 2B9 markierten Zellen im Groß- und Kleinhirn. Es wurden einzelne Zellen in der Molekularschicht (Stratum moleculare) und viele Zellen in der Körnerschicht (Stratum granulosum) sowie einzelne Zellen in der Großhirnrinde angefärbt (s. Abbildungen 7-97 bis 7-102). Der Antikörper EPS 1A8 ergab ein stärkeres Signal als der EPS 2B9.

3.2.3 PP2A-Gruppe

Proteinphosphatase 2A ist ein Holoenzym, das aus einer katalytischen Untereinheit C und zwei regulatorischen Untereinheiten A und B besteht. Als Antigen für die Antikörperherstellung diente die regulatorische Untereinheit A (Kremmer et al., 1997).

3.2.3.1 Immunhistochemie

Die Antikörper PP2A 2E6 und PP2A 6F9 wiesen Kreuzreaktivität mit allen in der Arbeit untersuchten Tierspezies auf. Beide Antikörper ergaben bei allen Tierspezies ungefähr ein gleiches Färbemuster, wobei die histologischen Schnitte nicht bei allen Spezies ein gleich starkes Signal zeigten. So markierte der Antikörper PP2A 2E6 im Kleinhirn des Schweins die Molekularschicht und die Körnerschicht mit der Aussparung von Zellkernen (s. Abbildungen 7-105 und 7-106). Die Großhirnschnitte des Schweins zeigten eine Anfärbung von bestimmten subkortikal gelegenen Gebieten (s. Abbildungen 7-103 und 7-104). Der Antikörper PP2A 2E6 band am Kaninengehirn deutlich schwächer als am Schweinegehirn mit der Beibehaltung des Färbemusters (s. Abbildungen 7-107 und 7-108).

3.2.4 P9H-Gruppe

Als Antigen (P9H) diente das humane PAX9-Protein. PAX-Gene kodieren Transkriptionsfaktoren, die eine große Rolle in der Embryonalentwicklung spielen. Für adulte Organismen ist die Bedeutung von PAX-Genen noch nicht vollständig aufgeklärt. PAX9-Protein wird im Ösophagusepithel eines gesunden Menschen exprimiert. Die Mehrheit der invasiven Karzinomen und Dysplasien zeigen eine deutliche Abnahme der PAX9-Expression (Gerber et al., 2002).

3.2.4.1 Immunhistochemie

Antikörper der P9H-Gruppe waren in ihrem Färbeverhalten an Gehirnen von verschiedenen Spezies unterschiedlich. Die Antikörper P9H 1C8 und P9H 5E12 zeigten Kreuzreaktionen mit allen Spezies. Der Antikörper P9H 4D7 band am Gehirngewebe von allen getesteten Tierarten bis auf Kaninchen. P9H 6E4 ergab kein Signal im Huhn. P9H 8F1 zeigte keine Färbung des Gewebes von Huhn, Hund und Katze. P9H 1C8- und P9H 5E12-Antikörper markierten stark die Körnerschichtzellen auf Kleinhirnschnitten des Huhns. Die Molekularschicht wurde ebenfalls angefärbt, jedoch viel schwächer (s. Abbildungen 7-109 und 7-110). Im Gegensatz dazu markierte P9H 4D7 deutlich die Purkinje-Zellen und einzelne große Zellen der Körnerschicht der Kleinhirnrinde des Huhns. Die Molekularschicht war dabei noch schwächer angefärbt (s. Abbildungen 7-111 und 7-112). Im Kleinhirn des Rindes zeigten alle P9H-Antikörper gleiches Färbemuster mit einer schwachen Markierung von Purkinje-Zellen, der Molekularschicht und der Körnerschicht (s. Abbildungen 7-113 und 7-114). Im Gehirn der Maus ergaben alle Antikörper der P9H-Gruppe eine diffuse Färbung. Dabei war die Markierung durch P9H 1C8 und P9H 5E12 stärker ausgeprägt als durch P9H 4D7 oder P9H 6E4 (s. Abbildungen 7-115 bis 7-118). Das Bindungsverhalten von P9H 5E12 auf Gehirnen von Katze und Ratte ist in den Abbildungen 7-119 und 7-120 dargestellt.

3.2.5 PUR-Gruppe

PUR-Antikörper sind gegen das Protein PUR alpha gerichtet. PUR alpha ist ein DNA-Bindungsprotein mit einer Affinität zur ori-Region (origin of replication) der eukaryontischen DNA. Es besteht eine hohe Ähnlichkeit zwischen dem humanem PUR-alpha-Protein und dem PUR-alpha-Protein der Maus (Ma et al., 1994).

3.2.5.1 Immunhistochemie

Antikörper der PUR-Gruppe reagierten mit Gehirngewebe aller getesteten Spezies. Durch diese Antikörper wurden Zellen sowohl im Großhirn als auch im Kleinhirn markiert. Im Bereich des Kleinhirns wurde besonders die Körnerschicht hervorgehoben (s. Abbildungen 7-121 bis 7-132).

3.3 Parkin

Für die Gewinnung spezifischer monoklonaler Antikörper gegen Parkin wurden insgesamt zwei Mäuse und zwei Ratten mit einem von Dr. Leimer (Ludwig-Maximilians-Universität München, Adolf-Butenandt-Institut, Abteilung Metabolische Biochemie) zur Verfügung gestellten Antigen immunisiert. Das Antigen war N-terminal mit einer His-Sequenz versehen und befand sich in 8 M Harnstoff in einer Konzentration von etwa 2,6 µg/µl. Die bei der anschließenden Fusion entstandenen Hybridome wurden in einem ELISA auf Bindung an Antigen und auf ihre Immunglobulinklasse getestet. Alle Hybridome, die aus den Fusionen mit Mausmilzzellen entstanden waren, haben sich als unspezifisch erwiesen. Sie reagierten entweder mit Proteinen von E.coli und produzierten Immunglobuline der IgM-Klasse. Von der ersten Fusion mit Rattenmilzzellen mit 800 getesteten Klonen konnten nur drei Klone gefunden werden, deren Antikörper spezifisch mit Parkin reagierten. Die Überstände dieser drei Klone wurden im Western-Blot auf spezifische Bindung an Parkinprotein getestet.

Zwei Klone

PARK 5C3 der IgG2b-Subklasse und
PARK 6G8 der IgG2b Subklasse

haben sich auch im Western-Blot als spezifisch erwiesen. Diese Klone wurden dann etabliert. Die zweite Fusion mit Rattenmilzzellen wurde auf die gleiche Weise getestet. Im ELISA wurden nur zwei Klone detektiert, die den gestellten Anforderungen entsprachen, und von diesen zeigte nur ein Klon

PARK 7D3 der IgG2a-Subklasse

spezifische Bindung im Western-Blot. Dieser Klon wurde dann ebenfalls etabliert.

3.3.1 Immunhistochemie

Reaktivität mit menschlichem Gehirn

PARK 5C3 und PARK 6G8 reagierten mit humanem Gehirn nicht (s. Abbildungen 7-134 und 7-135). Im Gegensatz dazu markierte PARK 7D3 einzelne Zellen im menschlichen Hirn (s. Abbildung 7-133). Das Färbemuster entsprach jedoch nicht den Strukturen, die typischerweise Parkin enthalten.

Reaktivität mit Zebrafischgehirn

Alle Parkin-Antikörper reagierten schwach positiv mit Zebrafischgehirn.

Reaktivität mit den anderen Spezies

PARK 5C3 und PARK 6G8 reagierten nicht mit Gehirnen der getesteten Spezies (s. Abbildungen 7-136 bis 7-142). Auf den Schnitten mit Gehirngewebe der Ratte sind Gefäße und gefäßenthaltende Hirnhäute durch den sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Ratte) markiert.

3.3.2 Western-Blot

Die Western-Blot-Analyse wurde von Dr. P. Kahle (Ludwig-Maximilians-Universität München, Adolf-Butenandt-Institut, Abteilung Metabolische Biochemie) durchgeführt. Dr. P. Kahle hat freundlicherweise die Ergebnisse zur Verfügung gestellt. 100 µg MYC-Parkin-Protein wurden der SDS-PAGE zugeführt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Zum Nachweis von Protein wurden folgende Antikörper verwendet: PARK 6G8, PARK 5C3 und ein polyklonaler Antikörper 5112 (Chemicon). Die Bande im Bereich von 55 kDa entspricht dem MYC-Parkin. Die Bande im Bereich von 40 kDa auf dem PARK 5C3-Streifen stellt ein Parkinspaltprodukt dar (s. Abbildung 3-17).

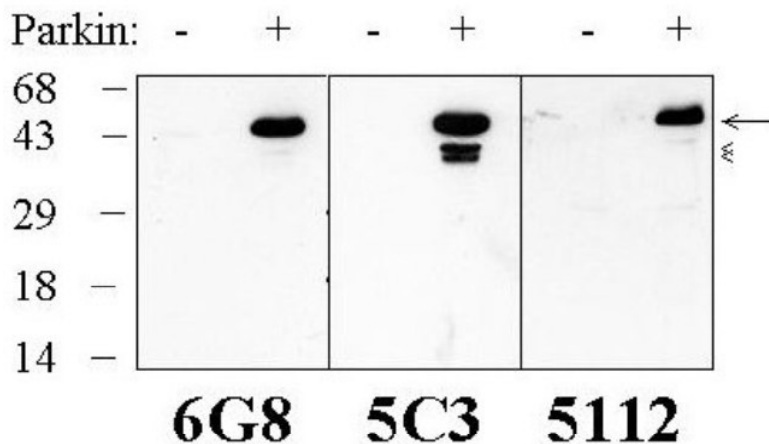


Abbildung 3-17: Western-Blot-Analyse mit PARK 6G8, PARK 5C3 und 5112 (Chemicon) (freundlicherweise von Dr. P. Kahle (Ludwig-Maximilians-Universität München, Adolf-Butenandt-Institut, Abteilung Metabolische Biochemie) zur Verfügung gestellt). Es wurden 100 µg Parkin-Protein (+) oder 100 µg irrelevantes Protein (-) pro Spur aufgetragen.

4 Diskussion

Ziele dieser Arbeit waren die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen neuronale Antigene des Zebrafisches und die Charakterisierung der von diesen Antikörpern erkannten Proteine, um letztendlich Gen-Funktions-Beziehungen herzustellen. Dazu wurden Ratten mit homogenisierten Gehirnen adulter Zebrafische immunisiert. Die Vorteile des Zebrafisches als Modellorganismus sind schon in der Einleitung beschrieben und sollen hier nur noch summarisch aufgezählt werden. Sie bestehen in der unproblematischen Haltung der Tiere, kurzen Generationszeiten mit vielen Organismen, Durchsichtigkeit der Embryonen, so dass mutationsbedingte Veränderungen erkennbar sind, Kleinheit der Embryonen und Jungtiere, die die Anwendung immunzytochemischer und -histochemischer Methoden an Ganzkörperschnitten auf einem Objektträger zulassen. Die Relevanz des Zebrafisches für die Medizin besteht darin, dass mögliche Genmutationen untersucht werden können, die sich in einem pathologischen Phänotyp ausdrücken und für die es Korrelate beim Menschen gibt. Zum Auffinden solcher Mutationen bedarf es mehrerer Schritte. Das als „positional cloning“ bezeichnete Verfahren (Collins, 1991) dient der Aufklärung von Genfunktionen durch die Analyse von Genmutationen. Dazu bedarf es der Lokalisation von Mutantenphänotypen auf bestimmten Chromosomenabschnitten, der Klonierung der betreffenden Chromosomenabschnitte, der Bestimmung der Gene in diesem Abschnitt und schließlich die Korrelation des Phänotyps mit bestimmten Gendefekten. Auf diese Weise wurden mehrere mutierte Gene im Zebrafischgenom identifiziert. So führt die Mutation eines extrazellulären Proteins aus der EGF-CFC-Gruppe zum „one eye-pinhead“-Phänotyp. Das kodierende Gen wird als OEP-Gen bezeichnet (Zhang et al., 1998). Korrespondierende Gene waren schon zuvor in den Genomen von Frosch, Maus und Mensch bekannt. Bei Nichtvertebraten sind entsprechende Proteine bisher nicht nachgewiesen. Hieraus wird der Schluss gezogen, das Proteine der EGF-CFC-Gruppe eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Vertebraten spielen.

Vergleicht man die Genkartierungen von Chromosomen oder Chromosomenabschnitten verschiedener Spezies miteinander, so lässt sich feststellen, dass bestimmte Gengruppierungen auch im Laufe der Evolution verbunden bleiben. Solche Gene werden als syntäne Gene bezeichnet. Zwischen Zebrafisch und Mensch finden sich im Genom mehr als 40 solcher syntäner Genpaare (Postlethwait et al., 1999, Amores et al., 1998). Diese Befunde sprechen dafür, dass diese Gene auch im Genom eines hypothetischen gemeinsamen Vorfahren syntän waren und ihre Nachbarschaft im Verlauf der Evolution beibehielten (Postlethwait et al., 1999). Gelingt es, durch Mutationsanalysen im Zebrafischgenom solchen syntänen Genen eine Funktion zuzuschreiben, besteht die Chance, die Genfunktion entsprechender Gene im Humangenom zu definieren, sofern sie noch nicht bekannt ist. Beispiele solcher Mutationen im Zebrafischgenom sind das SAU-(sauternes) und das GRL-(gridlock) Gen. Die Mutation des SAU-Gens führt zur Anämie mit erniedrigtem Hämoglobinspiegel (Brownlie et al., 1998). Das SAU-Gen kodiert für das Enzym δ -Aminolaevulinsäuresynthase (ALAS 2), ein Schlüsselenzym in der Häm biosynthese. Analog dazu beruht die kongenitale humane sideroblastische Anämie auf einer Mutation im ALAS-2-Gen. Eine Mutation im GRL-Gen des Zebrafisches führt zu einem Defekt des kardiovaskulären

Systems, das der menschlichen Aortakoarktation sehr ähnlich ist (Weinstein et al., 1995). Es ist zu erwarten, dass weitere solcher Parallelen aufgefunden werden, wenn man Mutationen, die man in EST –Sequenzen (expressed sequence tags) gefunden hat, in die entsprechenden Gene einführt und die mutierten Proteine exprimiert.

Bei der Analyse und Isolierung von Mutanten und Proteinen im Zusammenhang mit der Beschreibung von Genfunktionen kann in der modernen Forschung auf den Einsatz von Antikörpern, speziell denjenigen monoklonalen Ursprungs, nicht mehr verzichtet werden. In den letzten Jahren nimmt auch die Anwendung monoklonaler Antikörper als Therapeutikum bei bestimmten Krankheiten (Lymphome, Rheuma etc.) schnell zu und wird auch weiterhin wachsen und an Bedeutung gewinnen. Damit sind an die Herstellung der Antikörper hinsichtlich Spezifität, Affinität, Durchsatz und Immunogenität hohe Ansprüche gestellt, die nicht von jedem Verfahren in gleicher Weise erfüllt werden können. Die Vor- und Nachteile der Verfahren zur Erzeugung monoklonaler Antikörper bedürfen daher einer kurzen kritischen Würdigung. Die herkömmliche, von Köhler und Milstein, 1975 beschriebene Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper wird durch die Fusion von B-Zellen immunisierter Mäuse mit einer Mäusemyelom-Zelllinie bewerkstelligt. Dabei wird die Fähigkeit des lebenden Organismus genutzt, gegen eine Vielzahl von Antigenen mit einer humoralen Immunantwort zu reagieren. Mit geeigneten Selektionsverfahren lassen sich spezifische und in der Regel hochaffine Antikörper isolieren, die dann in einer Vielzahl verschiedener Techniken verwendet werden können. Domäne dieser Technik ist die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen extrazelluläre Proteine oder Oberflächenantigene von Zellen. Auch zytoplasmatische Bestandteile der Zelle erweisen sich oft, aber nicht immer als geeignete Antigene. Schwierigkeiten können hingegen mit Proteinen auftreten, deren Aminosäuresequenz sich im Laufe der Evolution kaum verändert hat, die also hoch konserviert sind. Gleichfalls schwierig können Antigene sein, die toxisch auf den Organismus wirken oder deren Variabilität, wie am Beispiel bestimmter Komponenten des AIDS-Virus festzustellen war, zu hoch ist, um den Organismus zu einer kontinuierlichen Immunantwort kommen zu lassen.

Diese Schwierigkeiten konnten in vielen Fällen überwunden werden, indem man Peptidabschnitte an bestimmte Carrierproteine (Hämocyanin, Albumin, Ovalbumin) koppelt und damit immunisiert oder gentechnisch hergestellte Fusionsproteine zwischen dem gesuchten Protein und anderen Proteinen (z.B. GST –Glutathionsynthetase) zur Auslösung einer Immunantwort benutzt. Es muss an dieser Stelle auch darauf hingewiesen werden, dass sich im Laufe der Evolution ein Vorgang herausgebildet hat, der als „Affinitätsreifung“ der Antikörper bezeichnet wird. Der molekulare Hintergrund dieses Vorgangs ist ein Prozess, bei dem in den variablen Abschnitten der Immunglobulin-L- und H-Ketten einzelne Aminosäuren ausgetauscht werden, die die Bindungsfähigkeit der Antikörper oft drastisch erhöhen (Berek und Milstein, 1988). Im Verlauf einer Immunantwort bleiben oft nur wenige Klone erhalten, die eine hohe Affinität besitzen, während niedrig-affine Klone absterben. Diesen Vorteil vermögen In-vitro-Verfahren zur Herstellung von Antikörpern nicht zu bieten.

Ein entscheidender Nachteil der Hybridomtechnik ist es, dass für jedes neue Antigen der Prozess der Immunisierung, Zellfusion und Selektion erneut in Gang gesetzt werden muss, wodurch die Gewinnung eines neuen monoklonalen Antikörpers langsam und aufwendig wird. Aus therapeutischem Blickwinkel ist es ein weiterer Nachteil, dass die Antikörper von

der Maus oder von der Ratte stammen und daher bei Verabreichung an den Menschen selbst immunogen wirken, was bei länger dauernder Verabreichung anaphylaktische Reaktionen oder eine beschleunigte Entfernung aus der Zirkulation auslösen kann. Aus diesem Grund sind xenogene Antikörper für eine Dauertherapie ungeeignet.

Diese Tatsache führte schon bald nach der Einführung der Methode zu Versuchen, humane monoklonale Antikörper zu erzeugen. Es erwies sich jedoch bald, dass die Fusion menschlicher B-Zellen mit Mäusemyelomzellen nicht zum gewünschten Erfolg führte. Zum einen waren die Ausbeuten an produziertem Antikörper sehr gering und zum anderen gingen den heterospezifischen Fusionszellen die für die Antikörperbildung relevanten menschlichen Chromosomen sehr schnell wieder verloren, so dass keine stabilen Hybridome selektiert werden konnten. Um diese Probleme zu meistern, wurden Methoden entwickelt, die murinen konstanten Regionen der Antikörper auf gentechnischem Weg durch die korrespondierenden konstanten Regionen humaner Immunglobuline zu ersetzen. Die auf diese Weise veränderten Immunglobuline werden als chimärische Antikörper bezeichnet.

Noch weiter gehende Veränderungen ersetzten nicht nur die konstanten Domänen der Antikörper durch ihre humanen Äquivalente, sondern tauschten auch noch die „Framework“-Bereiche der V-Teile von Immunglobulin-H- und L-Ketten gegen entsprechende Bereiche aus humanen Genen aus. Bei derart veränderten Molekülen spricht man von humanisierten Antikörpern. Diese Techniken sind jedoch nicht ohne Nachteile. So kann die Einführung menschlicher Genabschnitte zu einer Änderung in der Faltungsgeometrie der Antigenbindungsstelle führen, was unter Umständen zu massiven Titerverlusten oder gar zur völligen Aufhebung der Antigenbindung führen kann. Auch derart veränderte Antikörper vermögen noch eine gewisse Restimmunogenizität auszuüben, die eine Langzeitbehandlung oder wiederholte Anwendung solcher Antikörper mit Risiken belastet.

In neueren Publikationen wird die Erzeugung transgener Mäuse beschrieben, die menschliche Genabschnitte tragen und in der Lage sind, humane Antikörper zu bilden (Brüggemann et al., 1996). Es darf jedoch bezweifelt werden, dass mit diesem Ansatz genügend große Mengen an Antikörpern hergestellt werden können, um einen therapeutischen Einsatz zu ermöglichen. Karpas und Mitarbeitern ist es gelungen, stabile humane Hybridome zu entwickeln, die konstant große Antikörpermengen bilden (Karpas et al., 2001). Die Schwierigkeit dieses Ansatzes dürfte darin liegen, genügend geeignete B-Zellen zu isolieren, um Fusionen durchzuführen. Aus ethischen Gründen müssen Immunisierungen von Menschen mit virulenten Erregern (z.B. AIDS-Virus, Ebola-Virus, Hanta-Virus) unterbleiben.

Als alternative Möglichkeit zur Hybridomtechnik wurde die „phage display“-Methode entwickelt. Bei dieser Methode benutzt man filamentöse Phagen, in deren Genom Fragmente von humanen Immunglobulin-Ketten eingebaut sind. Die Phagen exprimieren dann in den Filamenten Teile von Antikörpern. Meist werden V_L – und V_H -Ketten, verbunden durch ein kurzes, ebenfalls im Gen kodiertes Peptid, auf der Oberfläche der Filamente exprimiert. Derartige Konstrukte nennt man scFv-Antikörper (Huston et al., 1988). Auf diese Weise entsteht eine Genbank antigenbindender Fragmente, die auf die Bindung mit dem als Antigen ausgewählten Protein getestet werden kann. Dies kann zum Beispiel mit auf PVDF-

Membranen gebundenen Proteinen geschehen (Liu et al., 2002). Sind die entsprechenden, das bindende Antikörperfragment tragenden Phagen selektiert, können sie in einem Bakterium vermehrt und die antigenbindenden Fragmente in großen Mengen produziert werden. Mit dieser Methode wurden bereits mehrere hochaffine Antikörper hergestellt (Griffiths et al., 1993).

Der Aufbau und die Handhabung einer solchen Genbank ist jedoch kompliziert und erfordert Erfahrung. Da für den Aufbau der Genbank jedoch Keimbahngene verwendet werden, haftet den solcherart produzierten Antikörperfragmenten ein entscheidender Nachteil an. Ihre Affinität geht nicht durch den Prozess der Affinitätsreifung, d.h. ein ursprünglich mit durchschnittlicher Bindungskonstante bindender Antikörper kann nicht durch den Prozess der somatischen Mutation zu einem hochaffinen Antikörper ausreifen. Hat also ein durch „phage display“ ausgewähltes Antikörperfragment nicht per se eine hohe Bindungskonstante, wird es sehr schwierig, wenn nicht unmöglich, hochaffine Antikörper zu isolieren. Ein weiterer Nachteil der scFv –Fragmente ist ihre kurze Halbwertszeit *in vivo*. Komplette Antikörpermoleküle haben auf Grund ihrer Fc-Teile eine viel längere Halbwertszeit (IgG z.B. 22 Tage), da sie an den neonatalen Rezeptor binden (Simister und Mostov, 1989) und dadurch auch einer schnellen Proteolyse im Gefäßendothel entgehen. Zudem ist der Fc-Teil der Antikörper für mehrere periphere Effekte, wie Opsonisierung, Komplementbindung und Rezeptorbindung verantwortlich, die beim Vorgang der Immunabwehr von ausschlaggebender Bedeutung sein können. Im „phage display“-Verfahren hergestellte scFv-Fragmente besitzen diese Eigenschaften nicht, woraus ihre eingeschränkte therapeutische Verwendbarkeit resultiert. Von Simmons und Mitarbeitern wurde kürzlich über eine neue Methode der Antikörperherstellung berichtet, die auch die Produktion von kompletten Antikörper-Molekülen in *E.coli* gestattet (Simmons et al., 2002).

Neben diesen allgemeingültigen Besonderheiten bei der Entwicklung und beim Umgang mit monoklonalen Antikörpern sind auch noch einige andere generelle Gesichtspunkte der Beachtung wert. Antikörper, die aufeinander folgende Aminosäuren einer Proteinkette erkennen, können mit anderen Proteinen mit gleicher oder sehr ähnlicher Sequenz kreuzreagieren. Dies ist besonders dann der Fall, wenn es sich um hochkonservierte Proteine handelt. Monoklonale Antikörper können isoelektrische Punkte haben, die nahe am pH-Wert der eingesetzten Pufferlösungen liegen. Solche Antikörper neigen zum Präzipitieren und müssen in anderen Pufferlösungen verdünnt oder angesetzt werden. Bei Western-Blots ist darauf zu achten, dass alle im Gel enthaltenen Detergenzien die Bindung der monoklonalen Antikörper stark herabsetzen oder auch ganz aufheben können. Daher muss bei solchen Versuchen auf Detergenzienfreiheit geachtet werden. Trotz dieser Einschränkungen sind monoklonale Antikörper unentbehrliche Hilfsmittel in vielen Forschungslabors geworden. Sie sind auch Grundlage dieser Arbeit, die sich auf die Charakterisierung von Proteinen im neurologischen Apparat des Zebrafischs konzentriert. Im Folgenden werden die mit den neu gewonnenen Antikörpern isolierten und charakterisierten Proteine im Einzelnen diskutiert.

4.1 Tenascin

Aus den Immunisierungen mit Zebrafisch-Gehirnen wurden 6 monoklonale Antikörper isoliert, die in Zebrafischembryonen mit der Neuralanlage, dem Rückenmark und der Retina reagierten. Die Antikörper zeigten auch mit Mäusehirn eine Kreuzreaktion. Mittels dieser Antikörper ließen sich in der SDS-Elektrophorese zwei Proteinbanden mit Molekulargewichten von 180 und 100 Kilodalton spezifisch anfärben. Diese Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, reduziert und alkyliert und anschließend tryptisch verdaut. Die massenspektrometrische Analyse ergab trotz der sehr geringen Proteinmenge mehrere Peptide, die sich mittels einer Kombination von nano-LC und Ionenfallen/MS/MS trennen und identifizieren ließen. Die ermittelten Peptidsequenzen wurden mit Hilfe des Mascot-Suchprogramms als Bestandteile des Tenascin R identifiziert.

Tenascin R gehört zu der großen Gruppe der Adhäsionsmoleküle (Chiquet-Ehrismann, 2004). Alle diese Proteine sind Bestandteile der extrazellulären Matrix und spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung eines multizellulären Organismus. Besonders wichtig sind die Proteine der extrazellulären Matrix für die Funktion des zentralen Nervensystems der Vertebraten. Spezifische Interaktionen zwischen Membrankomponenten der neuronalen Zellen und der extrazellulären Matrix sind die Voraussetzung für die Ausbildung von Synapsen und anderer Strukturen. Jedoch auch bei der Verhinderung von Zell-Zell-Kontakten und bei der Zellabstoßung spielen die Proteine der extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle (Keynes und Cook, 1992).

Bisher wurden fünf miteinander verwandte Tenascine beschrieben: Tenascin C (TN-C), Tenascin R (TN-R), Tenascin X (TN-X), Tenascin Y (TN-Y) und Tenascin W (TN-W) (Erickson, 1993, Joester und Faissner, 2001). Alle Tenascine zeigen einen ähnlichen modularen Aufbau (s. Abbildung 4-1). Einem cysteinreichen N-Terminus mit mehreren wiederholten Heptaden folgt ein Abschnitt mit einer variablen Anzahl von EGF-(Epidermal growth factor) ähnlichen Modulen und mehreren Fibronectin-Typ-III-(FNIII) ähnlichen Abschnitten. Am Carboxyterminus der Tenascine finden sich Aminosäuresequenzen, die zu Fibrinogen- β - und γ -Ketten homolog sind (s. Abbildung 4-1). TN-C ist in der Lage, sich über Disulfidbrücken zu Hexameren zusammenzulagern. TN-R kann Trimere bilden. Eine weitere Variabilität wurde bei der intensiven Analyse der FN-III-Domänen mit RT-PCR entdeckt. Es stellte sich heraus, dass durch alternatives Spleißen zusätzliche Kassetten in das Tenascin C eingeführt werden können (Sriramarao und Bourdon, 1993, Tucker et al., 1994, Mighell et al., 1997). Auf diese Weise entstehen unterschiedlich große Moleküle. Es wird vermutet, dass die wechselnden Kassetten in der FN-III-Region unterschiedliche Funktionen ausüben (Joester und Faissner, 2001). Im Folgenden werden die wichtigsten Tenascine und ihre vermutliche Funktion im Organismus kurz besprochen.

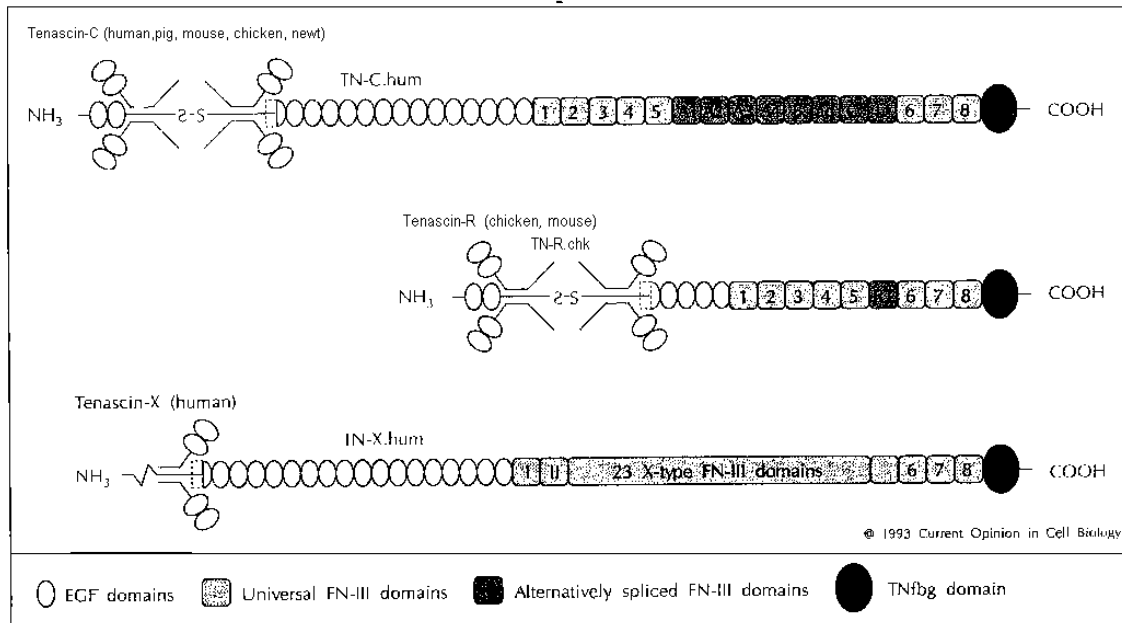


Abbildung 4-1: Domänenstruktur der Proteine der Tenascin-Gruppe (Mensch, Schwein, Maus, Huhn, Wassermolch). Die gemeinsame Fibronectin-III-Domäne, die alle Transkripte des Tenascin C und Tenascin R aufweisen, ist mit 1-5 und 6-8 gezeichnet. Das humane Tenascin C zeigt die höchste Zahl an alternativen Domänen. (Aus Erickson, H.P., 1993).

4.1.1 Tenascin C (TN-C)

Tenascin C war das erste der Tenascine, das Anfang der achtziger Jahre von mehreren Laboratorien in immer anderen Zusammenhängen beschrieben und mit vielen Synonymen benannt wurde (Erickson, 1993). Die erste publizierte Sequenz wurde 1989 publiziert und als Cytotactin beschrieben (Jones et al., 1989). Inzwischen werden alle Proteine, die die oben skizzierten Strukturmerkmale tragen, als Tenascine bezeichnet. Tenascin C ist ein großes, komplexes Glycoprotein der extrazellulären Matrix. Tenascin C wird in vielen Geweben exprimiert, wie in der Entwicklungsphase des Gehirns, im Knorpelgewebe und Mesenchym, im Gewebe bestimmter Tumoren, aber auch bei der Wundheilung und bei Entzündungen. In sich entwickelnden neuronalen Geweben folgt die Expression der Tenascine C und R bestimmten zeitlichen und räumlichen Mustern. Tenascin C ist schon am Tag 10 im sich entwickelnden Nervensystem der Maus nachzuweisen. Das Molekül wird hauptsächlich von unreifen und reaktiven Astrozyten und einer Subpopulation der radialen Gliazellen gebildet. Auch einige Bereiche des Hippocampus und einige motorische Neurone des Rückenmarks exprimieren das Molekül (Kawano et al., 1995). Tenascin C ist in Prozesse der Morphogenese, wie Axonwachstum (Lochter et al., 1994), die Verteilung von Oligodendrocyten und Zellmigration einbezogen (Halfter et al., 1989). Tenascin C fördert die Regeneration von Nerven. So zeigt sich ein hohes Expressionsniveau des Proteins während der Regeneration des Nervus ischiadicus des Huhns (Daniloff et al., 1989) und der Maus

(Martini et al., 1990), während es am Ende der Regeneration abnimmt. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde auch bei Denervation und Reinnervation der neuromuskulären Platte beobachtet (Sanes et al., 1986; Gatchalian et al., 1989). Auch beim Wachstum neuronaler Fasern scheint Tenascin C beteiligt zu sein. So nimmt die Tenascin-Expression beim Wachstum des Tractus opticus des Huhns zu (Crossin et al., 1986).

Hohe Expression von Tenascin C wurde an der Grenzschicht zwischen Stroma und Tumor bei einer ganzen Anzahl von Tumoren gefunden, wie Prostatakarzinom (Xue et al., 1998), Kolorektale Tumoren (Riedl et al., 1997), Hirntumoren (Zagzag et al., 1995, 1996), oralen Karzinomen (Ramos et al., 1998) und Mamma-Karzinom (Howeedy et al., 1990). Einige Autoren argumentieren, dass Tenascin C als Barriere für das weitere Vordringen des Tumors ins Gewebe wirkt, während andere in den anti-adhäsiven Eigenschaften des Moleküls stimulierende Eigenschaften für die Ausbreitung und letztendlich die Metastasierung der Karzinome sehen (Mai et al., 2002).

Ein in der modernen molekularbiologisch-genetisch orientierten Forschung häufig angewandtes Verfahren zur Testung der Funktion bestimmter Gene ist die Erzeugung von „knockout“-Mutanten. Meist arbeitet man dabei im Mäusemodell. Auch für das Tenascin C wurden derartige TN-C^{-/-} Mutanten erzeugt (Saga et al., 1992, Forsberg et al., 1996). Zur großen Überraschung zeigten sich die für Tenascin C defizienten Mäuse lebensfähig und fertil. Es war kein offensichtlicher abnormaler Phänotyp ausgeprägt. Es wird diskutiert, ob nicht die anderen paralogen Proteine der Tiere die Funktion der disrumpten Gene ganz oder teilweise ersetzen können. Es besteht also immer noch eine gewisse Unsicherheit in der Zuweisung von Funktionen an das Tenascin-C-Protein.

4.1.2 Tenascin R (TN-R)

Tenascin R wurde unter dem Namen Restrictin erstmals beim Huhn (Rathjen et al., 1991) und als J1-160/180 bei der Ratte (Pesheva et al., 1989) beschrieben. Die Sequenzen beider Proteine wurden bestimmt (Nörenberg et al., 1992, Fuss et al., 1993). Alternatives Spleißen führt zur Ausbildung von 2 Formen des TN-R mit Molekulargewichten von 160 kDa und 180 kDa. Die Moleküle lassen sich im Gegensatz zum TN-C nur im Zentralnervensystem nachweisen (Pesheva et al., 1989). Mit immunhistochemischen Methoden wurde nachgewiesen, dass das 160 kDa große Molekül hauptsächlich in der Molekularschicht der Kleinhirnrinde ausgeprägt wird, während die 180 kDa große Variante vorwiegend in der weißen Substanz und der Körnerschicht der Kleinhirnrinde vorkommt. Die höchste Expression des TN-R findet sich während der Embryonalentwicklung des ZNS. Im adulten Organismus ist die Expression geringer und findet sich in Oligodendrozyten und inhibitorischen Interneuronen des Kleinhirns, in bestimmten Bereichen des Hippocampus, in motorischen Neuronen des Rückenmarks und in der Retina (Fuss et al., 1993). Die extrazelluläre Matrix (ECM) des Nervensystems beeinflusst das Zusammenspiel von neuronalen und Gliazellen, hat regulierende Wirkung auf die Zellmigration, das Überleben der Zellen, die Zelldifferenzierung, das Aussprossen von Axonen und die Bildung von Synapsen (Bukalo et al., 2001, Pesheva et al., 1994). In diesem Kontext spielt das

Zusammenwirken der Tenascine mit Proteoglycanen der extrazellulären Matrix eine bedeutende Rolle. Zu den wichtigen Proteoglycanen in der ECM des Nervensystems zählen Brevican, Neurocan und Phosphacan (Brückner et al., 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass sich die Funktion von TN-R durch spezifische Glykosylierung verändert (Woodworth et al., 2002, 2004). Die funktionelle Analyse von TN-R an „knockout“-Mutanten führte wie bei TN-C nicht zu einem auffälligen Phänotyp. Die Mäuse waren vital und pflanzten sich fort. Subtilere Analysen elektrophysiologischer Parameter und des Verhaltens ergaben jedoch Abweichungen in der Nervenleitgeschwindigkeit, der Erregbarkeit im Hippocampusbereich, sowie Störungen der Feinmotorik und ein verstärktes Angstverhalten (Weber et al., 1999, Freitag et al., 2003, Brenneke et al., 2004, Gurevicius et al., 2004). Wegen der vermuteten Redundanz zwischen den verschiedenen Tenascinen wird eine endgültige Antwort auf die Frage nach der Funktion dieser Moleküle wohl erst möglich sein, wenn es gelingt Tiere sowohl für TN-C als auch für TN-R und TN-X defizient zu züchten (Joester und Faissner, 2001).

4.1.3 Tenascin X (TN-X)

TN-X ist das größte Tenascin mit über 400 kDa Molekulargewicht. Sein modularer Aufbau ist dem der anderen Tenascine ähnlich. Es findet sich ubiquitär in humanen fetalen Geweben, wie Skelett, Herz- und glatter Muskulatur und in den fetalen Testes (Bristow et al., 1993). TN-X wurde auch im peripheren Nervensystem (Endo- und Perineurium) nachgewiesen. Die Funktion dieses Proteins wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Sie reicht von einer minimalen Funktion bis zur Verhinderung der Invasion maligner Zellen (Matsumoto et al. 2002, Minamitani et al., 2002).

4.1.4 Tenascin Y und Tenascin W

Tenascin Y wurde als neues Molekül beschrieben, das von differenzierten Fibroblasten des Muskels sezerniert wird. Es enthält neben den für die Tenascine bekannten EGF- und FNIII-Repetitionen ein neues strukturelles Element, die SPX-Domäne (Hagios et al., 1996). TN-Y wurde inzwischen auch im sich entwickelnden ZNS und im peripheren Nervensystem nachgewiesen (Faissner, 1997, Tucker et al., 1999). Tenascin W ist ein verwandtes Molekül, das aus dem Zebrafisch isoliert wurde (Weber et al., 1998). Über die Funktion von beiden Proteinen ist bisher nichts bekannt.

4.2 Plasticin

Dieses Protein wurde von einem der monoklonalen Antikörper erkannt. Der Antikörper färbte in drei Tage alten Zebrafischembryonen Strukturen im Gehirn, im Rückenmark und der Retina an. Die Muskulatur wurde schwach angefärbt. Das Protein wurde aus einem Totallysat des Zebrafischs immunpräzipitiert, das Immunpräzipitat in Probenpuffer solubilisiert und in der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennt. Die mit Coomassie R 250 angefärbten

Proteinbanden wurden ausgeschnitten, einem tryptischen Abbau unterworfen und die Peptide eluiert. Die Peptide wurden massenspektrometrisch an einem MALDI-TOF-Massenspektrometer vermessen und das Protein mit dem Mascot-Suchprogramm identifiziert. Die im Massenspektrometer aufgefundenen Peptide deckten etwa 25% der Sequenz des Zebrafisch-Plasticins ab und waren damit hochsignifikant.

Plasticin gehört zu der großen Gruppe der intermediären Filamente. Der Name bezieht sich auf den charakteristischen Durchmesser der Filamente von 8-10 nm, der zwischen demjenigen von Aktinfilamenten (6 nm) und von Mikrotubuli (24 nm) liegt. Die intermediären Filamente sind in 5 Klassen aufgeteilt (Cooper et al., 1996, Reimer et al., 1991). Die intermediären Filamente sind im Zytoplasma aller Zellen ubiquitär verbreitet und bilden in verschiedenen Kombinationen das Zytoskelett. Auch in neuronalen Geweben finden sich intermediäre Filamente und werden hier als Neurofilamente bezeichnet. Aggregate von Neurofilamenten werden bei mehreren Erkrankungen des ZNS, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und bei der amyotrophen Lateralsklerose, als sogenannte Lewy-Körper beobachtet (Yen et al., 1986). Es ist jedoch noch immer unklar, ob sie in der Pathogenese dieser Krankheiten eine Rolle spielen.

Neurofilamente gehören zu den intermediären Filamenten. Neuronale intermediäre Filamente sind Heteropolymere, die aus verschiedenen Untereinheiten bestehen, bestimmte biochemische Eigenschaften und ein definiertes Expressionsmuster haben. Zu den neuronalen intermediären Filamenten gehören α -Internexin, Peripherin, Nestin, Vimentin, Desmin, sowie NF-L, NF-M und NF-H. Als erstes der Neurofilamentproteine wurde NF beschrieben (Hoffman und Lasek, 1975). Es ist reichlich in den großen myelinisierten Axonen vorhanden. Das Neurofilamentprotein ist aus drei Polypeptiden aufgebaut, die entsprechend ihrer Molekulargewichte als NF-L (light), NF-M (moderate) und NF-H (heavy) bezeichnet werden. Diese drei Polypeptide sorgen durch ihren obligaten Aufbau für einen bestimmten Durchmesser des Axons, was als wichtig für die Nervenleitgeschwindigkeit angesehen wird. Bei den Säugetieren werden in der frühen Entwicklung der neuronalen Zellen zunächst die Keratine K8 und K18 exprimiert, darauf folgt eine transiente Expression von Nestin (Lendahl et al., 1990) und Vimentin (Cochard und Paulin, 1984). In postmitotischen Neuronen hört die Expression von Vimentin und Nexin auf, und die Bildung der Neurofilament-Triplettproteine NF-L, NF-M und NF-H beginnt und steigert sich während der weiteren Embryonalentwicklung und postnatal (Shaw und Weber, 1982, Cochard und Paulin, 1984). Zwei weitere Proteine, α -Internexin (Kaplan et al., 1990) und Peripherin (Portier et al., 1983/84), kommen in ausdifferenzierten Neuronen im zentralen und peripheren Nervensystem vor. α -Internexin wurde erstmals aus dem Nervus opticus der Ratte isoliert (Fliegner et al., 1990). α -Internexin ist zur Ausbildung von Homopolymeren fähig (Kaplan et al., 1990). In ausgereiften Neuronen des ZNS sind α -Internexin und NF-L in etwa gleich verteilt. Neuronen mit kurzen Axonen exprimieren viel α -Internexin, während Neurone mit langen Axonen vorwiegend NF-Proteine haben (Kaplan et al., 1990, Fliegner et al., 1994).

Peripherin wurde erstmals als ein 56-57 kDa großes Protein aus Neuroblastom-Zellen und der PC12-Zelllinie (Phaeochromocytom) isoliert (Portier et al., 1983/84, Parysek und Goldman, 1987). Peripherin wird im Gegensatz zu den NF-Proteinen vorwiegend in den Ganglien der

sensorischen Nerven, des N. sympathicus und in den motorischen Kernen der Hirnnerven III-VII, X und XII, sowie in Motoneuronen des ventralen Horns des Rückenmarks exprimiert (Troy et al., 1990a, 1990b) Es wird vermutet, dass die verschiedenen Verteilungsmuster der Neurofilamentproteine während der Embryonalentwicklung und bei adulten Organismen etwas mit den Bedingungen der axonalen Wachstumsphase zu tun haben (Glasgow et al., 1992, 1994, Zhao und Szaro, 1997).

Die neuronalen Filamente der Nichtvertebraten sind denen der Vertebraten homolog. Es wurden jedoch bisher zwei Ausnahmen beschrieben. Goldfisch und Zebrafisch exprimieren kein Peripherin, sondern ein homologes Protein - das Plasticin. *Xenopus laevis* exprimiert in Axonen und neuralen Wachstumskoni ein nIF-ähnliches Protein, das Tanabin (Hemmati-Brivanlou et al., 1992). Plasticin gehört zu den Neurofilament-Proteinen und ist das Peripherin-Homolog der Nichtvertebraten (Gervasi et al., 2000). Im Gegensatz zu Peripherin, das Homopolymere bilden kann (Cui et al., 1995), fehlt dem Plasticin diese Fähigkeit (Asch und Schechter, 2000). Die Expression von Plasticin nimmt während der axonalen Regeneration zu (Oblinger et al., 1989). Canger et al. haben (1998) die Plasticinexpression während der Embryonalentwicklung des Zebrafischs untersucht. Plasticin wird in den retinalen Ganglienzellen während des axonalen Wachstums exprimiert. In späteren Entwicklungsphasen erscheint es auch in den Hirnnerven. Bei Verletzung des Nervus opticus des Zebrafischs und des Goldfischs zeigte sich eine Erhöhung der mRNS-Spiegel für Plasticin und Gefiltin in der Retina der Fische. Das Plasticin steigt nach einer Verletzung schnell an und erreicht ein Maximum um den 20. Tag. Das Gefiltin steigt später an mit einem Maximum etwa um den 40. Tag nach Setzen der Verletzung. Danach sinken die Spiegel wieder auf das Basalniveau ab. Beide neuronale intermediäre Filamente scheinen demnach bei der Axogenese eine integrale Rolle zu spielen (Asch et al., 1998). Außerdem findet sich eine Altersabhängigkeit in der Expression des Plasticins. Junge retinale Ganglienzellen, die sich in der peripheren Netzhaut befinden, exprimieren Plasticin, während ältere Zellen in der Mitte der Retina kein Plasticin enthalten (Fuchs et al., 1994, Glasgow et al., 1992). Gefiltin findet sich hingegen nicht in jungen, sondern in ausgereiften Retinazellen (Glasgow et al., 1994). Plasticin ist damit eng mit der Plastizität neuronaler Zellen während der Axogenese verknüpft.

4.3 TOP_{AP}

Unter den spezifisch mit neuronalen Geweben reagierenden monoklonalen Antikörpern fand sich ein monoklonaler Antikörper, der sowohl mit embryonalen als auch adulten Hirnen und Rückenmark und mit Retina reagierte. Das Protein wurde in einer Genbank in Lambda-Phagen als ein homologes Protein zum TOP_{AP}-Protein identifiziert. Es wies in der Aminosäuresequenz eine 99%ige Identität auf. Dieses Protein ist nahe verwandt mit den sogenannten Sarcolemm-assoziierten Proteinen (SLAPs), mit denen es bis zu 76% identisch ist. Diese Proteine sind vorwiegend im Herzmuskel und in der glatten Muskulatur nachzuweisen, Sie befinden sich sowohl in der Plasmamembran als auch in internen Membranen der Zelle. Es wird vermutet, dass sie eine wesentliche Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen spielen (Wigle et al., 1997, Wielowieyski et al., 2000). Eine genauere Funktionsbeschreibung steht aber noch aus.

4.4 VAT-1-Protein

Von den 17 mit neuronalen Organen des Zebrafischs reagierenden monoklonalen Antikörpern reagierten 2 Antikörper mit Randbezirken der Gehirn- und Rückenmarksanlage in 1 Tag alten Zebrafischembryonen. Auch bei älteren Embryonen und adulten Tieren war die immunhistochemische Anfärbbarkeit auf Gehirn, Rückenmark und Retina beschränkt. Kreuzreaktionen mit den Organen anderer Spezies wurden nicht beobachtet. Mittels Expression des Zebrafischgenoms in einer Genbank wurde das zugrunde liegende Protein als das VAT-1-Protein des Zebrafischs identifiziert.

Das Vat-1-Protein wurde erstmals aus dem elektrischen Organ des pazifischen Zitterrochens (*Torpedo californica*) isoliert und sequenziert (Linial et al., 1989). Vat-1 ist ein 41 kDa großes Protein, das sich in den synaptischen Vesikeln des elektrischen Organs befindet. Das Protein weist eine ATP- und Ca_2^+ -Bindungsfähigkeit, sowie eine moderate ATPase-Aktivität auf (Linial und Levis, 1993a, Levis und Linial, 1993). Das Vat-1-Protein bildet mit anderen Proteinen der synaptischen Membran einen hochmolekularen Komplex mit einem Molekulargewicht von 176 kDa (Linial, 1993). Die synaptischen Vesikel sind Speicherorganellen der Nervenenden, die eine große Rolle in der Überleitung von neuronalen Signalen und bei der Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten entlang der synaptischen Membran spielen. Vorgänge wie Ladung, Speicherung und Ausschüttung von Neurotransmittern sind an Membranproteine der synaptischen Vesikel gebunden. Mehrere Proteine der Vesikelmembran wurden identifiziert, wie z.B. p65 Synaptotagmin (Wendland et al., 1991), VAMP/Synaptobrevin (vesicle-associated membrane protein 1) (Trimble et al., 1988), GTP-bindendes Protein (Ngsee et al., 1990) und Synaptophysin (Cowan et al., 1990). Die Rolle der Einzelproteine im Prozess der Signalübertragung an den Synapsen und die Funktion von Vat-1 in diesem Kontext ist jedoch derzeit noch nicht geklärt.

Bei der Suche nach homologen Proteinen bei Säugern gelang es, aus Zellen des Ehrlich-Aszites-Tumors der Maus ein Protein zu isolieren, das 53%ige Identität mit dem Protein des Zitterrochens hat (Hayess et al., 1998). Auch ein menschliches homologes Protein wurde identifiziert. Es wurde bei der Sequenzierung des BRCA1-Gens in der Nähe dieses Locus entdeckt (Friedman et al., 1995). BRCA1 zeigt chromosomale Instabilität und prädisponiert für die Entstehung von Mamma- und Ovarialkarzinomen (Hall et al., 1992). Es ist bisher nicht bekannt, ob das Vat-1-Gen ähnliche chromosomale Instabilitäten zeigt. Bei Datenbankvergleichen des murinen und des humanen Vat-1-Homologs ergab sich eine mäßige Verwandtschaft (26-27% Identität) zum zeta-Kristallin der Augenlinse (Linial, 1993). Das Vat-1-Protein der Säuger bildet eine Subgruppe der Protein-Superfamilie mittellanger Dehydrogenasen/Reduktasen (Persson et al., 1994). Die Repräsentation dieser Verwandtschaftsverhältnisse ist im Stammbaum der Abbildung 4-2 wiedergegeben. Eine definierte Funktion für das Vat-1-Protein der Säuger ist bisher nicht beschrieben. Eine neuere Arbeit weist auf eine Funktion des humanen VAT-1 bei der Bildung von Keratinozyten hin (Koch et al., 2003).

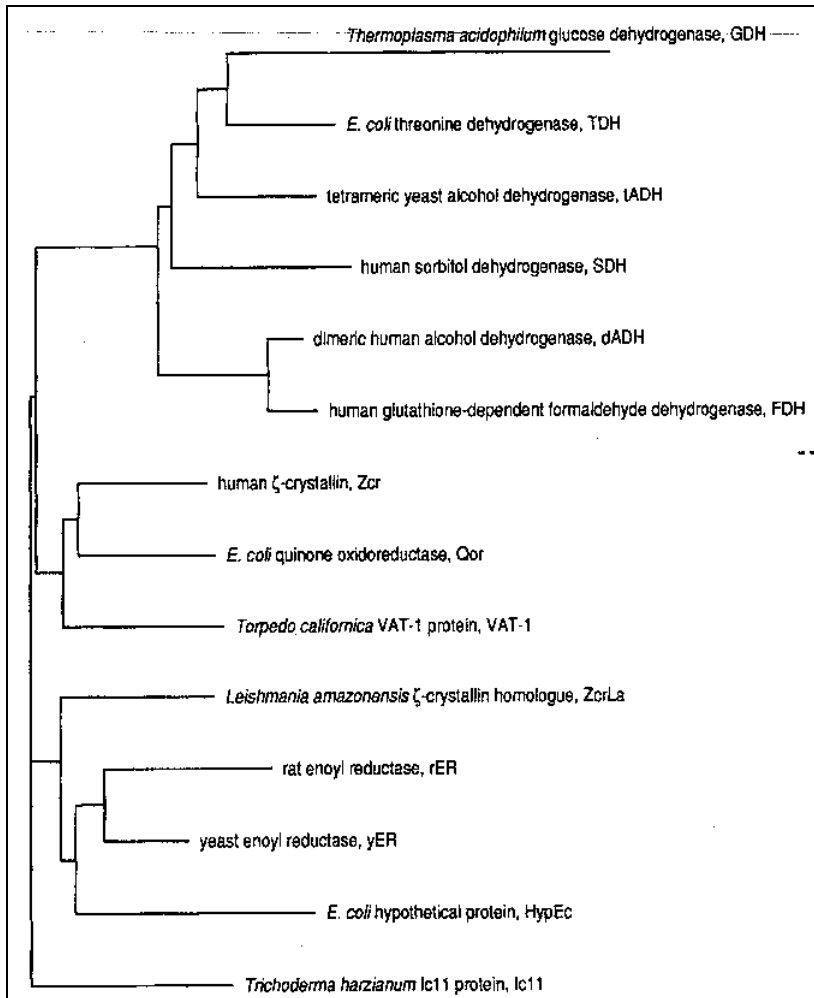


Abbildung 4-2: Phylogenetischer Baum der Gruppe der Dehydrogenasen/Reduktasen, erstellt anhand der Sequenzanalyse. (aus Persson et al., 1994).

4.5 Kreuzreagierende Monoklonale Antikörper

Außerhalb des Rahmens dieser Doktorarbeit waren monoklonale Antikörper gegen Antigene verschiedener Herkunft hergestellt worden. Im Rahmen der Dissertation wurden etwa 170 Antikörper auf Kreuzreaktionen mit neuronalen Strukturen beim Zebrafisch getestet. Fünf Antikörpergruppen, die dieses Verhalten zeigten, wurden ausgewählt und auch an 8 anderen Spezies (Huhn, Hund, Kaninchen, Katze, Schwein, Maus, Ratte, Rind) auf Kreuzreaktivität untersucht. Als Antigene dienten das ZBP-89- Protein (Transkriptionsfaktor des Epstein-Barr-Virus), die ε-Kette der humanen Proteinkinase C, die A-Kette der humanen Phosphatase 2A, das humane PAX9-Protein (Transkriptionsfaktor) und das DNA-Bindungsprotein PUR alpha (mit besonderer Affinität für Replikationsursprünge). Die meisten Antikörper reagierten mit dem Hirngewebe aller getesteten Spezies. Die Anfärbung in Kleinhirnarealen war etwas ausgeprägter als im Großhirn. Einzelne Antikörper gegen PAX9 reagierten nicht mit Hirngeweben aller Spezies.

4.6 Parkin

Zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern gegen dieses interessante Protein, das mit der Pathogenese des Morbus Parkinson in Zusammenhang gebracht wird, wurde ein anderer Immunisierungsweg beschritten als bei den Versuchen mit Zebrafischen. Je 2 Mäuse und 2 Ratten wurden mit einem Fusionsprotein des Parkins immunisiert. Das Antigen war am N-Terminus mit einer His-Sequenz versehen und war in 8 Molarem Harnstoff gelöst. Alle Fusionen mit Milzzellen der Maus führten zu Klonen, die keine spezifischen Antikörper bildeten. Aus über 800 getesteten Klonen konnten nur 3 Klone isoliert werden, die nicht mit E.coli-Proteinen reagierten. Alle 3 Antikörper reagierten mit Parkin im Western-Blot. Das Parkin war als Fusionsprotein mit einer myc-Markierung exprimiert. Die histochemische Analyse an Gehirnschnitten von Menschen und anderen Spezies verlief jedoch enttäuschend. Zwei der Antikörper reagierten mit keinem der getesteten Schnitte. Ein Antikörper färbte einzelne Zellen im menschlichen Gehirn, die in ihrer Verteilung aber nicht dem Muster entsprachen, wie es für das Parkin erwartet wurde.

Der Morbus Parkinson ist mit einer Prävalenz von 1% bei den 65-Jährigen und 4-5% bei den 85-Jährigen die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung des Menschen. Die Krankheit kann entweder sporadisch (idiopathisch) oder familiär gehäuft mit genetischen Hintergrund auftreten. Dieses familiär gehäufte Auftreten der Krankheit bietet die Möglichkeit, die mit der Krankheit verknüpften Gene genauer zu definieren. Beim Morbus Parkinson sind bisher 10 solcher Gene bekannt (Dawson und Dawson, 2003), die mit PARK1 bis PARK10 bezeichnet werden. Bisher wurden autosomal dominante, aber auch autosomal rezessive Erbgänge festgestellt. Während sporadische Fälle von Morbus Parkinson Erkrankungen des höheren Lebensalters sind, zeigen sich die erblichen Formen oft schon in früheren Lebensabschnitten. Während die Pathogenese des sporadischen Morbus Parkinson noch weitgehend ungeklärt ist, kommen Mutationen als Mechanismus für die erblichen Formen der Krankheit in Frage. Autosomal dominante Erbgänge der Krankheit sind bisher auf wenige Familien mit Morbus Parkinson beschränkt. Häufiger ist der autosomal rezessive Erbgang, wie er für die Gene PARK2, PARK6 und PARK7 beschrieben ist (Dawson und Dawson, 2003, Valente et al., 2001). Nicht allen Genen sind bisher auch spezifische Gene zugeordnet. Für Gene, wo ein solcher Zusammenhang existiert, folgt eine kurze Beschreibung der Gene und ihres vermutlichen Zusammenhangs mit dem Morbus Parkinson.

4.6.1 α -Synuclein (PARK1)

α -Synuclein ist ein Protein, das mit den synaptischen Vesikeln assoziiert ist (Maroteaux et al., 1991). Das Protein besteht aus 140 Aminosäuren, enthält unvollständige Heptamer-Wiederholungen am N-Terminus, einen anschließenden hydrophoben Bereich und eine saure carboxyterminale Region (Clayton und George, 1998). Beim Menschen wurden 3 verschiedene Synucleine (α -, β -, und γ -Synuclein) nachgewiesen, die von 3 verschiedenen Genen repräsentiert werden. Synucleine sind ubiquitäre Hirnproteine, deren physiologische Funktionen noch unbekannt sind. Eine Mutation des α -Synucleins (A53T) wurde in einigen Familien beschrieben und ist mit einem autosomal dominanten Erbgang des Morbus

Parkinson verbunden. (Polymeropoulos et al., 1997). Mutanten und proteolytische Abbauprodukte des α -Synukleins neigen zur Aggregation und Fibrillenbildung und sind Bestandteil der Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten, die in degenerierten neuronalen Zellen beim idiopathischen Morbus Parkinson gefunden werden (Frautschy et al., 1998, Dawson und Dawson, 2003, Giasson und Lee, 2003). Fragmente des α -Synucleins wurden auch in den senilen Plaques bei Morbus Alzheimer gefunden (Ueda et al., 1993). Es ist jedoch nicht klar, ob mit diesem Befund eine aktive Rolle des Proteins in der Pathogenese des Morbus Alzheimer verbunden ist.

4.6.2 Parkin (PARK2)

Das Parkin-Gen wurde bei der Analyse einer Erbkrankheit in der japanischen Population beschrieben, die mit autosomal rezessivem Erbgang zum Einsetzen des Morbus Parkinson schon in frühen Jahren führt (Kitada et al., 1998). Das Protein, das von diesem Gen kodiert wird, besteht aus 465 Aminosäuren. Es enthält am N-Terminus eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (Ubl), gefolgt von einem Mittelabschnitt und zwei RING-Fingermotiven am Carboxyterminus, die durch ein IBR-(in between RING-fingers) Modul getrennt sind. Parkin besitzt eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Als Substrate wurden CDCrel-1, Synphilin-1 und Pael-R identifiziert (Giasson und Lee, 2003, Dawson et Dawson, 2003). Parkin kann mit seiner Ubl-Domäne direkt an das 26S-Proteasom binden (Sakata et al., 2003). Damit wird wahrscheinlich, dass Parkin eine entscheidende Rolle bei der Bindung verfalteter oder aggregierter Proteine spielt, indem es sie ubiquitiniert und dem Abbau durch das Proteasom zuführt (Imai et al., 2000, Dawson und Dawson, 2003, Giasson und Lee 2003, Cookson, 2003). Mutationen im Parkin, die zu verminderter Aktivität oder zum Funktionsausfall führen, hätten eine Ansammlung verfalteter Proteine oder toxischer Abbauprodukte von Proteinen zur Folge, die ihrerseits zur Zellschädigung und zur Neurodegeneration führen. In diesem Zusammenhang erscheint eine Publikation von Bedeutung, die über eine bessere Degradation polyglutaminreicher Proteine, die bei Morbus Huntington und einigen erblichen cerebellaren Ataxien auftreten, durch überexprimiertes Parkin berichtet (Tsai et al., 2003). Über die Frage, ob mutiertes Parkin eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Morbus Parkinson spielt, wird noch diskutiert (Dawson und Dawson, 2003, Giasson und Lee, 2003, Cookson, 2003).

4.6.3 Ubiquitin-C-terminale Hydrolase (PARK5)

Die Ubiquitin C-terminale Hydrolase findet sich in vielen Zellen des Nervensystems. Ihr Vorkommen in Lewy-Körperchen und den „paired helical filaments“ beim Morbus Alzheimer wurde nachgewiesen (Lowe et al., 1990). Die physiologische Rolle des Proteins besteht in der Abspaltung des Ubiquitins von polyubiquitinierten Proteinen und damit ihrer Zuführung zum Abbau im Proteasom (Larsen et al., 1998). Über die Bedeutung der Ubiquitin C-terminalen Hydrolase in der Pathogenese des Morbus Parkinson ist bisher wenig bekannt.

4.7 Generelle Beurteilung der Versuche

Die Idee, durch Immunisierung von Ratten mit Lysaten aus Organen und Geweben des Zebrafischs ein großes Spektrum monoklonaler Antikörper zu erzeugen, war faszinierend. Das Modellsystem Zebrafisch ist gut zu handhaben und bietet keine logistischen Probleme bei der Versorgung mit Untersuchungsmaterial und der Auswahl interessanter Antikörper.

In ersten Versuchen an Ganzkörperschnitten (Pregel, Dissertation, 2000) waren besonders die sich entwickelnden neuronalen Strukturen von einigen Antikörpern deutlich und extensiv angefärbt worden. Daher konzentrierte sich diese Arbeit vor allem auf die Charakterisierung dieser Antikörper und den Versuch, die zugehörigen Antigene zu isolieren und zu charakterisieren. Letztendlich wurden aus drei Fusionen mit mehr als 200 getesteten Klonen 17 ausgewählt und näher untersucht. Alle 17 Klone reagierten ausschließlich mit Geweben neuronalen Ursprungs. Mit diesem Ansatz konnten die Proteine Tenascin R, Plasticin, VAT-1 und TOP_{AP} des Zebrafischs isoliert werden. Alle Proteine waren schon vorher von anderen Autoren charakterisiert worden. Sie sind mehr oder weniger ubiquitär im neuronalen Gewebe vorhanden. Es gelang nicht, neue oder an spezielle Entwicklungsstufen gekoppelte Antigene zu definieren. Dieses Ergebnis ist in Zusammenhang mit der Immunisierungstechnik zu bringen. Wahrscheinlich führt das Überangebot an Antigenen bei Immunisierung mit Organ- oder Ganzkörperlysaten zu einer Auswahl solcher Antigene, die vom Antigenerkennungssystem der immunisierten Tiere leicht prozessiert werden können. Damit geraten abundant auftretende Antigene in Vorteil, während Minordeterminanten unterdrückt werden oder nur selten antikörperbildende B-Zellen induzieren. Sind derartige B-Zellen als Fusionspartner aktiv, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass sie von Klonen gegen abundant auftretende Antigene überwachsen werden. Damit fällt für die Herstellung von spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen definierte Antigene die „Schrotschuss“-Immunisierung als ungeeignetes Verfahren aus. Sie ist zu zeitraubend, arbeits- und kostenintensiv. Für diese Zwecke empfiehlt es sich, mit gentechnisch hergestellten Fusionsproteinen oder an Carrierproteine gekoppelten Peptiden aus interessierenden Proteindomänen zu arbeiten. Das auch diese Ansätze nicht vor Fehlschlägen schützen, zeigen die Versuche, monoklonale Antikörper gegen Parkin herzustellen. Obwohl im ELISA antigenspezifische Antikörper nachgewiesen wurden, die auch im Western-Blot das gesuchte Antigen erkannten, scheiterten alle Versuche, das Protein in der Histologie nachzuweisen. Als Ursache kommt eine Denaturierung des Antigens durch Fixierungsschritte, die zur Folge hat, dass das vom Antikörper erkannte Epitop so verändert ist, dass eine Bindung nicht mehr nachgewiesen werden kann. Diese Imponderabilien werden sich nicht immer vermeiden lassen, da die wichtigen Schritte der Antigenpräsentation in einem biologischen Organismus erfolgen und ihre Abfolge der experimentellen Kontrolle weitgehend entzogen ist.

5 Literaturverzeichnis

Akerstrom, B., Brodin, T., Reis, K., Bjorck, L. (1985). Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol*, *135*, 2589-2592.

Alberts, B. (1998). The cell as a collection of protein machines: Preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*, *92*, 291-294.

Amores, A., Force, A., Yan, Y.L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.L., Westerfield, M., Ekker, M., Postlethwait J.H. (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, *282*, 1711-1714.

Asch, W.S., Leake, D., Canger, A.K., Passini, M.A., Argenton, F., Schechter, N. (1998). Cloning of zebrafish neurofilament cDNAs for plasticin and gefiltin: increased mRNA expression in ganglion cells after optic nerve injury. *J Neurochem*, *71*, 20-32.

Asch, W.S., Schechter, N. (2000). Plasticin, a type III neuronal intermediate filament protein, assembles as an obligate heteropolymer: implications for axonal flexibility. *J Neurochem*, *75*, 1475-1486.

Baumann, M., Feederle, R., Kremmer, E., Hammerschmidt, W. (1999). Cellular transcription factors recruit viral replication proteins to activate the Epstein-Barr virus origin of lytic DNA replication, oriLyt. *EMBO J*, *18*, 6095-6105.

Bedell, M.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. (1997a). Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev*, *11*, 1-10.

Bedell, M.A., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. (1997b). Mouse models of human disease. Part II: recent progress and future directions. *Genes Dev*, *11*, 11-43.

Berek, C., Milstein, C. (1988). Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol Rev*, *96*, 23-41.

Bjorck, L., Kronvall, G. (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol*, *133*, 969-974.

Brand, M., Wittbrodt, J. (1999). Zebraabärbling und Medaka als Modellorganismen der Entwicklungsbiologie. *Biospektrum*, *6*, 437-442.

Brenneke, F., Bukalo, O., Dityatev, A., Lie, A.A. (2004). Mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R show physiological and structural hallmarks of increased hippocampal excitability, but no increased susceptibility to seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Neuroscience*, *124*, 841-855.

Bristow, J., Tee, M.K., Gitelman, S.E., Mellon, S.H., Miller, W.L. (1993). Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J Cell Biol*, *122*, 265-278.

- Brownlie, A., Donovan, A., Pratt, S.J., Paw, B.H., Oates, A.C., Brugnara, C., Witkowska, H.E., Sassa, S., Zon, L.I. (1998). Positional cloning of the zebrafish sauterne gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nat Genet*, *20*, 222-223.
- Brückner, G., Grosche, J., Hartlage-Rubsamen, M., Schmidt, S., Schachner, M. (2003). Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. *J Chem Neuroanat*, *26*, 37-50.
- Brüggemann, M., Neuberger, M.S. (1996). Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice. *Immunol Today*, *17*, 391-397.
- Bukalo, O., Schachner, M., Dityatev, A. (2001). Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience*, *104*, 359-369.
- Canger, A.K., Passini, M.A., Asch, W.S., Leake, D., Zafonte, B.T., Glasgow, E., Schechter, N. (1998). Restricted expression of the neuronal intermediate filament protein plasticin during zebrafish development. *J Comp Neurol*, *399*, 561-572.
- Carnemolla, B., Leprini, A., Borsi, L., Querze, G., Urbini, S., Zardi, L. (1996). Human tenascin-R. Complete primary structure, pre-mRNA alternative splicing and gene localization on chromosome 1q23-q24. *J Biol Chem*, *271*, 8157-8160.
- Chiquet-Ehrismann, R. (2004). Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol*, *36*, 986-990.
- Clayton, D.F., George, J.M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci*, *21*, 249-254.
- Collins, F.S. (1991). Of needles and haystacks: finding human disease genes by positional cloning. *Clin Res*, *39*, 615-623.
- Cochard, P., Paulin, D. (1984). Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J Neurosci*, *4*, 2080-2094.
- Cookson, M.R. (2003). Neurodegeneration: how does parkin prevent Parkinson's disease? *Curr Biol*, *13*, R522-R524.
- Cooper, J.A., Kiehart, D.P. (1996). Septins may form a ubiquitous family of cytoskeletal filaments. *J Cell Biol*, *134*, 1345-1348.
- Cowan, D., Linial, M., Scheller, R.H. (1990). Torpedo synaptophysin: evolution of a synaptic vesicle protein. *Brain Res*, *509*, 1-7.
- Crossin, K.L., Hoffman, S., Grumet, M., Thiery, J.P., Edelman, G.M. (1986). Site-restricted expression of cytactin during development of the chicken embryo. *J Cell Biol*, *102*, 1917-1930.

- Cui, C., Stambrook, P.J., Parysek, L.M. (1995). Peripherin assembles into homopolymers in SW13 cells. *J Cell Sci*, *108*, 3279-3284.
- Daniloff, J.K., Crossin, K.L., Pincon-Raymond, M., Murawsky, M., Rieger, F., Edelman, G.M. (1989). Expression of cytotactin in the normal and regenerating neuromuscular system. *J Cell Biol*, *108*, 625-635.
- Dawson, T.M., Dawson, V.L. (2003). Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J Clin Invest*, *111*, 145-151.
- Driever, W., Stemple, D., Schier, A., Solnica-Krezel, L. (1994). Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet*, *10*, 152-159.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Malicki, J., Stemple, D.L., Stainier, D.Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., Boggs, C. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, *123*, 37-46.
- Engvall, E., Perlman, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, *8*, 871-874.
- Engvall, E., Perlmann, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol*, *109*, 129-135.
- Erickson, H.P. (1993). Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol*, *5*, 869-876.
- Faissner, A. (1997). The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res*, *290*, 331-341.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M. et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* rd. *Science*, *269*, 496-512.
- Fliegner, K.H., Kaplan, M.P., Wood, T.L., Pintar, J.E., Liem, R.K. (1994). Expression of the gene for the neuronal intermediate filament protein alpha-internexin coincides with the onset of neuronal differentiation in the developing rat nervous system. *J Comp Neurol*, *342*, 161-173.
- Fliegner, K.H., Ching, G.Y., Liem, R.K. (1990). The predicted amino acid sequence of alpha-internexin is that of a novel neuronal intermediate filament protein. *EMBO J*, *9*, 749-755.
- Forsberg, E., Hirsch, E., Frohlich, L., Meyer, M., Ekblom, P., Aszodi, A., Werner, S., Fassler, R. (1996). Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proc Natl Acad Sci*, *93*, 6594-6599.

Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., Van Vught, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Venter, J.C. et al. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borellia burgdorferi*. *Nature*, *390*, 580-586.

Frautschy, S.A., Yang, F., Irrizarry, M., Hyman, B., Saido, T.C., Hsiao, K., Cole, G.M. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol*, *152*, 307-317.

Friedman, L.S., Ostermeyer, E.A., Lynch, E.D., Welch, P., Stabo, C.J., Meza, J.E., Anderson, L.A., Dowd, P.D., Lee, M.K., Rowell, S.E., Ellison, J., Boyd, J., King, M.C. (1995). 22 genes form chromosome 17q21: cloning, sequencing, and characterization of mutations in breast cancer families and tumors. *Genomics*, *25*, 256-263.

Freitag, S., Schachner, M., Morellini, F. (2003). Behavioral alterations in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Behav Brain Res*, *145*, 189-207.

Fuchs, C., Glasgow, E., Hitchcock, P.F., Schechter, N. (1994). Plasticin, a newly identified neurofilament protein, is preferentially expressed in young retinal ganglion cells of adult goldfish. *J Comp Neurol*, *350*, 452-462.

Fuss, B., Wintergerst, E.S., Bartsch, U., Schachner, M. (1993). Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin. *J Cell Biol*, *120*, 1237-1249.

Gatchalian, C.L., Schachner, M., Sanes, J.R. (1989). Fibroblasts that proliferate near denervated synaptic sites in skeletal muscle synthesize the adhesive molecules tenascin(J1), N-CAM, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Biol*, *108*, 1873-1890.

Gavin, A.C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A. et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, *415*, 141-147.

Genereux, D.P., Logsdon, J.M. (2003). Jr. Much ado about bacteria-to-vertebrate lateral gene transfer. *Trends Genet*, *19*, 191-195.

Gerber, J.K., Richter, T., Kremmer, E., Adamski, J., Hofler, H., Balling, R., Peters, H. (2002). Progressive loss of PAX9 expression correlates with increasing malignancy of dysplastic and cancerous epithelium of the human oesophagus. *J Pathol*, *197*, 293-297.

Gervasi, C., Steward, C.B., Szaro, B.G. (2000). *Xenopus laevis* peripherin (XIF3) is expressed in radial glia and proliferating neural epithelial cells as well as in neurons. *J Comp Neurol*, *423*, 512-531.

Giasson, B.I., Lee, V.M. (2003). Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell*, *114*, 1-8.

- Glasgow, E., Druger, R.K., Levine, E.M., Fuchs, C., Schechter, N. (1992). Plasticin, a novel type III neurofilament protein from goldfish retina: increased expression during optic nerve regeneration. *Neuron*, *9*, 373-381.
- Glasgow, E., Druger, R.K., Fuchs, C., Lane, W.S., Schechter, N. (1994). Molecular cloning of gefiltin (ON1): serial expression of two new neurofilament mRNAs during optic nerve regeneration. *EMBO J*, *13*, 297-305.
- Goding, J.W. (1983). *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, Inc., London, U.K.
- Goffeau, A., Aert, M.L., Agostini-Carbone, A., Ahmed, M., Aigle, L., Alberghina, K., Albermann, M., Albers, M., Aldea, D. et al. (1997). The Yeast Genome Directory. *Nature*, *387*, 1-105.
- Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., Hughes-Jones, N.C., et al. (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J*, *12*, 725-734.
- Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J. et al. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J*, *13*, 3245-3260.
- Gurevicius, K., Gureviciene, I., Valjakka, A., Schachner, M., Tanila, H. (2004). Enhanced cortical and hippocampal neuronal excitability in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Mol Cell Neurosci*, *25*, 515-523.
- Hagios, C., Koch, M., Spring, J., Chiquet, M., Chiquet-Ehrismann, R (1996). Tenascin-Y: a protein of novel domain structure is secreted by differentiated fibroblasts of muscle connective tissue. *J Cell Biol.*, *134*, 1499-1512.
- Halfter, W., Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R.P. (1989). The effect of tenascin and embryonic basal lamina on the behavior and morphology of neural crest cells in vitro. *Dev Biol*, *132*, 14-25.
- Hall, J.M., Friedman, L., Guenther, C., Lee, M.K., Weber, J.L., Black, D.M., King, M.C. (1992). Closing in on a breast cancer gene on chromosome 17q. *Am J Hum Genet*, *50*, 1235-1242.
- Hayess, K., Kraft, R., Sachsinger, J., Janke, J., Beckmann, G., Rohde, K., Jandrig, B., Benndorf, R. (1998). Mammalian protein homologous to VAT-1 of *Torpedo californica*: isolation from Ehrlich ascites tumor cells, biochemical characterization, and organization of its gene. *J Cell Biochem*, *69*, 304-315.
- Hemmati-Brivanlou, A., Mann, R.W., Harland, R.M. (1992). A protein expressed in the growth cones of embryonic vertebrate neurons defines a new class of intermediate filament protein. *Neuron*, *9*, 417-428.

Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A. et al. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, *415*, 180-183.

Hoffman, P.N., Lasek, R.J. (1975). The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol*, *66*, 351-366.

Howeedy, A.A., Virtanen, I., Laitinen, L., Gould, N.S., Koukoulis, G.K., Gould, V.E. (1990). Differential distribution of tenascin in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. *Lab Invest*, *63*, 798-806.

Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E., Crea, R. et al. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*, *85*, 5879-5883.

Imai, Y., Soda, M., Takahashi, R. (2000). Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem*, *275*, 35661-35664.

International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*, 860-921.

Jackson, V., Shires, A., Chalkley, R., Granner, D.K. (1975). Studies on highly metabolically active acetylation and phosphorylation of histones. *J Biol Chem*, *250*, 4856-4863.

Joester, A., Faissner, A. (2001). The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol*, *20*, 13-22.

Jones, F.S., Hoffman, S., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. (1989). A detailed structural model of cytotactin: protein homologies, alternative RNA splicing, and binding regions. *Proc Natl Acad Sci*, *86*, 1905-1909.

Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G. (1970). Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. *Anal Biochem*, *36*, 401-412.

Kaplan, M.P., Chin, S.S., Fliegner, K.H., Liem, R.K. (1990). Alpha-internexin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain. *J Neurosci*, *10*, 2735-2748.

Karas, M., Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, *60*, 2299-2301.

Karpas, A., Dremucheveva, A., Czepulkowski, B.H. (2001). A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci*, *98*, 1799-1804.

- Kawano, H., Ohyama, K., Kawamura, K., Nagatsu, I. (1995). Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Brain Res Dev Brain Res*, *86*, 101-113.
- Keynes, R.J., Cook, G.M. (1992). Repellent cues in axon guidance. *Curr Opin Neurobiol*, *2*, 55-59.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the Zebrafish. *Dev. Dyn*, *203*, 253-310.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, *392*, 605-608.
- Klose, J., Spielmann, H. (1975). Gel isoelectric focusing of mouse lactate dehydrogenase: heterogeneity of the isoenzymes A4 and X4. *Biochem Genet*, *13*, 707-720.
- Knapik, E.W., Goodman, A., Atkinson, O.S., Roberts, C.T., Shiozawa, M., Sim, C.U., Weksler-Zangen, S., Trolliet, M.R., Futrell, C., Innes, B.A., Koike, G., McLaughlin, M.G., Pierre, L., Simon, J.S., Vilallonga, E., Roy, M., Chiang, P.W., Fishman, M.C., Driever, W., Jacob, H.J. (1996). A reference cross DNA panel for zebrafish (*Danio rerio*) anchored with simple sequence length polymorphisms. *Development*, *123*, 451-460.
- Knapik, E.W., Goodman, A., Ekker, M., Chevrette, M., Delgado, J., Neuhaus, S., Shimoda, N., Driever, W., Fishman, M.C., Jacob, H.J. (1998). A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nat. Genet*, *18*, 338-343.
- Koch, J., Foekens, J., Timmermans, M., Fink, W., Wirzbach, A., Kramer, M.D., Schaefer, B.M. (2003). Human VAT-1: a calcium-regulated activation marker of human epithelial cells. *Arch Dermatol Res*, *295*, 203-210.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, *256*, 495-497.
- Kremmer, E., Ohst, K., Kiefer, J., Brewis, N., Walter, G. (1997). Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. *Mol Cell Biol*, *17*, 1692-1701.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., Klinman, D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, *374*, 546-549.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*, 860-921.

- Larsen, C.N., Krantz, B.A., Wilkinson, K.D. (1998). Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry*, *37*, 3358-3368.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B, McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, *60*, 585-595.
- Levius, O., Linial, M. (1993). VAT-1 from Torpedo synaptic vesicles is a calcium binding protein: a study in bacterial expression systems. *Cell Mol Neurobiol*, *13*, 483-492.
- Linial, M., Miller, K., Scheller, R.H. (1989). VAT-1: an abundant membrane protein from Torpedo cholinergic synaptic vesicles. *Neuron*, *2*, 1265-1273.
- Linial, M. (1993). VAT-1 from Torpedo electric organ forms a high-molecular-mass protein complex within the synaptic vesicle membrane. *Eur J Biochem*, *216*, 189-197.
- Linial, M., Levius, O. (1993a). The protein VAT-1 from Torpedo electric organ exhibits an ATPase activity. *Neurosci Lett*, *152*, 155-157.
- Linial, M., Levius, O. (1993b). VAT-1 from Torpedo is a membranous homologue of zeta crystallin. *FEBS Lett*, *315*; 91-94.
- Liu, B., Huang, L., Sihlbom, C., Burlingame, A., Marks, J.D. (2002). Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display. *J Mol Biol*, *315*, 1063-1073.
- Lochter, A., Taylor, J., Fuss, B., Schachner, M. (1994). The extracellular matrix molecule janusin regulates neuronal morphology in a substrate- and culture time-dependent manner. *Eur J Neurosci*, *6*, 597-606.
- Lowe, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R.J., Wilkinson, K.D. (1990). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *J Pathol*, *161*, 153-160.
- Ma, Z.W., Bergemann, A.D., Johnson, E.M. (1994). Conservation in human and mouse Pur alpha of a motif common to several proteins involved in initiation of DNA replication. *Gene*, *149*, 311-314.
- Mai, J., Sameni, M., Mikkelsen, T., Slogane, B.F. (2002). Degradation of extracellular matrix protein tenascin-C by cathepsin B: an interaction involved in the progression of gliomas. *Biol Chem*, *383*, 1407-1413.
- Maroteaux, L., Scheller, R.H. (1991). The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Brain Res Mol Brain Res*, *11*, 335-343.
- Martini, R., Schachner, M., Faissner, A. (1990). Enhanced expression of the extracellular matrix molecule J1/tenascin in the regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Neurocytol*, *19*, 601-616.

- Matsumoto, K., Takahashi, K., Yoshiki, A., Kusakabe, M., Ariga, H. (2002). Invasion of melanoma in double knockout mice lacking tenascin-X and tenascin-C. *Jpn J Cancer Res*, *93*, 968-975.
- Mighell, A.J., Thompson, J., Hume, W.J., Markham, A.F., Robinson, P.A. (1997). Human tenascin-C: identification of a novel type III repeat in oral cancer and of novel splice variants in normal, malignant and reactive oral mucosae. *Int J Cancer*, *72*, 236-240.
- Minamitani, T., Ariga, H., Matsumoto, K. (2002). Adhesive defect in extracellular matrix tenascin-X-null fibroblasts: a possible mechanism of tumor invasion. *Biol Pharm Bull*, *25*, 1472-1475.
- Mischak, H., Goodnight, J.A., Kölch, W., Martiny-Baron, G., Schaechtle, C., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., Pierce, J.H., Mushinski, J.F. (1993). Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem*, *268*, 6090-6096.
- Müller, W., Hassel, M. (1999). *Entwicklungsbiologie der Tiere und des Menschen: einführendes Lehrbuch der Embryologie, Entwicklungsgenetik und Entwicklungsphysiologie*. Springer Verlag, 110-115.
- Ngsee, J.K., Miller, K., Wendland, B., Scheller, R.H. (1990). Multiple GTP-binding proteins from cholinergic synaptic vesicles. *J Neurosci*, *10*, 317-322.
- Nörenberg, U., Wille, H., Wolff, J.M., Frank, R., Rathjen, F.G. (1992). The chicken neural extracellular matrix molecule restrictin: similarity with EGF-, fibronectin type III-, and fibrinogen-like motifs. *Neuron*, *8*, 849-863.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, *287*, 795-801.
- O'Brien, S.J., Menotti-Raymond, M., Murphy, W.J., Nash, W.G., Wienberg, J., Stanyon, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Womack, J.E., Marshall Graves, J.A. (1999). The promise of comparative genomics in mammals. *Science*, *286*, 458-462, 479-481.
- Oblinger, M.M., Wong, J., Parysek, L.M. (1989). Axotomy-induced changes in the expression of a type III neuronal intermediate filament gene. *J Neurosci*, *9*, 3766-3775.
- Palazzolo, M.J., Hamilton, B.A., Ding, D.L., Martin, C.H., Mead, D.A., Mierendorf, R.C., Raghavan, K.V., Meyerowitz, E.M., Lipshitz, H.D. (1990). Phage lambda cDNA cloning vectors for subtractive hybridization, fusion-protein synthesis and Cre-loxP automatic plasmid subcloning. *Gene*, *88*, 25-36.
- Parysek, L.M., Goldman, R.D. (1987). Characterization of intermediate filaments in PC12 cells. *J Neurosci*, *7*, 781-791.

- Persson, B., Zigler, J.S. Jr., Jornvall, H. (1994). A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *Eur J Biochem*, *226*, 15-22.
- Pesheva, P., Spiess, E., Schachner, M. (1989). J1-160 and J1-180 are oligodendrocyte-secreted nonpermissive substrates for cell adhesion. *J Cell Biol*, *109*, 1765-1778.
- Pesheva, P., Probstmeier, R., Skubitz, A.P., McCarthy, J.B., Furcht, L.T., Schachner, M. (1994). Tenascin-R (J1 160/180 inhibits fibronectin-mediated cell adhesion--functional relatedness to tenascin-C. *J Cell Sci*, *107*, 2323-2333.
- Pirofski, L., Casadevall, A., Rodriguez, L., Zuckier, L.S., Scharff, M.D. (1990). Current state of the hybridoma technology. *J Clin Immunol*, *10 (suppl)*, 5-12.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, *276*, 2045-2047.
- Portier, M.M., de Nechaud, B., Gros, F. (1983-84). Peripherin, a new member of the intermediate filament protein family. *Dev Neurosci.*, *6*, 335-344.
- Postlethwait, J.H., Johnson, S., Midson, C.N., Talbot, W.S., Gates, M., Ballinger, E.W., Africa, D., Andrews, R., Carl, T., Eisen, J.S. (1994). A genetic map for the zebrafish. *Science*, *264*, 699-703.
- Postlethwait, J.H. and W.S. Talbot. (1997). Zebrafish genomics: from mutants to genes. *Trends Genet*, *13*, 183-190.
- Postlethwait, J.H., Yan, Y.L., Gates, M.A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E.S., Force, A., Gong, Z., Goutel, C., Fritz, A., Kelsh, R., Knapik, E., Liao, E., Paw, B., Ransom, D., Singer, A., Thomson, M., Abduljabbar, T.S., Yelick, P., Beier, D., Joly, J.S., Larhammar, D., Rosa, F. et al. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet*, *18*, 345-349.
- Postlethwait, J., Amores, A., Force, A., Yan, Y.L. (1999). The zebrafish genome. *Methods Cell Biol*, *60*, 149-163.
- Pregel, I. (2000). Entwicklung und immunmorphologische Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Proteine des Zebraäbrblings (*Danio rerio*). Dissertation.
- Ramos, D.M., Chen, B., Regezi, J., Zardi, L., Pytela, R. (1998). Tenascin-C matrix assembly in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, *75*, 680-687.

Rathjen, F.G., Wolff, J.M., Chiquet-Ehrismann, R. (1991). Restrictin: a chick neural extracellular matrix protein involved in cell attachment co-purifies with the cell recognition molecule F11. *Development*, *113*, 151-164.

Reimer, D., Dodemont, H., Weber, K. (1991). Cloning of the non-neuronal intermediate filament protein of the gastropod *Aplysia californica*; identification of an amino acid residue essential for the IFA epitope. *Eur J Cell Biol*, *56*, 351-357.

Riedl, S., Kadmon, M., Tandara, A., Hinz, U., Moller, P., Faissner, A. (1997). Tenascin-C tissue concentration in inflammatory and neoplastic diseases of the colon mucosa. *Anticancer Res*, *17*, 3165-3166.

Saga, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Sakakura, T., Aizawa, S. (1992). Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev*, *6*, 1821-1831.

Sakata, E., Yamaguchi, Y., Kurimoto, E., Kikuchi, J., Yokoyama, S., Yamada, S., Kawahara, H., Yokosawa, H., Hattori, N., Mizuno, Y., Tanaka, K., Kato, K. (2003). Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep*, *4*, 301-306.

Sanes, J.R., Schachner, M., Covault, J. (1986). Expression of several adhesive macromolecules (N-CAM, L1, J1, NILE, uvomorulin, laminin, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan) in embryonic, adult, and denervated adult skeletal muscle. *J Cell Biol*, *102*, 420-431.

Savitt, J.M., Trisler, D., Hilt, D.C. (1995). Molecular cloning of TOPAP: a topographically graded protein in the developing chick visual system. *Neuron*, *14*, 253-261.

Shaw, G., Weber, K. (1982). Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. *Nature*, *298*, 277-279.

Simister, N.E., Mostov, K.E. (1989). Cloning and expression of the neonatal rat intestinal Fc receptor, a major histocompatibility complex class I antigen homolog. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *54*, 571-580.

Simmons, L.C., Reilly, D., Klimowski, L., Raju, T.S., Meng, G., Sims, P., Hong, K., Shields, R.L., Damico, L.A., Rancatore, P., Yansura, D.G. (2002). Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *J Immunol Methods*, *263*, 133-147.

Sriramarao, P., Bourdon, M.A. (1993). A novel tenascin type III repeat is part of a complex of tenascin mRNA alternative splices. *Nucleic Acids Res*, *21*, 163-168.

Strähle, U., Ingham, P.W. (1992). Flight of fancy or a major new school? *Curr. Bio*, *2*, 135-139.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F. (1981). Produktion of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, *291*, 293-296.

Thomas, M., Cameron, J.R., Davis, R.W. (1974). Viable molecular hybrids of bacteriophage Lambda and eukaryotic DNA. *Proc Nat Acad Sci*, *71*, 4579-4583.

Trimble, W.S., Cowan, D.M., Scheller, R.H. (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad, Sci*, *85*, 4538-4542.

Troy, C.M., Brown, K., Greene, L.A., Shelanski, M.L. (1990). Ontogeny of the neuronal intermediate filament protein, peripherin, in the mouse embryo. *Neuroscience*, *36*, 217-237.

Troy, C.M., Muma, N.A., Greene, L.A., Price, D.L., Shelanski, M.L. (1990). Regulation of peripherin and neurofilament expression in regenerating rat motor neurons. *Brain Res*, *529*, 232-238.

Tsai, Y.C., Fishman, P.S., Thakor, N.V., Oyler, G.A. (2003). Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *J Biol Chem*, *278*, 22044-22055.

Tucker, R.P., Hagios, C., Chiquet-Ehrismann, R. (1999). Tenascin-Y in the developing and adult avian nervous system. *Dev Neurosci*, *21*, 126-133.

Tucker, R.P., Spring, J., Baumgartner, S., Martin, D., Hagios, C., Poss, P.M., Chiquet-Ehrismann, R. (1994). Novel tenascin variants with a distinctive pattern of expression in the avian embryo. *Development*, *120*, 637-647.

Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D.A., Kondo, J., Ihara, Y., Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci*, *90*, 11282-11286.

Updyke, T.V., Nicolson, G.L. (1986). Immunoaffinity isolation of membrane antigens with biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin-agarose. *Methods Enzymol*, *121*, 717-725.

Valente, E.M., Bentivoglio, A.R., Dixon, P.H., Ferrarsi, A., Ialongo, T., Frontali, M., Albanese, A., Wood, N.W. (2001). Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet*, *68*, 895-900.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, *291*, 1304-51.

Weber, P., Bartsch, U., Rasband, M.N., Czaniera, R., Lang, Y., Bluethmann, H., Margolis, R.U., Levinson, S.R., Shrager, P., Montag, D., Schachner, M. (1999). Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci*, *19*, 4245-4262.

- Weber, P., Montag, D., Schachner, M., Bernhardt, R.R. (1998). Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *J Neurobiol*, *35*, 1-16.
- Weinstein, B.M., Stemple, D.L., Driever, W., Fishman, M.C. (1995). Gridlock, a localized heritable vascular patterning defect in the zebrafish. *Nat Med*, *11*, 1143-1147.
- Wendland, B., Miller, K.G., Schilling, J., Scheller, R.H. (1991). Differential expression of the p65 gene family. *Neuron*, *6*, 993-1007.
- Whitaker, J.R., Granum, P.E. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal Biochem*, *109*, 156-159.
- Wielowieyski, P.A., Sevinc, S., Guzzo, R., Salih, M., Wigle, J.T., Tuana, B.S. (2000). Alternative splicing, expression, and genomic structure of the 3' region of the gene encoding the sarcolemmal-associated proteins (SLAPs) defines a novel class of coiled-coil tail-anchored membrane proteins. *J Biol Chem*, *275*, 38474-38481.
- Wigle, J.T., Demchyshyn, L., Pratt, M.A., Staines, W.A., Salih, M., Tuana, B.S. (1997). Molecular cloning, expression, and chromosomal assignment of sarcolemmal-associated proteins. A family of acidic amphipathic alpha-helical proteins associated with the membrane. *J Biol Chem*, *272*, 32384-32394.
- Woodworth, A., Pesheva, P., Fiete, D., Baenziger, J.U. (2004). Neuronal-specific synthesis and glycosylation of tenascin-R. *J Biol Chem*, *279*, 10413-10421.
- Woodworth, A., Fiete, D., Baenziger, J.U. (2002). Spatial and temporal regulation of tenascin-R glycosylation in the cerebellum. *J Biol Chem*, *277*, 50941-50947.
- Wood, W.I., Gitschier, J., Lasky, L.A., Lawn, R.M. (1985). Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: A method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc Natl Acad Sci*, *82*, 1585-1588.
- Xue, Y., Li, J., Latijnhouwers, M.A., Smedts, F., Umbas, R., Aalders, T.W., Debruyne, F.M., De La Rosette, J.J., Schalken, J.A. (1998). Expression of periglandular tenascin-C and basement membrane laminin in normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma. *Br J Urol*, *81*, 844-851.
- Yen, S.H., Dickson, D.W., Peterson, C. Goldman, J.C. (1986). Cytoskeletal abnormalities in neuropathy. *Prog. Neuropathol*, *6*, 63-90.
- Young, R.A., Davis, R.W. (1983). Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc Nat Acad Sci*, *80*, 1194-1198.
- Zagzag, D., Friedlander, D.R., Dosik, J., Chikramane, S., Chan, W., Greco, M.A., Allen, J.C., Dorovini-Zis, K., Grumet, M. (1996). Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. *Cancer Res*, *56*, 182-189.

Zagzag, D., Friedlander, D.R., Miller, D.C., Dosik, J., Cangiarella, J., Kostianovsky, M., Cohen, H., Grumet, M., Greco, M.A. (1995). Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis. *Cancer Res*, 15; 907-914.

Zhang, J., Talbot, W.S., Schier, A.F. (1998). Positional cloning identifies zebrafish one-eyed pinhead as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation. *Cell*, 92, 241-251.

Zhao, Y., Szaro, B.G. (1997). Xefiltin, a *Xenopus laevis* neuronal intermediate filament protein, is expressed in actively growing optic axons during development and regeneration. *J Neurobiol*, 33, 811-824.

Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., Mitchell, T., Miller, P., Dean, R.A., Gerstein, M., Snyder, M. (2001). Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, 293, 2101-2105.

6 Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indonylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNS	Komplementäre Disoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
HT	Hypoxanthin und Thymidin
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalctopyranosid
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-Linked Immunoassay
FCS	Fötale Kälberserum
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
k_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Mol
MALDI-TOF	Flugzeitmassenspektrometer
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
min.	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	Millimol
μ m	Mikrometer
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
NBT	Nitroblau- Tetrazolium Chloride
nIF	Neuronale Intermediärfilamente
nm	Nanometer
OPD	Orthophenylendiamin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec.	Sekunde
TN	Tenascin
v/v	Volumen pro Gesamtvolumen
w/v	Gewicht pro Gewicht des Gesamtvolumens
ZNS	Zentralnervensystem

7 Anhang

ZEGE 2C9

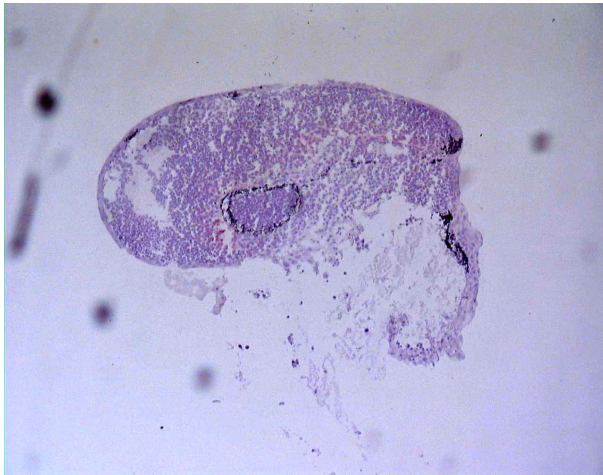


Abbildung 7-1. ZEGE 2C9. Zebrafischembryo, 1 Tag alt. Vergrößerung 10x.

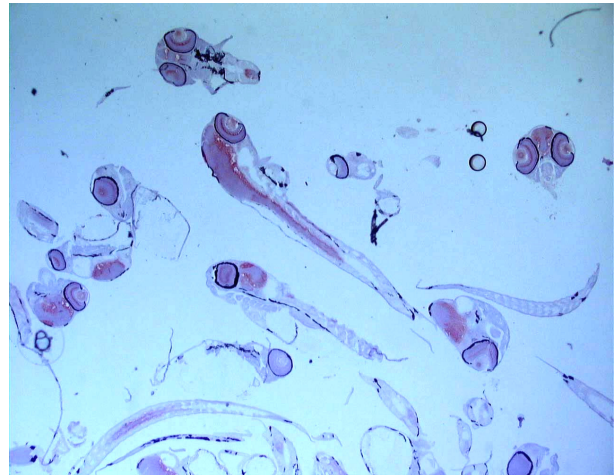


Abbildung 7-2. ZEGE 2C9. Zebrafischembryo, 3 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

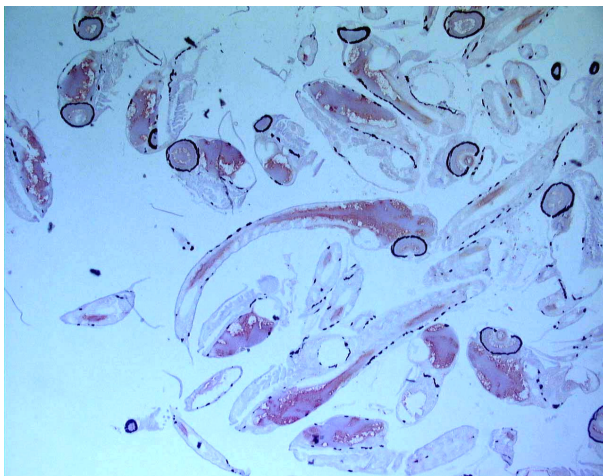


Abbildung 7-3. ZEGE 2C9. Zebrafischlarve, 5 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.



Abbildung 7-4. ZEGE 2C9. Zebrafisch, 23 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

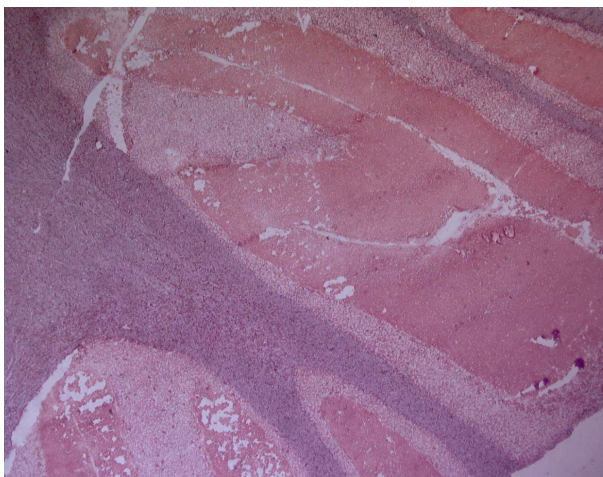


Abbildung 7-5. ZEGE 2C9. Schwein. Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

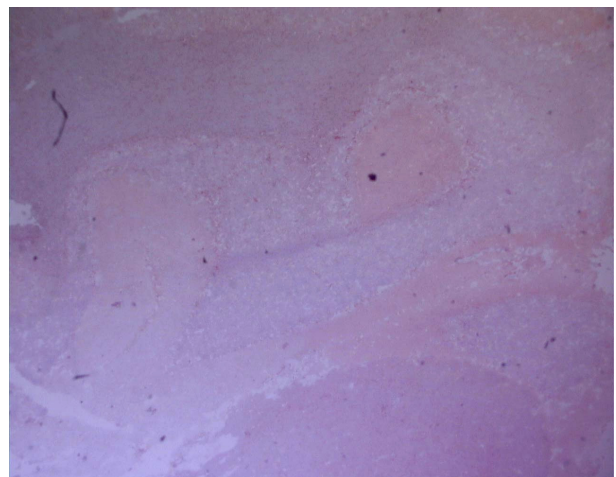


Abbildung 7-6. ZEGE 2C9. Kaninchen. Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

ZEGE 3H9

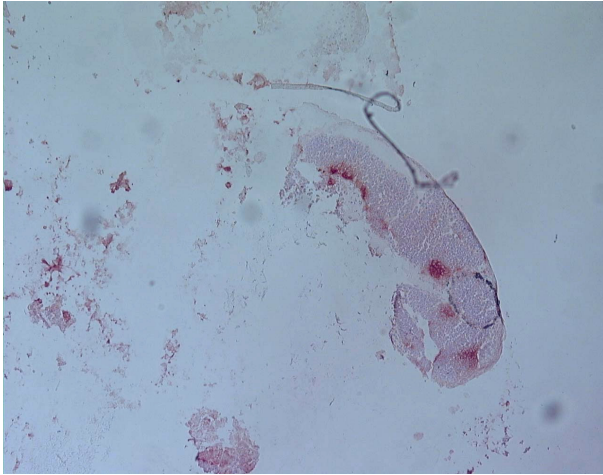


Abbildung 7-7. ZEGE 3H9. Zebrafischembryo, 1 Tag alt. Vergrößerung 10x.



Abbildung 7-8. ZEGE 3H9. Zebrafischembryo, 2 Tage alt. Vergrößerung 10x.

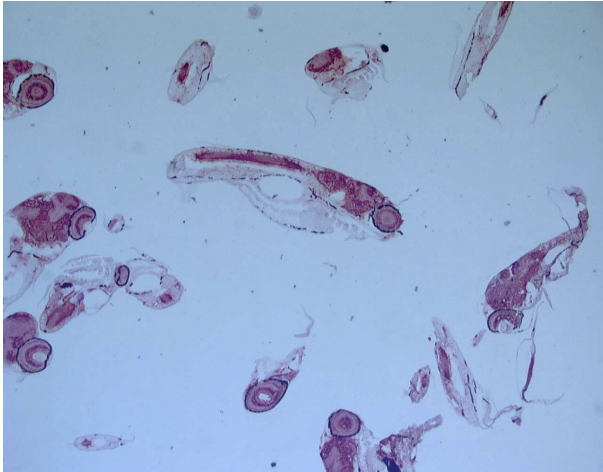


Abbildung 7-9. ZEGE 3H9. Zebrafischlarve, 5 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

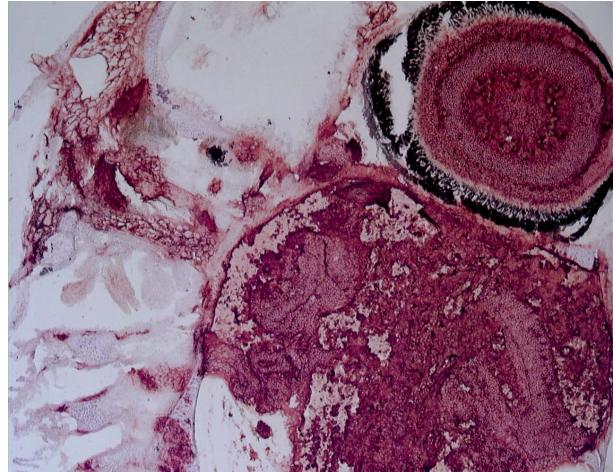


Abbildung 7-10. ZEGE 3H9. Zebrafisch, 18 Tage alt. Vergrößerung 10x.



Abbildung 7-11. ZEGE 3H9. Ratteembryo, 11 Tage alt.

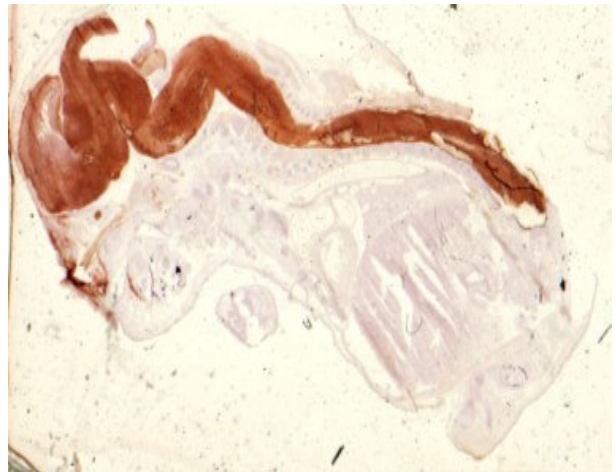


Abbildung 7-12. ZEGE 3H9. Mausembryo, 16 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

ZEGE 3H9

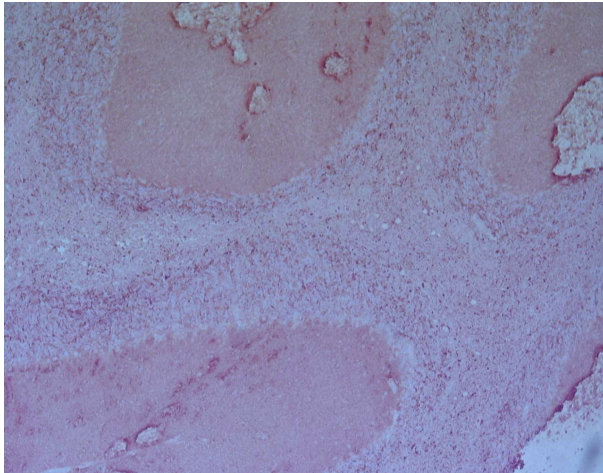


Abbildung 7-13. ZEGE 3H9. Maus, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

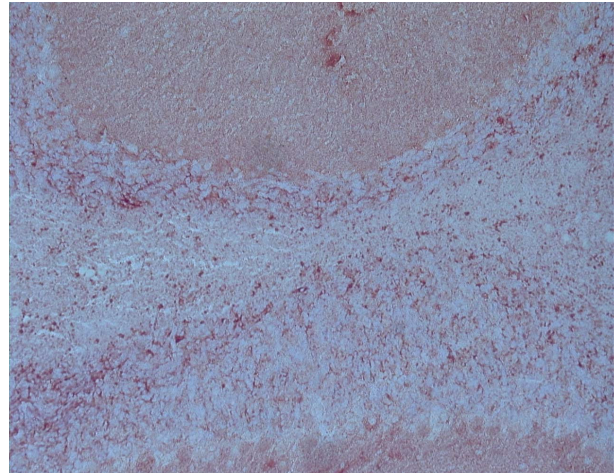


Abbildung 7-14. ZEGE 3H9. Maus, Gehirn.
Vergrößerung 20x.

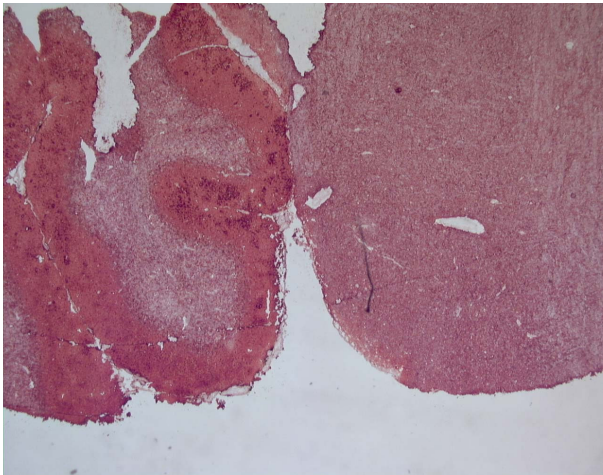


Abbildung 7-15. ZEGE 3H9. Kaninchen, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

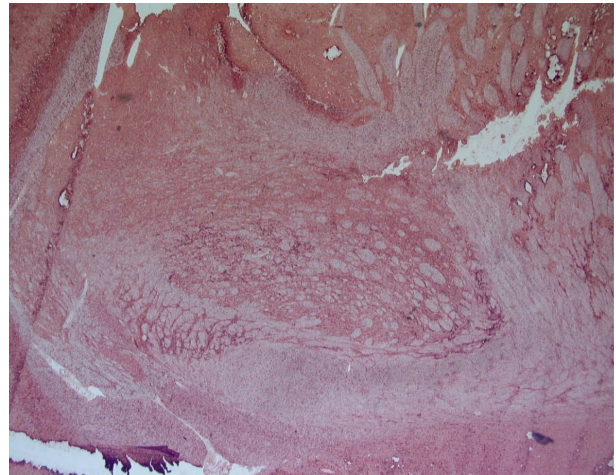


Abbildung 7-16. ZEGE 3H9. Ratte, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

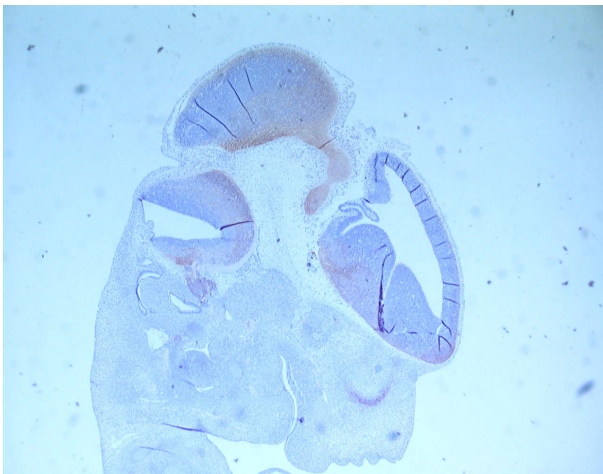


Abbildung 7-17. ZEGE 3H9. Mensch, Embryo.
Vergrößerung 2,5x. (Das Präparat ist
freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls
(Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

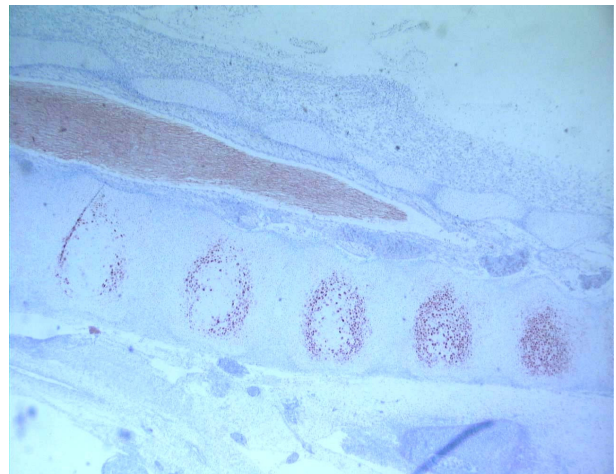


Abbildung 7-18. ZEGE 3H9. Mensch, Embryo.
Vergrößerung 2,5x. (Das Präparat ist
freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls
(Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

ZEGE 3H9

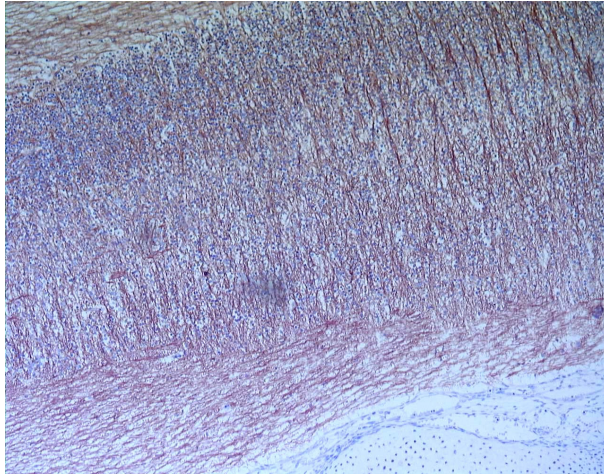


Abbildung 7-19. ZEGE 3H9. Mensch, Embryo. Vergrößerung 10x. (Das Präparat ist freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls (Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

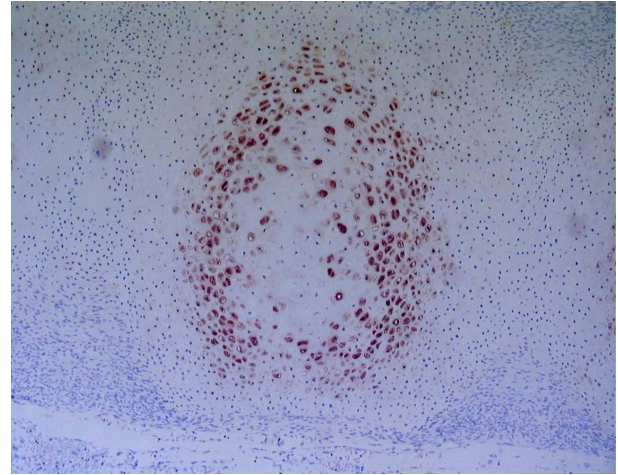


Abbildung 7-20. ZEGE 3H9. Mensch, Embryo. Vergrößerung 10x. (Das Präparat ist freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls (Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

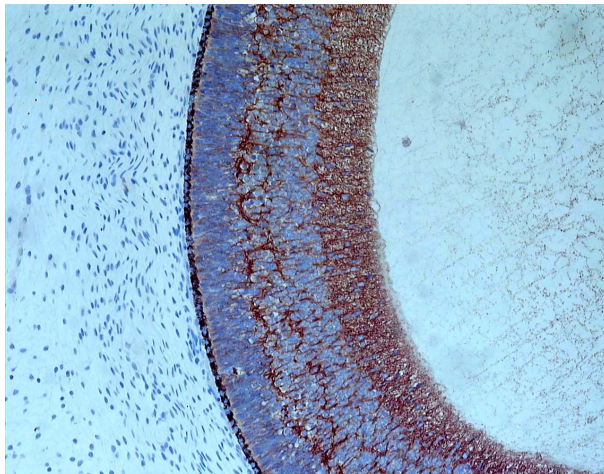


Abbildung 7-21. ZEGE 3H9. Mensch, Embryo. Vergrößerung 20x. (Das Präparat ist freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls (Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

ZEGE 4B9



Abbildung 7-22. ZEGE 4B9. Zebrafischembryo, 1 Tag alt. Vergrößerung 10x.

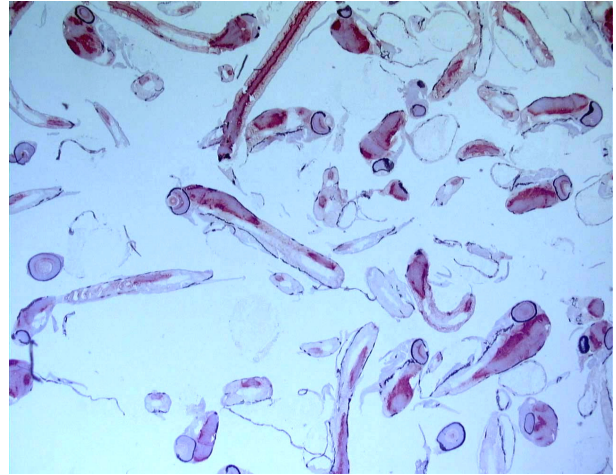


Abbildung 7-23. ZEGE 4B9. Zebrafischembryo, 3 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

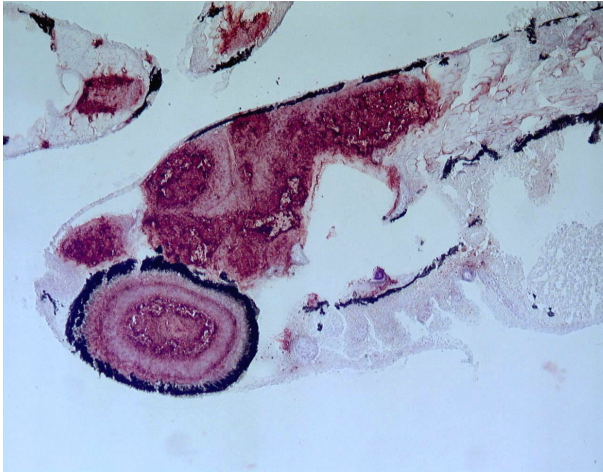


Abbildung 7-24. ZEGE 4B9. Zebrafisch, 12 Tage alt. Vergrößerung 10x.

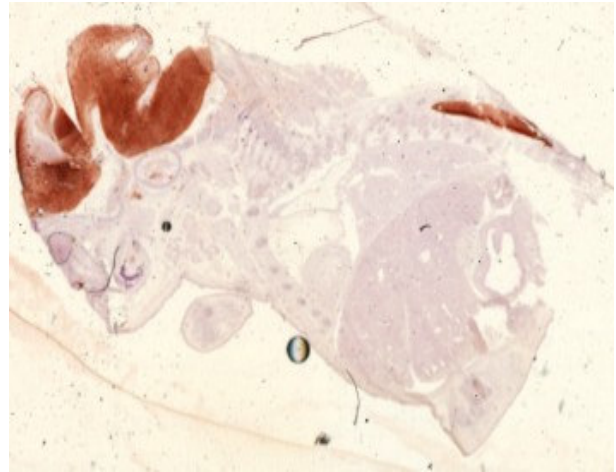


Abbildung 7-25. ZEGE 4B9. Mausembryo, 16 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

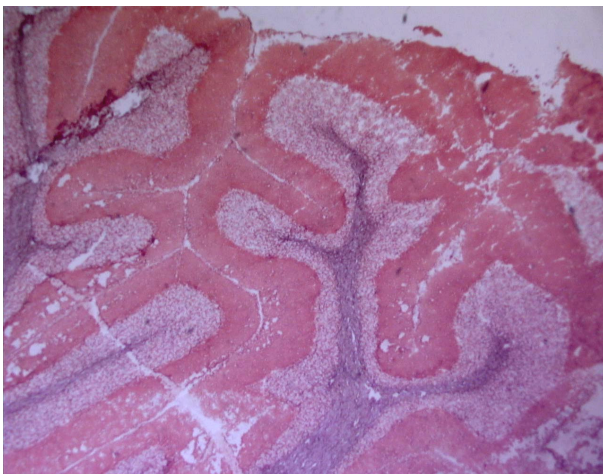


Abbildung7-26. ZEGE 4B9. Schwein, Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

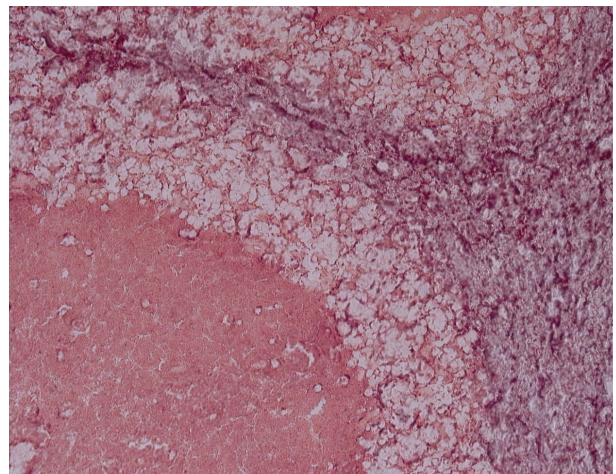


Abbildung7- 27. ZEGE 4B9. Schwein, Gehirn. Vergrößerung 20x.

ZEGE 4B9

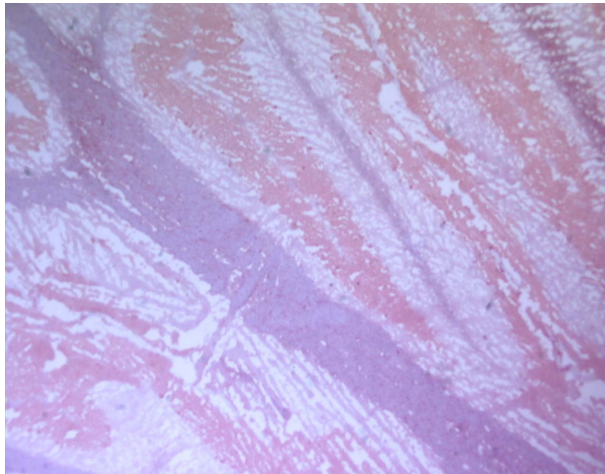


Abbildung 7-28. ZEGE 4B9. Rind, Kleinhirn.
Vergrößerung 2,5x.

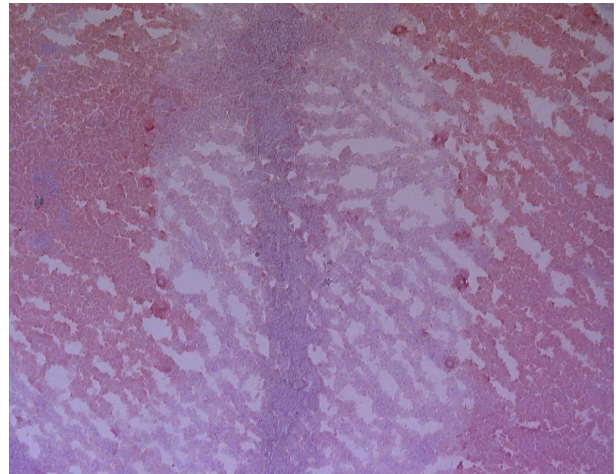


Abbildung 7-29. ZEGE 4B9. Rind, Kleinhirn.
Vergrößerung 10x.

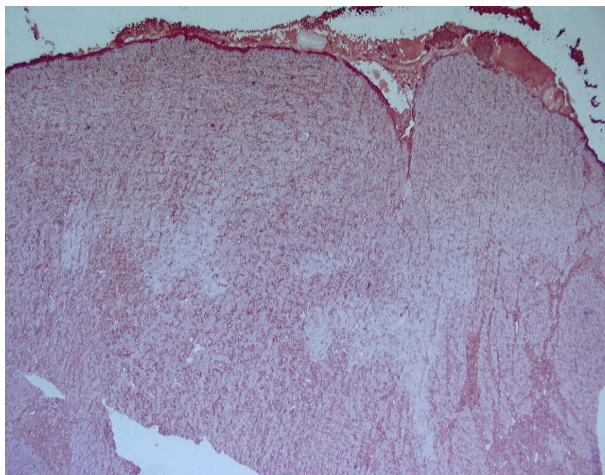


Abbildung 7-30. ZEGE 4B9. Katze, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

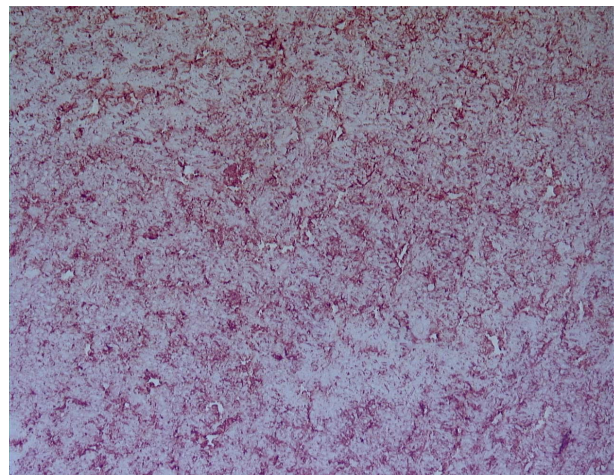


Abbildung 7-31. ZEGE 4B9. Katze, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

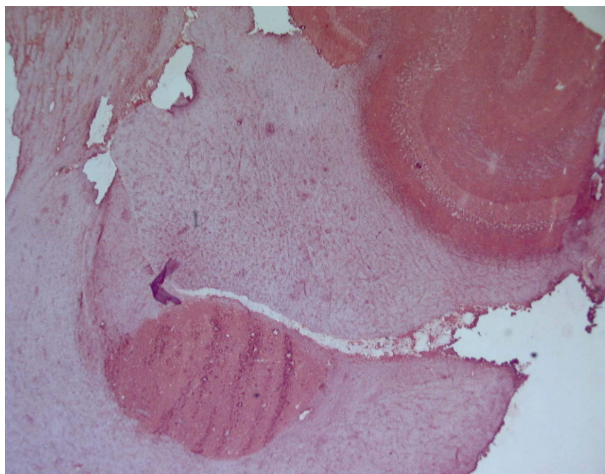


Abbildung 7-32. ZEGE 4B9. Kaninchen, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

ZEGE 4B9

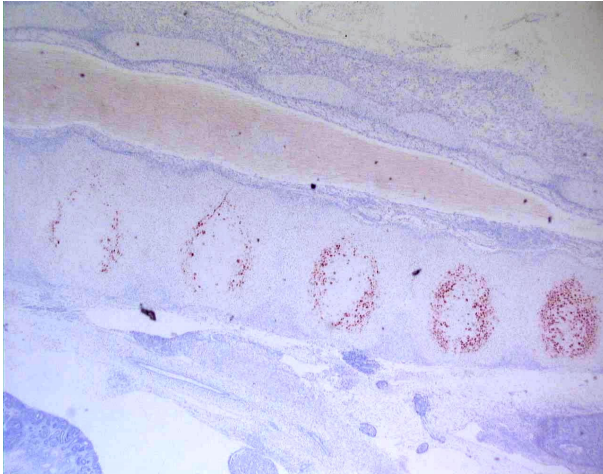


Abbildung 7-33. ZEGE 4B9. Mensch, Embryo. Vergrößerung 2,5x. (Das Präparat ist freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls (Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

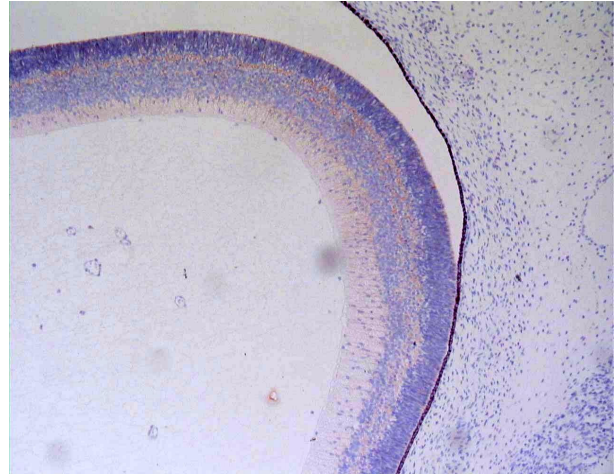


Abbildung 7-34. ZEGE 4B9. Mensch, Embryo. Vergrößerung 10x. (Das Präparat ist freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls (Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

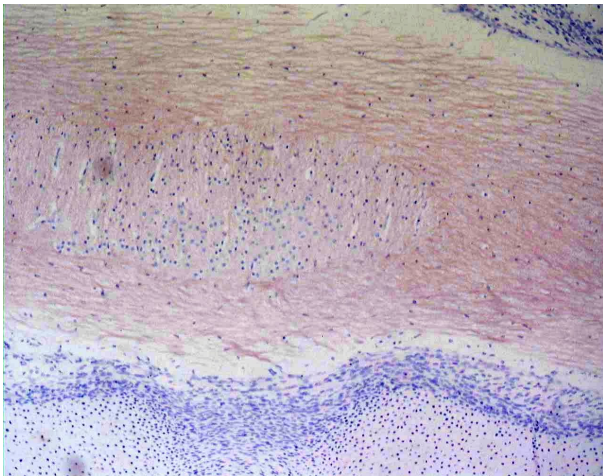


Abbildung 7-35. ZEGE 4B9. Mensch, Embryo. Vergrößerung 10x. (Das Präparat ist freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls (Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

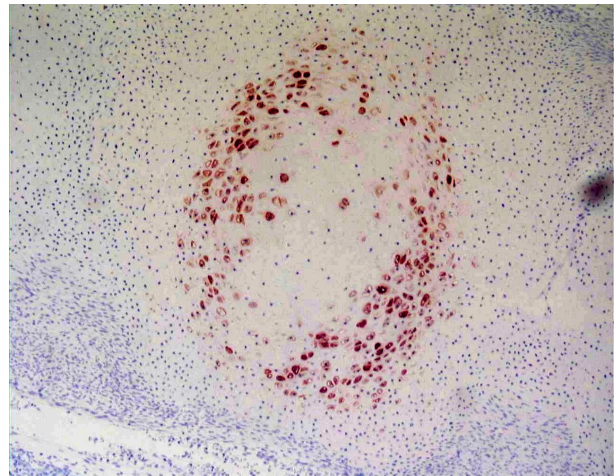


Abbildung 7-36. ZEGE 4B9. Mensch, Embryo. Vergrößerung 10x. (Das Präparat ist freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls (Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

ZEGE 6F1



Abbildung 7-37. ZEGE 6F1. Zebrafischembryo, 1 Tag alt. Vergrößerung 10x.

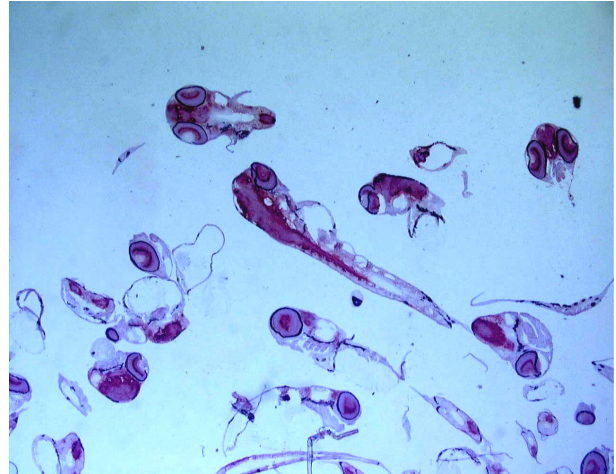


Abbildung 7-38. ZEGE 6F1. Zebrafischembryo, 3 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

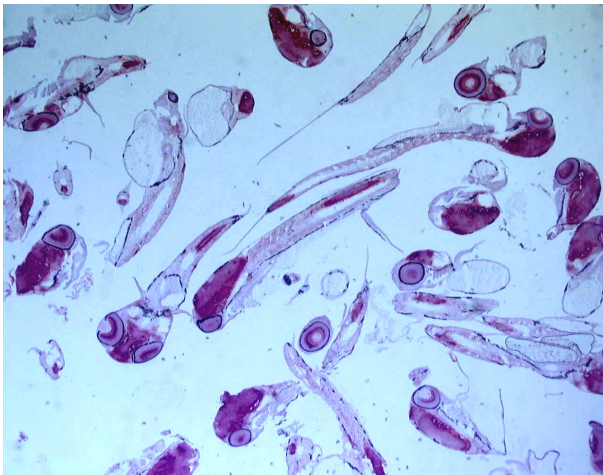


Abbildung 7-39. ZEGE 6F1. Zebrafischlarve, 5 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

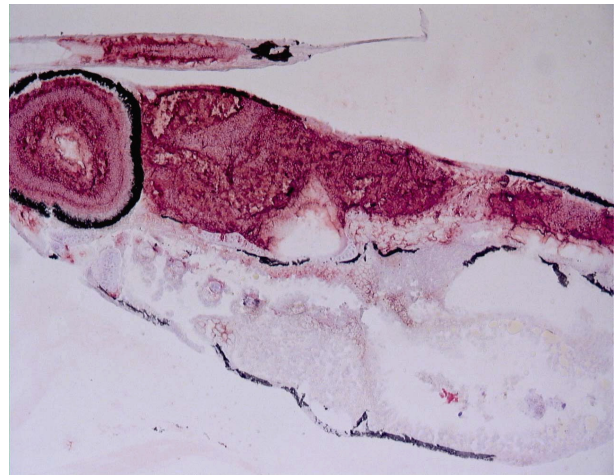


Abbildung 7-40. ZEGE 6F1. Zebrafisch, 12 Tage alt. Vergrößerung 10x.

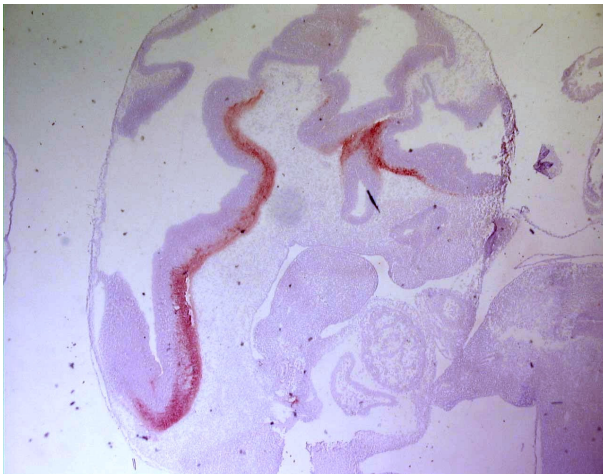


Abbildung 7-41. ZEGE 6F1 Mausembryo, 12 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

ZEGE 6F1.

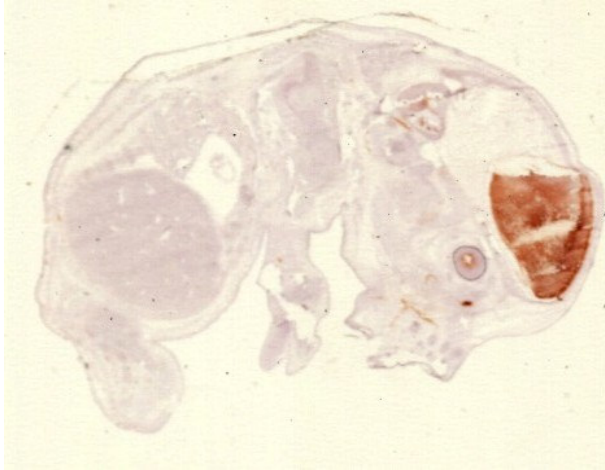


Abbildung 7-42. ZEGE 6F1. Ratteembryo. 11 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

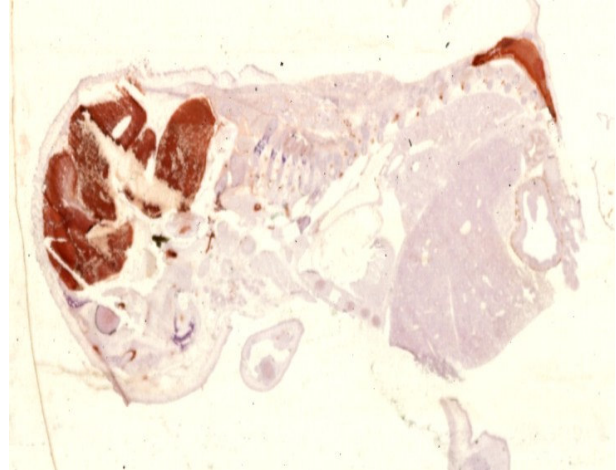


Abbildung 7-43. ZEGE 6F1. Mausembryo. 16 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

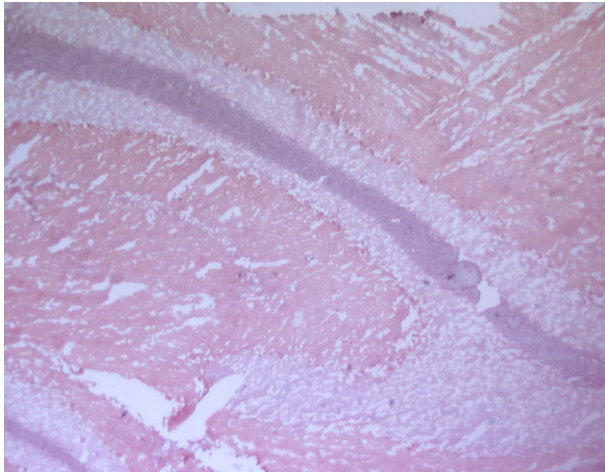


Abbildung 7-44. ZEGE 6F1. Rind, Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

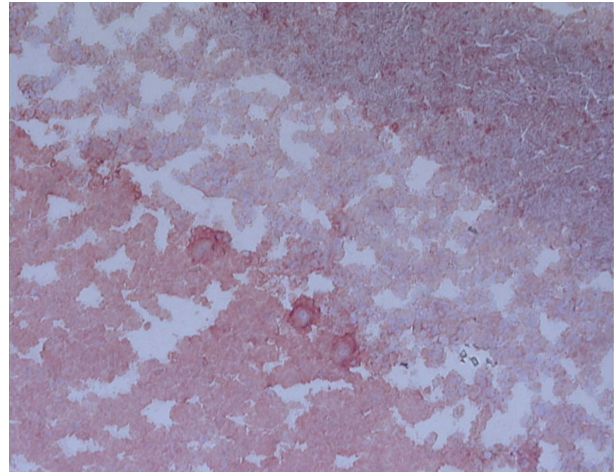


Abbildung 7-45. ZEGE 6F1. Rind, Gehirn. Vergrößerung 20x.

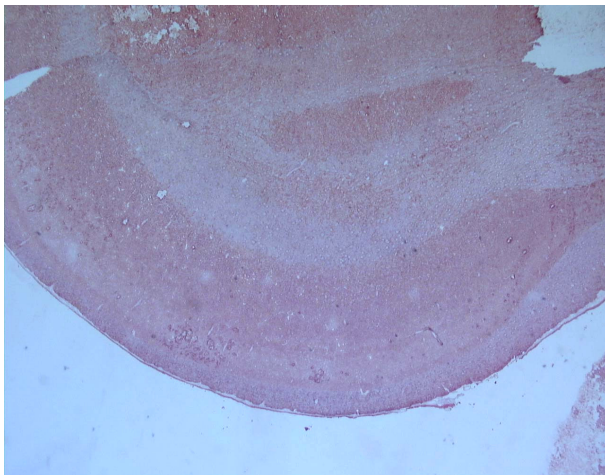


Abbildung 7-46. ZEGE 6F1. Huhn, Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

ZEGE 6F1

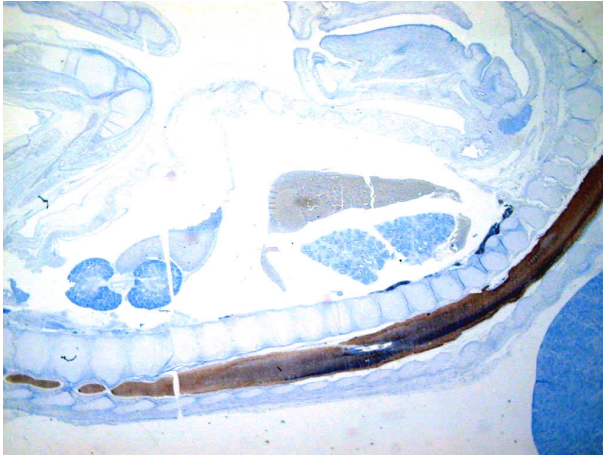


Abbildung 7-47. ZEGE 6F1. Embryo, Mensch. (Das Bild ist freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls (Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

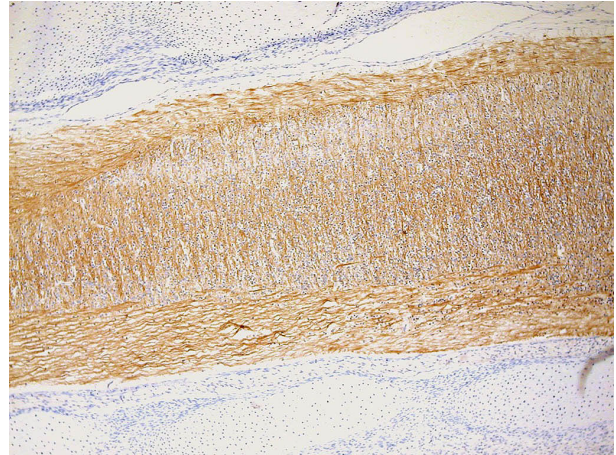


Abbildung 7-48. ZEGE 6F1. Embryo, Mensch. (Das Bild ist freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls, Hongkong zur Verfügung gestellt worden).

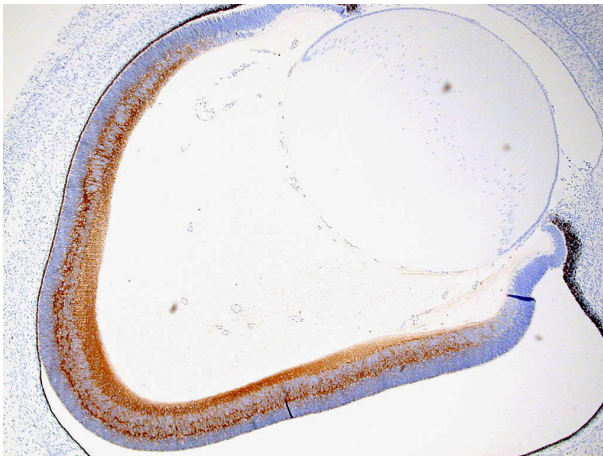


Abbildung 7-49. ZEGE 6F1. Embryo, Mensch. (Das Bild ist freundlicherweise Prof. Dr John Nicholls (Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

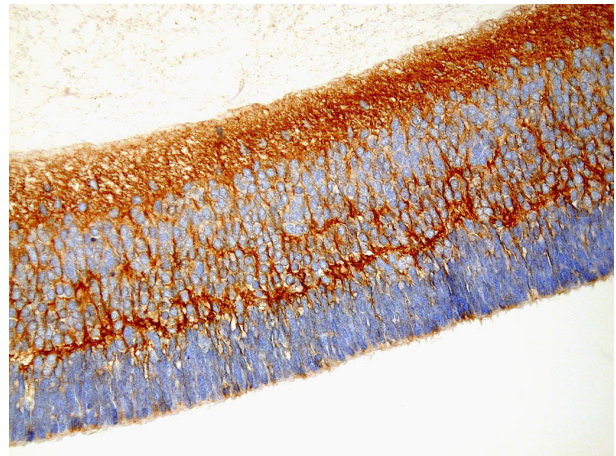


Abbildung 7-50. ZEGE 6F1. Embryo, Mensch. (Das Bild ist freundlicherweise von Prof. Dr John Nicholls (Hongkong) zur Verfügung gestellt worden).

ZEGE 8F8.



Abbildung 7-51. ZEGE 8F8. Zebrafischembryo, 1 Tag alt. Vergrößerung 10x.



Abbildung 7-52. ZEGE 8F8. Zebrafischembryo, 3 Tage alt. Vergrößerung 10x.

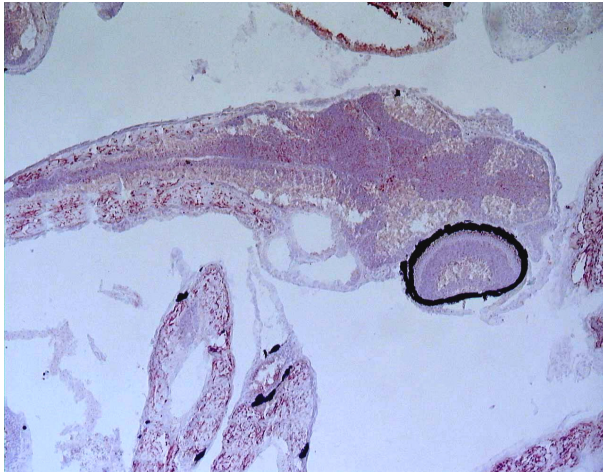


Abbildung 7-53. ZEGE 8F8. Zebrafischlarve, 5 Tage alt. Vergrößerung 10x.

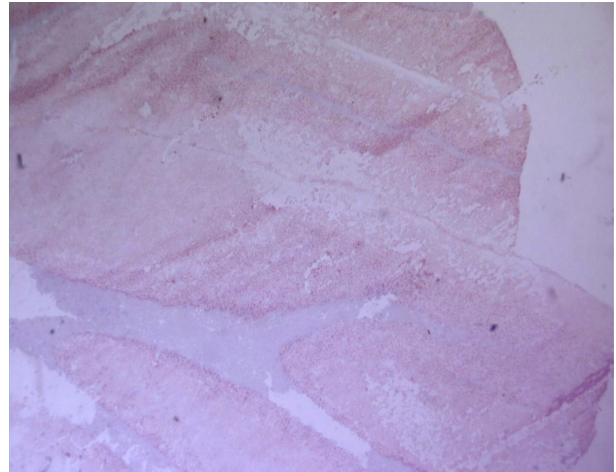


Abbildung 7-54. ZEGE 8F8. Schwein, Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

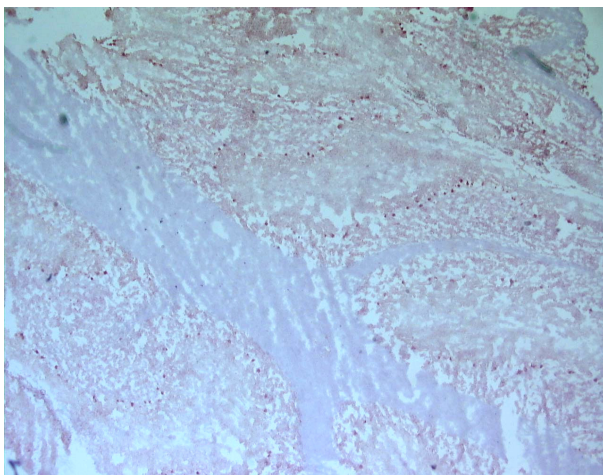


Abbildung 7-55. ZEGE 8F8. Rind, Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

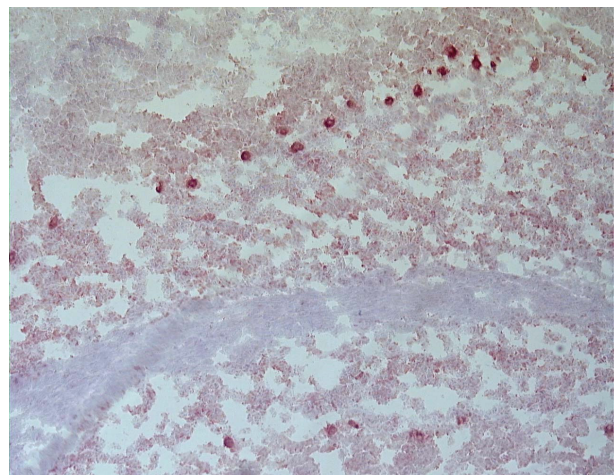


Abbildung 7-56. ZEGE 8F8. Rind, Gehirn. Vergrößerung 10x.

ZEGE 8D12



Abbildung 7-57. ZEGE 8D12. Zebrafischembryo, 1 Tag alt. Vergrößerung 10x.

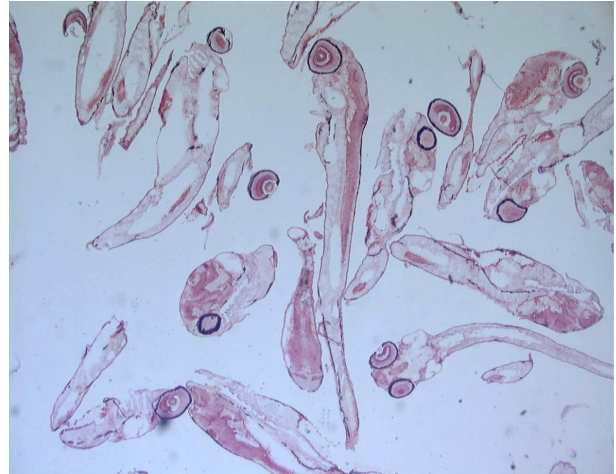


Abbildung 7-58. ZEGE 8D12. Zebrafischembryo, 2 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.



Abbildung 7-59. ZEGE 8D12. Zebrafischembryo, 2 Tage alt. Vergrößerung 10x.



Abbildung 7-60. ZEGE 8D12. Zebrafischembryo, 3 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.



Abbildung 7-61. ZEGE 8D12. Zebrafischlarve, 5 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

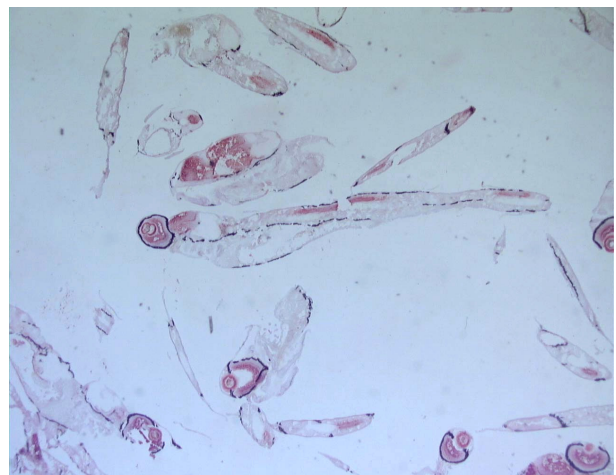


Abbildung 7-62. ZEGE 8D12. Zebrafisch, 12 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

ZEGE 8D5, ZEGE 2F12

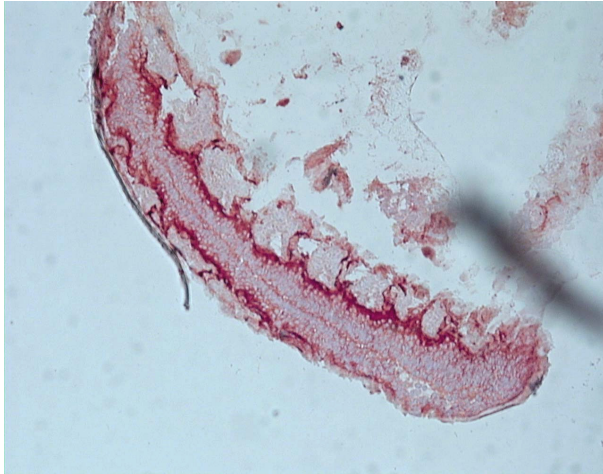


Abbildung 7-63. ZEGE 8D5. Zebrafischembryo, 1 Tag alt. Vergrößerung 10x.



Abbildung 7-64. ZEGE 8D5. Zebrafischembryo, 3 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

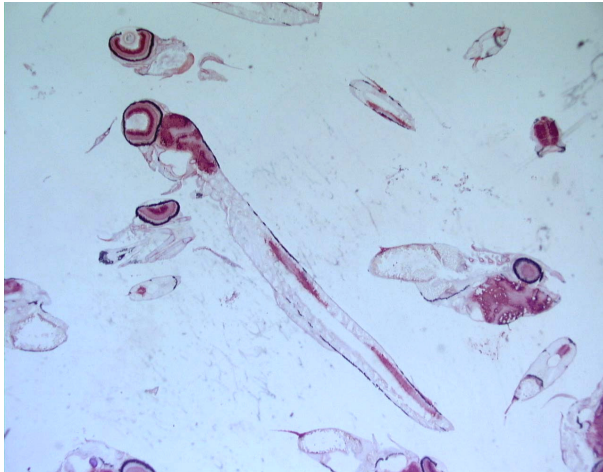


Abbildung 7-65. ZEGE 8D5. Zebrafisch 12 Tage alt. Vergrößerung 2,5x. Vergrößerung 10x.

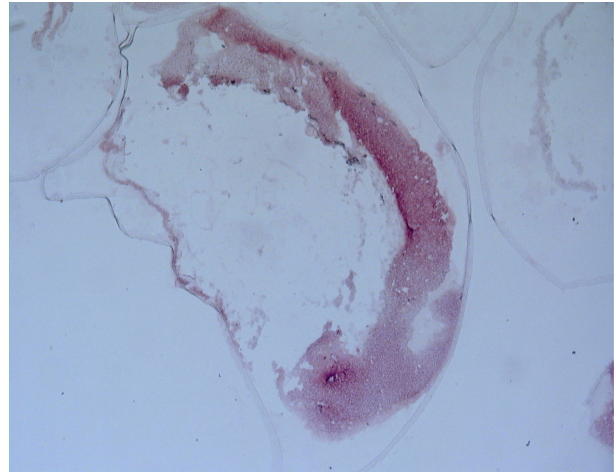


Abbildung 7-66. ZEGE 2F12. Zebrafischembryo, 1 Tag alt. Vergrößerung 10x.



Abbildung 7-67. ZEGE 2F12. Zebrafischlarve, 5 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

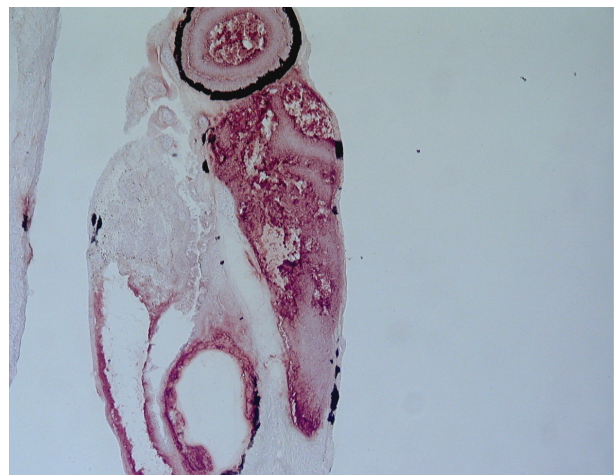


Abbildung 7-68. ZEGE 2F12. Zebrafischlarve, 5 Tage alt. Vergrößerung 10x.

ZEGE 7D7.



Abbildung 7-69. ZEGE 7D7. Zebrafischembryo, 1 Tag alt. Vergrößerung 10x.



Abbildung 7-70. ZEGE 7D7. Zebrafischembryo, 2 Tage alt. Vergrößerung 10x.

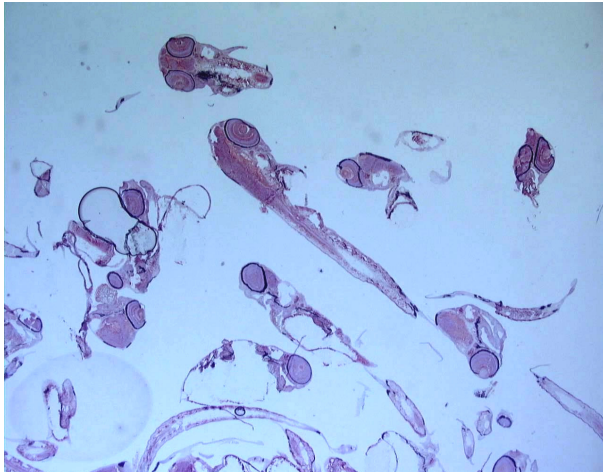


Abbildung 7-71. ZEGE 7D7. Zebrafischembryo, 3 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.



Abbildung 7-72. ZEGE 7D7. Zebrafisch, 12 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

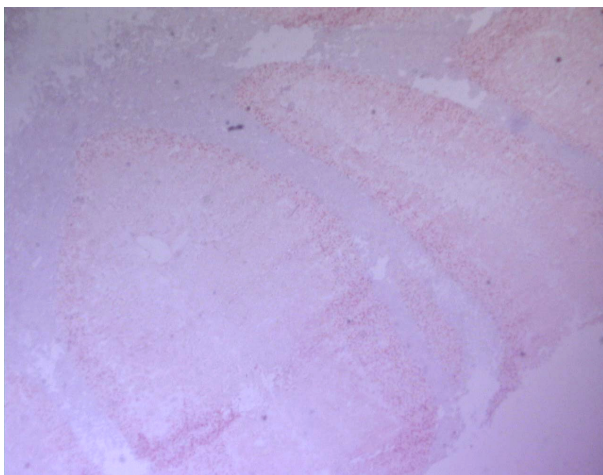


Abbildung 7-73. ZEGE 7D7. Schwein, Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

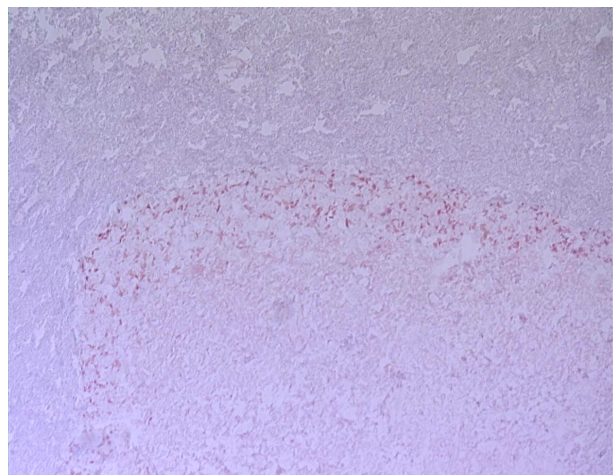


Abbildung 7-74. ZEGE 7D7. Schwein, Gehirn. Vergrößerung 10x.

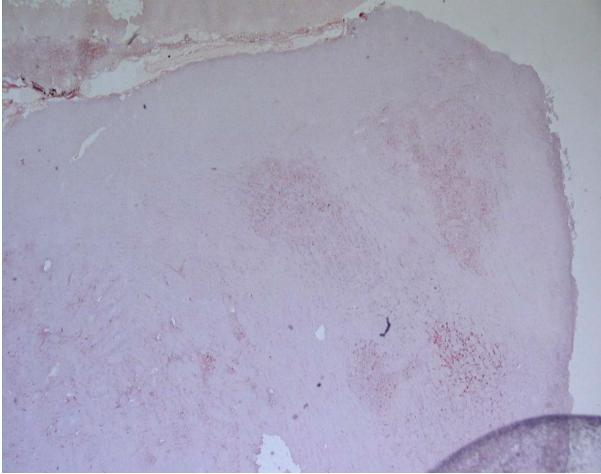


Abbildung 7-75. ZEGE 7D7. Kaninchen, Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

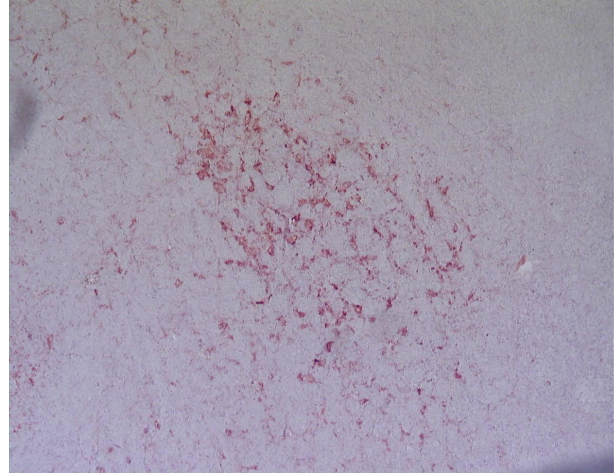


Abbildung 7-76. ZEGE 7D7. Kaninchen, Gehirn. Vergrößerung 10x.

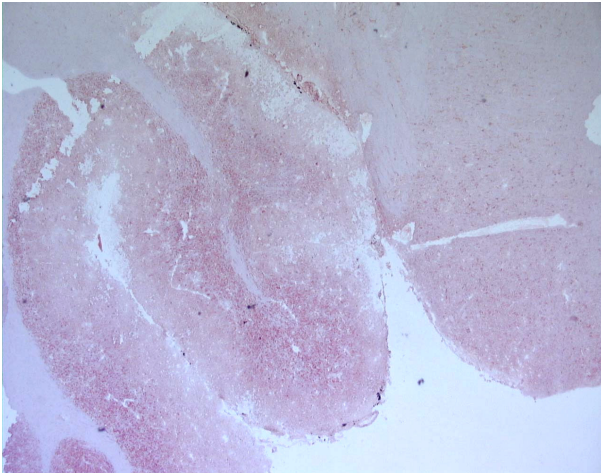


Abbildung 7-77. Kaninchen, Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

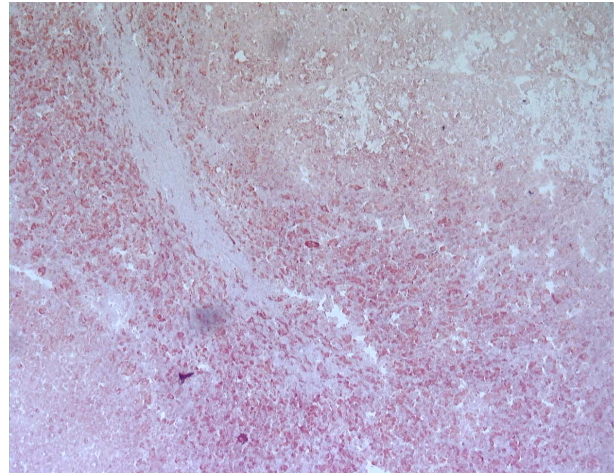


Abbildung 7-78. ZEGE 7D7. Kaninchen, Gehirn. Vergrößerung 10x.

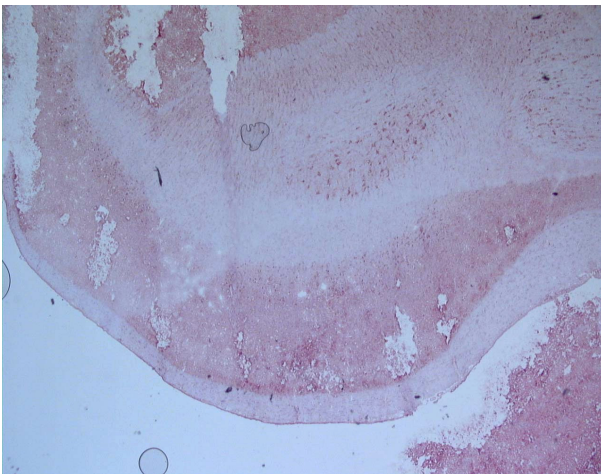


Abbildung 7-79. ZEGE 7D7. Huhn, Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

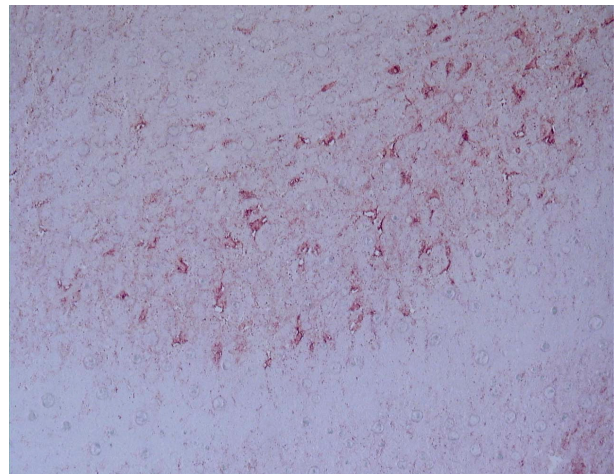


Abbildung 7-80. ZEGE 7D7. Huhn, Gehirn. Vergrößerung 10x.

ZEGE 2A8.



Abbildung 7-81. ZEGE 2A8. Zebrafischembryo, 1 Tag alt. Vergrößerung 10x.



Abbildung 7-82. ZEGE 2A8. Zebrafischembryo, 3 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

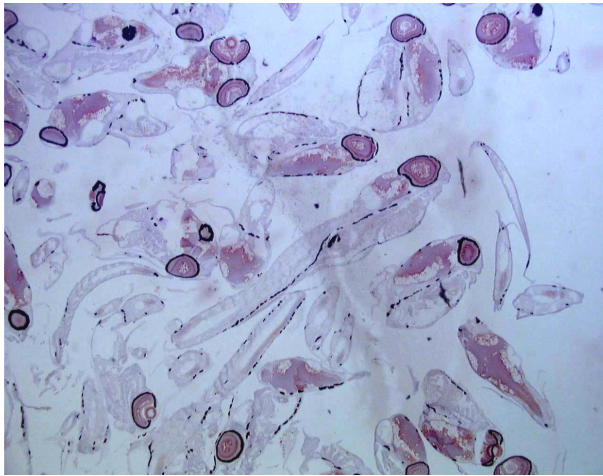


Abbildung 7-83. ZEGE 2A8. Zebrafischlarve, 5 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

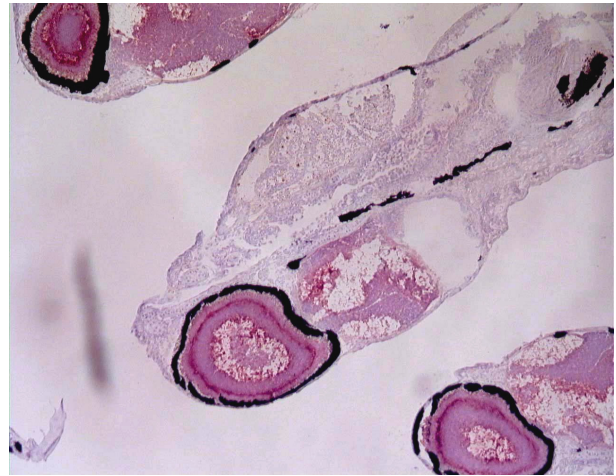


Abbildung 7-84. ZEGE 2A8. Zebrafischlarve, 5 Tage alt. Vergrößerung 10x.

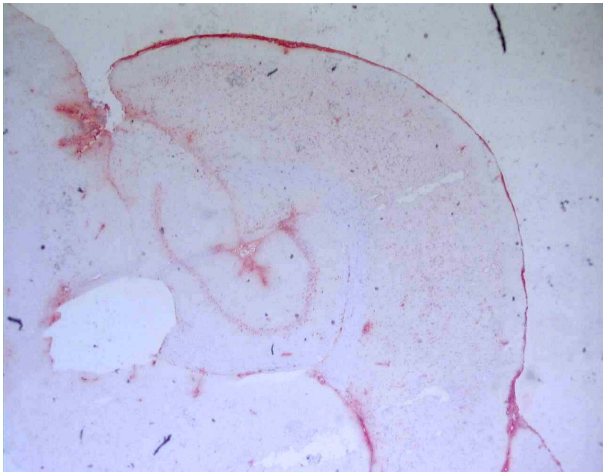


Abbildung 7-85. ZEGE 2A8. Ratte, Gehirn. Vergrößerung 2,5x.

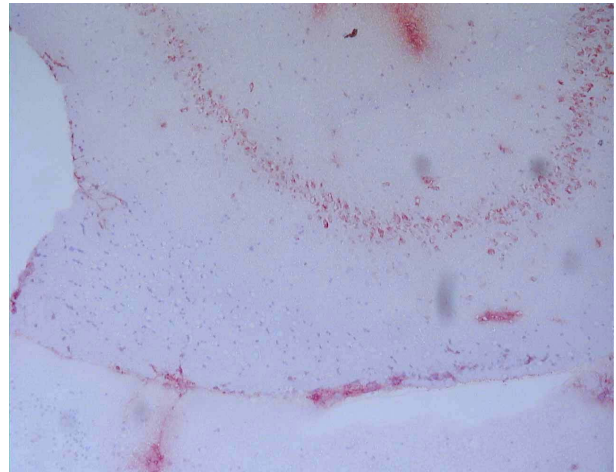


Abbildung 7-86. ZEGE 2A8. Ratte, Gehirn. Vergrößerung 10x.

ZEGE 7B11.

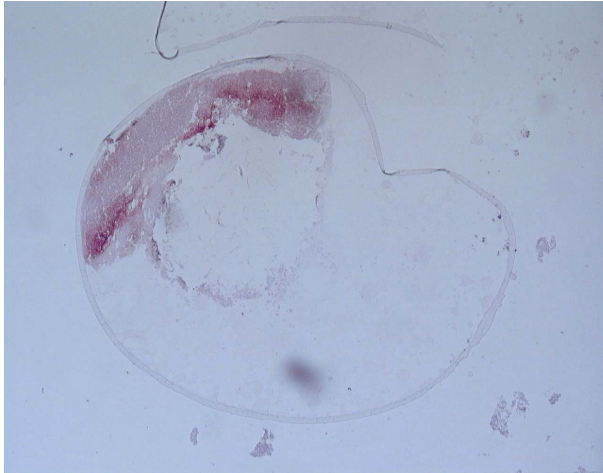


Abbildung 7-87. ZEGE 7B11. Zebrafischembryo, 1 Tag alt. Vergrößerung 10x.



Abbildung 7-88. ZEGE 7B11. Zebrafischembryo, 2 Tage alt. Vergrößerung 10x.

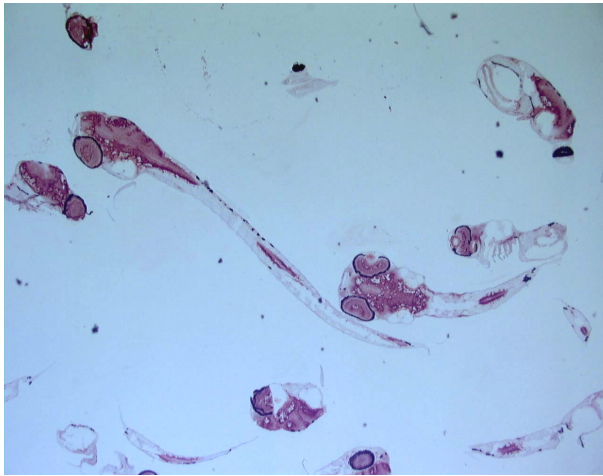


Abbildung 7-89. ZEGE 7B11. Zebrafischlarve, 5 Tage alt. Vergrößerung 10x.

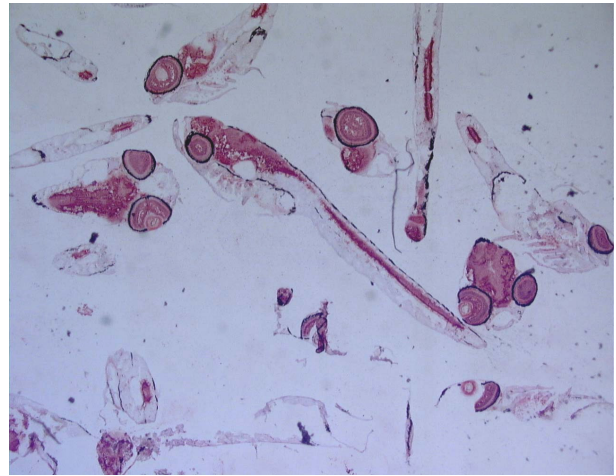


Abbildung 7-90. ZEGE 7B11. Zebrafisch, 12 Tage alt. Vergrößerung 2,5x.

VIII-41

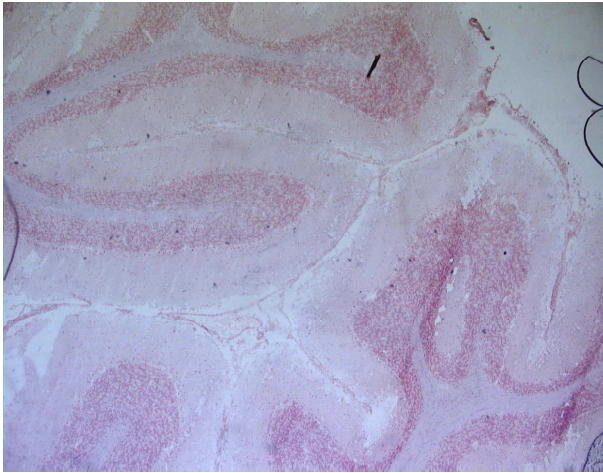


Abbildung 7-91. VIII-41 8G7. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

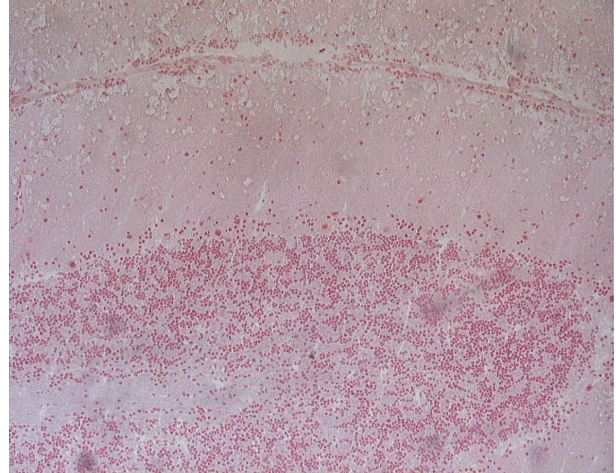


Abbildung 7-92. VIII-41 8G7. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

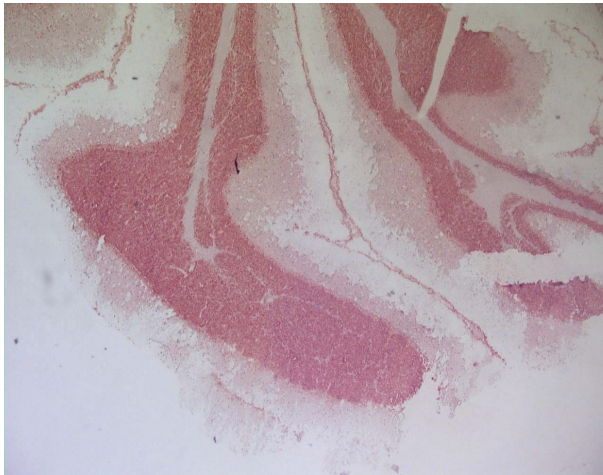


Abbildung 7-93. VIII-41 8B4. Huhn, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

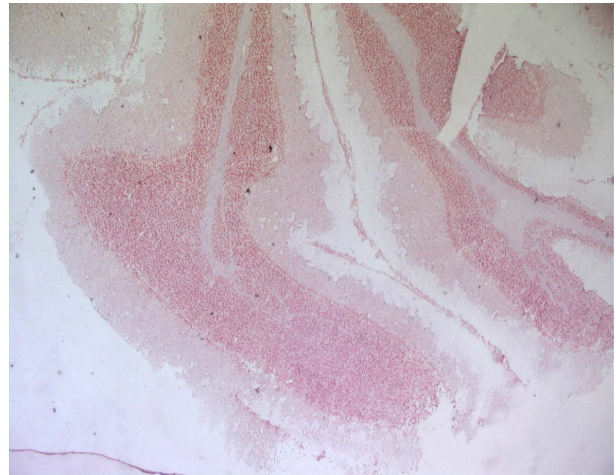


Abbildung 7-94. VIII-41 6E7. Huhn, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

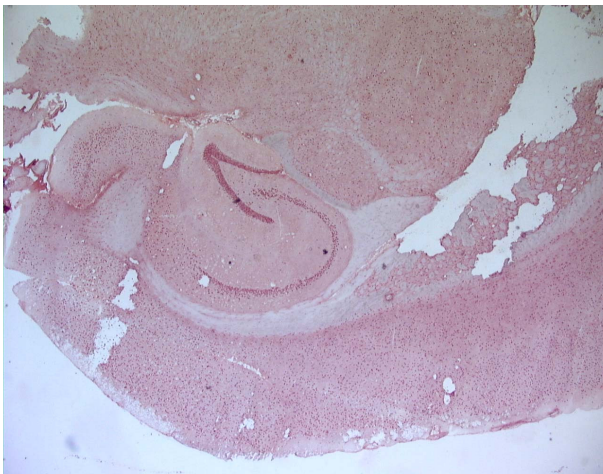


Abbildung 7-95. VIII-41 8B4. Maus, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

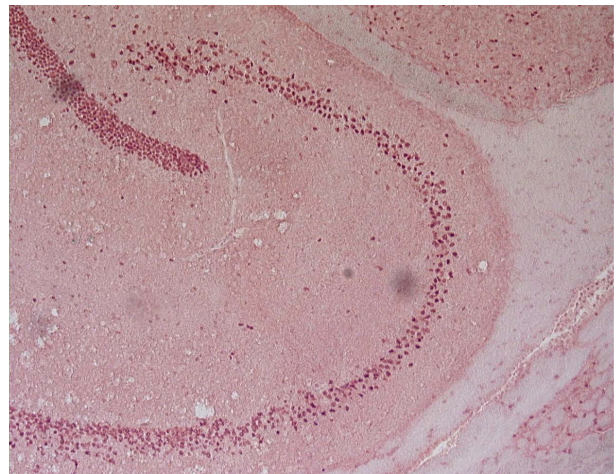


Abbildung 7-96. VIII-41 8B4. Maus, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

EPS

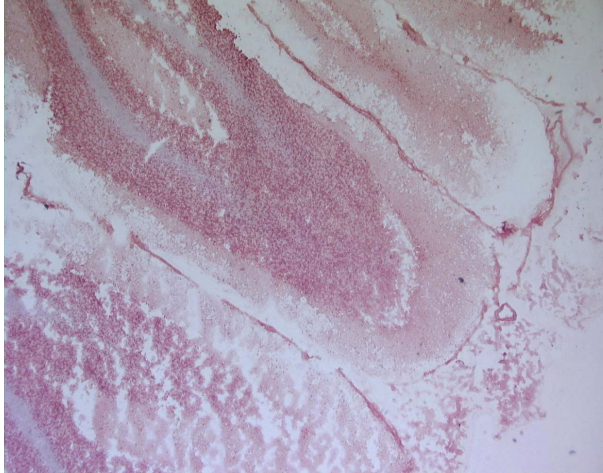


Abbildung 7-97. EPS 1A8. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

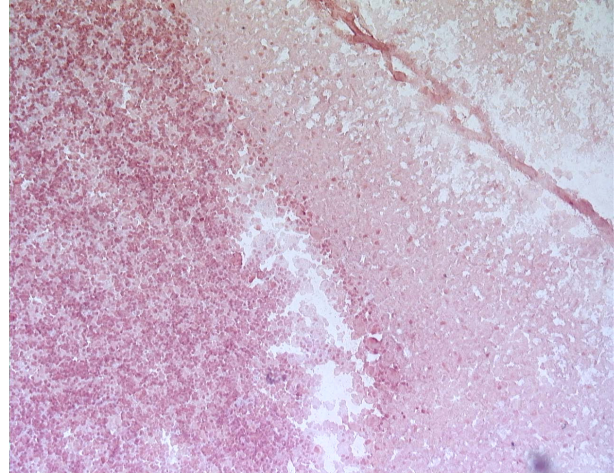


Abbildung 7-98. EPS 1A8. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

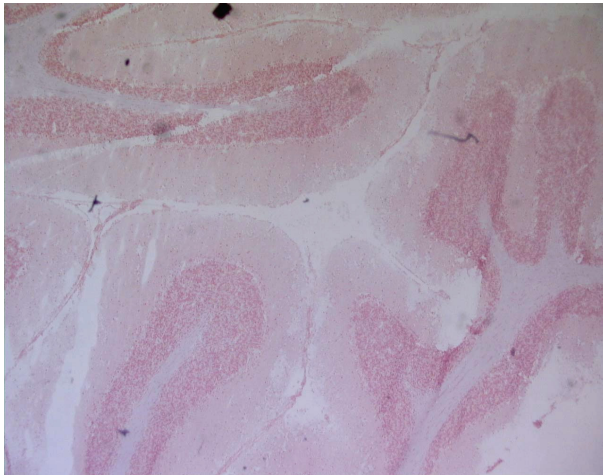


Abbildung 7-99. EPS 2B9. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

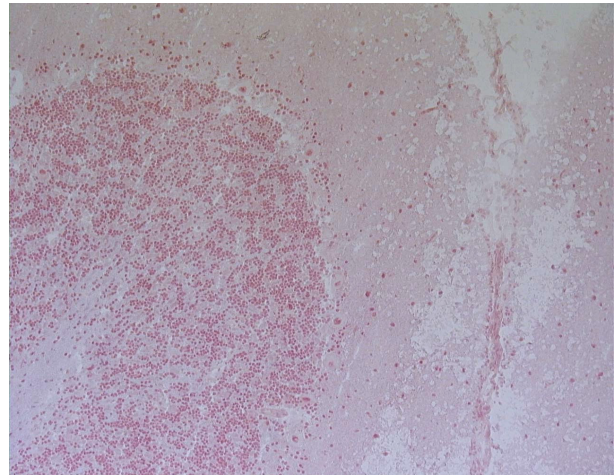


Abbildung 7-100. EPS 2B9. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

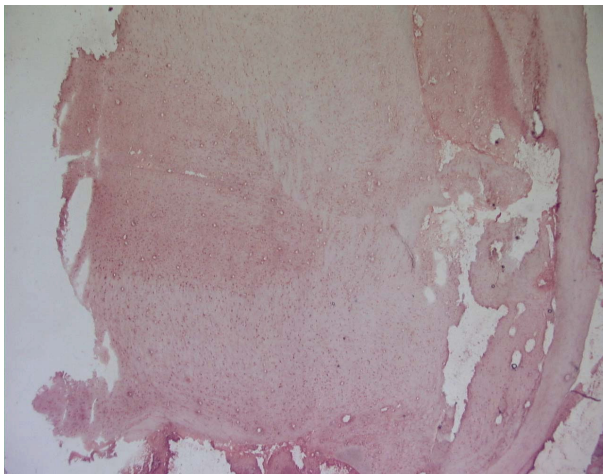


Abbildung 7-101. EPS 1A8. Maus, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

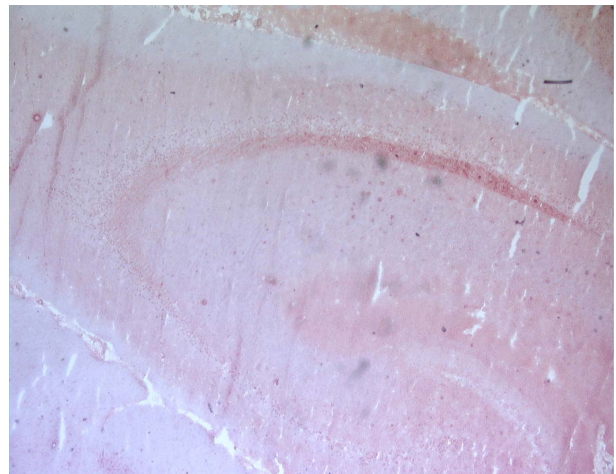


Abbildung 7-102. EPS 1A8. Kaninchen, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

PP2A

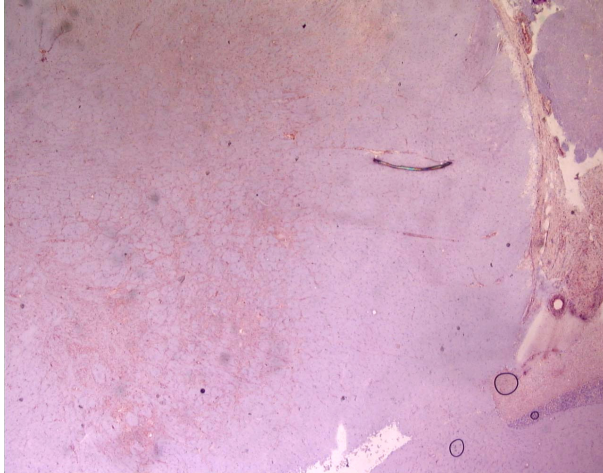


Abbildung 7-103. PP2A 2E6. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

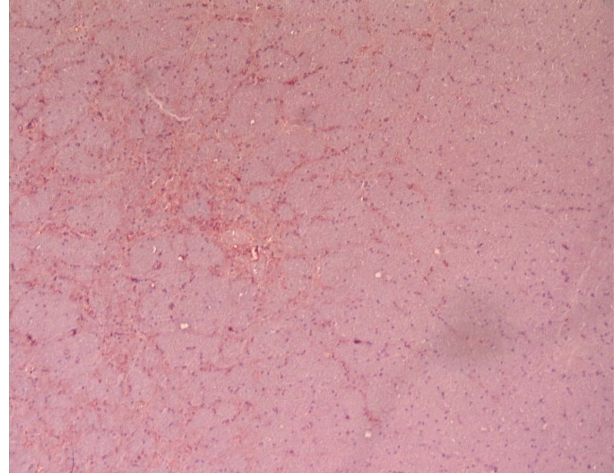


Abbildung 7-104. PP2A 2E6. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

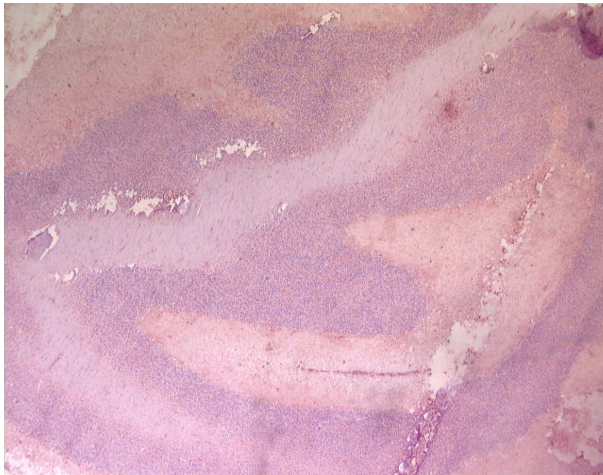


Abbildung 7-105. PP2A 2E6. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

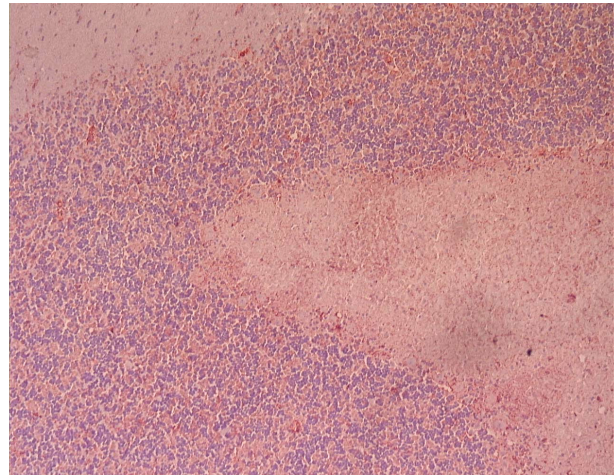


Abbildung 7-106. PP2A 2E6. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

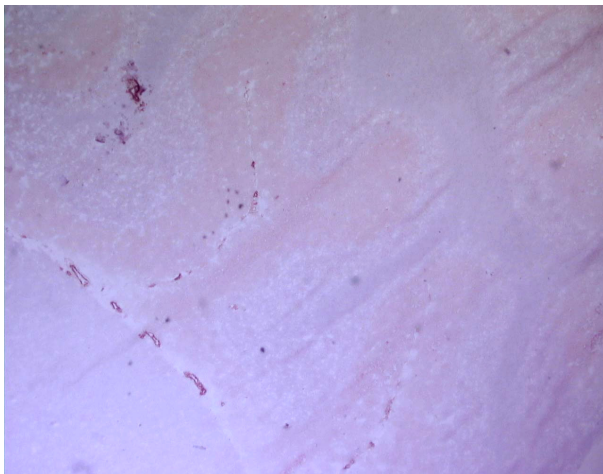


Abbildung 7-107. PP2A 2E6. Kaninchen, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

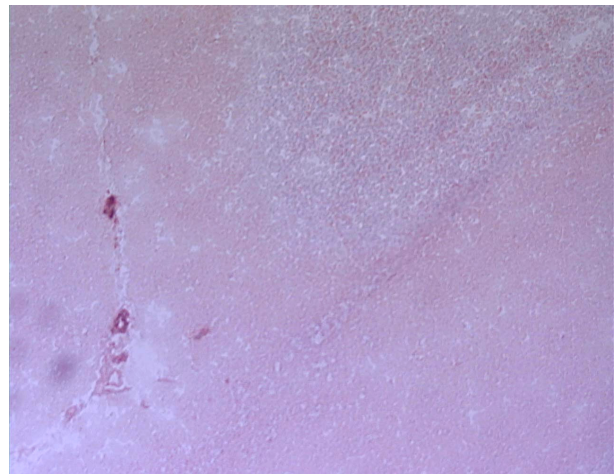


Abbildung 7-108. PP2A 2E6. Kaninchen, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

P9H



Abbildung 7-109. P9H 1C8. Huhn, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.



Abbildung 7-110. P9H 5E12. Huhn, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

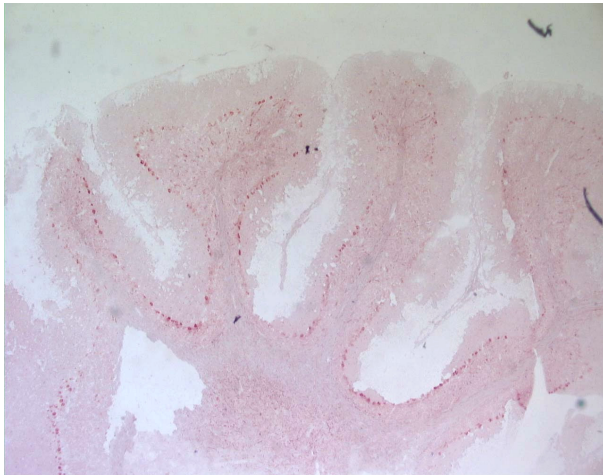


Abbildung 7-111. P9H 4D7. Huhn, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

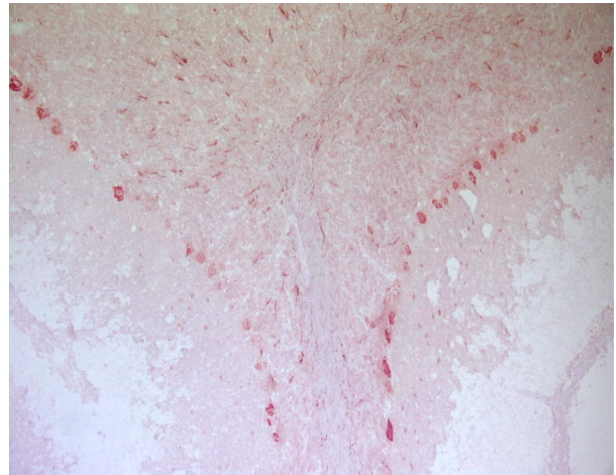


Abbildung 7-112. P9H 4D7. Huhn, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

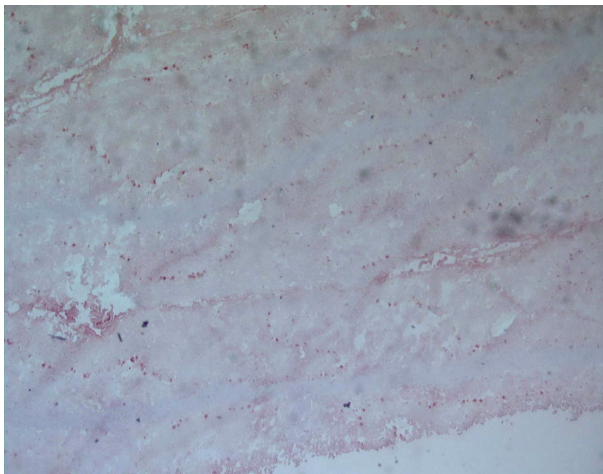


Abbildung 7-113. P9H 1C8. Rind, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

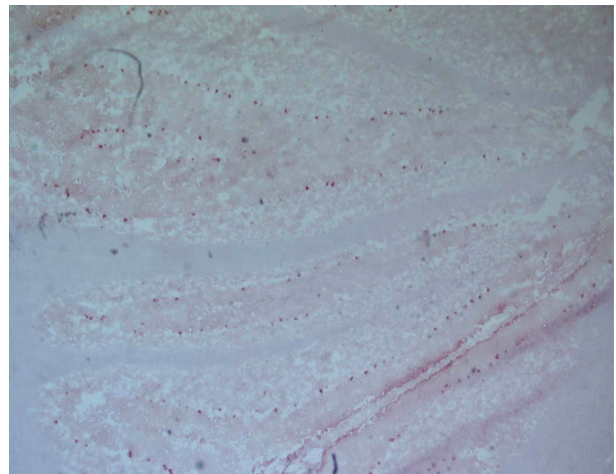


Abbildung 7-114. P9H 4D7. Rind, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

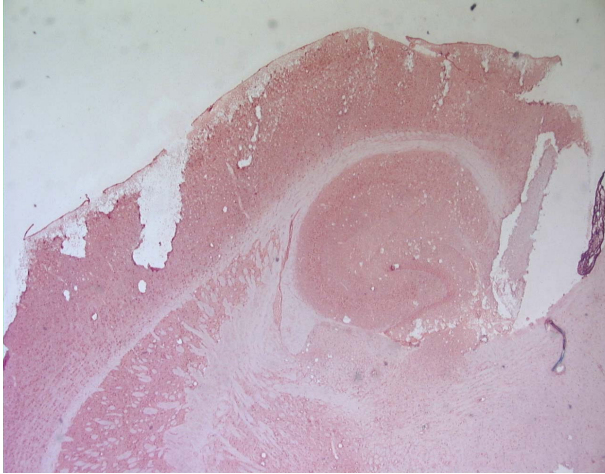


Abbildung 7-115. P9H 1C8. Maus, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

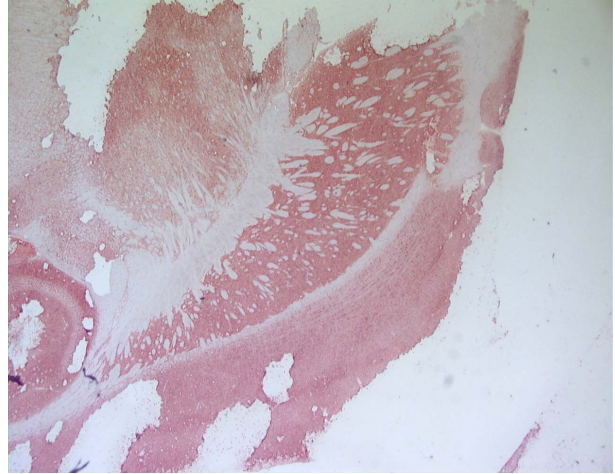


Abbildung 7-116. P9H 5E12. Maus, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

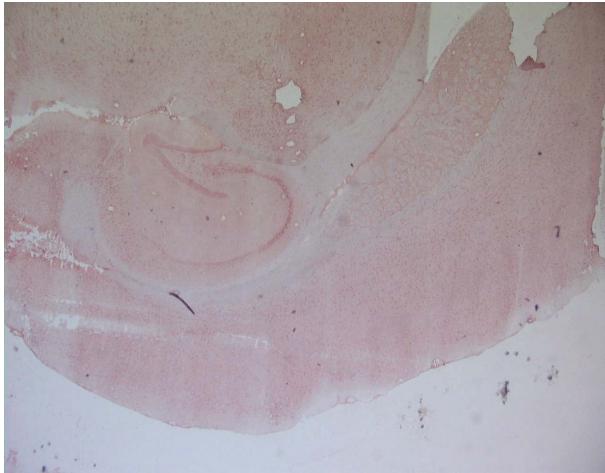


Abbildung 7-117. P9H 4D7. Maus, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

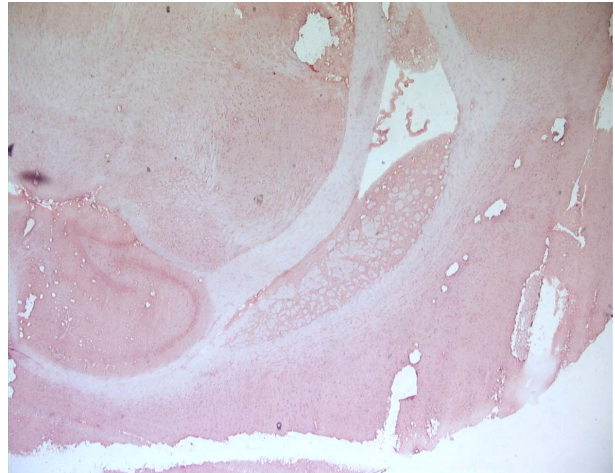


Abbildung 7-118. P9H 6E4. Maus, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.



Abbildung 7-119. P9H 5E12. Katze, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

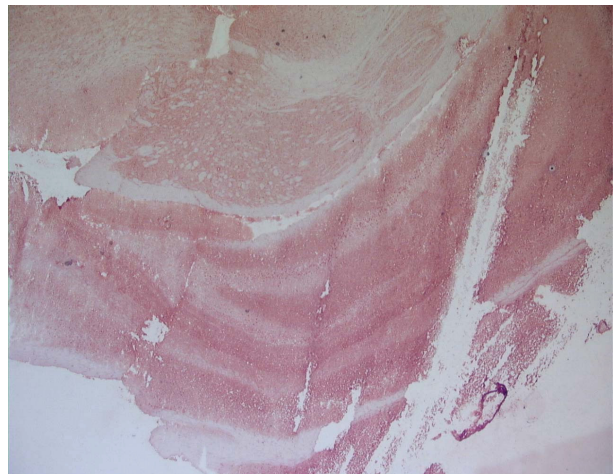


Abbildung 7-120. P9H 5E12. Ratte, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

PUR

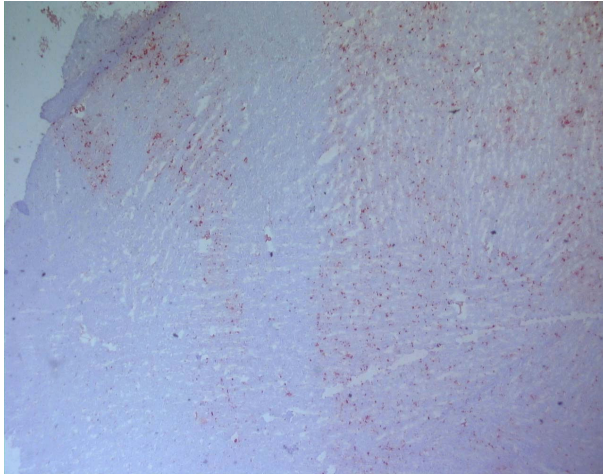


Abbildung 7-121. PUR11A3. Katze, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

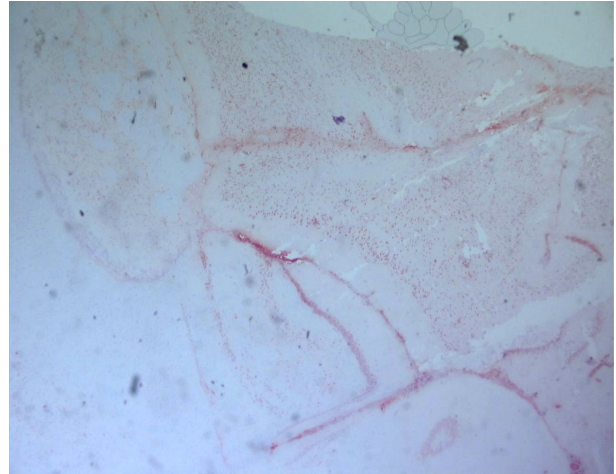


Abbildung 7-122. PUR11A3. Ratte, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

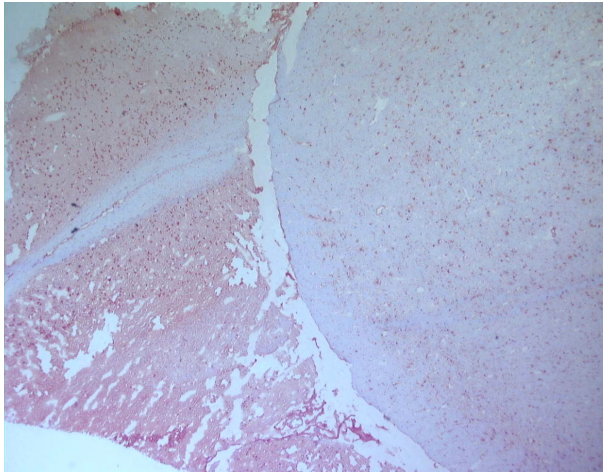


Abbildung 7-123. PUR1D7. Katze, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

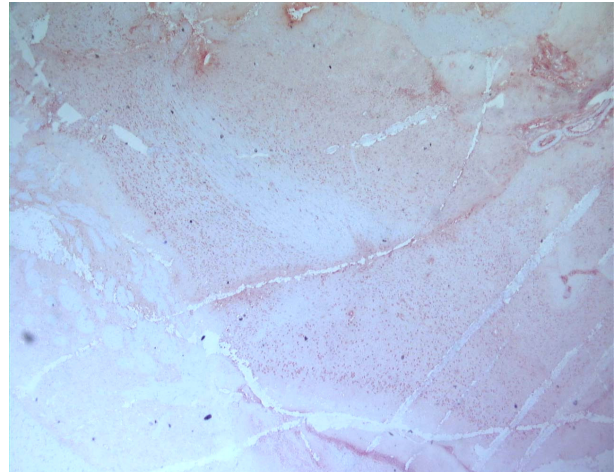


Abbildung 7-124. PUR1D7. Ratte, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

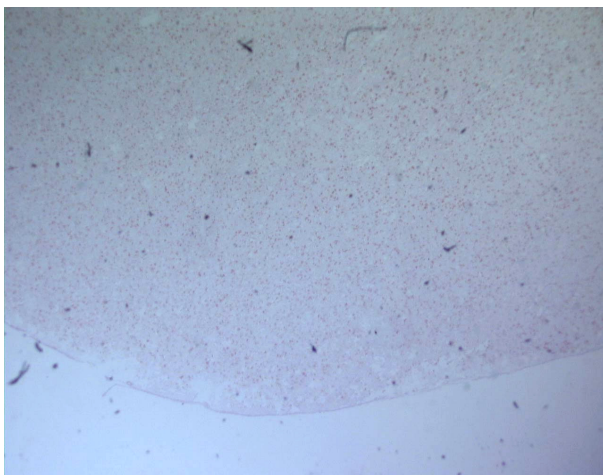


Abbildung 7-125. PUR1D7. Huhn, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

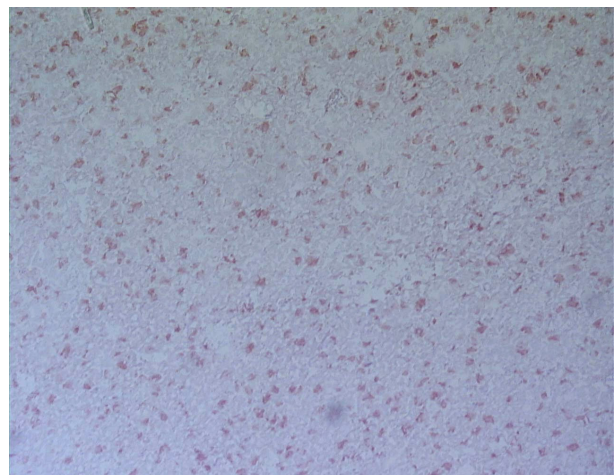


Abbildung 7-126. PUR1D7. Huhn, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

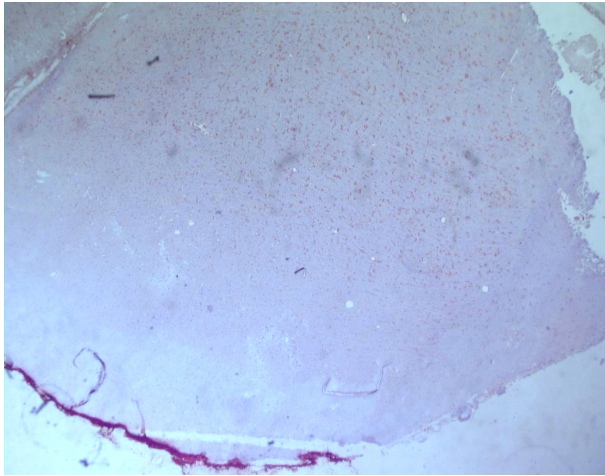


Abbildung 7-127. PUR 1D7. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

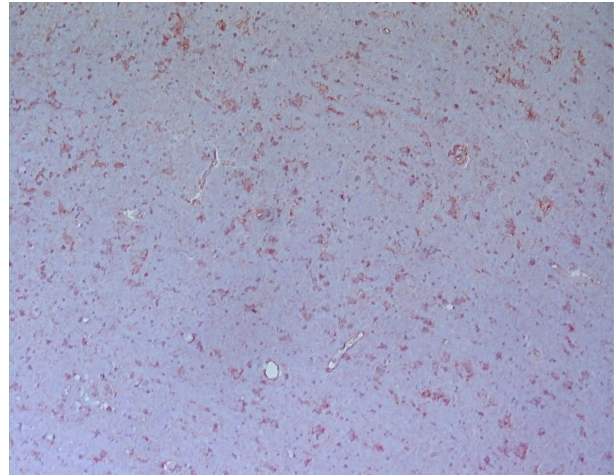


Abbildung 7-128. PUR 1D7. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

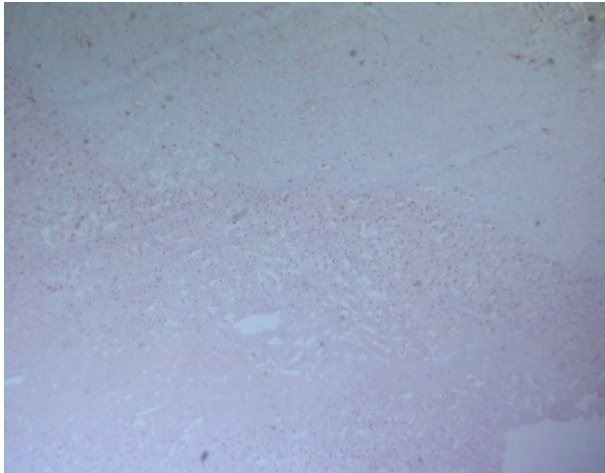


Abbildung 7-129. PUR 1D7. Hund, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

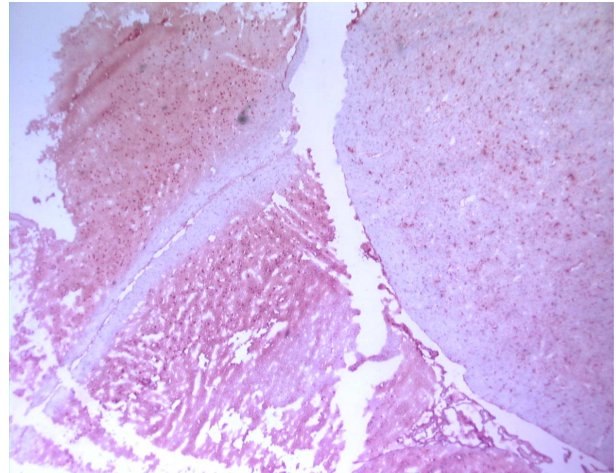


Abbildung 7-130. PUR 1F1. Katze, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

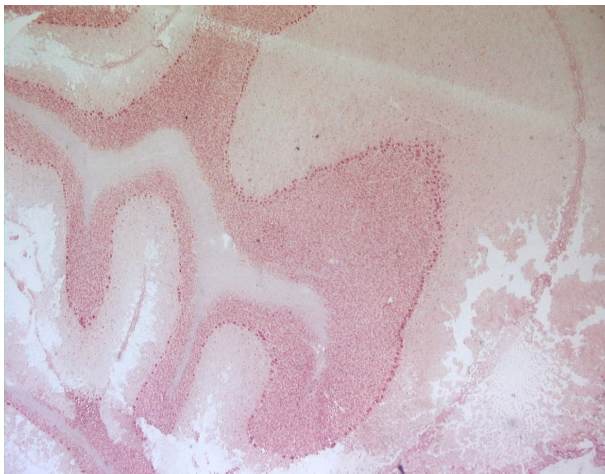


Abbildung 7-131. PUR 1F1. Huhn, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

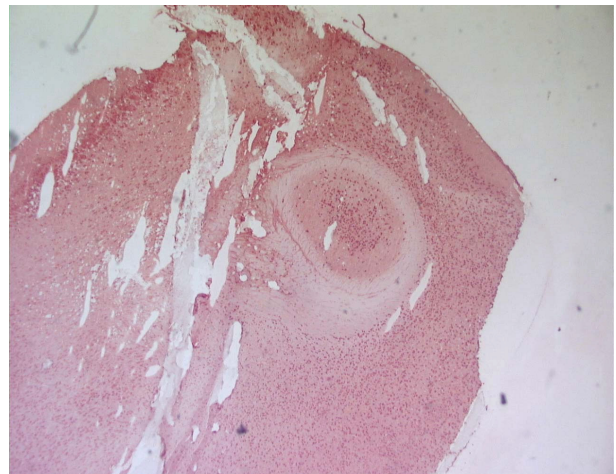


Abbildung 7-132. PUR 1F1. Maus, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

Parkin

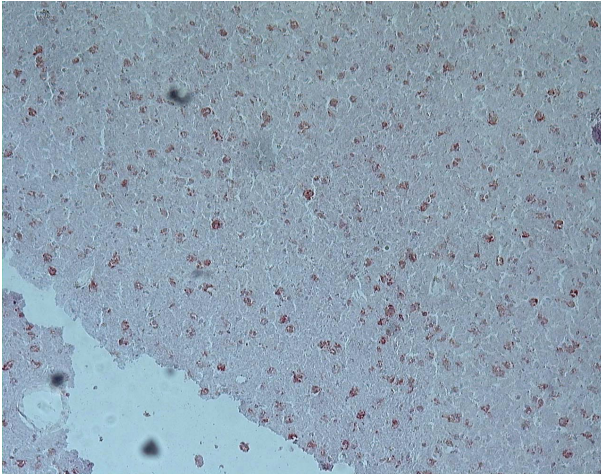


Abbildung 7-133. Park 7D3. Mensch, Gehirn.
Vergrößerung 10x.

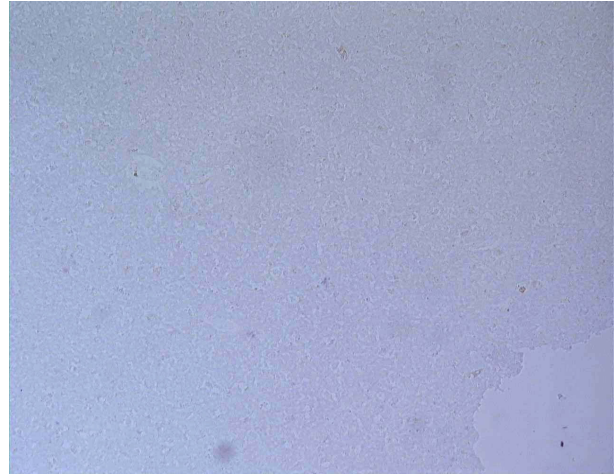


Abbildung 7-134. Park 5C3. Mensch, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

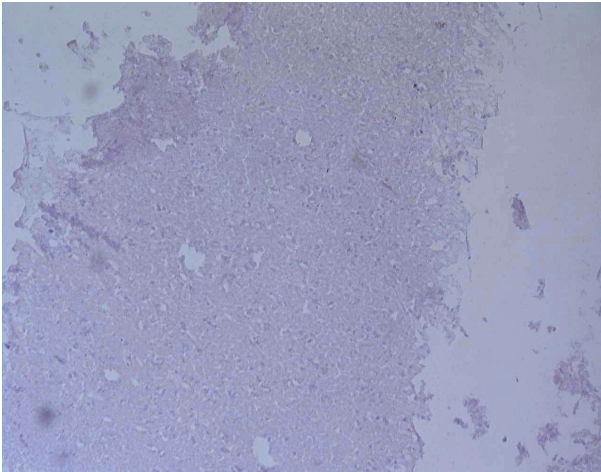


Abbildung 7-135. Park 6G8. Mensch, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

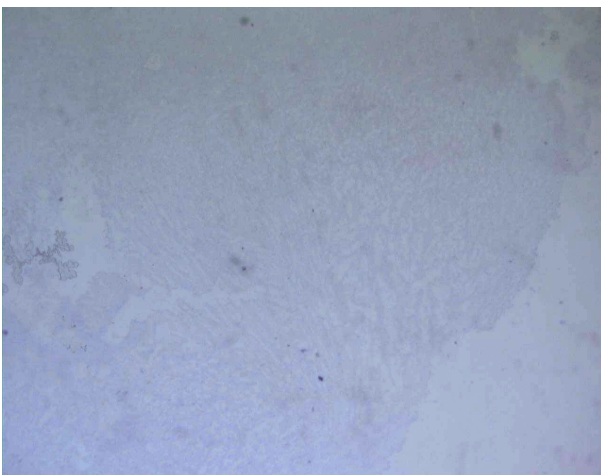


Abbildung 7-136. Park 5C3. Hund, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.



Abbildung 7-137. Park 5C3. Ratte, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

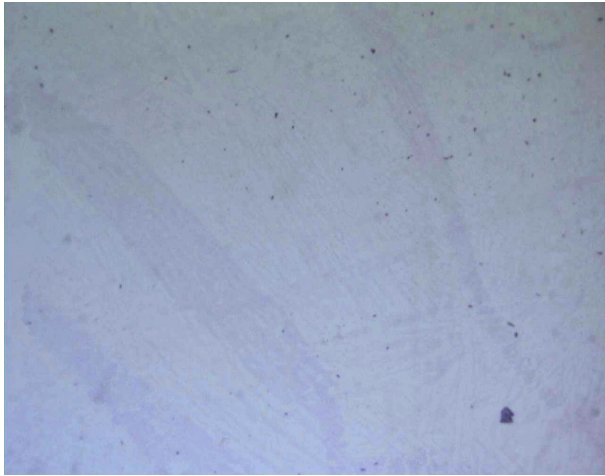


Abbildung 7-138. Park 5C3. Rind, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

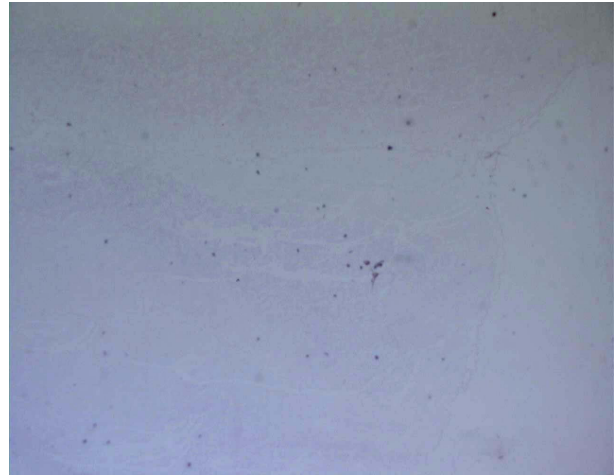


Abbildung 7-139. Park 5C3. Schwein, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

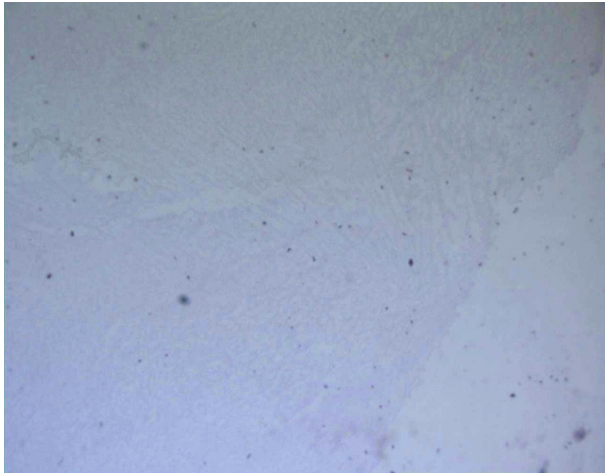


Abbildung 7-140. Park 6G8. Hund, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

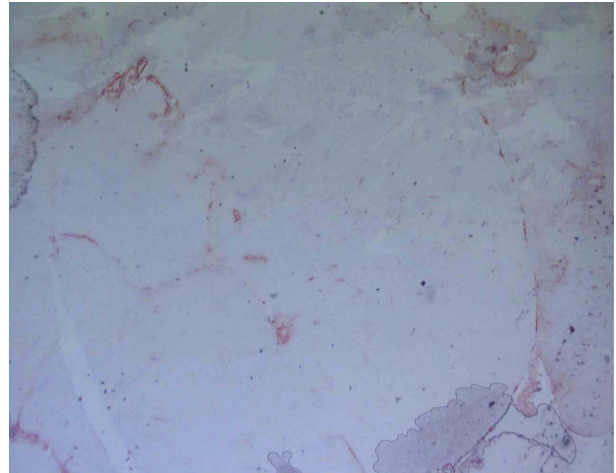


Abbildung 7-141. Park 6G8. Ratte, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

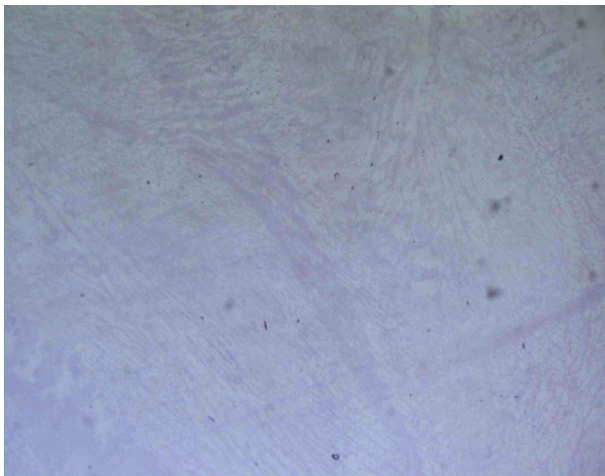


Abbildung 7-142. Park 6G8. Rind, Gehirn.
Vergrößerung 2,5x.

8 Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper sind unverzichtbare Hilfsmittel, um Proteinkomplexe aus Zellen zu isolieren oder Proteine in Gewebeschnitten zu lokalisieren. Sie dienen auch dazu, Entwicklungsvorgänge aufzuklären. Dabei wird als Modellorganismus für Vertebraten oft der Zebrafisch gewählt, da er sich asaisonal vermehrt, eine zahlreiche Nachkommenschaft hat und sowohl die Befruchtung als auch die Entwicklung außerhalb des Mutterleibs erfolgt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper generiert, die spezifisch mit neuronalen Geweben und Organen des Zebrafisches reagieren. Zur Immunisierung wurde Gehirngewebe des Zebrafisches verwendet. Immunisiert wurden Ratten. Antikörperbildende B-Zellen aus der Ratte wurden mit einer Mausmyelom-Zelllinie fusioniert. Proteine von Interesse wurden mit Hilfe der Antikörper aus Zelllysaten des Zebrafisch-Gehirns immunpräzipitiert und durch Elektrophorese in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die durch Antikörper detektierbaren Banden wurden ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine mit massenspektrometrischen Techniken identifiziert. In einem weiteren Ansatz diente eine in λ -Phagen inklonierte Genbank der Expression der Proteine. Die Proteine wurden ebenfalls mit monoklonalen Antikörpern identifiziert. Die Phagen, die diese Proteine produzierten, wurden vermehrt und die für das Protein kodierende DNA sequenziert. Wir haben unsere Anstrengungen vor allem auf Proteine neuronalen Ursprungs konzentriert, weil diese Strukturen in den Fischen besonders deutlich markiert wurden. Histologische Untersuchungen an anderen Spezies ergaben, dass die Antikörper mit neuronalen Strukturen vieler Spezies reagierten, was auf eine hohe Konservierung der Proteine in der Phylogenese schließen lässt.

Aus drei Fusionen mit Milzzellen von immunisierten Ratten wurden 2400 Zellüberstände erzeugt, die auf ihre Immunglobulin-Subklasse getestet wurden. IgG-positive Überstände wurden auf histologischen Schnitten untersucht. Schließlich wurden 17 Klone etabliert, die mit Nervengewebe des Zebrafisches reagierten, und weitere 9 Klone, die sowohl mit neuronalen Zellen des Zebrafisches als auch mit neuronalem Gewebe anderer Spezies reagierten. Die von den einzelnen Antikörpern erkannten Proteine wurden entweder massenspektrometrisch oder mittels einer Expressionsgenbank, die aus drei Tage alten Zebrafischlarven hergestellt wurde, identifiziert.

Es wurden Antikörper gegen folgende Proteine gefunden:

1. Tenascin R

Das Tenascin R ist ein Protein der extrazellulären Matrix. Es interagiert mit den Proteoglycanen Brevican, Neurocan und Phosphacan. Es wird vor allem während früherer Stadien der Entwicklung exprimiert. Immunhistochemisch wird es in der Körnerschicht des Kleinhirns, in bestimmten Arealen des Hippocampus, in der Retina und in Motoneuronen des Rückenmarks gefunden. Es wird mit Prozessen der Zellmigration und Axonentwicklung und Synapsenbildung in Verbindung gebracht.

2. Plasticin

Plasticin gehört zu den neuronalen, intermediären Filament-Proteinen (Neurofilamente). Plasticin ist ein Protein, das aus 435 Aminosäuren aufgebaut ist. Es ist verwandt mit dem Vertebratenprotein Peripherin und dessen Homolog bei Nichtvertebraten. Der monoklonale Antikörper reagiert im Zebrafisch mit Hirn, Rückenmark und Retina. Bei Schädigung des Nervus opticus am Zebrafisch wird ein Anstieg des Plasticins in der Regenerationsphase beobachtet. Plasticin spielt eine Rolle für die Plastizität der Zellen bei der Axonentwicklung.

3. TOP_{AP}

Der Antikörper reagiert mit Hirn, Rückenmark und Retina sowohl von Zebrafisch-Embryonen als auch von adulten Tieren. Das zugehörige Antigen wurde mit Hilfe der Expressionsgenbank definiert. Es ist zu 99% identisch mit TOP_{AP} der Säuger. Eine Funktion ist für dieses Protein bisher nicht bekannt.

4. VAT-1

Die Antikörper, die dieses Protein erkennen, färben Randbezirke der Gehirn- und Rückenmarksanlage beim ein Tag alten Zebrafischembryo. Auch beim erwachsenen Tier beschränkt sich die Reaktivität des Antikörpers auf Hirn, Rückenmark und Retina. Das Protein wurde mit Hilfe der Expressionsgenbank als Analogon zum VAT-1-Protein aus dem elektrischen Organ des Zitterrochens identifiziert. Das Protein spielt bei der Signalübertragung an Synapsen eine Rolle. Beim Menschen liegt sein Genort interessanterweise im Bereich des BRCA-1-Gens, das mit der neoplastischen Entartung von Mamma und Ovarium in Verbindung steht.

5. Kreuzreagierende Monoklonale Antikörper

Es wurden 16 monoklonale Antikörper, die gegen fünf verschiedene humane Antigene hergestellt worden waren, auf Kreuzreaktivität mit Zebrafischgehirn getestet. Die Antikörper reagierten sowohl mit dem Hirn des Zebrafisches als auch mit dem Hirn acht verschiedener Säugerspezies.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Versuch unternommen, gezielt gegen ein Fusionskonstrukt, das Teile des humanen Parkins enthielt, monoklonale Antikörper herzustellen. Aus vier Fusionen wurden nur drei spezifisch mit dem Antigen reagierende Antikörper selektiert, die auch im Western-Blot mit Parkin reagierten. In vivo wurde das Antigen in histologischen Schnitten jedoch nicht erkannt.

Die Auswertung aller Ergebnisse führt zu der Schlussfolgerung, dass zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern gentechnisch (durch Fusionsproteine) oder proteinchemisch (durch Peptid-Carrierkopplung) hergestellte Antigene eingesetzt werden sollten. Im Gegensatz zu größeren Organismen lässt sich der Aufwand, monoklonale Antikörper durch

ungezielte Immunisierung zu induzieren und anschließend zu charakterisieren, beim Zebrafisch rechtfertigen, da in der Literatur nur wenige Antikörper für diese Spezies beschrieben sind und die Austestung der Hybridome mit histologischen Methoden auf dem Gesamtorganismus erfolgen kann. Somit kann das Bindevverhalten des Antikörpers bei der Ersttestung auf einen Blick erfasst werden und die unspezifisch-reagierenden Hybridome können sofort verworfen werden.

Dass auch der Ansatz, gegen Fusionsproteine monoklonale Antikörper herzustellen, nicht immer zu Antikörpern mit den gewünschten Eigenschaften führt, zeigt das Beispiel Parkin. Die generierten Antikörper erkannten das Protein im Western-Blot, nicht jedoch in der Immunhistologie.

Danksagung

Frau Dr. med. E. Kremmer, ohne die diese Arbeit nicht möglich wäre, möchte ich für die Themenstellung, die fruchtbaren Diskussionen, stetige Hilfsbereitschaft, viel Geduld, Organisation der Arbeit und Korrekturen herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. Ralph Mocikat danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit, für die konstruktiven Vorschläge zur Verbesserung der Arbeit und intensive Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Dolores Schendel für die Möglichkeit, meine Arbeit am GSF-Institut für Molekulare Immunologie durchzuführen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau U. Ehrler, Frau C. Brucker, Frau B. Kaiser für viel Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken.

Zum Gelingen und zur Durchführung dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, mein besonderer Dank gilt:

Herrn Dr. M. Eulitz für die ZEGE 8F8 (Plasticin)-Untersuchungen am Massenspektrometer und die Auswertung der gefundenen Massen, besonders für die intensive Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Dr. Marius Üffing und Herrn Dr. Christian Glöckner (Institut für Humangenetik der GSF) für die Auftrennung und Vorbereitung der Tenascinproben für die massenspektrometrische Untersuchung.

Herrn Dr. Albert Sickmann (Medizinisches Proteom-Zentrum der Ruhr Universität in Bochum) für die massenspektrometrische Teascinanalyse mittels einer Kombination von nano-LC und Ionenfallen/MS/MS.

Frau Dr. Christine Hennard für die intensive Betreuung bei Arbeit mit der Expressionsgenbank und für die Identifizierung und Entschlüsselung der Aminosäuresequenzen des Proteins TOP-AP und des VAT-1-Homologs.

Herrn Prof. Dr John Nicholls (Hongkong) für das Erstellen der histologischen Schnitte eines menschlichen Embryos mit den Antikörpern ZEGE 3H9, ZEGE 6F1 und ZEGE 4B9.

Herrn Dr. P. Kahle (LMU München, Adolf-Butenandt-Institut , Abteilung Metabolische Biochemie) für die Western-Blot-Analyse mit PARK 6G8, PARK 5C3 und 5112 (Chemicon).

Herrn Erik Blazek für die präparative Darstellung von Proteinen (GSF, Institut für Molekulare Immunologie, Abteilung Genexpression).

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Familienname: Malamid
Vorname: Anna
Geburtsdatum: 12.03.1976
Geburtsort: Saratow, Russland
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNGSDATEN

1983-1993 Mittelschule, Saratow (Russland), Mittelschulabschluss 1993
1993-1996 Staatliche Medizinische Universität Saratow (Russland),
Studiengang: Humanmedizin, 6 Semester abgeschlossen
1996-1997 Umzug nach Deutschland,
Goethe-Institut (München), Deutschkurs
1997-2002 Ludwig-Maximilians-Universität München,
Studiengang: Medizin, 2. Staatsexamen 13.09.2002 (Note: gut)
2002-2003 Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg,
Studiengang: Medizin,
3. Staatsexamen im November 2003 (Note: gut)

BERUFSPRAXIS

2004-2004 Klinikum Karlsbad-Langensteinbach, Innere Medizin, Ärztin im
Praktikum

Approbation 01.10.2004

DISSERTATION:

2001-2005 Institut für Molekulare Immunologie, GSF-Forschungszentrum
für Umwelt und Gesundheit, München