

**Funktion und Expression der  
transmembranen Isoformen des  
HLA-Klasse-III-Gens *LST1***

**Dissertation der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**



**vorgelegt von**

**Christian Schiller**

**München, 24. Juni 2009**

---

**Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Elisabeth H. Weiß**

**Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Schleicher**

**Tag der mündlichen Prüfung: 7. August 2009**

1	Zusammenfassung .....	6
2	Einleitung.....	7
2.1	Der HLA-Komplex .....	7
2.2	Die HLA-Klasse-III-Region .....	8
2.3	Das <i>LST1</i> -Gen .....	8
2.3.1	Genomische Lokalisation von <i>LST1</i> .....	9
2.3.2	Exon-Intron-Stuktur von <i>LST1</i> .....	9
2.3.3	Transkription von <i>LST1</i> .....	10
2.3.4	Translation von <i>LST1</i> .....	12
2.3.5	<i>LST1</i> -Polymorphismen .....	14
2.3.6	Funktion von <i>LST1</i> .....	18
3	Zielsetzung dieser Arbeit .....	20
4	Material.....	21
4.1	Arbeiten mit Bakterien .....	21
4.1.1	Bakterienstämme.....	21
4.1.2	Kulturmedien für Bakterien .....	21
4.1.3	Selektionsantibiotika für Bakterien .....	21
4.2	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	21
4.2.1	Eukaryotische Zelllinien .....	21
4.2.2	Kulturmedien für eukaryotische Zellen .....	22
4.3	Enzyme.....	22
4.3.1	Restriktionsenzyme .....	22
4.3.2	Sonstige Enzyme.....	23
4.4	Nukleinsäuren .....	23
4.4.1	Vektoren .....	23
4.4.2	Oligonukleotide.....	24
4.4.3	Größenstandards.....	25
4.5	Antikörper.....	25
4.6	Kits und spezielle Reagenzien .....	26
4.7	Gebrauchslösungen .....	26
4.8	Verbrauchsmaterialien .....	27
4.9	Geräte.....	28
5	Methoden .....	30
5.1	Arbeiten mit Bakterien .....	30
5.1.1	Gießen von Agarplatten .....	30
5.1.2	Anzucht von Bakterien im Schüttelinkubator .....	30
5.1.3	Einfrieren von Bakterien .....	30
5.1.4	Transformation durch Hitzeschock.....	30
5.2	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	31
5.2.1	Bestimmung der Zellzahl .....	31
5.2.2	Kultivieren von eukaryotischen Zellen.....	31
5.2.3	Kryokonservierung von Zellen .....	32
5.2.4	Transfektion mittels Lipofektion.....	32
5.2.5	Transfektion mittels Elektroporation .....	33
5.2.6	Durchflusszytometrie .....	33
5.2.7	Polylysin-Beschichtung von Deckgläschen .....	34
5.2.8	Immunzytochemie .....	34
5.2.9	Mikroskopie von lebenden Zellen.....	35
5.2.10	Zellmarkierung durch Fluoreszenzfarbstoffe .....	35

5.2.11	Isolierung von Exosomen.....	35
5.2.12	Immunisierung und Etablierung von Hybridomzelllinien .....	36
5.2.13	Generierung von unreifen und reifen DC .....	36
5.3	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	37
5.3.1	Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien .....	37
5.3.2	Isolierung von RNS aus eukaryotischen Zellen.....	38
5.3.3	Reinigen von DNS durch Phenol-Chloroform-Extraktion .....	38
5.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	39
5.3.5	Polymerase-Kettenreaktion.....	39
5.3.6	RT-PCR.....	43
5.3.7	Agarosegelelektrophorese .....	43
5.3.8	Präparative Agarosegelelektrophorese .....	44
5.3.9	Klonierung von PCR-Produkten .....	44
5.3.10	Restriktionsverdau .....	44
5.3.11	Ligation.....	44
5.3.12	Sequenzieren von Plasmiden .....	44
5.4	Arbeiten mit Proteinen.....	44
5.4.1	Herstellung von Lysaten aus eukaryotischen Zellen .....	44
5.4.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Bakterien .....	45
5.4.3	Proteinreinigung mittels Affinitätssäulenchromatographie .....	45
5.4.4	Dialyse von Proteinlösungen .....	46
5.4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels der Bradford-Methode .....	46
5.4.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	46
5.4.7	Anfärben von Proteinen mittels Coomassiefärbung .....	47
5.4.8	Anfärben von Proteinen mittels Silberfärbung .....	47
5.4.9	Western-Analyse .....	48
5.4.10	Immundetektion von Western-Membranen .....	48
5.4.11	Quantitative Immundetektion von Western-Membranen .....	49
5.4.12	Strippen von Western-Membranen .....	50
5.4.13	Immunpräzipitation .....	50
5.4.14	Präabsorption von Hybridomüberständen.....	51
6	Ergebnisse .....	52
6.1	Herstellung von LST1-Expressionsvektoren.....	52
6.1.1	Isolierung von LST1-Spleißvarianten .....	52
6.1.2	Charakterisierung einer neuen LST1-Spleißvariante.....	55
6.1.3	Klonierung von LST1-Expressionsvektoren .....	57
6.2	Herstellung von monoklonalen LST1-Antikörpern.....	62
6.2.1	Isolierung von rekombinantem HIS-LST1 .....	62
6.2.2	Immunisierung und Etablierung von Hybridomzelllinien .....	64
6.2.3	Charakterisierung der monoklonalen LST1-Antikörper.....	64
6.3	Proteincharakterisierung von LST1 .....	72
6.3.1	<i>LST1</i> kodiert evolutionär konservierte Proteine.....	72
6.3.2	<i>LST1</i> kodiert Typ-I-Transmembranproteine .....	74
6.3.3	LST1-Transmembranisoformen bilden Multimere mittels Disulfidbrücken .....	77
6.3.4	Tyrosin-Phosphorylierung von LST1 .....	79
6.3.5	LST1 dimerisiert nach Kreuzvernetzung .....	83
6.3.6	Funktionelle Bereiche der LST1-Transmembranisoformen .....	84
6.4	Charakterisierung der Zellmorphologie-Modulation durch LST1 .....	86
6.4.1	LST1-Überexpression induziert morphologische Veränderungen .....	86

6.4.2 LST1 induziert die Bildung von TNT .....	87
6.4.3 LST1 induziert die Bildung von funktionellen TNT.....	91
6.4.4 Nachweis von endogenem LST1 in TNT.....	95
6.5 Charakterisierung der LST1-Proteinexpression.....	97
6.5.1 Regulation der LST1-Proteinexpression .....	97
6.5.2 LST1-Proteinexpression in DC .....	101
7 Diskussion.....	104
7.1 Charakterisierung und Funktionsanalyse von LST1 .....	104
7.1.1 Evolution des <i>LST1</i> -Gens .....	104
7.1.2 Proteincharakterisierung von LST1 und Funktion als potentielles TRAP.....	105
7.1.3 Modulation der Zellmorphologie durch LST1.....	111
7.2 Expression von LST1 .....	116
7.2.1 Regulation der LST1-Expression .....	116
7.2.2 Regulation der LST1-Expression in DC .....	117
7.3 Arbeitsmodell .....	119
8 Literaturverzeichnis.....	121
9 Anhang.....	129
9.1 Abkürzungsverzeichnis .....	129
9.2 <i>LST1</i> -Sequenz .....	131
9.3 <i>LST1</i> -Polymorphismen.....	133
9.4 Charakterisierung der monoklonalen LST1-Antikörper .....	134
9.5 Proteinvergleiche .....	136
9.6 Verwendete Vektoren.....	137
10 Danksagung .....	140

# 1 Zusammenfassung

Die MHC-Klasse-III-Region beherbergt mehrere inflammatorische Gene und enthält das *LST1*-Gen (*Leukocyte Specific Transcript 1*). *LST1*-Transkripte werden stark in Immunzellen, insbesondere in B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und Dendritischen Zellen, exprimiert. Die *LST1*-Transkripte werden durch inflammatorische Stimuli deutlich verstärkt und weiterhin extensiv alternativ gespleißt: Es sind 17 Spleißvarianten bekannt, die 12 unterschiedliche Polypeptide kodieren. Die *LST1*-Isoformen lassen sich in transmembrane oder lösliche Proteine klassifizieren. Innerhalb dieser Klassen können die *LST1*-Isoformen in der Sequenz ihrer C-terminalen Aminosäuren teilweise stark variieren. In den bisherigen, funktionellen Studien wurde postuliert, dass *LST1*-Isoformen sowohl in der Regulation der Immunantwort, wie in der interzellulären Kommunikation eine Rolle spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion und Expression von *LST1* auf der Proteinebene untersucht. Aus RNS der U-937-Zelllinie konnten über RT-PCR zehn Spleißvarianten isoliert werden, die unterschiedliche Isoformen kodieren. Die cDNS wurde zur Herstellung von Vektoren für die rekombinante Expression von sechs *LST1*-Isoformen verwendet. Um auch die endogenen Proteine untersuchen zu können, wurden monoklonale Antikörper gegen bakteriell exprimiertes *LST1* hergestellt und charakterisiert. Der *LST1*-7E2-Antikörper konnte zur Detektion von denaturiertem *LST1* in der Western-Analyse eingesetzt werden, während die Klone 2B1 und 8D12 zusätzlich zum Nachweis des nativen Proteins in der Immunpräzipitation, Durchflusszytometrie und Immunzytochemie geeignet waren.

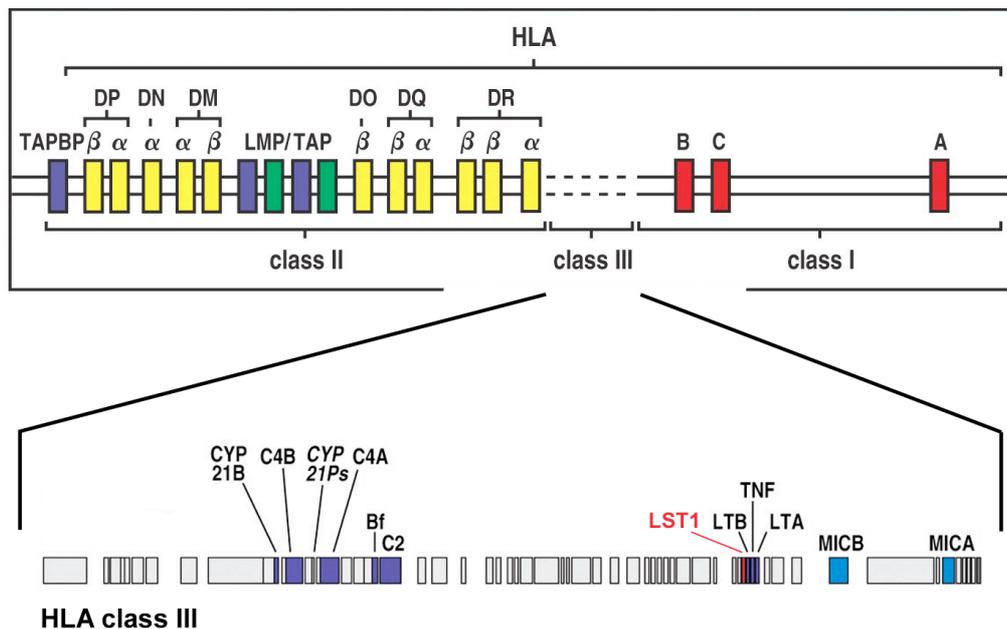
Die Untersuchung der *LST1*-Proteinexpression zeigte, dass diese nicht mit der Transkriptexpression korreliert. In sämtlichen untersuchten Zellen konnte lediglich die *LST1*.2345-Isoform detektiert werden. Es wurden keine höheren Proteinmengen in Immunzellen beobachtet. In weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die *LST1*-Konformation während der Reifung von Dendritischen Zellen differentiell reguliert wird; dieser Effekt konnte auf die Wirkung von  $\text{TNF-}\alpha$  zurückgeführt werden.

Im ersten Abschnitt der funktionellen Untersuchung von *LST1* wurden die evolutionär konservierten Motive der Volle-Länge transmembranen *LST1*.2345-Isoform bestimmt und gesondert analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass *LST1* Typ-I-Transmembranproteine kodiert, die Disulfidbrücken-vermittelte Multimere bilden. Weiterhin konnte die Phosphorylierung von zwei konservierten, Tyrosin-enthaltenden Motiven nachgewiesen werden. Bei einem dieser Motive handelte es sich um ein potentielles ITIM, das in U-937-Zellen konstitutiv phosphoryliert war, die Phosphorylierung des zweiten Tyrosin-enthaltenden Motivs führte zur Dimerisierung von *LST1* und anschließend zu dessen mutmaßlichem Abbau. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass *LST1* ein potentielles transmembranes Adaptorprotein (TRAP) ist. Eine ähnliche Wirkungsweise wie bekannte TRAP, konnte aber bei der Kreuzvernetzung von rekombinantem *LST1* in HEK 293T-Zellen nicht bestätigt werden, da diese nicht zur Phosphorylierung, sondern lediglich zur Dimerisierung des Proteins führte. Im zweiten Abschnitt der funktionellen Untersuchung von *LST1* wurde dessen Rolle bei der Regulation der Zellmorphologie untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von transmembranem *LST1* die Bildung von funktionellen tunneling nanotubes (TNT) induziert. Dieser Befund bestätigt frühere Vermutungen, dass *LST1* die interzelluläre Kommunikation vermittelt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Der HLA-Komplex

Der HLA-Komplex (Human Leukocyte Antigen) erstreckt sich über 3,6 Megabasenpaare DNS und umfasst 239 Gene (Shiina et al. 2004). Er ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6, im Bereich 6p21.3, lokalisiert und wird in Klasse-I-, II- und III-Regionen unterteilt (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Übersicht des HLA-Komplexes.** Schematische Darstellung der Organisation des HLA-Komplexes in Klasse-I-, II- und III-Regionen. Die Klasse-III-Region, die das *LST1*-Gen (rot markiert) enthält, wird detaillierter gezeigt (Quelle: verändert nach Janeway et al. 2005).

Die detaillierte Charakterisierung des HLA-Komplexes begann, nachdem bekannt wurde, dass die in diesem Komplex kodierten MHC-Klasse-I- und II-Moleküle (Major Histocompatibility Complex) für die Antigenpräsentation an der Zelloberfläche verantwortlich sind. In der HLA-Klasse-I-Region werden die  $\alpha$ -Ketten der MHC-Klasse-I-Moleküle kodiert, die im endoplasmatischen Retikulum mit Antigenen beladen werden. In der HLA-Klasse-II-Region werden die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der MHC-Klasse-II-Moleküle kodiert. Diese werden mit Antigenen beladen, wenn das Vesikel, in dem sie sich befinden, mit einem antigenhaltigen Endosom verschmilzt. Neben der Antigenpräsentation, dienen MHC-Moleküle den Zellen des Immunsystems zur Unterscheidung zwischen körpereigenen Zellen und körperfremden Organismen, bzw. Gewebe und spielen deswegen in der Transplantationsmedizin eine wichtige Rolle.

Die funktionellen Gene im HLA-Komplex lassen sich in 4 Kategorien einordnen. Die hochpolymorphen, klassischen HLA-Gene kodieren die MHC-Moleküle. Die nicht-klassischen HLA-Gene kodieren MHC-ähnliche Moleküle, welche jedoch nur eine begrenzte Anzahl an Antigenen präsentieren können. Die inflammatorischen Gene kodieren Proteine, die eine Rolle

in der Immunreaktion spielen. In die Kategorie der nicht-inflammatorischen Gene lassen sich alle im HLA-Komplex lokalisierten Gene einordnen, die nicht an der Immunreaktion beteiligt sind. Darunter fallen Gene, die an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt sind, wie z.B. Transkriptionsregulation (*CREBL1*), Mismatchreparatur (*MSH5*), ATP-Hydrolyse (*ATP6V1G2*) und Apoptose (*BAT3*). Kopplungsanalysen haben gezeigt, dass Gene im HLA-Komplex mit mehr als 100 Krankheiten assoziiert sind (Shiina et al. 2004). In den meisten Fällen handelt es sich um ein bestimmtes Allel eines klassischen HLA-Gens, das mit einem erhöhten Risiko einer autoimmunen Erkrankung assoziiert ist, z.B. das HLA-DRB1\*401/404-Allel bei rheumatoider Arthritis (MacGregor et al. 1995), das HLA-DRB1\*1501-Allel bei multipler Sklerose (Chao et al. 2009), das HLA-B\*39-Allel bei Typ-I-Diabetes (Nejentsev et al. 2007) und das HLA-B\*27-Allel bei Spondylitis ankylosans (Reveille 2006).

## 2.2 Die HLA-Klasse-III-Region

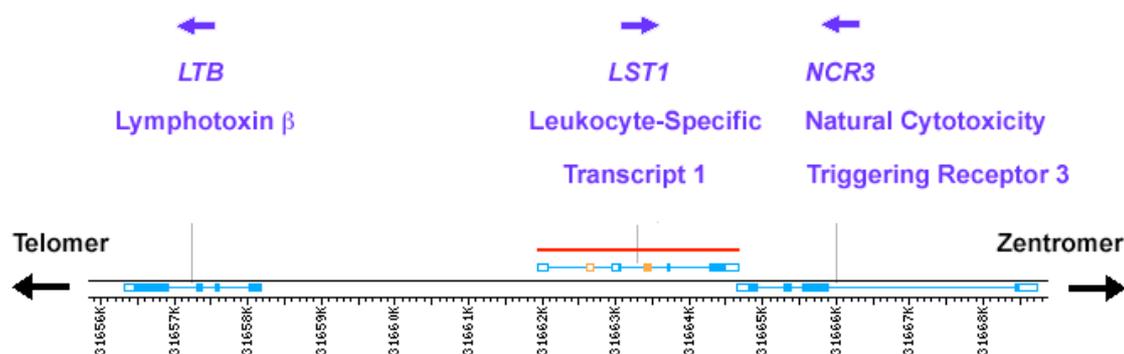
Zwischen den HLA-Klasse-I- und Klasse-II-Regionen befindet sich die HLA-Klasse-III-Region (Abb. 1). Diese umfasst den Bereich zwischen den Genen *NOTCH4* und *BAT1* auf einer Länge von 730 Kilobasenpaaren DNS. Die Klasse-III-Region enthält 62 Gene und besitzt somit die höchste Gendichte im humanen Genom: Mehr als 14 % der Region sind proteinkodierend und mehr als 72 % der Region werden transkribiert (Xie et al. 2003). Der HLA-Klasse-III-Abschnitt beherbergt weder klassische noch nicht-klassische HLA-Gene. Alle im Komplex enthaltenen Gene lassen sich entweder als inflammatorische oder als nicht-inflammatorische Gene charakterisieren. Wie bereits unter 2.1 ausgeführt, sind die meisten mit dem HLA-Komplex assoziierten Krankheiten, auf bestimmte Allele der klassischen HLA-Gene zurückzuführen. Dennoch ist eine Reihe von Polymorphismen in den inflammatorischen Genen des HLA-Klasse-III-Komplexes bekannt, die mit einer höheren Inzidenz von bestimmten autoimmunen Krankheiten assoziiert sind. So ist z.B. der G-308-Polymorphismus im *TNF*-Gen mit Colitis Ulcerosa (Yamamoto-Furusho et al. 2004), der Basedow-Krankheit (Bednarczuk et al. 2004) und dem Löfgren-Syndrom (Mrazek et al. 2005) assoziiert. Weiterhin sind krankheitsrelevante Polymorphismen in den Genen *MICA* und *TAP2* bekannt. Die *MICA*-Allele A5 und A9 sind jeweils mit Typ-I-Diabetes (Gambelunghe et al. 2000) und Psoriasis-Arthritis (Gonzales et al. 2002) assoziiert, während das *TAP2*-565A-Allel eine genetische Prädisposition für rheumatoide Arthritis darstellt (Yu et al. 2004). Bei den meisten dieser Krankheiten spielen Allele der klassischen HLA-Gene ebenfalls eine Rolle, sodass sich die genetische Prädisposition aus dem Zusammenspiel von Allelen klassischer HLA-Gene und inflammatorischer Gene ergibt.

## 2.3 Das *LST1*-Gen

Das Maus-Homolog zum menschlichen *LST1*-Gen wurde 1987 entdeckt, als Tsuge et al. in einer cDNS-Genbank von Maus-B-Lymphozyten nach neuen B-Zell-spezifischen Transkripten suchten. Im Klon B144 fanden sie ein solches Transkript und benannten das Gen nach dem Klon. Durch Restriktionskartierung konnte das Gen 10 kb zentromerisch vom *Tnf*-Gen im H-2-Komplex der Maus lokalisiert werden. Einige Jahre später wurde das menschliche Ortholog von *B144* entdeckt (Messer et al. 1991 und Sargent et al. 1989) und wegen der starken Transkriptexpression in Leukozyten *LST1* (Leukocyte Specific Transcript 1) benannt.

### 2.3.1 Genomische Lokalisation von *LST1*

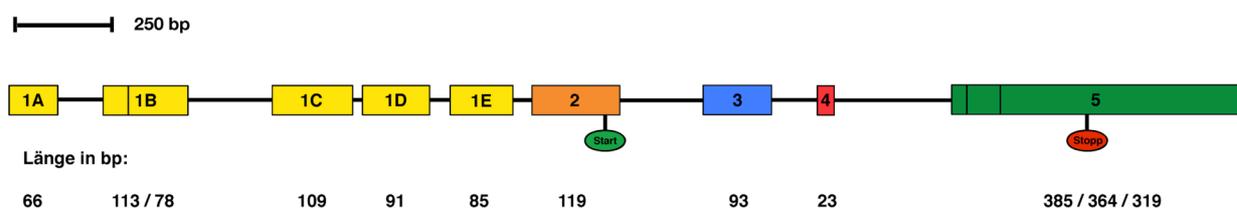
Das *LST1*-Gen ist in der HLA-Klasse-III-Region lokalisiert, im sog. *TNF*-Cluster, welcher mehrere inflammatorische Gene beherbergt (Abb. 1). *LST1* umfasst 2,7 Kilobasenpaare DNS und wird von den Genen *LTB* und *NCR3* auf dem Gegenstrang flankiert (Abb. 2). *LTB* kodiert das Lymphotoxin- $\beta$ , ein Zytokin der TNF-Superfamilie, *NCR3* kodiert einen aktivierenden Rezeptor auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die Gene *LST1* und *NCR3* liegen sehr dicht aneinander, ihre Polyadenylierungssequenzen sind nur 47 Basenpaare (bp) voneinander entfernt (Nalabolu et al. 1996).



**Abbildung 2: Genorganisation von *LST1* und dessen flankierenden Genen.** Die Skala unten ist in Kilobasenpaaren gezeichnet, die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an (Quelle: verändert nach NCBI Map Viewer, [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/)).

### 2.3.2 Exon-Intron-Stuktur von *LST1*

Das *LST1*-Gen wird in 9 Exone und 8 Introne unterteilt (Abb. 3), wobei die Exone 1A - 1E nicht proteinkodierend sind, jedes dieser Exone enthält jedoch mindestens eine alternative Transkriptionsinitiationsstelle. Im Exon 1B sind zwei Transkriptionsinitiationsstellen vorhanden und das Exon 5 enthält zwei alternative Spleißstellen, dies erhöht die Anzahl der exonischen Teilsequenzen auf 12. Die durch alternative Transkriptionsinitiation entstehende Variante von Exon 1B wird als Exon 1B' bezeichnet. Die durch Benutzung der alternativen Spleißstellen in Exon 5 entstehenden Varianten werden als Exon 5' und 5'' bezeichnet.



**Abbildung 3: Exon-Intron-Stuktur von *LST1*.** Die alternative Transkriptionsinitiationsstelle in Exon 1B und die alternative Spleißstellen in Exon 5 sind durch schwarze Striche gekennzeichnet. Die allgemeine Translationsinitiationsstelle ist durch „Start“ markiert. Das Stopp-Codon der Exon 4-enthaltenden Transkripte ist durch „Stopp“ gekennzeichnet. Die Länge der einzelnen Exone ist in Basenpaaren angegeben. Nur die Exone sind im oben links angegebenen Maßstab gezeichnet, die Introne sind aus Platzgründen kürzer dargestellt.

Das Exon 4 umfasst nur 23 bp DNS, es wurde jedoch auch eine 148 bp lange Exon 4-Sequenz beschrieben (Raghunathan et al. 2001). Mittels RT-PCR konnten aber aus RNS von der histiozytären Lymphomzelllinie U-937 und Dendritischen Zellen (DC) keine Transkripte isoliert werden, die ein Exon 4 dieser Länge enthielten. Dies lässt vermuten, dass die 148 bp lange Exon 4-Variante nur sehr selten in *LST1*-Transkripten zu finden ist und eine untergeordnete biologische Rolle spielt (Hirner 2004).

### 2.3.3 Transkription von *LST1*

#### 2.3.3.1 *LST1*-Spleißvarianten

Sämtliche *LST1*-Transkripte enthalten eines der alternativen Exone 1, das Exon 2 und das Exon 5 oder eine seiner verkürzten Varianten. *LST1* wird extensiv alternativ gespleißt (de Baey et al. 1997 und Rollinger-Holzinger et al. 2000) und es sind insgesamt 16 *LST1*-Spleißformen bekannt (siehe Tabelle 1). Diese kommen durch die unterschiedliche Benutzung der alternativen Exone 1A - E, das Vorhandensein der Exone 3 und 4 im Transkript oder das Verwenden der alternativen Spleißstellen im Exon 5 zustande.

**Tabelle 1: Beschriebene *LST1*-Spleißvarianten.** Die Spleißvarianten A - H wurden mit den dazugehörigen, alternativen Exon 1-Sequenzen charakterisiert (de Baey et al. 1997). Bei den Spleißvarianten I - O wurden nur die proteinkodierenden Exone 2 – 5 charakterisiert (Hillier et al. 1996, Rollinger-Holzinger et al. 2000 und Mulcahy et al. 2005), daher ist die tatsächliche Länge dieser Transkripte höher als hier angegeben.

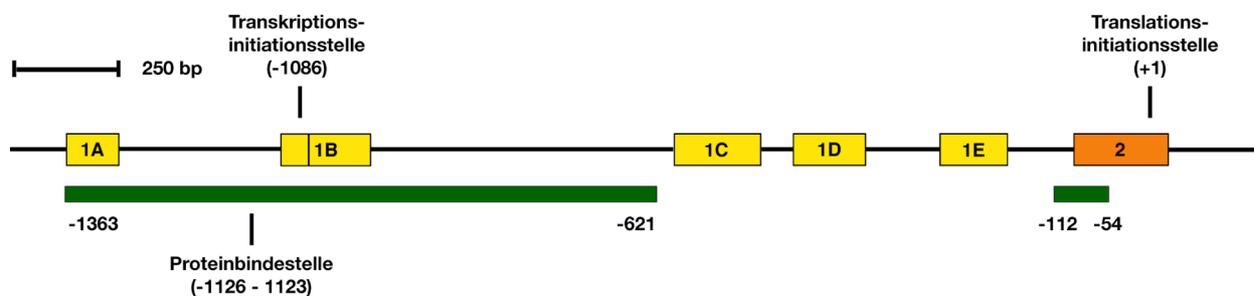
Spleißvariante	Alternativer Name	Exone	Länge
LST1/A	LST1.1B2345´	1B, 2, 3, 4, 5´	712 bp
LST1/B	LST1.1B´2345´	1B´, 2, 3, 4, 5´	677 bp
LST1/C	LST1.1C235	1C, 2, 3, 5	706 bp
LST1/D	LST1.1B25´	1B, 2, 5´	596 bp
LST1/E	LST1.1D25´	1D, 2, 5´	574 bp
LST1/F	LST1.1B245´	1B, 2, 4, 5´	619 bp
LST1/G	LST1.1E2345´	1E, 2, 3, 4, 5´	684 bp
LST1/H	LST1.1E245´	1E, 2, 4, 5´	591 bp
LST1/I	LST1.2345´´	2, 3, 4, 5´´	554 bp
LST1/J	LST1.245	2, 4, 5	527 bp
LST1/K	LST1.235´	2, 3, 5´	576 bp
LST1/L	LST1.245´´	2, 4, 5´´	461 bp
LST1/M	LST1.25	2, 5	504 bp
LST1/N	LST1.25´´	2, 5´´	483 bp
LST1/O	LST1.235´´	2, 3, 5´´	531 bp
LST1/P	LST1.2345	2, 3, 4, 5	620 bp

Die Transkription von *LST1* kann in jeder der alternativen Transkriptionsinitiationsstellen in den Exonen 1A - E beginnen, dabei wird die Stelle im Exon 1B´ am häufigsten verwendet. Bei der Transkription von *LST1* in der histiozytären Lymphomzelllinie U-937 wird die Initiationsstelle im Exon 1B´ in 64 % der Transkripte verwendet. Die Stellen in den Exonen 1C (5,6 %) und 1E (30,6 %) werden seltener benutzt (Yu et al. 2000). *LST1*-Transkripte, die die Transkriptionsinitiationsstelle im Exon 1D benutzen, wurden bislang nur aus IFN- $\gamma$ -stimulierten U-937-Zellen isoliert (LST1/E, de Baey et al. 1997). Am seltensten wird bei der *LST1*-Transkription die

Initiationsstelle im Exon 1A benutzt, entsprechende Transkripte konnten bislang nur mittels RT-PCR, unter Verwendung eines Exon 1A-spezifischen Primers, isoliert werden (Yu et al. 2000).

### 2.3.3.2 *LST1*-Promotor-Region

Die Regulation der Transkription von *LST1* wurde bei der Charakterisierung des Gens nicht beschrieben, da stromaufwärts von Exon 1A keine typischen Promotor-Sequenzen vorhanden sind. Reporter-gen-Untersuchungen haben aber mittlerweile gezeigt, dass zwei Sequenzabschnitte im Bereich zwischen den Exonen 1A und 2 (Abb. 4) die höchste Promotoraktivität zeigen (Yu et al. 2000). Im ersten der beiden Promotor-Bereiche wurden Bindestellen von 4 bekannten Transkriptionsfaktoren (C/EBP $\beta$ , GATA, PU.1 und SOX5) vermutet, deren Bindung konnte jedoch experimentell nicht bestätigt werden. Die Bindestelle eines noch unbekanntes Proteins konnte jedoch eindeutig identifiziert werden. Die signifikant verringerte Expression von *LST1* nach Deletion dieser Stelle zeigte, dass Proteinbindung in diesem Sequenzabschnitt für die Promotoraktivität essentiell ist (Yu et al. 2000).



**Abbildung 4: Promotor-Region von *LST1*.** Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die Translationsinitiationsstelle (+1). Die zwei Regionen mit der stärksten Promotor-Aktivität sind grün markiert. Zusätzlich sind die einzige bekannte Proteinbindestelle und die am häufigsten benutzte Transkriptionsinitiationsstelle in Exon 1B' gekennzeichnet. Exone und Introne sind im oben links angegebenen Maßstab gezeichnet.

### 2.3.3.3 Regulation der *LST1*-Transkription

Das *LST1*-Gen wird am stärksten in den Zellen des Immunsystems exprimiert. Die Stärke der Expression, aber auch die Anzahl der nachweisbaren Spleißvarianten, ist bei Immunzellen höher als in Zellen nicht-lymphoiden Ursprungs. So lassen sich in DC, peripheren Blutlymphozyten und anderen Subtypen von Immunzellen bis zu 7 alternative *LST1*-Transkripte nachweisen, während in den meisten Gewebetypen lediglich die Spleißvariante *LST1.2345'* exprimiert wird (Tab. 2).

In monozytären Zellen lässt sich die *LST1*-Expression durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  deutlich steigern (Holzinger et al. 1995). Die IFN- $\gamma$ -Behandlung verändert nicht nur die Stärke der Expression, sondern beeinflusst auch, welche Spleißvarianten exprimiert werden. So wurden bei behandelten U-937-Zellen die längeren, Exon 3-enthaltenden Transkripte supprimiert, während kürzere Spleißvarianten ohne das Exon 3 verstärkt exprimiert wurden. Die Veränderung des *LST1*-Expressionsmusters ist jedoch zelltypspezifisch, in CD8 $^+$  T-Zellen wurde nach der IFN- $\gamma$ -Behandlung eine Suppression der kürzeren Transkripte ohne Exon 3 beobachtet. Dieser Effekt wurde auch durch TPA-Behandlung von peripheren Blutlymphozyten erreicht (de Baey et al. 1997). Wegen der für die RT-PCR verwendeten Primer (in den Exonen 1B und 5 bindend), konnte bei dieser Untersuchung allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Stimulation nicht die Menge der Transkripte ohne Exon 3 erhöht oder verringert, sondern lediglich zur Transkriptionsinitiation in einem anderen alternativen Exon 1

führt. In einer späteren Untersuchung konnte jedoch mittels quantitativer PCR die Induktion der LST1-Expression in U-937-Zellen durch IFN- $\gamma$ -Behandlung bestätigt werden. Die Menge der LST1-Transkripte ohne Exon 3 war in den behandelten U-937-Zellen signifikant erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Stimulation der Zellen mit LPS oder bei Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* erhalten (Mulcahy et al. 2005).

**Tabelle 2: Exprimierte LST1-Spleißvarianten in verschiedenen Zelltypen, bzw. Geweben.** Die exprimierten Spleißvarianten sind in der alternativen Nomenklatur aus der Tab. 1 aufgezählt. LST1-Transkripte, bei denen nur der proteinkodierende Sequenzabschnitt (Exon 2 - 5) charakterisiert wurde, sind ohne Angabe der Exon 1-Variante aufgelistet (de Baey et al. 1997, Rollinger-Holzinger et al. 2000 und Mulcahy et al. 2005).

Zelltyp, bzw. Gewebe	Exprimierte LST1-Spleißvarianten
Dendritische Zellen	LST1.2345', LST1.2345'', LST1.235', LST1.235'', LST1.245', LST1.25', LST1.25''
Periphere Blutlymphozyten	LST1.2345', LST1.235', LST1.245, LST1.1B245', LST1.25, LST1.1B25', LST1.1B25''
Jurkat, Lymphom T-Zelllinie	LST1.2345', LST1.235', LST1.245, LST1.1B245', LST1.1B25', LST1.1B25''
LG2, lymphoblastoide B-Zelllinie	LST1.2345', LST1.1B245', LST1.1B25', LST1.1B25''
U-937, histiozytäre Lymphomzelllinie (Monozyten-ähnlich)	LST1.2345', LST1.1B235, LST1.1B245', LST1.1B25', LST1.1B25''
Mono-Mac-6, monoblastische Leukämiezelllinie (Makrophagen-ähnlich)	LST1.1B245', LST1.B25', LST1.1B25''
Lunge	LST1.2345', LST1.1B245', LST1.1B25', LST1.1B25''
Milz	LST1.2345'
Thymus	LST1.2345'
Mandeln	LST1.2345'
Leber	LST1.2345'
Plazenta	LST1.2345'
Niere	LST1.2345'

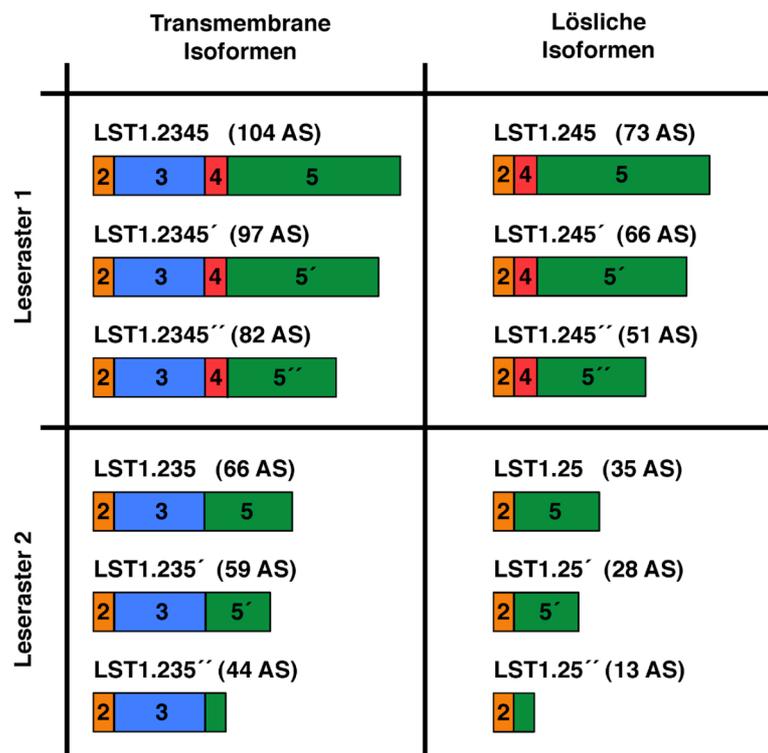
### 2.3.4 Translation von LST1

Die 16 charakterisierten LST1-Spleißvarianten kodieren 12 unterschiedliche Isoformen (Abb. 5). Die Translation sämtlicher LST1-Transkripte beginnt am Ende von Exon 2, somit enthalten nur die Exone 2 - 5 proteinkodierende Sequenzen. Im Exon 3 wird eine Transmembranhelix kodiert (Holzinger et al. 1995), das Vorhandensein dieses Exons im Transkript bestimmt, ob ein lösliches Protein oder ein Transmembranprotein kodiert wird. Das Fehlen von Exon 4 im Transkript verursacht eine Leserasterverschiebung, die zu einem verfrühten Stopp-Codon kurz hinter der Exon 5'-Spleißstelle führt, dadurch wird die Variabilität der exprimierten Proteine weiter erhöht (de Baey et al. 1997). Die verschiedenen LST1-Isoformen lassen sich also grob in lösliche Proteine und Transmembranproteine einteilen (Abb. 6). Weiterhin kann zwischen Proteinen unterschieden werden, die bis zum regulären Stopp-Codon translatiert werden und verkürzten Proteinen, bei denen die Leserasterverschiebung im Transkript zu einem verfrühten Stopp-Codon führt (Abb.6).

	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5/5'/5''
LST1.2345	MLSRNDDICI	YGGIGLGGLL	LLAVVLLSAC	LCWLHRRVSR LERSWHLISW SQAGSSEQE LHYASLQRLP VPSSEGGDLR GRDKRGTKEG PRADYACIAE NKPT*
LST1.2345'	MLSRNDDICI	YGGIGLGGLL	LLAVVLLSAC	LCWLHRRVSR LERSWHLISW SQAGSSEQE LHYASLQRLP VPSSEGGDLR GRDKRGTKEG PRADYACIAE NKPT*
LST1.2345''	MLSRNDDICI	YGGIGLGGLL	LLAVVLLSAC	LCWLHRRVSR LERSWHLISW SQAGSSEQE LHYASLQRLP VPSSEGGDLR GRDKRGTKEG PRADYACIAE NKPT*
LST1.235	MLSRNDDICI	YGGIGLGGLL	LLAVVLLSAC	LCWLHRRVSR LERSWHLISW SQAGSSEQE LHYASLQRLP VPSSEGGDLR GRDKRGTKEG PRADYACIAE NKPT*
LST1.235'	MLSRNDDICI	YGGIGLGGLL	LLAVVLLSAC	LCWLHRRVSR LERSWHLISW SQAGSSEQE LHYASLQRLP VPSSEGGDLR GRDKRGTKEG PRADYACIAE NKPT*
LST1.235''	MLSRNDDICI	YGGIGLGGLL	LLAVVLLSAC	LCWLHRRVSR LERSWHLISW SQAGSSEQE LHYASLQRLP VPSSEGGDLR GRDKRGTKEG PRADYACIAE NKPT*
LST1.245	MLSRNDVKRL	ERSWHLISWS	QAQSSSEQEL	HYASLQRLP VPSSEGGDLR RDKRGTKEG PRADYACIAE NKPT*
LST1.245'	MLSRNDVKRL	ERSWHLISWS	QAQSSSEQEL	HYASLQRLP VPSSEGGDLR RDKRGTKEG PRADYACIAE NKPT*
LST1.245''	MLSRNDVKRL	ERSWHLISWS	QAQSSSEQEL	HYASLQRLP VPSSEGGDLR RDKRGTKEG PRADYACIAE NKPT*
LST1.25	MLSRNDAPS	LVPGGGLLRA	GPLCISAEA	ASAAQ*
LST1.25'	MLSRNDGPG	LRAGTPLCIS	AEAAQ*	
LST1.25''	MLSRNDEAAS	AQ*		

**Abbildung 5: Aminosäuresequenzen der LST1-Isoformen.** Die von den beschriebenen LST1-Spleißvarianten (siehe Tab. 1) kodierten Isoformen sind angegeben. Die Aminosäuren sind, je nachdem von welchem Exon sie kodiert werden, farblich dargestellt. Das Symbol „\*“ gibt den Translationsstopp an.

Alle LST1-Isoformen sind relativ klein: Die größte Isoform (LST1.2345) umfasst 104 Aminosäuren (AS), alle anderen Isoformen sind z.T. deutlich kleiner.



**Abbildung 6: Klassifizierung der LST1-Isoformen.** Die Isoformen sind als Balken dargestellt, die von den verschiedenen Exonen kodierten Bereiche sind farblich markiert und gekennzeichnet. Die Größe der Proteine ist in AS angegeben. Die LST1-Isoformen lassen sich als lösliche Proteine oder Transmembranproteine klassifizieren. Die Isoformen unterscheiden sich auch innerhalb dieser Klassen und zwar durch eine verkürzte, bzw. veränderte Aminosäuresequenz im vom Exon 5 kodierten Bereich. Isoformen, die im korrekten Leseraster (1) translatiert werden, enden mit dem regulären Stopp-Codon, während Transkripte ohne Exon 4 durch das veränderte Leseraster (2) nur bis zu einem verfrühten Stopp-Codon translatiert werden.

### 2.3.5 LST1-Polymorphismen

Die bisher charakterisierten Polymorphismen im *LST1*-Gen sind ausschließlich in nicht-proteinkodierende Bereiche, wie Introne und 5'-, bzw. 3'-flankierende Sequenzen, lokalisiert. Eine Liste aller beschriebenen *LST1*-Polymorphismen ist im Anhang unter 9.3 zu finden.

#### 2.3.5.1 Die Mikrosatelliten *TNFd* und *TNFe*

Im vierten *LST1*-Intron (zwischen den Exonen 4 und 5) befinden sich die polymorphen Mikrosatelliten *TNFd* und *TNFe*. Sie wurden nach dem benachbarten Gen für den Tumor Nekrose Faktor (*TNF*) zu einer Zeit benannt, als das *LST1*-Gen noch nicht charakterisiert worden war. Beide Mikrosatelliten enthalten die (GA)-Nukleotidwiederholung in mehreren Wiederholungsblöcken, die Allele unterscheiden sich in der Anzahl der Wiederholungen in einem definierten *TNFd*-, bzw. *TNFe*-Wiederholungsblock. Aus diesem Grund richtet sich die Allelnomenklatur nach der Anzahl der zusätzlichen Wiederholungen (*TNFd*1, d2, d3 usw., bzw. *TNFe*1, e2, e3 usw.). Erste Assoziationsstudien konnten keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen *TNFd*-, bzw. *TNFe*-Allelen und der Inzidenz von juveniler und rheumatoider Arthritis liefern (Field et al. 1997 und Feichtlbauer et al. 1998).

Spätere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass der Versuchsaufbau dieser Studien anfällig für fehlerhafte *TNFd*-Alleltypisierungen war, sodass ihre Aussagekraft relativiert werden muss (Spink et al. 2004). Assoziationsuntersuchungen mit korrekt typisierten Allelen haben eine erhöhte Inzidenz von Non-Hodgkin-Lymphomen bei homozygoten Trägern der Allele *TNFd4* und *TNFe1/2* gezeigt (Spink et al. 2006). Bei der Behandlung der Lymphome wurde überraschenderweise auch ein Einfluss der *TNFd*-Allele entdeckt. So konnte bei Transplantationsempfängern von hämatopoetischen Stammzellen festgestellt werden, dass der Schweregrad der Transplantat-Wirt-Reaktion mit der Anzahl der Wiederholungen im *TNFd*-Mikrosatellit zunimmt ( $d5 > d4 > d3$ ). Dieser Effekt trat auf, wenn entweder der Transplantatempfänger oder der Spender homozygot für die genannten *TNFd*-Allele waren (Bettens et al. 2006). Eine weitere Studie bestätigt diesen Befund: Bei Transplantatempfängern, die homozygot für die *TNFd3*- oder *TNFd4*-Allele waren, wurde ein höherer Schweregrad der Transplantat-Wirt-Reaktion festgestellt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Empfänger bereits vor der Transplantation einen höheren intrinsischen TNF- $\alpha$ -Spiegel im Blut besaßen (Remberger et al. 2003). Dieser Befund wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass *TNFd3*-Homozygote häufiger an IgA-Nephritis erkranken (Tuglular et al. 2003), da es sich hierbei um eine Autoimmunerkrankung handelt, bei der TNF eine wesentliche Rolle spielt.

Es bleibt jedoch zu erklären, wie der *TNFd*-Polymorphismus im *LST1*-Gen die Expression des 10 kb entfernten *TNF*-Gens beeinflussen könnte. Es ist naheliegend zu vermuten, dass eine oder mehrere *LST1*-Isoformen an der Regulation von TNF- $\alpha$  beteiligt sein könnten. Da der *TNFd*-Polymorphismus in einem Intron liegt, muss die Regulation über die *LST1*-Transkription, bzw. die RNS-Prozessierung erfolgen. Es wäre durchaus vorstellbar, dass die *TNFd*-Sequenz das Spleißen beeinflusst, die Spleiß-Verzweigungsstelle für die Exon 5-Spleißstelle liegt zwar innerhalb der Sequenz des *TNFd*-Mikrosatelliten, ist aber 70 bp vom variablen Wiederholungsblock entfernt (Abb. 7).

Einen Einfluss der *TNF*-Mikrosatelliten auf das Spleißen von *LST1* über exonische Spleiß-Verstärker (ESE) wäre allerdings auch vorstellbar. Diese Hexamer-Sequenzen liegen meistens stromabwärts der 3'-Spleißstelle von Exonen und dienen als Bindestellen für Spleißfaktoren. Das Vorhandensein einer ESE-Sequenz im Exon begünstigt im Normalfall das Spleißen, wenn aber die ESE-Sequenz im Intron, stromaufwärts der 3'-Spleißstelle liegt, kann sie das Spleißen negativ regulieren (McNally und McNally 1998).

Eine Suche nach ESE-Sequenzen im Bereich zwischen den *TNFe*-Mikrosatelliten und der Exon 5'-Spleißstelle zeigte drei ESE-Sequenzen im Bereich der Exon 5-Spleißstellen (Abb. 7). Zwei ESE verstärken das Spleißen zu der Exon 5'-Spleißstelle, ein ESE das Spleißen zu der Exon 5''-Stelle während das Spleißen zu der Exon 5-Stelle nicht verstärkt wird. Dies passt in etwa zu der Häufigkeit, mit der Transkripte mit den alternativen Exon 5-Varianten in peripheren Blutlymphozyten beobachtet werden (siehe Tab. 2). Die meisten ESE-Sequenzen in diesem Bereich lassen sich jedoch im Intron 4 finden, vor allem die (GA)-Wiederholungsblöcke von *TNFd* und *TNFe* sind von überlappenden ESE-Sequenzen durchsetzt. Es wäre also möglich, dass die Anzahl der Wiederholungen im *TNFd*-Block 1 erhebliche Auswirkungen auf das Spleißen und somit auf die Expression von *LST1* hat. Eine weitere Möglichkeit, wie der polymorphe *TNFd*-Wiederholungsblock das Spleißen beeinflussen könnte, wäre durch Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle im Bereich zwischen *TNFe* und *TNFd* (Abb. 7). Diese Stelle wird primär von einer ESE-Sequenz (A4-ESE) und einer exonischen Spleiß-Unterdrückungs-Sequenz (A3-ESS) reguliert (Lei und Vorechovsky 2005). Einen zusätzlichen

Einfluss der ESE-Sequenzen im *TNFd* wurde zwar vermutet, konnte aber nicht eindeutig gezeigt werden (Lei und Vorechovsky 2005).

Intron 4		
GAAAATCGAG	<u>GCAAAAGAGA AAGAGAAAAT GAGACAGAAA CCAAGAGAAA</u>	187
<u>TNF<sub>e</sub></u>		
<u>AAGTGAGACA</u>	<u>GAGGATAGGA GAGACAGGGA GAAAATGAGA GTGAGAGAGA</u>	237
<i>Wiederholungsblock</i>		
<u>CACAAAGAGA</u>	<u>AGAGCAATGA AAGAGAGAGA GAGAGAGAGG CTCCAGAACC</u>	287
<u>AGGCACAGTG</u>	GCTCACGTCT GTCATTCCAG CTATCGCAAG GCTGAGGCAG	337
	A3-ESS      A4-ESE <u>TNF<sub>d</sub></u>	
<u>GAAGATAGCT</u>	TGAGCTCAGG GGTGAAGAC AATCCTGGAC AACATAGTGG	387
<i>Wiederholungsblock</i>		
<u>ACTCTGTCTC</u>	<u>CAAAGAAAAA AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGGG</u>	437
<u>AGAGAGAGAG</u>	<u>AGAGAGAGGG AGAGAAGTAA GAAAGGCTGG AGGTGGGAGC</u>	487
<b>Exon 5</b>		
<u>AGAACTCACA</u>	<u>GGGAAGGATC TGACGCATCG CCTCCATCA G↑CACCTTCTG</u>	9
<b>Exon 5'</b>		
<u>TCCTGGTCCC</u>	<u>AG↑GCCAGGG CTCCTCAGAG CAGGAACTCC ACTATGCATC</u>	59
<b>Exon 5''</b>		
<u>TCTGCAG↑AGG</u>	<u>CTGCCAGTGC CCAGCAGTGA GGGACCTGAC CTCAGGGGCA</u>	109

**Abbildung 7: Spleißregulatorische Sequenzen im Bereich der Mikrosatelliten *TNFd* und *TNF<sub>e</sub>*.** Die mit dem RESCUE-ESE-Algorithmus (Fairbrother et al. 2002) ermittelten ESE-Sequenzen sind grün, die kryptische 3'-Spleißstelle ist blau hervorgehoben (Lei und Vorechovsky 2005). Die regulatorischen Sequenzen für diese Spleißstelle sind gekennzeichnet (A3-ESS: rot, A4-ESE: grün, Lei und Vorechovsky 2005). Die Verzweigungsstelle für die 3'-Spleißstelle von Exon 5 ist lila hervorgehoben. Die Mikrosatelliten *TNF<sub>e</sub>* und *TNF<sub>d</sub>* (Allele e2 und d3) sind unterstrichen (wie von de Baey et al. 1997 beschrieben). Die polymorphen Wiederholungsblöcke der Mikrosatelliten sind in kursiver Schrift, die Exon 5-Sequenz in fetter Schrift gezeichnet. Die Nummerierung rechts gibt die Position im Intron 4, bzw. Exon 5 in Basenpaaren an.

### 2.3.5.2 Basenaustausch-Polymorphismen (SNP)

Eine groß angelegte Suche nach Polymorphismen in einer 130 kb langen Region des HLA-Klasse-III-Komplexes, die mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt assoziiert ist, führte im Jahr 2003 zur Entdeckung von 5 *LST1*-Basenaustausch-Polymorphismen (Iida et al. 2003). Der erste Polymorphismus (i-LST1-1, A → G) liegt in der 5'-flankierenden Region, 235 bp stromaufwärts vom ersten Exon 1A. Der zweite (i-LST1-2, G → A) und dritte (i-LST1-3, T → A) Polymorphismus liegt im Intron 1B (Position 286), bzw. 1C (Pos. 23). Der vierte Polymorphismus (iLST1-4) liegt im Intron 4 und kann dem polymorphen Wiederholungsblock von *TNF<sub>d</sub>* zugeordnet werden. Der fünfte Polymorphismus (i-LST1-5, A → T) liegt im Exon 5 (Pos. 382) und ist der einzige Basenaustausch aus dieser Reihe, der deutliche Folgen für die *LST1*-Expression haben könnte. Die beschriebene Substitution zerstört das Polyadenylierungssignal von *LST1*, was die Stabilität der *LST1*-mRNS und somit die Expression massiv beeinträchtigen könnte.

Ein weiterer *LST1*-Polymorphismus wurde bei der Suche nach Suszeptibilitätsgenen für rheumatoide Arthritis in der *TNF*-Region entdeckt (*LST1*\*2, A → G). Für diesen Polymorphismus konnte eine Assoziation mit rheumatoider Arthritis (Kilding et al. 2004) und Lupus Nephritis (Mewar et al. 2006) nachgewiesen werden. Der Basenaustausch befindet sich im Intron 2 von *LST1* (Pos. 35) und hat somit keine direkte Auswirkung auf die Aminosäuresequenzen der *LST1*-Isoformen.

Allerdings wäre ein Einfluss auf die *LST1*-Expression über die Veränderung des Spleißmusters, wie schon für *TNFD* postuliert, auch hier denkbar. Die Basensubstitution eliminiert eine ESE-Sequenz, welche eine benachbarte, potentielle, kryptische 3'-Spleißstelle aktivieren könnte (Abb. 8). Der ESE-Sequenz folgt unmittelbar stromabwärts ein 26 bp langer Bereich mit überlappenden ESS-Sequenzen, die für die Unterdrückung der kryptischen Spleißstelle verantwortlich sein könnten. Die Wechselwirkung der ESS- und ESE-Sequenzen könnte für die Regulation der potentiellen kryptischen Spleißstelle verantwortlich sein. Da die möglichen Spleiß-Verzweigungsstellen in der Exon 2-Sequenz liegen (Abb. 8), wäre die wahrscheinlichste Folge der Benutzung der kryptischen Spleißstelle das Überspringen von Exon 2 beim Spleißen. Dies würde sich erheblich auf die Proteinexpression von *LST1* auswirken, da die Translation in der alternativen Exon 2-Sequenz beginnen würde, und die resultierenden Proteine lediglich 9 AS lang wären.

Exon 2		
GCAAGGACTA	GAGTTCCTGA	CCTCCAGGCC AGTCCCTGAT CCCTGACCTA
		100
Intron 2		
ATGTTATCGC	GGAATGATGG	TAAGTAAAGT GTCTCTTGCA TCTGCATAGA
		31
GAGAGTCCTG	GGAGCTTAGG	AAGTGATGGG GAACAGTGAT GTATGCAGCT
		81

**Abbildung 8: Spleißregulatorische Sequenzen im Bereich von Exon 2 und Intron 2.** Die mit dem RESCUE-ESE-Algorithmus (Fairbrother et al. 2002) ermittelte ESE-Sequenz ist grün, die mit dem FAS-ESS-Algorithmus (Wang et al. 2004) ermittelten ESS-Sequenzen sind rot hervorgehoben. Der *LST1*\*2-Polymorphismus (A → G) in der ESE-Sequenz ist fett gezeichnet und unterstrichen. Die potentielle kryptische Spleißstelle ist blau hervorgehoben, die dazugehörigen möglichen Spleiß-Verzweigungsstellen sind lila hervorgehoben. Die Nummerierung rechts gibt die Position im Exon 2, bzw. Intron 2 in Basenpaaren an.

Die neuesten *LST1*-Basenaustausch-Polymorphismen stammen aus einer Studie der koreanischen Population im Jahr 2006. Zwei neue *LST1*-Polymorphismen konnten nachgewiesen werden (Yoo et al. 2006). Der erste Polymorphismus (rs61720346, T → A) liegt in der 3'-untranslatierten Region (Exon 5, Pos. 306) und der zweite (rs61180923, A → G) liegt 54 bp stromabwärts der Polyadenylierungsstelle von *LST1*. Die Position beider Polymorphismen lässt nicht auf eine Beeinflussung der *LST1*-Expression schließen.

### 2.3.5.3 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen

In der 3'-flankierenden Sequenz von *LST1* wurde eine polymorphe *Pvu* II-Schnittstelle beschrieben, verursacht durch einen stillen Basenaustausch im Exon 5 von *NCR3* (de Baey et al. 1995). Wegen der räumlichen Nähe beider Gene wurde dieser Polymorphismus zunächst dem *LST1*-Gen zugeschrieben.

### 2.3.6 Funktion von LST1

Fast zwanzig Jahre nach der Erstbeschreibung von LST1 ist seine genaue Funktion immer noch weitgehend unbekannt. In den letzten Jahren haben jedoch mehrere Studien einige Hinweise auf die mögliche Funktion geliefert.

#### 2.3.6.1 Immunregulatorische Funktion

Den ersten Hinweis auf eine immunregulatorische Rolle von LST1 brachte eine Untersuchung hervor, bei der gezeigt wurde, dass die Proliferation von Lymphozyten *in vitro* durch Zugabe von rekombinantem LST1.3Δ5 (ohne Transmembrandomäne) dosisabhängig inhibiert werden kann. Eine proliferationshemmende Wirkung konnte auch für das rekombinante Protein LST1.3Δ45' (ohne Transmembrandomäne) gezeigt werden, wenn auch der Effekt nicht so stark war, wie beim LST1.3Δ5 (Rollinger–Holzinger et al. 2000).

Weitere Befunde sprechen ebenfalls für eine immunregulatorische Rolle von LST1. So wurden im Blut von Patienten mit rheumatoider Arthritis höhere *LST1*-Transkriptmengen festgestellt als bei gesunden Kontrollpatienten. Die Erhöhung der Expression konnte den Spleißvarianten LST1.25' und LST1.25'' zugeschrieben werden, diese kodieren lösliche LST1-Isoformen (Mulcahy et al. 2005).

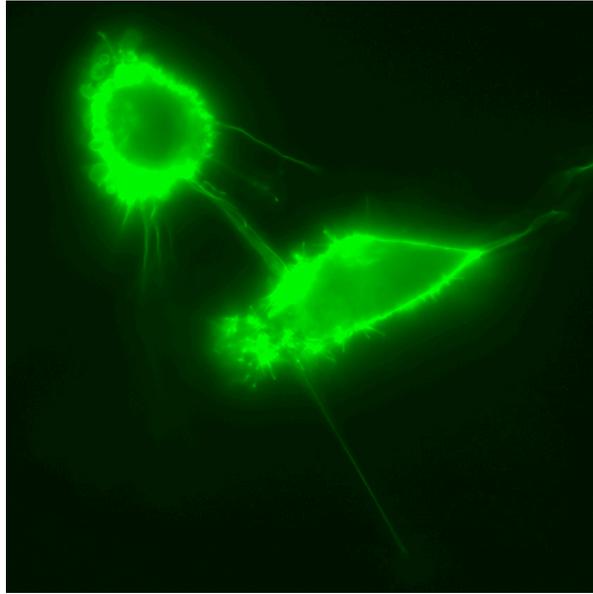
Eine verstärkte LST1-Expression wurde ebenfalls in der Amnionflüssigkeit von Feten mit Neuralrohrdefekt festgestellt (Nagy et al. 2006). Es ist bekannt, dass virale Infektionen ein Risikofaktor für Neuralrohrdefekte sind (Sharma und Gulati 1992), ein möglicher Pathomechanismus wird in der resultierenden Immunreaktion vermutet.

#### 2.3.6.2 Regulation des NFκB-Signalwegs

Mittels der „yeast two-hybrid“-Methode konnten zwei potentielle Interaktionspartner von LST1.245' ermittelt werden: KIAA1333, eine E3 Ubiquitin-Ligase und NY-REN-24, das ein Cactin-ähnliches Protein kodiert (Lehner et al. 2004). Das Cactin-Protein interagiert bei *Drosophila* mit dem Cactus-Protein, das Homolog des menschlichen IκB-Proteins, das für die Regulation des Transkriptionsfaktors NFκB zuständig ist. Es wurde postuliert, dass LST1.245' die Bindung zwischen KIAA1333 und NY-REN-24 vermitteln könnte. Der somit entstandene Komplex könnte mit IκB interagieren und dessen Menge mittels Ubiquitinylierung durch KIAA1333 regulieren, was sich ebenfalls auf die Regulation von NFκB auswirken würde.

#### 2.3.6.3 Modulation der Zellmorphologie

Raghunathan et al. postulierten 2001, dass LST1 eine Rolle bei den morphologischen Veränderungen, die während der Reifung von DC auftreten, spielen könnte. Gründe für diese Theorie waren die bereits bekannte, starke Expression von LST1 in DC und die Beobachtung von morphologischen Veränderungen in verschiedenen humanen Zelllinien nach Transfektion mit Vektoren, die transmembrane LST1-EGFP Fusionsproteine kodierten. Die Induktion von morphologischen Veränderungen nach LST1-Überexpression konnte in einer späteren Untersuchung mit einem LST1.2345-EGFP-Konstrukt bestätigt werden (Abb. 9, Hirner 2004).



**Abbildung 9: Induktion von morphologischen Veränderungen nach LST1-Überexpression.** Das LST1.2345-EGFP-Fusionsprotein wurde transient in HeLa-Zellen exprimiert, die Transfektanten wurden fixiert und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die LST1-Überexpression führte zur Bildung von zellulären Fortsätzen zwischen den Zellen (Quelle: verändert nach Hirner 2004).

Die von Raghunathan et al. beobachteten dünnen, langen Fortsätze wurden als „cytoneme-like Filopodia“ (CLF) bezeichnet. Bei den Zytoneimen handelt es sich um zelluläre Ausläufer, die Zellen in der Imaginalscheibe des *Drosophila*-Embryos miteinander verbinden können (Ramirez-Weber und Kornberg 1999). Im Jahr 2004 wurden ähnliche Strukturen erstmals in Säugerzellen beobachtet: Die sog. „tunneling nanotubes“ (TNT) wurden als dünne, lange Fortsätze (50 – 200 nm Durchmesser und bis zu mehrere Zelldurchmesser lang) beschrieben, die PC12-Zellen miteinander verbinden können (Rustom et al. 2004). Es wurde weiterhin nachgewiesen, dass TNT den Transfer von Organellen und löslichen Farbstoffen zwischen Zellen vermitteln können (Rustom et al. 2004, bzw. Watkins und Salter 2005). Die Bildung von TNT stellt also einen neuen Mechanismus der interzellulären Kommunikation dar.

In den letzten Jahren hat sich das Gebiet der TNT-Forschung schnell entwickelt (für eine Übersicht siehe Davis und Sowinski 2008). Inzwischen wurden TNT bei einer Vielzahl von Immunzellen nachgewiesen: B-Zellen (Gupta und DeFranco 2003), T-Zellen (Sowinski et al. 2008), Makrophagen, NK-Zellen (Onfelt et al. 2004) und DC (Watkins und Salter 2005). Zusätzlich konnten mehrere Untersuchungen zeigen, dass neutrophile Granulozyten unter bestimmten Bedingungen TNT-ähnliche Fortsätze bilden können (Galkina et al. 2001, 2005 und 2006). In einer neueren Arbeit konnten TNT zwischen DC in der Kornea von Mäusen beobachtet werden, was den ersten in vivo-Nachweis dieser Strukturen darstellt (Chinnery et al. 2008).

### 3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die HLA-Klasse-III-Region ist mit einer Vielzahl von autoimmunen Krankheiten assoziiert (siehe 2.2). Bei den meisten dieser Krankheiten wird die genetische Prädisposition sowohl durch Allele klassischer HLA-Gene, wie auch durch Allele inflammatorischer Gene, bestimmt.

Beim HLA-Klasse-III-Gen *LST1* sind mehrere Polymorphismen bekannt, die mit einer Prädisposition für autoimmune Krankheiten assoziiert sind (siehe 2.3.5). Da die Funktion der von *LST1* kodierten Isoformen noch weitgehend unbekannt ist, konnte für diese Polymorphismen noch kein Pathomechanismus postuliert werden. In früheren Untersuchungen wurde die Regulation der *LST1*-Transkription ausführlich charakterisiert (siehe 2.3.3.3). In welcher Art und Weise sich diese auf die *LST1*-Proteinexpression auswirkt, wurde aber bisher nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher die Funktion und Expression der *LST1*-Isoformen zu untersuchen.

Die Funktion von *LST1* sollte durch die Identifizierung und Analyse der funktionellen Domänen der Volle-Länge transmembranen *LST1.2345*-Isoform bestimmt werden. Dazu sollten Expressionsvektoren für verschiedene *LST1*-Isoformen kloniert werden. Um die funktionelle Untersuchung nicht nur auf rekombinante Proteine zu beschränken, sollten für den Nachweis des endogenen Proteins monoklonale, *LST1*-spezifische Antikörper hergestellt und charakterisiert werden. Als Teil der funktionellen Charakterisierung sollte auch die, in früheren Untersuchungen beschriebene, *LST1*-vermittelte Modulation der Zellmorphologie untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die *LST1*-Proteinexpression untersucht werden. Die in früheren Studien erhobenen Daten zu der Transkriptexpression von *LST1*, sollten auf Proteinebene validiert werden. Die stärkste *LST1*-Transkriptexpression wurde für Monozyten und DC beschrieben. Daher sollte die *LST1*-Proteinexpression während der Reifung von DC analysiert werden.

## 4 Material

### 4.1 Arbeiten mit Bakterien

#### 4.1.1 Bakterienstämme

Es wurden die Bakterienstämme TOP10F' (One Shot Competent Cells) und DH5 $\alpha$  (Subcloning Efficiency, bzw. Library Efficiency Competent Cells) der Firma Invitrogen (Paisley, Großbritannien), sowie der Bakterienstamm BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL der Firma Stratagene (La Jolla, USA) verwendet.

#### 4.1.2 Kulturmedien für Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium (pH 7,5)	1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 17 mM NaCl
SOC-Medium (pH 7,0)	2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM NaOH, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glucose

#### 4.1.3 Selektionsantibiotika für Bakterien

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kanamycin	ICN Biomedicals, Aurora, USA

## 4.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

### 4.2.1 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
Capan-1	Humane Pankreas-Adenokarzinomzelllinie (ATCC HTB-79)
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzelllinie mit stabiler Expression des großen SV40 T-Antigens (ATCC CRL-11268)
HeLa 229	Humane Zervix-Adenokarzinomzelllinie (ATCC CCL-2.1)
HL-60	Humane Leukämiezelllinie, isoliert aus dem Blut eines Patienten mit akuter promyelozytischer Leukämie (ATCC CCL-240)

Bezeichnung	Beschreibung
HMEC	Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie (ATCC CRL-10636)
HT-29	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie (ATCC HTB-38)
Jurkat	Humane Leukämiezelllinie, isoliert aus dem Blut eines Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie (ATCC TIB-152)
K-562	Humane Leukämiezelllinie, isoliert aus dem Blut eines Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie (ATCC CCL-243)
SK-MEL-28	Humane maligne Melanomzelllinie (ATCC HTB-72))
U-251 MG	Humane Gliomzelllinie (ATCC HTB-17)
U-937	Humane histiozytäre Lymphomzelllinie (ATCC CRL-1593.2)
WI-38 VA13	Humane Fibroblastenzelllinie, zeigt stabile Expression des großen SV40 T-Antigens (ATCC CCL-75.1)

#### 4.2.2 Kulturmedien für eukaryotische Zellen

Medium	Zusammensetzung
RPMI-Kulturmedium	RPMI 1640 (PAA, Pasching, Österreich) mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (PAA, Pasching, Österreich), 1 mM Natriumpyruvat, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (jeweils von der Firma Cambrex, Verviers, Belgien)
DMEM-Kulturmedium	DMEM High Glucose 4,5 g/l (PAA, Pasching, Österreich) mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (PAA, Pasching, Österreich), 1 mM Natriumpyruvat, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (jeweils von der Firma Cambrex, Verviers, Belgien)
DMEM-Kulturmedium für Lebendzell-Mikroskopie	DMEM F12 HAM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (PAA, Pasching, Österreich), 1 mM Natriumpyruvat, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (jeweils von der Firma Cambrex, Verviers, Belgien)
Selektionsmedium	Kulturmedium mit 2,5 mg/ml G418 (PAA, Pasching, Österreich)
Einfriermedium	Kulturmedium mit 5 % Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland)

### 4.3 Enzyme

#### 4.3.1 Restriktionsenzyme

Enzym	Reaktionspuffer	Optimale Temperatur	Schnittstelle	Hersteller
<i>Bam</i> H I	BamHI-Puffer + BSA	37°C	G/GATCC CCTAG/G	New England BioLabs, Beverly, USA
<i>Bgl</i> II	Puffer 3	37°C	A/GATCT TCTAG/A	New England BioLabs, Beverly, USA

Enzym	Reaktions-puffer	Optimale Temperatur	Schnittstelle	Hersteller
<i>BstX</i> I	Puffer 3	55°C	CCANNNNN/NTGG GGTN/NNNNNACC	New England BioLabs, Beverly, USA
<i>Eco0109</i> I	Puffer 4 + BSA	37°C	RG/GNCCY YCCNG/GR	New England BioLabs, Beverly, USA
<i>EcoR</i> I	EcoRI-Puffer	37°C	G/AATTC CTTAA/G	New England BioLabs, Beverly, USA
<i>Hind</i> III	Puffer 2	37°C	A/AGCTT TTCGA/A	New England BioLabs, Beverly, USA
<i>Kpn</i> I	Puffer 1 + BSA	37°C	GGTAC/C C/CATGG	New England BioLabs, Beverly, USA
<i>Xho</i> I	Puffer H	37°C	C/TCGAG GAGCT/C	MBI Fermentas, Hanover, USA

### 4.3.2 Sonstige Enzyme

Enzym	Hersteller
Dnase I	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Rnase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Paisley, Großbritannien
Trypsin (25 mg/ml)	PAA, Pasching, Österreich

## 4.4 Nukleinsäuren

### 4.4.1 Vektoren

#### 4.4.1.1 Allgemeine Vektoren

Bezeichnung	Größe	Resistenzen	Hersteller
pCR II-TOPO	4,0 kb	Ampicillin Kanamycin	Invitrogen, Paisley, Großbritannien
pCR 2.1-TOPO	3,9 kb	Ampicillin Kanamycin	Invitrogen, Paisley, Großbritannien
pET-15b	5,7 kb	Ampicillin	Novagen, Darmstadt, Deutschland
pET-45b(+)	5,2 kb	Ampicillin	Novagen, Darmstadt, Deutschland
pEGFP-N1	4,7 kb	Kanamycin Neomycin	Clontech, Mountain View, USA
pEGFP-Tub	6,0 kb	Kanamycin Neomycin	Clontech, Mountain View, USA

Bezeichnung	Größe	Resistenzen	Hersteller
pDsRed2-N1	4,7 kb	Kanamycin Neomycin	Clontech, Mountain View, USA
pcDNA 3.1(-)	5,4 kb	Ampicillin, Neomycin	Invitrogen, Paisley, Großbritannien

#### 4.4.1.2 LST1-Expressionsvektoren

Bezeichnung	kodiertes Protein	Insertionsprimer	Hersteller
Klon 7/4 in pcDNA 3.1(-)	LST1.2345'-FLAG	5-LST1-VL, 3-FLAG-1, 3-FLAG-2	Christian Schiller (2005)
Klon 2.1 in pET-45b(+)	HIS-LST1.3Δ45'	5'-LST3-Bgl, 3'LST1A	Maximilian Nitschké (2006)
Klon 5.2.5 in pcDNA 3.1(-)	FLAG-LST1.2345	5-Lst2-FLAG1, 5-Lst2-FLAG2, 3'LST1A	Maximilian Nitschké (2006)
Klon 5'.2.16 in pcDNA 3.1(-)	FLAG-LST1.2345'	5-Lst2-FLAG1, 5-Lst2-FLAG2, 3'LST1A	Maximilian Nitschké (2006)
Klon 12-2 in pcDNA 3.1(-)	FLAG-LST1.2345Δ	5-Lst2-FLAG1, 5-Lst2-FLAG2, 3'LST1A	Alexander Seidl (2007)
Klon 16.2 in pIRES2-EGFP	LST1.2345	5'pET-VL, 3'LST1A	Stefanie Färberböck (2008)

#### 4.4.1.3 Sonstige Expressionsvektoren

Bezeichnung	Protein	Insertionsprimer	Hersteller
Klon 13/3 in pEGFP-N1	KIR2DS2-EGFP	158J-F, 158J-R_BamHI	Eva Schlecker (2007)

#### 4.4.2 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech in Ebersberg, Deutschland synthetisiert.

##### 4.4.2.1 LST1-Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
5-Lst2-FLAG1	GACGACGATGACAAGTTATCGCGGAATGAT
5-Lst2-FLAG2	CTCGAGATGGACTACAAGGACGACGATGACAAG
5-Lst1-VL	CTCGAGACCTAATGTTATCGCGGAATGATG
3-FLAG-2	TTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGGT
3-Lst5-Kpn	GGTACCCAGGTGGGTTTGTTC
3-LST1C-FLAG1	CTTGTAGTCGGTCTGCTGGGCACTGG
3'LST1A	CGGATCCTTATCAGGTGGGTTTGTTC
Lst1.5	CCAGCTCCTCTCCAGCC
Lst2s	GCAAGGACTAGAGTTCCTGAC
Lst5	CTGGGACCAGGACAGAAGGTG
Lst5as	CAATGCAGGCATAGTCAGC

#### 4.4.2.2 Sonstige Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
M13 (-20) uni	GTAAAACGACGGCCAG
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGACC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGGC
pEGFP-Nas	TTACGTCGCCGTCCAGCTCGACCA

#### 4.4.3 Größenstandards

Für die Größenbestimmung von DNS-Molekülen in Agarosegelen wurde der 1 kb Plus (1 kb+) Längenstandard der Firma Invitrogen (Paisley, Großbritannien) verwendet.

Für die Größenbestimmung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde der Prestained Protein Marker Broad Range von CellSignaling (Beverly, USA) verwendet.

### 4.5 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
anti-His <sub>6</sub> -Tag (Maus)	DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland
anti-FLAG M2 (Maus)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
IgG1 Isotypkontrolle (Maus)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
anti-Phospho-Tyrosin 4G10 (Maus)	Millipore, Schwalbach, Deutschland
anti-β-Tubulin WA-3 (Maus)	Prof. M. Schliwa, Adolf-Butenandt Institut, LMU München, Deutschland
anti-RMC 16D2, IgG2a Isotypkontrolle (Ratte)	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
anti-Maus Serum (Ziege)	Prof. R. P. Linke, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland
anti-Maus HRP (Ziege)	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Maus Cy2 (Ziege)	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Maus RPE (Ziege)	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark
anti-Maus Cy5 (Ziege)	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Maus IRDye800CW (Ziege)	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA
anti-Ratte HRP (Ziege)	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Ratte DTAF (Ziege)	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Ratte RPE (Ziege)	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Ratte IRDye800CW (Ziege)	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA

## 4.6 Kits und spezielle Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
7-Aminoactinomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Agarose SeaKem GTG	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
CFSE Cell Tracer	Molecular Probes, Paisley, Großbritannien
Dialysemembran Visking	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dil Cell Tracer	Molecular Probes, Paisley, Großbritannien
dNTP Set PCR Grade	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
ECL Kit	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
FastStart High Fidelity PCR Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
G418 Sulphate	PAA, Pasching, Österreich
IFN- $\gamma$ (20000 U/ $\mu$ l)	ProTech, Rocky Hills, USA
Latrunculin-A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Paisley, Großbritannien
L-Polylysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
One Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR Puffer – MgCl <sub>2</sub> (10 x)	Invitrogen, Paisley, Großbritannien
peqGold Trifast Reagent	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Polyethylenimin (PEI) pH 7	Prof. H. Leonhardt, Department Biologie II, LMU München, Deutschland
ProPur Midi MC Kit	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
Protease Inhibitoren Complete	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Protein G-Sepharose	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
Quick Ligation Kit	New England Biolabs, Beverly, USA
Roti-Load 1 Proteinauftragspuffer (4x)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TNF- $\alpha$ (4430 U/ $\mu$ l)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Paisley, Großbritannien
Trypanblau (2,5 %-ige Lösung)	Cambrex, Verviers, Belgien
Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame, USA

## 4.7 Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Laufpuffer zur Proteinauftrennung (pH 8,3)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS (pH 7,4)	139,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Proteinauftragspuffer (3 x)	150 mM Tris/HCl pH 6,5 6 % (w/v) SDS 0,3 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glycerol 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA 0,015 % (v/v) Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml)
1 x TBE-Puffer	100 mM Tris 83 mM Borsäure 1 mM EDTA 0,015 % (v/v) Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml)
TBS (pH 7,6)	20 mM Tris 137 mM NaCl
Towbin Transferpuffer (pH 8,3)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Triton-Lysepuffer (pH 8,0)	50 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100 Protease Inhibitoren Complete (nach Anleitung)

#### 4.8 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Deckgläschen (24 x 24 mm)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektroporationsküvetten Gene Pulser (0,4 cm gap)	BioRad, Hercules, USA
Falcon-Röhrchen, TC-Kulturflaschen, 6- und 24-Loch-Flachbodenplatten, 96-Loch Rundbodenplatten, Petrischalen, Plastikpipetten, Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Faltenfilter	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Fotometerküvette Uvette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Glasbodenschälchen (35 mm Lochdurchmesser)	BioImaging Zentrum der LMU München, Deutschland
Glasbodenschälchen $\mu$ -Dish (35 mm Lochdurchmesser)	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Kanülen Sterican 27 G $\frac{3}{4}$	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, Deutschland
Parafilm "M"	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR-Gefäße (200 $\mu$ l)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml / 2 ml)	Brand, Wertheim, Deutschland
Röntgenfilm Contatyp Medical	Typon Imaging, Burgdorf, Schweiz
Spritzen (3 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter (0,2 $\mu$ m)	M & B Stricker Laborfachhandel, Tutzing, Deutschland
Transfermembran Protran (Nitrocellulose)	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Transfermembran Immobilon-FL (PVDF)	Millipore, Schwalbach, Deutschland

## 4.9 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Begasungsbrutschrank	BB 6220	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Elektroporationssystem	Electro Cell Manipulator 600	BTX, San Diego, USA
ELISA-Messgerät	Emax Precision Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Entwicklermaschine	CP 1000	Agfa Healthcare, München, Deutschland
Fotometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Geldokumentationssystem	Geldokumentationssystem	Biophotonics, Ann Arbor, USA
Homogenisator	RW16	KIKA Labortechnik, Köln, Deutschland
Mikroskop (Durchlicht)	ID 03	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop (Fluoreszenz)	TE 2000 S Eclipse	Nikon, Amstelveen, Niederlande
Mikroskop (Konfokal)	TCS-SP1	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop (Konfokal, für Lebendzell-Mikroskopie)	TCS-SP5/AOBS	Leica, Wetzlar, Deutschland

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
PAGE-Apparatur	Novex Mini Cell	Invitrogen, Paisley, Großbritannien
Schüttelinkubator	TH25/SM25	Edmund Bühler Labortechnik, Tübingen, Deutschland
Sterilwerkbank	HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Thermocycler	GeneAmp 2700	Applied Biosystems, Foster City, USA
	Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Techne Progene	Thermo-Dux, Wertheim, Deutschland
Transilluminator	UV-Transilluminator (Wellenlänge: 312 nm)	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Ultraschallstab	Sonifier 250	Branson, Pusan, Korea
Western-Blot-Transfertank	Hoefler TE 22	Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Western-Blot-Detektionssystem	Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA
Zählkammer	Neubauer, 0,1 mm Tiefe	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim/Rhön, Deutschland
Zentrifugen	4K15	Sigma, Osterode am Harz, Deutschland
	Biofuge fresco	Heraeus Sepatech, Osterode am Harz, Deutschland
	Biofuge pico	Heraeus Sepatech, Osterode am Harz, Deutschland
	Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode am Harz, Deutschland
	Avanti J – 30 I	Beckman Coulter, Fullerton, USA
	Optima MAX-XP	Beckman Coulter, Fullerton, USA

## 5 Methoden

### 5.1 Arbeiten mit Bakterien

#### 5.1.1 Gießen von Agarplatten

Agarplatten wurden verwendet um transformierte Bakterien über Nacht wachsen zu lassen. Um drei Platten zu gießen, wurden 1,35 g Agar-Agar in 90 ml LB-Medium unter Erhitzen gelöst. War die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt, wurde ein geeignetes Selektionsantibiotikum zugegeben. Je etwa 30 ml der Lösung wurden in eine Petrischale (Durchmesser 10 cm) gegossen und erkalten lassen. Für die Blau-Weiß-Selektion wurden je 40 µl X-Gal (40 mg/ml) auf die Platten ausplattiert. Falls die Transformation mit TOP10F'-Bakterien erfolgte, wurden zusätzlich, je Platte, 40 µl 100 mM IPTG ausgestrichen.

#### 5.1.2 Anzucht von Bakterien im Schüttelinkubator

Für die Isolierung von Plasmid-DNS wurden Bakterien über Nacht im Schüttelinkubator vermehrt. Um Plasmid-DNS mittels einer Mini-Präparation zu isolieren, wurden 5 ml LB-Medium mit 50 µl Bakteriensuspension angeimpft. Um Plasmid-DNS mittels einer Midi-Präparation zu isolieren, wurden 25 ml LB-Medium mit 100 µl Bakteriensuspension angeimpft. In beiden Fällen wurden die Kulturen mit einem passenden Selektionsantibiotikum versetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator vermehrt.

#### 5.1.3 Einfrieren von Bakterien

Etwa 500 µl einer Übernachtskultur wurden mit dem gleichen Volumen 2 x Einfriermedium gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

<u>2 x Einfriermedium:</u>	72,3 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	26,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	3,1 mM Na-Citrat
	0,73 mM MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	13,6 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	8,8 % (v/v) Glycerin

#### 5.1.4 Transformation durch Hitzeschock

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit chemokompetenten Bakterien der Stämme TOP10F', DH5α (beide von Invitrogen) und BL21-CodonPlus (Stratagene) Transformationen mittels Hitzeschock durchgeführt. Es wurde stets nach Herstelleranleitung vorgegangen.

## 5.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

### 5.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. 10  $\mu$ l der Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau (0,5 % (v/v) Trypanblau in PBS) verdünnt und in den Raum zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert. Mindestens 100 lebende (nicht blaue) Zellen wurden gezählt, die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl gesamt} \times 2 \div 4 \times 10^4 / \text{ml} = \text{Zellkonzentration}$$

↓            ↓  
(Verdünnungsfaktor) (Anzahl der gezählten Großquadrate)

### 5.2.2 Kultivieren von eukaryotischen Zellen

#### 5.2.2.1 Kultivieren von adhärennten Zellen

Adhärennte Zellen wurden mit DMEM-Kulturmedium im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Vor dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche mittels Trypsin-EDTA-Behandlung gelöst und subkultiviert. Zunächst wurde das Medium aus der Kulturflasche über eine Pasteurpipette abgesaugt, als Nächstes wurden Mediumreste mittels Zugabe von 10 ml PBS und anschließendem Absaugen entfernt. 3 ml warme (37°C) Trypsin-EDTA-Lösung wurden zugegeben, die Kulturflasche wurde 1 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurden 2 ml der Trypsin-EDTA-Lösung abgesaugt. Die Kulturflasche wurde weitere 4 min bei 37°C inkubiert. Zu der Zellsuspension wurden 9 ml Kulturmedium gegeben, durch Auf und Abpipettieren wurden die adhärennten Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Zellen wurden, falls nötig, gezählt und wieder ausgesät.

Trypsin-EDTA-Lösung:                      0,05 % (w/v) Trypsin  
    1 mM EDTA in PBS

#### 5.2.2.2 Kultivieren von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden mit RPMI-Kulturmedium im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Vor dem Erreichen, der für jede Zelllinie festgelegten, höchstzulässigen Zellkonzentration (vorgegeben durch ATCC, Manassas, USA), wurden die Zellen subkultiviert. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 400 g zentrifugiert. Das Sediment wurde im passenden Volumen Kulturmedium resuspendiert und ausgesät.

## 5.2.3 Kryokonservierung von Zellen

### 5.2.3.1 Einfrieren von vitalen Zellen

Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen 5 min bei 400 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend in Einfriermedium resuspendiert, wobei die Konzentration auf  $3 - 5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt wurde. Die Zellsuspension (1 ml) wurde zunächst bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren, die Langzeitlagerung erfolgte in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$ .

### 5.2.3.2 Auftauen von vitalen Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden zügig aufgetaut, die Zellsuspension wurde sofort in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und 5 min bei 400 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in einem entsprechenden Volumen Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in einer Kulturflasche ausgesät.

## 5.2.4 Transfektion mittels Lipofektion

### 5.2.4.1 Transfektion von HeLa-Zellen mittels Lipofektion

Adhärente HeLa-Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 transient transfiziert. Am Vorabend wurden je  $8,5 \times 10^5$  Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesät, sodass diese am nächsten Tag eine Konfluenz von 90 – 95 % aufwiesen. Es wurde nach Herstelleranleitung vorgegangen, die DNS- und Lipofectamine-Mengen wurden jedoch optimiert:  $2 \mu\text{l}$  Lipofectamine +  $2 \mu\text{g}$  Plasmid-DNS pro Ansatz. Weiterhin wurde in jedem Loch der 6-Loch-Platte vor der Transfektion das Kulturmedium bis auf 1 ml abgesaugt und der gesamte Transfektionsansatz tröpfchenweise zugegeben. Nach einer dreistündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die transfizierten Zellen wurden 24 h nach der Transfektion analysiert.

### 5.2.4.2 Transfektion von HEK 293T-Zellen mittels Lipofektion

Adhärente HEK 293T-Zellen wurden mit Polyethylenimin (PEI) transient transfiziert. Am Vorabend wurden je  $8,5 \times 10^5$  Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesät, sodass diese am nächsten Tag eine Konfluenz von mindestens 80 % aufwiesen. Pro Transfektionsansatz wurden  $150 \mu\text{l}$  DMEM-Medium (ohne Zusätze) in einem Reaktionsgefäß pipettiert,  $8 \mu\text{g}$  Plasmid-DNS wurden dazupipettiert und die Lösung kurz gevortext. Die PEI-Stammlösung wurde nun ausführlich gevortext und  $32 \mu\text{l}$  davon in den Transfektionsansatz pipettiert. Dieser wurde anschließend kurz gevortext und mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In jedem Loch der 6-Loch-Platte wurde nun das Kulturmedium bis auf 1 ml abgesaugt und der gesamte Transfektionsansatz tröpfchenweise zugegeben. Nach einer dreistündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die transfizierten Zellen wurden 24 h nach der Transfektion analysiert.



### 5.2.6.3 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur (MPI für Neurobiologie, Martinsried), es wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen. Es wurden stets 10000 Zellen erfasst, die Auswertung wurde mit dem Programm CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

### 5.2.7 Polylysin-Beschichtung von Deckgläschen

Polylysin-beschichtete Deckgläschen wurden eingesetzt um Suspensionszellen für die Immunzytochemie adhären zu lassen. Weiterhin wurden Polylysin-beschichtete Deckgläschen verwendet um die Adhäsion von adhären Zellen zu beschleunigen oder um die Adhäsion von semi-adhären Zelllinien zu verstärken. Die zu behandelnden Deckgläschen (steril) wurden in einer 6-Loch-Platte zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und kurz an der Luft trocknen lassen. Jedes Deckgläschen wurde nun mit 250 µl der Polylysinlösung (1,4 mg/ml) bedeckt und 2 h an der Luft trocknen lassen. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und kurz an der Luft trocknen lassen.

### 5.2.8 Immunzytochemie

Sollten transient transfizierte Zellen gefärbt werden, wurden die Zellen auf Deckgläschen in einer 6-Loch-Platte, wie unter 5.2.4 beschrieben, ausgesät und transfiziert. Sollten untransfizierte Zellen gefärbt werden, so wurden am Vorabend  $2 \times 10^5$  Zellen auf Deckgläschen in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Zur Färbung mittels Immunzytochemie wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS + 0,02 % (v/v) Tween 20 (PBS-T) gewaschen und anschließend mit 1 ml 4 %-iger PFA-Lösung (in PBS) für 10 min fixiert. Um die Entstehung von Trocknungsartefakten zu verhindern, wurde nach der Fixierung die PFA-Lösung nicht komplett abgesaugt, sondern 5 ml PBS-T zugegeben und die Lösung bis auf 1 ml abgesaugt. Der Vorgang wurde einmal wiederholt, erst danach wurde die Lösung komplett abgesaugt und die Deckgläschen zweimal mit 5 ml PBS-T gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren wurden sie entweder mit 1 ml eiskaltem Methanol (p.a.) oder mit 1 ml 0,2 %-iger Triton-X-100-Lösung (v/v in PBS) für 3 min behandelt und zweimal mit 5 ml PBS-T gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Zellen als Nächstes mit 1 ml 2 %-iger (w/v) BSA-Lösung (in PBS-T) für 60 min blockiert und anschließend kurz mit PBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte entweder für 1 h bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4°C. Hierfür wurde jedes Deckgläschen aus der 6-Loch-Platte genommen und mit der Zellseite nach unten auf einem Streifen Parafilm mit 100 µl primärer Antikörperlösung gelegt. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Deckgläschen dreimal für je 5 min mit 5 ml PBS-T in der 6-Loch-Platte gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte im Dunkeln für 1 h, wie beim ersten Antikörper erfolgte die Inkubation ebenfalls auf Parafilm. Im Anschluss an die Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurden die Deckgläschen viermal für 5 min mit 5 ml PBS-T in der 6-Loch-Platte gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger mit einem Tropfen Vectashield gelegt. Nach dem Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Ränder mit Nagellack versiegelt und das fertige Präparat bis zur Mikroskopie bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Präparate wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (am TE 2000 S Eclipse-Mikroskop) oder konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (am TCS-SP1-Mikroskop) untersucht. Die Mikroskopieaufnahmen wurden mit dem Programm ImageJ 1.32J (NIH, Bethesda, USA) ausgewertet.

## **5.2.9 Mikroskopie von lebenden Zellen**

Um Zellen lebend zu mikroskopieren, wurden diese in Glasbodenschälchen ausgesät. Die Zellen wurden im HEPES-haltigen Medium (DMEM F12 HAM) kultiviert. Die Mikroskopie erfolgte bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> am konfokalen TCS-SP5-Fluoreszenzmikroskop.

## **5.2.10 Zellmarkierung durch Fluoreszenzfarbstoffe**

### **5.2.10.1 Zellmarkierung mittels CFSE**

Zur unspezifischen Markierung von Zellen wurde der Farbstoff Carboxy-Fluoresceinacetat, Succinimidyl-Ester (CFSE) eingesetzt. Dieser diffundiert passiv in die Zelle und verteilt sich gleichmäßig im Zytoplasma und Zellkern. Der aufgenommene Farbstoff fluoresziert bei passender Anregung im grünen Spektrum (Anregungsmaximum: 492 nm, Emissionsmaximum: 517 nm). Adhärente Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte mit CFSE gefärbt, dazu wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und in 2 ml CFSE-Lösung (10 µM, frisch in PBS gelöst) für 15 min im Begasungsbrutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgesaugt, die Zellen mit 3 ml DMEM-Kulturmedium versetzt und 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zehnmal mit 5 ml PBS + 5 % (v/v) FCS gewaschen und in 3 ml DMEM-Kulturmedium weiter kultiviert.

### **5.2.10.2 Zellmarkierung mittels Dil**

Ebenfalls zur unspezifischen Markierung von Zellen wurde der Farbstoff 1,1-Dilinoleyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin, perchlorat (Dil) eingesetzt. Dieser wird in die Zellmembran eingebaut und gelangt über den endozytotischen Weg in intrazelluläre Vesikel. Die Dil-gefärbte Membran und Vesikel fluoreszieren bei passender Anregung im roten Farbbereich (Anregungsmaximum: 549 nm, Emissionsmaximum: 565 nm). Adhärente Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte mit Dil gefärbt, dazu wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und in 2 ml Dil-Lösung (5 µM, in DMEM-Medium ohne Zusätze) für 45 min im Begasungsbrutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgesaugt, die Zellen wurden zehnmal mit 5 ml PBS + 5 % (v/v) FCS gewaschen und in 3 ml DMEM-Kulturmedium weiter kultiviert.

## **5.2.11 Isolierung von Exosomen**

Exosomen sind zelluläre Vesikel mit einem Durchmesser von 50 – 90 nm, die von Säugerzellen ausgeschleust werden. Exosomen wurden aus dem Überstand von adhärennten Zellen mittels differentieller Zentrifugation isoliert. Da FCS selbst Exosomen enthält, wurden die adhärennten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und über Nacht im DMEM-Kulturmedium ohne FCS kultiviert. Am nächsten Tag wurde der Zellüberstand abgenommen und 5 min bei 400 g

zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit einem Sterilfilter (0,2 µm) filtriert. Der filtrierte Überstand wurde nun 30 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wurde wiederum vorsichtig abgenommen. Zur Sedimentation der Exosomen wurde der Überstand 1 h bei 100000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das nicht sichtbare Exosomensediment wurde in 14 ml PBS resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine letzte Zentrifugation für 1 h bei 100000 g und 4°C, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das nicht sichtbare Exosomensediment in 50 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert.

<u>RIPA-Lysepuffer:</u>	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	150 mM NaCl
	0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat
	1,0 % (v/v) NP-40
	0,1 % (w/v) SDS
	Protease Inhibitoren Complete (nach Anleitung)

### 5.2.12 Immunisierung und Etablierung von Hybridomzelllinien

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten, monoklonalen LST1-Antikörper wurden in Kooperation mit Dr. Elisabeth Kremmer (Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München) hergestellt. Die Immunisierung der Ratten mit dem rekombinanten HIS-LST1-Protein und die anschließende Etablierung von antikörpersezernierenden Hybridomzelllinien wurde durch die Arbeitsgruppe von Dr. Kremmer durchgeführt.

Lou/C-Ratten wurden mit dem gereinigten HIS-LST1-Protein immunisiert. Je 50 µg HIS-LST1 wurden intraperitoneal und subkutan injiziert, als Adjuvanz wurde dabei das synthetische Cytosin-Guanin-Oligodeoxynukleotid CPG2006 (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) verwendet. Nach 8 Wochen wurden die Ratten erneut mit je 50 µg rekombinantem Protein intraperitoneal und subkutan immunisiert. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurden aus den Ratten Milzzellen isoliert, die anschließend mit der Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL-1580) fusioniert wurden. Zum Nachweis von LST1-spezifischen Antikörpern in den Überständen der resultierenden Hybridomklone wurde ein enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) durchgeführt. Dazu wurden ELISA-Platten mit HIS-LST1 (3 µg/ml) über Nacht beschichtet, am nächsten Tag mit Milchpulver geblockt und anschließend mit den Hybridomüberständen inkubiert. Gebundene, LST1-spezifische Antikörper wurden mit einem Gemisch aus biotinylierten Maus-Antikörpern gegen Ratte IgG (anti-IgG1, anti-IgG2a und anti-IgG2b von ATCC, Manassas, USA; anti-IgG2c von Ascenion, München, Deutschland) nachgewiesen. Die Detektion der anti-IgG-Antikörper erfolgte mittels HRP-gekoppeltem Avidin (Alexis, Grünberg, Deutschland).

### 5.2.13 Generierung von unreifen und reifen DC

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten unreifen und reifen DC wurden durch Stefani Spranger (AG Prof. Schendel, Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München) generiert. Dazu wurden zunächst  $5 \times 10^6$  periphere Blutlymphozyten von einem gesunden Spender in einer Zellkulturflasche (Nunclon Surface, 80 cm<sup>2</sup>, Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland) für 50 min bei 37° C und 6,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die nicht-adhärenenten Zellen

wurden abgenommen und die adhärenenten Monozyten wurden in DC-Medium (RPMI 1640 VLE von Biochrom, Berlin, Deutschland mit 1,5 % Humanserum von Humanserum-Pool des Instituts für Transfusionsmedizin, Suhl, Deutschland) kultiviert.

Die Reifung der Monozyten zu DC wurde, unter Verwendung zweier unterschiedlicher Protokolle, induziert. Das klassische DC-Ausreifungsprotokoll wurde nach den Vorgaben von Jonuleit et al. (1997) angewandt. Zusätzlich wurde ein in der Arbeitsgruppe von Prof. Schendel entwickeltes, schnelleres Ausreifungsprotokoll angewendet (Cocktail-6-Methode, Spranger 2008). Bei diesem Protokoll wurden die adhärenenten Monozyten 48 h lang mit GM-CSF (Berlex, Seattle, USA, 100 ng/ml) und IL-4 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland, 20 ng/ml) stimuliert. Anschließend konnten die unreifen DC geerntet werden. Sollten reife DC hergestellt werden, so wurden den unreifen DC nun folgende Faktoren zugegeben: CLO75 (InvivoGen, San Diego, USA), IL-1 $\beta$  (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland, 10 ng/ml), IFN- $\gamma$  (Boehringer, Mannheim, Deutschland), PGE<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, 250 ng/ml), PolyI:C (InvivoGen, San Diego, USA) und TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland, 10 ng/ml). Die Endkonzentrationen mancher Faktoren kann wegen einer laufenden Patentanmeldung nicht angegeben werden. Die Behandlung der unreifen DC mit den genannten Faktoren erfolgte für 24 h, anschließend konnten die reifen DC geerntet werden.

## 5.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

#### Isolierung mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (high copy)

Zur Plasmidisolierung wurden 5 ml einer Übernachtskultur eingesetzt, es wurde nach Herstelleranleitung vorgegangen mit folgender Änderung:

Schritt 5: Der zusätzliche Waschschrift mit AW-Puffer wurde immer durchgeführt.

#### Isolierung mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (low copy)

Zur Plasmidisolierung wurden 5 ml einer Übernachtskultur eingesetzt, es wurde nach Herstelleranleitung vorgegangen mit folgenden Änderungen:

Schritt 5: Der zusätzliche Waschschrift mit AW-Puffer wurde immer durchgeführt.

Schritt 7: 35  $\mu$ l des warmen (70°C) Elutionspuffers wurden auf die Säule pipettiert, 3 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min lang bei 12000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

#### „PEG“-Plasmidisolierung/Modifizierte Alkalische Lyse

In die Plasmidisolierung wurden 25 ml einer Übernachtskultur eingesetzt, diese wurde 10 min bei 5500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment gründlich in 2 ml GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 3 ml 0,2 N NaOH/1 % SDS-Lösung und vorsichtiges Kippen bis die Suspension klar und zähflüssig wurde, diese wurde anschließend

5 min lang auf Eis inkubiert. Die Neutralisierung des Lysats erfolgte durch Zugabe von 3 ml 3 M KAc, vorsichtiges Kippen und einer fünfminütigen Inkubation auf Eis. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen wurde die Lösung 10 min bei 5500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit Rnase A versetzt (Endkonzentration 20 µg/ml). Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C im Wasserbad. Bei der folgenden Chloroform-Extraktion wurden 4 ml Chloroform (p.a.) zugegeben, die Lösung wurde 30 s durch Schütteln gemischt und anschließend für 1 min bei 5500 g zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und erneut mit Chloroform extrahiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Als Nächstes folgte die Präzipitation der DNS durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol (99,8 %, p.a.) und sofortige Zentrifugation für 10 min bei 5500 g. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 5 ml 70 %-igem Ethanol (p.a.) gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min bei 5500 g) getrocknet. Anschließend wurde das Sediment in 320 µl H<sub>2</sub>O gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Präzipitation der Plasmid-DNS durch Zugabe von 80 µl 4 M NaCl und 400 µl 13 % (w/v) PEG<sub>8000</sub>. Durch Kippen des Gefäßes wurde die Lösung vorsichtig gemischt und daraufhin für 20 min auf Eis inkubiert. Mit der folgenden Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 12000 g wurde die präzipitierte Plasmid-DNS sedimentiert. Wurde sterile DNS für die darauffolgenden Versuche benötigt, so mussten nun alle Pipettierschritte an der Sterilwerkbank durchgeführt werden. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment mit 1 ml 70 %-igem Ethanol (p.a.) gewaschen. Die getrocknete Plasmid-DNS wurde in 300 µl Tris/HCl pH 8,5 (steril) gelöst, anschließend wurde ihre Konzentration bestimmt. Die gelöste Plasmid-DNS wurde bei -20°C gelagert.

### 5.3.2 Isolierung von RNS aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung von RNS aus eukaryotischen Zellen wurde das peqGold Trifast-Reagenz nach Anleitung des Herstellers verwendet.

### 5.3.3 Reinigen von DNS durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde in dieser Arbeit eingesetzt um DNS nach Restriktionsverdauungen zu reinigen. Die DNS-Lösung wurde mittels TE-Puffer auf das doppelte Volumen eingestellt. Zur Lösung wurde 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, gut geschüttelt und anschließend 10 min bei 12000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere (wässrige) Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Um Phenolreste zu entfernen wurde 1 Vol. Chloroform (p.a.) zugegeben, gut geschüttelt und anschließend 10 min bei 12000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere (wässrige) Phase wurde wieder vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt, die DNS-Lösung wurde auf 200 mM NaCl eingestellt, mit 2,5 Vol. 100 %-igem Ethanol (p.a.) versetzt und gut gemischt. Die DNS wurde in der Kälte präzipitiert, entweder 2 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C. Wurde sterile DNS für die darauffolgenden Versuche benötigt, so mussten nun alle Pipettierschritte an der Sterilwerkbank durchgeführt werden. Das Gefäß mit der präzipitierten DNS wurde 15 min bei 12000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Sediment zweimal mit Ethanol gewaschen. Im ersten Waschschrift wurden dem Sediment 200 µl 70 %-iges Ethanol (p.a.) zugegeben, anschließend 10 min bei 12000 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Im zweiten Waschschrift wurden dem Sediment 100 µl



Primerkombination: Lst2s + 3'LST1A (Taq Polymerase)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 0,8 mM

1.	95°C Denaturierung	5 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	25 Zyklen
3.	58°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	30 s	
5.	72°C Finale Extension	10 min	

Primerkombination: Lst2s + Lst5 (Taq Polymerase)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 0,8 mM

1.	95°C Denaturierung	5 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	25 Zyklen
3.	63°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	30 s	
5.	72°C Finale Extension	10 min	

Primerkombination: 5-LST1-VL + Lst1.5 (Taq Polymerase)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 0,8 mM

1.	95°C Denaturierung	5 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	25 Zyklen
3.	65°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	30 s	
5.	72°C Finale Extension	10 min	

Primerkombination: Lst2-FLAG2 + pEGFP-Nas (Taq Polymerase)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1 mM

1.	95°C Denaturierung	5 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	25 Zyklen
3.	69°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	30 s	
5.	72°C Finale Extension	10 min	

Primerkombination: M13 forward + M13 reverse (Taq Polymerase)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1,25 mM

1.	95°C Denaturierung	5 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	25 Zyklen
3.	56°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	30 s	
5.	72°C Finale Extension	10 min	

Primerkombination: T7 + BGH reverse (Taq Polymerase)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1 mM

1.	95°C Denaturierung	5 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	25 Zyklen
3.	51°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	30 s	
5.	72°C Finale Extension	10 min	

Primerkombination: 5-LST1-VL + 3'LST1A (FastStart High Fidelity Taq)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 2 mM

1.	95°C Denaturierung	2 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	35 Zyklen
3.	65°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	1 min	
5.	72°C Finale Extension	7 min	

Primerkombination: Lst2-FLAG1 + 3-Lst5-Kpn (FastStart High Fidelity Taq)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1 mM

1.	95°C Denaturierung	2 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	35 Zyklen
3.	61°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	1 min	
5.	72°C Finale Extension	7 min	

Primerkombination: Lst2-FLAG2 + 3-Lst5-Kpn, bzw. 3'LST1A (FastStart High Fidelity Taq)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1 mM

1.	95°C Denaturierung	2 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	35 Zyklen
3.	66°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	1 min	
5.	72°C Finale Extension	7 min	

Primerkombination: Lst2-FLAG1 + 3'LST1A (FastStart High Fidelity Taq)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1 mM

1.	95°C Denaturierung	2 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	35 Zyklen
3.	61°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	1 min	
5.	72°C Finale Extension	7 min	

Primerkombination: 5-LST1-VL + 3-LST1C-FLAG1, bzw. 3'LST1A (FastStart High Fidelity Taq)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1 mM

1.	95°C Denaturierung	2 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	35 Zyklen
3.	65°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	1 min	
5.	72°C Finale Extension	7 min	

Primerkombination: 5-LST1-VL + 3-LST1C-FLAG1, bzw. 3'LST1A, bzw. 3-FLAG-2 (FastStart High Fidelity Taq)

MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1 mM

1.	95°C Denaturierung	2 min	
2.	95°C Denaturierung	30 s	35 Zyklen
3.	65°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	1 min	
5.	72°C Finale Extension	7 min	

### 5.3.6 RT-PCR

Es wurde der One Step RT-PCR Kit nach Anleitung mit folgenden Bedingungen verwendet:

Primerkombination: Lst2s + 3'LST1A

RNS-Menge: 1 µg

1.	50°C Reverse Transkription	30 min	
2.	95°C Denaturierung	15 min	
2.	94°C Denaturierung	30 s	30 Zyklen
3.	58°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	1 min	
5.	72°C Finale Extension	10 min	

Primerkombination: Lst2s + Lst5

RNS-Menge: 1 µg

1.	50°C Reverse Transkription	30 min	
2.	95°C Denaturierung	15 min	
2.	94°C Denaturierung	30 s	30 Zyklen
3.	57°C Anlagerung	30 s	
4.	72°C Extension	1 min	
5.	72°C Finale Extension	10 min	

### 5.3.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosekonzentration der Gele wurde je nach Größe der zu trennenden Fragmente zwischen 0,7 % und 2,0 % gewählt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in einen Erlenmeyer-Kolben (300 ml) eingewogen und im passenden Volumen 1 x TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Eine geeignete Gelkammer (kleine: 50 ml Volumen, große: 100 ml Volumen) wurde an den offenen Seiten mit Tesaband zweimal abgedichtet und ein passender Probenkamm wurde gewählt. Nachdem die Agaroselösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde sie in die Gelkammer gegossen. War das Gel erstarrt, wurde das Klebeband und der Probenkamm entfernt und die Gelkammer in eine Gelapparatur eingesetzt, die mit 1x TBE befüllt war. Die aufzutragende DNS wurde – falls nötig – mit Wasser auf ein Volumen von mindestens 10 µl aufgefüllt und mit 6 x Auftragspuffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 2 mM EDTA, 30 % [w/v] Ficoll 400, 4 % [w/v] Orange G) versetzt. Zusätzlich zu den Proben wurde pro Gel eine Proben tasche mit 200 ng DNS-Marker (1 kb Plus) beladen. Die Spannung wurde abhängig von der Fragmentgröße und der Prozentigkeit des Gels zwischen 30 und 100 Volt gewählt. Nach dem Lauf wurde das Gel am UV-Transilluminator mit dem Geldokumentationssystem fotografiert.

### 5.3.8 Präparative Agarosegelelektrophorese

Um DNS-Fragmente einer bestimmten Größe aus Agarosegelen zu isolieren, wurde eine präparative Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde wie unter 5.3.7 verfahren, jedoch wurde die Agarose Seakem GTG verwendet. Diese wurde in 1 x TAE-Puffer gelöst, als Laufpuffer wurde ebenfalls 1 x TAE-Puffer verwendet. Nach dem Gellauf wurde die gewünschte Bande auf dem Transilluminator zügig ausgeschnitten und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gewogen. Zur Reinigung der DNS wurde der NucleoSpin Extract II Kit nach Anleitung des Herstellers verwendet.

### 5.3.9 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit dem TOPO TA Cloning Kit in den pCR 2.1 oder pCR II-Vektor. Es wurde stets nach Anleitung des Herstellers verfahren.

### 5.3.10 Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdauungen in dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders angegeben, in einem Volumen von 20  $\mu$ l angesetzt. Es wurden 2  $\mu$ l des passenden 10 x Restriktionspuffers und 1 U Enzym/ $\mu$ g DNS zugegeben. Das Volumen wurde mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Restriktionsverdauungen wurden, wenn nicht anders angegeben, 1 h lang bei 37°C durchgeführt.

### 5.3.11 Ligation

Um DNS-Fragmente mit linearisierten Vektoren zu ligieren, wurde der Quick Ligation Kit verwendet. Es wurde, wenn nicht anders angegeben, nach Anleitung des Herstellers verfahren.

### 5.3.12 Sequenzieren von Plasmiden

Alle Sequenzierarbeiten wurden von der Firma MWG-Biotech AG in Ebersberg, Deutschland durchgeführt. Es wurde stets 1  $\mu$ g getrocknete Plasmid-DNS unter Angabe des Sequenzierungsprimers eingeschickt.

## 5.4 Arbeiten mit Proteinen

### 5.4.1 Herstellung von Lysaten aus eukaryotischen Zellen

Um Lysate von eukaryotischen Zellen herzustellen wurden die Zellen gezählt, bei 400 g 5 min zentrifugiert und in eiskaltem Triton-Lysepuffer resuspendiert. Pro 1 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden 20 – 40  $\mu$ l Lysepuffer eingesetzt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis lysiert und das Lysat



### 5.4.4 Dialyse von Proteinlösungen

Um störende Faktoren wie Imidazol und Harnstoff aus gereinigten Proteinlösungen zu entfernen, wurde eine Dialyse durchgeführt. Hierfür wurde ein passendes Stück (1 cm pro 1 ml der zu dialysierenden Lösung) Visking-Dialyseschlauch zweimal für 10 min in 2 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1 mM EDTA aufgekocht und danach gründlich mit  $\text{H}_2\text{O}$  gereinigt. Die zu dialysierende Lösung wurde in den Schlauch pipettiert und dieser gründlich mit Bindfaden verschlossen und mit einer Klammer versehen. Der gefüllte Schlauch wurde anschließend in einem Liter eiskaltem PBS eingetaucht, die Dialyse erfolgte unter Rühren im Kühlraum über Nacht. Im Abstand von 2, 16 und 18 Stunden wurde das PBS ausgetauscht.

### 5.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels der Bradford-Methode

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde die Bradford-Methode angewandt. Dabei macht man sich die Eigenschaft vom Farbstoff Coomassie G-250 zunutze, bei Proteinbindung seine Absorption bei 595 nm zu erhöhen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Standardkurve bestimmt. Dazu wurden verschiedene Volumina BSA (1 mg/ml) in eine 96-Loch-ELISA-Platte pipettiert: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 und 20  $\mu\text{l}$ . Von der zu untersuchenden Proteinlösung wurden auch verschiedene Volumina in Duplikaten auf die 96-Loch-ELISA-Platte pipettiert: 5, 10 und 20  $\mu\text{l}$ . In jede der, entweder mit BSA oder Proteinlösung, befüllten Vertiefungen wurden nun 200  $\mu\text{l}$  der frisch angesetzten Bradford-Färbelösung pipettiert und gut gemischt. Die Absorption bei 595 nm, abzüglich der Absorption bei 450 nm, wurde am ELISA-Gerät gemessen und zwar frühestens 5 min, jedoch spätestens 1 h nach Zugabe der Färbelösung. Anhand der erhaltenen BSA-Absorptionswerte konnte im Excel Programm eine Standardkurve erstellt werden (Y-Achse: Absorption 595 nm – 450 nm, X-Achse: BSA-Volumen), mit deren Werten die Proteinkonzentration der Probe errechnet werden konnte. Dazu wurden die gemittelten Werte der Proteinlösung auf der Y-Achse aufgetragen und anhand der BSA-Standardkurve die zugehörigen Probenwerte auf der X-Achse abgelesen. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$(1000 \mu\text{l} / \text{Probenvolumen}) \times \text{X-Wert} = \text{Konzentration in } \mu\text{g/ml}$$

Bradford Stammlösung :                    0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250  
    25 % (v/v) Ethanol  
    50 % (v/v) Phosphorsäure

Bradford Färbelösung :                1 Vol. Bradford Stammlösung  
    4 Vol.  $\text{H}_2\text{O}$   
    mittels Faltenfilter filtrieren

### 5.4.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden 15 %-ige Trenngele verwendet. Nach dem Zusammenbau der Glasplatten wurde zunächst der untere Rand mit 660  $\mu\text{l}$  Trenngellösung (versetzt mit je 10  $\mu\text{l}$  APS und TEMED) abgedichtet. Um flüssige APS- und TEMED-Reste zu entfernen, wurde das Dichtungsgel zweimal mit 1 ml Isopropanol (p.a.)

ausgespült. Anschließend wurde die restliche Trenngellösung auf 0,1 % APS und 0,04 % TEMED eingestellt und das Trenngel bis etwa 1 cm unter den Kamm gegossen. Eine dünne Schicht Isopropanol (1 ml, p.a.) wurde über das Gel geschichtet, um eine glatte Oberkante zu erzeugen. Nach Erstarren des Trenngels (45 min) wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel darübergelassen. Dabei wurde auch der Kamm eingesetzt. Sobald das Gel vollständig auspolymerisiert war (30 min), konnten die Proteinproben mit Proteinauftragspuffer (Roti-Load 1) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert werden. Das fertige Polyacrylamidgel wurde in die PAGE-Apparatur eingespannt und mit Laufpuffer bedeckt. Als Nächstes wurde der Kamm gezogen und die Proteinproben in die Geltaschen pipettiert. Je eine Tasche pro Gel wurde mit Proteinmarker beladen (Prestained Protein Marker Broad Range; jede Markerbande 0,1 – 0,2 µg/µl). Die aufgetragene Menge Marker variierte je nach Anwendung (Coomassiefärbung / Silberfärbung = 15 µl, Western-Blot mit Chemilumineszenzdetektion = 15 µl, Western-Blot mit Fluoreszenzdetektion = 1 µl). Das Einlaufen der Proben erfolgte bei 55 V, im Sammelgel wurde die Spannung auf 75 V erhöht. Die Auftrennung im Trenngel wurde schließlich bei 125 V durchgeführt.

Trenngel (Endvolumen 10 ml) :            15 % (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)  
    375 mM Tris/HCl pH 8,8  
    0,1 % (w/v) SDS

Sammelgel (Endvolumen 5 ml) :            5 % (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)  
    126 mM Tris/HCl pH 6,8  
    0,1 % (w/v) SDS

Laufpuffer (pH 8,3) :                        25 mM Tris  
    192 mM Glycin  
    0,1 % (w/v) SDS

#### 5.4.7 Anfärben von Proteinen mittels Coomassiefärbung

Um Proteine auf Polyacrylamidgelen sichtbar zu machen, wurde die Coomassiefärbung durchgeführt. Das Gel wurde mindestens eine Stunde (meistens über Nacht) in Coomassie-Färbelösung geschüttelt und anschließend mindestens eine Stunde in Entfärbelösung bewegt.

Coomassie-Färbelösung:                    50 % (v/v) Ethanol (p.a.)  
    10 % (v/v) Essigsäure (p.a.)  
    0,1 % (w/v) Coomassie R250

Entfärbelösung:                            10 % (v/v) Ethanol (p.a.)  
    7 % (v/v) Essigsäure (p.a.)

#### 5.4.8 Anfärben von Proteinen mittels Silberfärbung

Um Proteine auf Polyacrylamidgelen mit einer höheren Sensitivität sichtbar zu machen, als bei der Coomassiefärbung, wurde die Silberfärbung durchgeführt. Zunächst wurde das Gel 1 h in der Fixierlösung geschüttelt, anschließend 20 min in 50 % Ethanol (p.a.) und danach 20 min in 30 % Ethanol (p.a.). Als Nächstes wurde das Gel 2 min lang in der frisch angesetzten

Imprägnierlösung geschüttelt und sofort danach dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Färbung des Gels erfolgte in der frisch angesetzten Färbelösung für 20 min, anschließend wurde die überschüssige Färbelösung durch zwei kurze Waschschriffe mit H<sub>2</sub>O entfernt. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen wurde das Gel in der frisch angesetzten Entwicklerlösung geschüttelt bis die Banden sichtbar wurden, die Entwicklerlösung wurde dann sofort weggeschüttelt und das Gel mit Fixierlösung bedeckt.

<u>Fixierlösung:</u>	50 % (v/v) Methanol (p.a.) 12 % (v/v) Essigsäure (p.a.)
<u>Imprägnierlösung:</u>	0,07 % (v/v) Formaldehydlösung (37 %) 0,865 mM Natriumthiosulfat
<u>Färbelösung:</u>	0,07 % (v/v) Formaldehydlösung (37 % ) 12 mM Silbernitrat
<u>Entwicklerlösung:</u>	0,05 % (v/v) Formaldehydlösung (37 %) 0,0346 mM Natriumthiosulfat 566 mM Natriumcarbonat (wasserfrei)

#### 5.4.9 Western-Analyse

Das Polyacrylamidgel wurde von den Glasplatten abgelöst und 15 min in Towbin-Transferpuffer äquilibriert. Zwei etwa 8,5 x 10 cm große Stücke Blotting-Papier, zwei Blotschwämme und die Nitrocellulosetransfermembran (in Trenngelgröße von 7,5 x 8,5 cm) wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt (5 min). Wurde die PVDF-Transfermembran für den Western-Blot verwendet, so musste diese zunächst 15 s in Methanol (p.a.) eingetaucht werden bevor sie 5 min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Das Blotting-Papier, das Polyacrylamidgel, die Transfermembran und die Blotschwämme wurden in die Blotfassung gespannt. Die fertige Blotfassung wurde in den, mit Towbin-Transferpuffer gefüllten, Western-Blot-Transfertank in der richtigen Orientierung gesteckt. Es wurde stets über Nacht bei 30 V geblottet.

<u>Towbin-Transferpuffer (pH 8,3) :</u>	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol (p.a.)
---	---

#### 5.4.10 Immundetektion von Western-Membranen

Proteine auf Nitrocellulose, bzw. PVDF-Transfermembranen wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert. Nach dem elektrophoretischen Transfer der Proteine auf die Membran, wurde diese zunächst zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Membran 1 h in Blockierlösung geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem primären Antikörper inkubiert, dieser wurde in Blockierlösung + 0,1 % Tween 20 verdünnt. Um die Menge an eingesetztem Antikörper gering zu halten, wurde 1 ml Antikörperlösung auf die Membran pipettiert und diese mit einem Stück Folie bedeckt. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran viermal für 5 min mit 25 ml TBS + 0,1 % Tween 20 (TBS-T) gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 1 ml sekundärer

Antikörperlösung für 1 h. Für die Chemilumineszenzdetektion wurden HRP-gekoppelte Antikörper verwendet, für die Fluoreszenzdetektion wurden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper verwendet, außerdem wurden die Inkubation und die darauffolgenden Waschschriffe im Dunkeln durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Membran viermal für 5 min mit 25 ml TBS-T gewaschen. Sollte eine Fluoreszenzdetektion durchgeführt werden, so wurde die Membran noch zweimal mit 25 ml TBS für jeweils 10 min gewaschen, die Detektion erfolgte anschließend am Western-Blot-Detektionssystem. Sollte die Detektion mittels Chemilumineszenz erfolgen, so wurden jeweils 0,7 ml der Detektionslösungen 1 und 2 aus dem ECL Kit gemischt und auf die Membran pipettiert, die mit einem Stück Folie bedeckt wurde. Nach einer einminütigen Inkubation wurde das überschüssige Substrat abgetupft und die Membran in Folie eingeschweißt, wobei genau darauf geachtet wurde, dass sich zwischen Membran und Folie keine Luftblasen befanden. Der Blot wurde nun zur Orientierung mit einem kleinen Stück Leuchtstreifen versehen und in der Dunkelkammer auf Röntgenfilm exponiert. In der Regel wurden folgende Expositionszeiten gewählt: 2 min, 5 min und 10 min. Die exponierten Filme wurden sofort in der Entwicklermaschine entwickelt.

TBS: 50 mM Tris/HCl pH 8,0  
138 mM NaCl  
2,7 mM KCl

Blockierlösung: 50 mM Tris/HCl pH 8,0  
138 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
5 % (w/v) Magermilchpulver

#### 5.4.11 Quantitative Immundetektion von Western-Membranen

Die quantitative Immundetektion wurde wie eine normale Fluoreszenzdetektion (siehe 5.4.10) durchgeführt. Zusätzlich zur Detektion von LST1 wurde der Blot jedoch mit dem anti- $\beta$ -Tubulin WA-3 (1:300) und dem anti-Maus IRDye800CW (1:10000) als zweitem Antikörper detektiert. Die Detektion erfolgte am Western-Blot-Detektionssystem und die quantitative Auswertung wurde mit der Odyssey Application Software 3.0 (LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA) vorgenommen. Um Intensitätsschwankungen bei der Detektion auszuschließen, wurde jeder Blot dreimal bei drei unterschiedlichen Anregungsintensitäten detektiert und ausgewertet. Die Intensität des Tubulinsignals in jeder Spur wurde als Ladekontrolle verwendet um eventuelle Intensitätsschwankungen aufgrund unterschiedlicher Lysatmengen ausschließen zu können. Dazu wurde aus allen auf dem Blot untersuchten Lysaten eine durchschnittliche Tubulin-Intensität errechnet und für jede Spur die LST1-Intensität anhand der eigenen Tubulin-Intensität auf die durchschnittliche Tubulin-Intensität normalisiert. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Tubulin-Intensität}}{\text{durchschnittliche Tubulin-Intensität}} \times \text{LST1-Intensität} = \text{normalisierte LST1-Intensität}$$

Die normalisierten LST1-Intensitätswerte konnten nun miteinander verglichen werden. Es wurde stets ein Wert als 100 % definiert, sodass beim Vergleich mit weiteren LST1-Werten

eine prozentuale Zunahme oder Abnahme angegeben werden konnte. Die prozentuale Änderung wurde für jede der drei Detektionen errechnet, aus den erhaltenen Werten wurde das arithmetische Mittel gebildet.

Die statistische Auswertung der Expressionsdaten wurde, wie folgt, durchgeführt: Zunächst wurde jede Datenreihe einem Kolmogorov-Smirnov-Test unterzogen (mit dem Programm SigmaStat 3.0 von Systat, Erkrath, Deutschland), um die Verteilung der Daten zu untersuchen. War der mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test ermittelte p-Wert größer als 0,05, so wurde von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen und es konnte zum Vergleich zweier Datenreihen ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test durchgeführt werden (mit dem Programm Excel 2004 von Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland). Datenreihen, deren Werte nicht normal verteilt waren, wurden mit einem Mann-Whitney-Test verglichen (mit dem Programm Prism 4.03 von GraphPad, La Jolla, USA).

#### 5.4.12 Strippen von Western-Membranen

Um eine bereits detektierte Western-Membran mit einem anderen Antikörper erneut zu detektieren, ist es nötig den Blot von den gebundenen Antikörpern zu befreien (stripfen). Dafür wurde der Blot kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen und dann mit Stripping-Puffer bei 55°C 30 min im Wasserbad geschwenkt. Anschließend wurde der Blot zehnmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Falls die erste Immundetektion mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper erfolgte, konnte die vollständige Ablösung der Antikörper im Western-Blot-Detektionssystem überprüft werden. War dies der Fall konnte nun die Membran, wie unter 5.4.10 beschrieben, neu detektiert werden.

<u>Stripping-Puffer</u>	62,5 mM Tris/HCl pH 6,7
	2 % (w/v) SDS
	10 mM β-Mercaptoethanol

#### 5.4.13 Immunpräzipitation

Die IP dient dazu, mittels spezifischer Antikörper, bestimmte Proteine aus einem Zelllysate zu isolieren. Dazu wird ein Antikörper zum Zelllysate gegeben, welcher das gewünschte Protein bindet. Anschließend wird der Protein-Antikörper-Komplex ebenfalls gebunden, nämlich von Protein-G-Sepharose. Der so entstandene Immunkomplex kann dann mittels Zentrifugation sedimentiert werden. Alle Schritte der IP wurden bei 4°C durchgeführt. Pro Ansatz wurden 20 µl der 50 %-igen (v/v) Protein-G-Sepharose eingesetzt. Vor ihrer Verwendung wurde die Protein-G-Sepharose zweimal mit 1 ml Triton-Lysepuffer gewaschen, dazu wurde die Sepharose durch kurzes (15 s) Zentrifugieren bei 12000 g sedimentiert, der Überstand wurde mit einer Spritze und einer 27G-Kanüle abgenommen. Das Lysat von 1 – 3 x 10<sup>7</sup> Zellen wurde mit 10 µg gereinigtem Antikörper oder 100 µl Hybridomüberstand versetzt und entweder für 1 h auf Eis inkubiert oder über Nacht bei 4°C gerollt. Anschließend wurde das Lysat mit der gewaschenen Protein-G-Sepharose versetzt und für 1 h bei 4°C gerollt. Im Anschluss wurde die Protein-G-Sepharose dreimal mit 1 ml Triton-Lysepuffer gewaschen und in 30 µl 1 x SDS-Auftragspuffer (Roti-Load 1) resuspendiert. Die Probe wurde entweder sofort für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgekocht oder bei -20°C gelagert.

#### **5.4.14 Präabsorption von Hybridomüberständen**

Als Kontrolle für die Spezifität von Hybridomüberständen wurden diese mit dem immunogenen Peptid präabsorbiert. Für den Hybridomüberstand wurde eine Konzentration an spezifischem Antikörper von 50 µg/ml angenommen (Harlow und Lane 1988). Zum Hybridomüberstand wurde ein zehnfacher molarer Überschuss des immunogenen Peptid zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C gerollt. Anschließend wurde das Gemisch 30 min bei 100000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und als präabsorbierte Kontrolle verwendet.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Herstellung von LST1-Expressionsvektoren

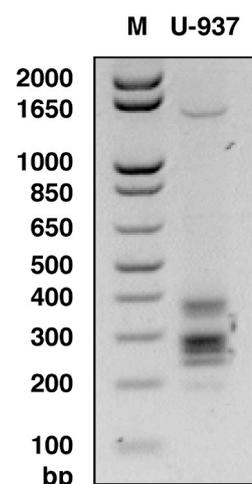
Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollten Expressionvektoren für verschiedene LST1-Spleißvarianten hergestellt werden. Diese sollten im Laufe der Arbeit eingesetzt werden um LST1-Isoformen in humanen Zelllinien zu exprimieren und dadurch Hinweise auf Struktur und Funktion der Proteine zu erhalten.

#### 6.1.1 Isolierung von LST1-Spleißvarianten

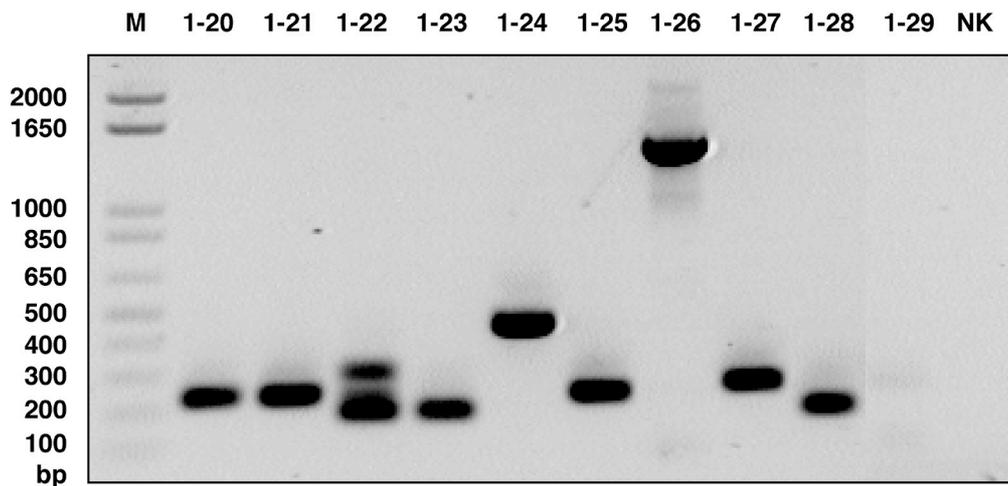
Um Expressionsvektoren für verschiedene LST1-Spleißvarianten herzustellen, musste zunächst aus *LST1*-Transkripten komplementäre DNS (cDNS) hergestellt werden.

Zur Isolierung der *LST1*-Transkripte wurde Gesamt-RNS aus der U-937-Zelllinie extrahiert und in eine RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) eingesetzt. Zur Amplifikation wurden die *LST1*-spezifischen Primer Lst2s und 3'LST1A verwendet. Der Lst2s-Primer bindet im Exon 2 von *LST1*, stromaufwärts der Translationsinitiationsstelle, der 3'LST1A-Primer bindet im Exon 5, im Bereich des Stopp-Codons. Somit wurde mit dieser Primerpaarung nur der proteinkodierende Anteil von *LST1* (Exone 2 – 5) amplifiziert. Es sollten also nur Spleißvarianten isoliert werden, die sich in ihrer proteinkodierenden Sequenz unterscheiden (12 Spleißvarianten). Die Amplifikate aus der RT-PCR wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 10), anhand der Größe konnten 6 verschiedene LST1-Spleißvarianten identifiziert werden: LST1.2345, LST1.2345', LST1.245, LST1.245', LST1.25' und LST1.25''.

**Abbildung 10: Amplifizierte *LST1*-Transkripte aus der U-937-RNS.** In die RT-PCR-Reaktion wurde isolierte Gesamt-RNS aus der U-937-Zelllinie eingesetzt. Zur Amplifikation wurden der One Step RT-PCR-Kit und die *LST1*-spezifischen Primer Lst2s und 3'LST1A verwendet. Vom Amplifikat (U-937) wurden 5 µl auf einem 2 %-igen Agarosegel aufgetragen. Anhand der Größe konnten 6 alternative Transkripte identifiziert werden: LST1.2345 (375 bp), LST1.2345' (354 bp), LST1.245 (282 bp), LST1.245' (261 bp), LST1.25' (238 bp) und LST1.25'' (193 bp). Spleißvarianten, die sich nur geringfügig in ihrer Größe unterscheiden, erscheinen zusammen als eine diffuse Bande (LST1.2345/LST1.2345' und LST1.245/LST1.245'). Die Bande bei 1479 bp ist auf ungespleißte RNS, die noch die Introne 2, 3 und 4 enthält, zurückzuführen. Die Größen der Markerfragmente (M) sind links in Basenpaaren angegeben.



Um die RT-PCR-Produkte zweifelsfrei den verschiedenen LST1-Spleißvarianten zuordnen zu können, wurden die Amplifikate mit dem TOPO TA Cloning Kit in den pCR II-Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von TOP10F'-Bakterien verwendet, diese wurden anschließend auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht kultiviert. Die so erhaltenen Transformandenkolonien wurden zunächst mittels PCR auf das Vorhandensein einer *LST1*-Insertion überprüft. Dabei wurden, wie schon bei der RT-PCR, die Primer Lst2s und 3'LST1A verwendet. Die resultierenden PCR-Produkte wurden auf Agarosegele aufgetrennt, anhand der

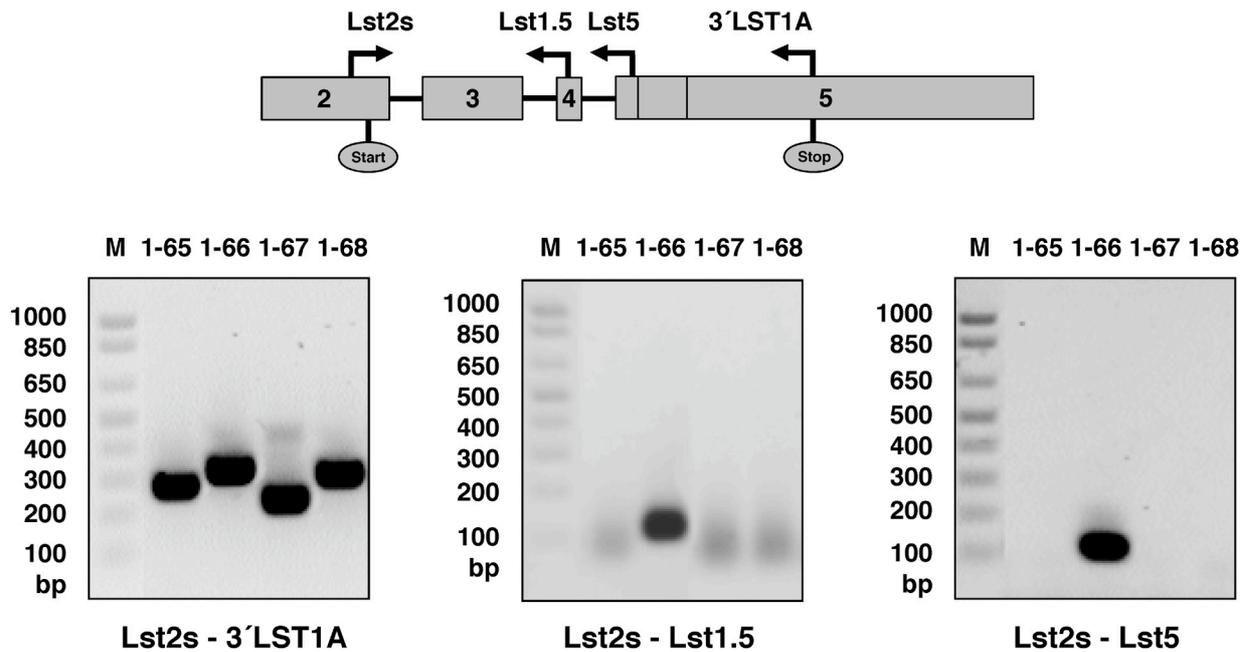


**Abbildung 11: PCR-Screen von Transformandenklonen.** Die Bakterienklone wurden mittels PCR auf das Vorhandensein einer *LST1*-Insertion überprüft. Zur Amplifikation wurden die *LST1*-spezifischen Primer Lst2s und 3′LST1A verwendet. Vom Amplifikat (Klone 1-20 – 29) wurden 10 µl auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetragen. Bei der negativen Kontrolle (NK) wurden keine Bakterien in die PCR-Reaktion eingesetzt. Anhand der Fragmentgrößen lässt sich eine grobe Zuordnung der Transkripte vornehmen: Klone 1-20, 1-21 = *LST1.25′* (238 bp), 1-22 = nicht monoklonal, 1-23 = *LST1.25′′* (193 bp), 1-24 = kann nicht zugeordnet werden (etwa 450 bp), 1-25 = *LST1.25′* (238 bp), 1-26 = cDNS stammt aus ungespleißter RNS (1479 bp), 1-27 = *LST1.245* (282 bp), 1-28 = *LST1.25′′* (193 bp) und 1-29 = keine *LST1*-Insertion. Die Größen der Markerfragmente (M) sind links in Basenpaaren angegeben.

Größe konnten die Amplifikate den verschiedenen *LST1*-Spleißvarianten grob zugeordnet werden (exemplarisch gezeigt in Abb. 11). Da aber die Amplifikate für die 12 erwarteten Spleißvarianten im Größenbereich zwischen 193 und 375 bp liegen und die Größenunterschiede z.T. geringfügig sind, ist diese Methode in ihrer Genauigkeit nicht ausreichend um die Transkripte zweifelsfrei identifizieren zu können. Daher wurden mit ausgewählten cDNS-Klonen Exon-spezifische PCR-Screens durchgeführt, bei denen Lst2s stets als 5′-Primer verwendet, der 3′-Primer aber variiert wurde. Die verwendeten 3′-Primer binden im Exon 4 (Lst1.5), Exon 5 (Lst5) oder Exon 5′′ (3′LST1A) und ermöglichen sowohl die Identifizierung von Transkripten, die das Exon 4 enthalten, wie die Unterscheidung zwischen Transkripten mit Exon 5 und 5′, bzw. 5′′ (exemplarisch gezeigt in Abb. 12). Der Exon-spezifische PCR-Screen erlaubte also eine genauere Identifizierung der bereits grob zugeordneten cDNS-Klone.

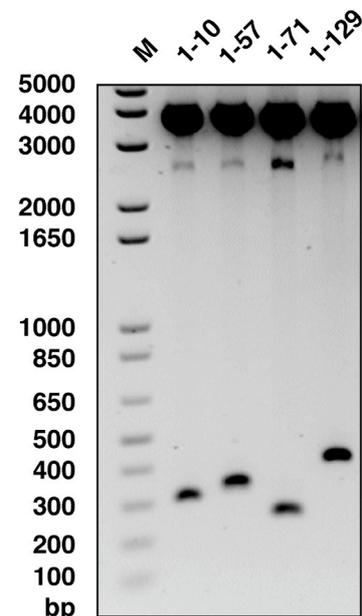
Im nächsten Schritt wurden für jede der *LST1*-Spleißvarianten mehrere „Kandidatenklone“ bestimmt. Plasmid-DNS dieser Bakterienklone wurde mit dem NucleoSpin Plasmid Kit isoliert und die Größe der Insertion mittels Restriktionsanalyse bestätigt (exemplarisch gezeigt in Abb. 13). Die cDNS-Klone, deren Zuordnung zu einer *LST1*-Spleißvariante mittels Restriktionsanalyse bestätigt werden konnte, wurden zusätzlich sequenziert. Dadurch sollten Mutationen in der cDNS ausgeschlossen werden, die bei der ursprünglichen RT-PCR aufgetreten sein könnten. Der verwendete One Step RT-PCR-Kit enthält eine Taq-Polymerase, diese besitzt zwar 5′ → 3′ aber keine 3′ → 5′ Exonukleaseaktivität. Infolgedessen kommt es, statistisch betrachtet, zu einer Basensubstitution in 9000 Nukleotiden (Tindall und Kunkel 1988). Bei der Amplifikation der relativ kleinen *LST1*-Transkripte war zwar das Risiko einer Basensubstitution gering, es sollte aber trotzdem mittels Sequenzierung ausgeschlossen werden.

Die Sequenzanalyse ermöglichte es die Zuordnung der Kandidatenklone endgültig zu bestätigen, aus den klonierten RT-PCR Amplifikaten der U-937-RNS konnten 10 verschiedene



**Abbildung 12: Exon-spezifischer PCR-Screen ausgewählter cDNS-Klone.** Die Bindestellen des verwendeten 5'-Primers Lst2s und der Exon-spezifischen 3'-Primer Lst1.5, Lst5 und 3'LST1A sind in der schematischen Darstellung der *LST1*-Sequenz mit Pfeilen eingezeichnet. Vom Amplifikat (Klone 1-65 – 68) wurden je 10 µl auf 1 %-ige Agarosegele aufgetragen. Anhand der Amplifikatsgröße (Primerpaar Lst2s – 3'LST1A) und des Vorhandenseins der Exon 4 (Primerpaar Lst2s – Lst1.5), bzw. Exon 5-Sequenz (Primerpaar Lst2s – Lst5) lassen sich die Transkripte identifizieren: Klon 1-65 = LST1.25', 1-66 = LST1.245, 1-67 = LST1.25'' und 1-68 = LST1.235''. Die Größen der Markerfragmente (M) sind jeweils links in Basenpaaren angegeben.

**Abbildung 13: Restriktionsanalyse von ausgewählten Transformandenklonen.** Die Plasmid-DNS der Transformandenklone wurde mit dem Restriktionsenzym *BstX* I verdaut. Die Erkennungssequenz von *BstX* I ist stromaufwärts- und abwärts der multiplen Klonierstelle des pCR II-Vektors lokalisiert. Von der verdauten Plasmid-DNS wurden je 500 ng auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Die Größe der Insertionen bestätigt die durch die vorhergehenden PCR-Screens getroffene Zuordnung der Spleißvarianten: Klon 1-10 = LST1.245 (322 bp), 1-57 = LST1.2345'' (349 bp), 1-71 = LST1.25' (278 bp) und 1-129 = LST1.2345 (415 bp). Die Größen der Markerfragmente (M) sind links in Basenpaaren angegeben.



Spleißvarianten isoliert werden: LST1.2345, LST1.2345', LST1.2345'', LST1.235', LST1.235'', LST1.245, LST1.245', LST1.245'', LST1.25' und LST1.25''. Dies impliziert, dass die U-937-Zelllinie mehr alternative *LST1*-Transkripte exprimiert als bisher beschrieben (de Baey et al. 1997: 5 Transkripte, siehe Tab. 2).

Die zusätzlichen Transkripte lassen sich dadurch erklären, dass nicht alle 10 Spleißvarianten bei der Auftrennung der RT-PCR Produkte sichtbar waren (siehe Abb. 10).

Insgesamt wurden 325 Klone mittels PCR-Screen typisiert, von 44 dieser Klone wurde die Plasmid-DNS isoliert und mittels Restriktionsanalyse untersucht. Zusätzlich wurde bei 14 Klonen die Plasmid-DNS sequenziert. Bei der Typisierung konnten jedoch keine Kandidatenklone für die Spleißvarianten LST1.235 und LST1.25 identifiziert werden. Da bei *LST1* eine zelltypspezifische Expression bestimmter Spleißvarianten bekannt ist (siehe Tab. 2), wurde versucht die zwei fehlenden Spleißvarianten aus der RNS anderer Zelllinien zu isolieren.

Aus DC, der Leukämiezelllinie K-562 und der endothelialen Zelllinie HMEC wurde Gesamt-RNS isoliert und in RT-PCR-Reaktionen eingesetzt. Um ausschließlich Transkripte nachzuweisen, die die komplette Exon 5-Sequenz enthalten, wurden bei der RT-PCR-Reaktion die Primer Lst2s und Lst5 verwendet. Aus der RNS von DC konnten die bereits isolierten Transkripte LST1.2345 und LST1.245 amplifiziert werden (nicht gezeigt).

Die gesuchten Spleißvarianten LST1.235 und LST1.25 konnten bei keiner der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die fehlende Expression dieser alternativen Transkripte in den untersuchten Zelllinien deutet darauf hin, dass sie eine untergeordnete biologische Rolle spielen.

### 6.1.2 Charakterisierung einer neuen LST1-Spleißvariante

Bei der Typisierung der cDNS-Klone mittels PCR-Screen konnten einige Klone keiner bekannten Spleißvariante zugeordnet werden. Die Amplifikate dieser Klone zeigten höhere Fragmentgrößen, als für die bekannten *LST1*-Transkripte erwartet wurde. Bei den meisten Klonen ließ sich diese Diskrepanz darauf zurückführen, dass die klonierte cDNS aus nicht vollständig gespleißten Transkripten stammte. Die Sequenzierung des Klones 1-24 zeigte jedoch keine ungespleißten Introns in der cDNS, sondern eine verlängerte Exon 3-Sequenz (Abb. 14A, „Exon 3 lang“). Diese war 185 bp lang und somit ungefähr doppelt so lang wie die bekannte, 93 bp lange, Exon 3-Sequenz.

Bei mehreren *LST1*-Polymorphismen ist eine Regulation des Spleißens durch bestimmte Allele postuliert worden (siehe Einleitung 2.3.5.1 und 2.3.5.2). Daher wurde an dieser Stelle untersucht, ob die verlängerte Exon 3-Sequenz durch Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle zustande kam.

In der genomischen *LST1*-Sequenz weist die potentielle, alternative 3'-Spleißakzeptorstelle statt des nötigen AG- ein TG-Dinukleotid auf. Unmittelbar stromaufwärts der potentiellen Akzeptorstelle wären der nötige Polypyrimidintrakt und eine passende Spleiß-Verzweigungsstelle vorhanden (Abb. 14B). Eine T → A Basensubstitution an der Akzeptorstelle könnte also die kryptische 3'-Spleißstelle aktivieren und die im Klon 1-24 beobachtete, längere Exon 3-Sequenz verursachen. Das Vorhandensein der längeren Exon 3-Sequenz in Transkripten würde eine Leserasterverschiebung verursachen, die schon im fünften Basentriplett der verlängerten Exon 3-Sequenz zu einem verfrühten Stopp-Codon führen würde (Abb. 14A). Die Folge der Mutation wäre also eine partielle bis komplette Suppression der Expression von transmembranen *LST1*-Isoformen.

Bei allen publizierten *LST1*-Sequenzen ist allerdings an der fraglichen Stelle kein Polymorphismus beschrieben worden, sodass die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, dass die beschriebene, längere Exon 3-Sequenz lediglich auf ein aberrant gespleißtes Transkript zurückzuführen ist.



## 6.1.3 Klonierung von LST1-Expressionsvektoren

### 6.1.3.1 Klonierung von FLAG-LST1 Expressionsvektoren

Zu Beginn dieser Arbeit, als die LST1-Antikörper noch nicht entwickelt worden waren, konnte überexprimiertes, rekombinantes LST1 in Antikörper-basierten Verfahren nur mit Hilfe eines Etiketts nachgewiesen werden. Bei der Wahl des Etiketts wurden mehrere Aspekte berücksichtigt, letztendlich wurde das FLAG-Etikett gewählt, weil der dazugehörige Antikörper FLAG M2 mit hoher Affinität N- und C-terminal etikettierte Proteine erkennen kann. Weitere Gründe waren die kurze FLAG-Aminosäuresequenz (DYKDDDDK) und die Tatsache, dass die Etikettsequenz ohne eine Verknüpfungssequenz (linker) direkt an die LST1-Sequenz fusioniert werden konnte.

#### 6.1.3.1.1 Amplifikation von FLAG-LST1-Sequenzen mittels PCR

Die LST1-Spleißvarianten LST1.235' und LST1.245 sollten, mit der Sequenz für ein N-terminales FLAG-Etikett versehen, in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA 3.1 (-) kloniert werden. Dazu wurden die isolierten LST1-cDNS-Sequenzen im pCR II-Vektor (siehe 6.1.1) verwendet. Je 1 ng der Plasmid-DNS (Klone 1-155 = LST1.235' und 1-66 = LST1.245) wurde in PCR-Reaktionen mit den Primern 5-Lst2-FLAG1 und 3'LST1A eingesetzt, es wurde der FastStart High Fidelity PCR Kit verwendet. Dieser enthält neben der Taq-Polymerase noch ein Korrekturleseprotein, das die fehlende 3' → 5' Exonukleaseaktivität der Polymerase kompensiert und somit die Wahrscheinlichkeit für fehlerhafte Amplifikate stark reduziert. Die PCR-Produkte aus dieser Reaktion (1 µl) wurden jeweils in eine zweite PCR-Reaktion eingesetzt, dabei wurden der FastStart High Fidelity PCR Kit und das Primerpaar 5-Lst2-FLAG2 / 3'LST1A benutzt. Die Sequenz für das FLAG-Etikett wurde also mit der LST1-Sequenz mittels eines „semi-nested“ PCR-Ansatzes fusioniert. Der 5-Lst2-FLAG1-Primer bindet im Exon 2, dadurch wird die reguläre Translationsinitiationsstelle zerstört und ein Teil der FLAG-Sequenz hinzugefügt. Der 5-Lst2-FLAG2-Primer bindet im Bereich des ersten Primers und vervollständigt die FLAG-Sequenz, zusätzlich fügt er unmittelbar stromaufwärts ein neues Start-Codon und eine *Xho* I-Schnittstelle ein. Bei beiden PCR-Reaktionen wurde der bereits für die RT-PCR (siehe 6.1.1) verwendete 3'-Primer 3'LST1A eingesetzt.

#### 6.1.3.1.2 Klonierung der FLAG-LST1-Sequenzen in den pCR II-Vektor

Nach der zweiten PCR-Reaktion wurden die fertigen PCR-Produkte unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kits mit dem pCR II-Vektor ligiert und anschließend in TOP10F'-Bakterien transformiert. Die resultierenden Transformandenklone wurden mittels PCR auf das Vorhandensein der FLAG-LST1-Insertion überprüft, dazu wurden die Primer 5-Lst2-FLAG2 und 3'LST1A verwendet (erwartete Amplifikate: FLAG-LST1.235' = 311 bp, FLAG-LST1.245 = 262 bp). Von den positiven Bakterienklonen wurden je drei ausgewählt (Klone 8-4, 8-11, 8-17, 9-1, 9-7 und 9-16), aus denen Plasmid-DNS mit dem NucleoSpin Plasmid Kit isoliert wurde. Um die korrekte Länge der Insertion zu bestätigen, wurde die Plasmid-DNS der ausgewählten Klone mittels Restriktionsanalyse untersucht. Dabei wurden die Enzyme *Xho* I und *Eco*R I verwendet, die die FLAG-LST1-Insertion flankieren (erwartete Insertionsgrößen: FLAG-LST1.235' = 321 bp, FLAG-LST1.245 = 272 bp). Die *Xho* I-Schnittstelle wurde durch den 5-Lst2-FLAG2-Primer eingefügt, die *Eco*R I-Schnittstelle liegt im pCR II-Vektor, stromabwärts von der multiplen Klonierstelle. Die Restriktionsanalyse zeigte bei allen Klonen die erwartete Fragment-

größe, um die korrekte Sequenz der FLAG-LST1-Insertionen zu bestätigen, wurde Plasmid-DNS von je zwei Klonen (8-4, 8-11, 9-7 und 9-16) sequenziert. Die Sequenzierergebnisse zeigten, dass beide Klone, die die FLAG-LST1.235'-Insertion enthielten (8-4 und 8-11) fehlerfrei waren, die Klone mit der FLAG-LST1.245-Insertion wiesen jedoch jeweils eine Basensubstitution auf. Bei der Mutation im Klon 9-16 handelte es sich um eine „missense“-Mutation, die im Klon 9-7 war lediglich eine stille Mutation, weshalb entschieden wurde mit diesem Klon weiterzuarbeiten.

#### 6.1.3.1.3 Klonierung der FLAG-LST1-Sequenzen in den pcDNA 3.1 (-)-Vektor

Im nächsten Klonierungsschritt wurden die FLAG-LST1-Insertionen in den Vektor pcDNA 3.1(-) umkloniert. Die Plasmid-DNS der Klone 8-11 und 9-7 wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *EcoR* I verdaut, parallel dazu wurde der Vektor pcDNA 3.1 (-) ebenfalls mit dieser Enzymkombination verdaut. Die Vollständigkeit des pcDNA-Verdau wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft und anschließend wurde der restliche Restriktionsansatz mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Die durch den Verdau freigesetzten Insertionen der Klone 8-11 und 9-7 wurden mittels präparativer Agarosegelelektrophorese isoliert und gereinigt. Die Bestimmung der DNS-Konzentration der isolierten FLAG-LST1-Insertionen und die des verdauten pcDNA-Vektors erfolgte durch Auftrennung über ein Agarosegel und anschließende Abschätzung anhand des DNS-Markers. Der pcDNA-Vektor und die Insertionen wurden in Ligationsreaktionen eingesetzt, verwendet wurde der Quick Ligation Kit. Die Ligationsprodukte wurden anschließend in DH5 $\alpha$  Subcloning Efficiency-Bakterien transformiert. Das Testen der resultierenden Transformandenklone auf das Vorhandensein der FLAG-LST1-Insertion erfolgte mittels PCR, unter Verwendung der Primer 5-Lst2-FLAG2 und 3'LST1A. Von je zwei positiven Klonen (12-8, 12-16, 13-1 und 13-7) wurde Plasmid-DNS mit dem Nucleospin Plasmid Kit isoliert und mittels Restriktionsanalyse untersucht. Die Restriktionen mit den Enzymen *Xho* I und *EcoR* I konnten in sämtlichen Klonen Insertionen mit der erwarteten Größe freisetzen (FLAG-LST1.235' = 321 bp, FLAG-LST1.245 = 272 bp). Für alle weiteren Versuche mit den fertigen Expressionsvektoren wurden die Klone 12-16 (FLAG-LST1.235') und 13-1 (FLAG-LST1.245) verwendet.

Die Expressionsvektoren für FLAG-LST1.2345 (Klon 5.2.5) und FLAG-LST1.2345' (Klon 5'.2.16) wurden von Maximilian Nitschké, wie unter 6.1.3.1.1 – 6.1.3.1.3 beschrieben, hergestellt (Nitschké 2006).

#### **6.1.3.2 Klonierung eines LST1-FLAG Expressionsvektors**

Als Kontrolle für die bisher hergestellten N-terminal FLAG-etikettierten Expressionsvektoren und um einen Einfluss der Etikettlokalisierung auf die Proteinfunktion auszuschließen, wurde ein C-terminal FLAG-etikettiertes LST1.235'-Konstrukt kloniert. Der Expressionsvektor wurde nach der in 6.1.3.1.1 – 6.1.3.1.3 beschriebenen Klonierungsstrategie hergestellt und es wurden, wenn nicht anders angegeben, die dort genannten Reagenzien verwendet.

##### 6.1.3.2.1 Amplifikation der LST1.235'-FLAG-Sequenz mittels PCR

Als Matrize für die Amplifikation diente die cDNS der LST1.235'-Spleißvariante (Klon 2-10) im pCR II-Vektor (siehe 6.1.1). Bei der ersten PCR-Reaktion wurde das Primerpaar 5-LST1-VL / 3-LST1C-FLAG1, bei der zweiten PCR-Reaktion das Primerpaar 5-LST1-VL / 3-FLAG2 verwendet. Der Primer 5-LST1-VL bindet im Exon 2 und fügt eine *Xho* I-Schnittstelle

stromaufwärts der Translationsinitiationsstelle von *LST1* ein. Der 3-LST1C-FLAG1-Primer bindet im Exon 5 und zerstört das Stopp-Codon von LST1.235', zusätzlich fügt es den ersten Teil der FLAG-Sequenz ein. Der 3-FLAG2-Primer ist z.T. komplementär zum 3-LST1C-FLAG1-Primer und vervollständigt die FLAG-Sequenz, zusätzlich wird ein Stopp-Codon direkt stromabwärts der FLAG-Sequenz eingefügt.

#### 6.1.3.2.2 Klonierung der LST1.235'-FLAG-Sequenz in den pCR II-Vektor

Das Amplifikat aus der zweiten PCR-Reaktion wurde, wie unter 6.1.3.1.2 beschrieben, in den Vektor pCR II kloniert und transformiert. Die resultierenden Transformandenklone wurden mittels PCR auf das Vorhandensein der LST1-FLAG-Insertion untersucht, verwendet wurden dabei die Primer M13 forward und M13 reverse (erwartetes Amplifikat: 462 bp). Diese binden im pCR II-Vektor stromaufwärts und stromabwärts der Klonierstelle. Plasmid-DNS wurde aus drei positiven Bakterienklonen (Klone 7-5, 7-11 und 7-12) isoliert und mittels Restriktionsanalyse untersucht, dabei wurden die Enzyme *Xho* I und *EcoR* I verwendet. Die *Xho* I-Schnittstelle wurde durch den 5-LST1-VL-Primer eingefügt, die *EcoR* I-Schnittstelle liegt im pCR II-Vektor, stromabwärts der multiplen Klonierstelle. Bei den untersuchten Klonen konnte die erwartete Insertionsgröße (228 bp) bestätigt werden, zusätzlich wurde die Plasmid-DNS von zwei dieser Klone (7-11 und 7-12) sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse zeigte, dass die Sequenz des Klons 7-11 eine Basensubstitution aufwies, während die Sequenz des Klons 7-12 fehlerfrei war.

#### 6.1.3.2.3 Klonierung der LST1-FLAG-Sequenz in den pcDNA 3.1 (-)-Vektor

Die LST1-FLAG-Insertion wurde im nächsten Schritt aus dem pCR II-Vektor ausgeschnitten und in den Vektor pcDNA 3.1 (-) umklont. Der Vektor pcDNA 3.1 (-) und die Plasmid-DNS des Klons 7-12 wurden mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *EcoR* I verdaut und anschließend gereinigt. Der verdaut und gereinigte pcDNA-Vektor wurde mit der LST1-FLAG-Insertion in eine Ligationsreaktion eingesetzt und anschließend transformiert. Die resultierenden Transformandenklone wurden mittels PCR auf das Vorhandensein der LST1-FLAG-Insertion getestet, die Primer T7 und BGH reverse wurden hierfür verwendet (erwartetes Amplifikat: 367 bp). Diese binden stromaufwärts und stromabwärts der multiplen Klonierstelle des Vektors. Aus zwei positiven Klonen (9A-8 und 9A-22) wurde Plasmid-DNS isoliert und mittels Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Xho* I und *EcoR* I untersucht. Bei beiden Klonen konnte durch den Verdau die Insertion in der richtigen Größe (228 bp) freigesetzt werden. Bei allen weiteren Versuchen wurde der Klon 9A-22 (LST1.235'-FLAG) verwendet.

Der bereits vorhandene Expressionsvektor für LST1.2345'-FLAG (Schiller 2005) wurde ebenfalls im Laufe der Arbeit als Kontrolle für die N-terminal FLAG-etikettierten LST1-Isoformen eingesetzt.

#### **6.1.3.3 Klonierung von FLAG-LST1-EGFP Expressionsvektoren**

Um FLAG-LST1-EGFP-Fusionsproteine in transfizierten Zellen zu exprimieren, wurden die LST1-Spleißvarianten LST1.2345 und LST1.245, mit der Sequenz für einen N-terminalen FLAG-Etikett versehen, in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert. Die Expressionsvektoren wurden nach der, unter 6.1.3.1.1 – 6.1.3.1.3, beschriebenen Klonierungsstrategie hergestellt und es wurden, wenn nicht anders angegeben, die dort genannten Reagenzien verwendet.

#### 6.1.3.3.1 Amplifikation von FLAG-LST1-Sequenzen mittels PCR

Als Matrizen für die Amplifikationen dienten die LST1-cDNS-Sequenzen im pCR II-Vektor (Klone 6-7 = LST1.2345 und 1-66 = LST1.245). Bei den ersten PCR-Reaktionen wurde das Primerpaar 5-Lst2-FLAG1 / 3-Lst5-Kpn, bei den zweiten das Primerpaar 5-Lst2-FLAG2 / 3-Lst5-Kpn eingesetzt. Die Primer 5-Lst2-FLAG1 und 5-Lst2-FLAG2 wurden unter 6.1.3.1.1 bereits beschrieben. Der Primer 3-Lst5-Kpn bindet im Exon 5 von *LST1* und zerstört das reguläre Stopp-Codon, zusätzlich wird stromabwärts eine *Kpn* I-Schnittstelle eingefügt, die den Leserasterkonformen Übergang zur EGFP-Sequenz im pEGFP-N1-Vektor gewährleisten soll.

#### 6.1.3.3.2 Klonierung der FLAG-LST1-Sequenzen in den pCR II-Vektor

Die Amplifikate der zweistufigen PCR-Reaktionen wurden, wie unter 6.1.3.1.2 beschrieben, mit dem pCR II-Vektor ligiert und anschließend transformiert. Die FLAG-LST1 Transformandenklone wurden mittels PCR auf das Vorhandensein der Insertionen überprüft. Es wurden dazu die Primer 5-Lst2-FLAG2 und 3-Lst5-Kpn verwendet (erwartete Amplifikate: FLAG-LST1.2345 = 350 bp, FLAG-LST1.245 = 257 bp). Aus je drei positiven Klonen (4-9, 4-18, 4-22, 11-2, 11-4 und 11-6) wurde Plasmid-DNS isoliert und mittels Restriktionsanalyse untersucht. Dabei wurden die Enzyme *Xho* I und *Kpn* I verwendet, die die FLAG-LST1-Insertionen flankieren (erwartete Insertionsgrößen: FLAG-LST1.2345 = 348 bp, FLAG-LST1.245 = 255 bp). Von den Klonen, deren Insertionen in der Restriktionsanalyse die erwartete Fragmentgröße zeigten, wurden pro Ansatz zwei sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten, dass von den FLAG-LST1.245-Klonen, einer eine Basensubstitution aufwies (Klon 4-18) und einer fehlerfrei war (Klon 4-22). Die Klone mit der FLAG-LST1.2345-Insertion zeigten beide Basensubstitutionen, beim Klon 11-2 wurden zwei Substitutionen festgestellt, beim Klon 11-6 führte eine Substitution lediglich zu einer stillen Mutation, weshalb entschieden wurde mit diesem Klon weiterzuarbeiten.

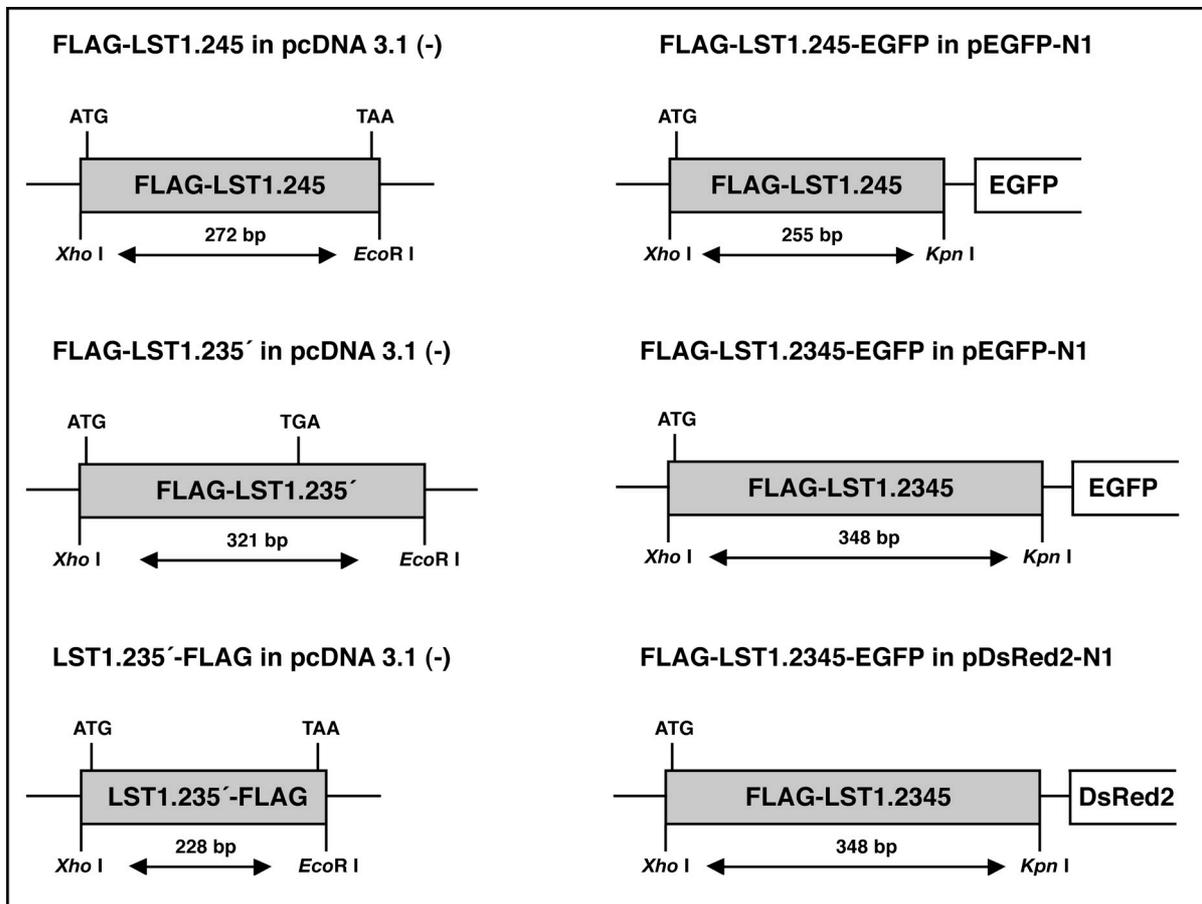
#### 6.1.3.3.3 Klonierung der FLAG-LST1-Sequenzen in den pEGFP-N1-Vektor

Im nächsten Klonierungsschritt wurden die FLAG-LST1-Insertionen in den Vektor pEGFP-N1 umkloniert. Die Plasmid-DNS der Klone 4-22 und 11-6 wurde mit dem Restriktionsenzymen *Xho* I und *Kpn* I verdaut und gereinigt, parallel dazu wurde der Vektor pEGFP-N1 ebenfalls mit dieser Enzymkombination verdaut und anschließend gereinigt. Der verdaute pcDNA-Vektor wurde mit den isolierten Insertionen in Ligationsreaktionen eingesetzt und transformiert. Das Testen der resultierenden Transformandenklone auf das Vorhandensein der FLAG-LST1-Insertionen erfolgte mittels PCR, unter Verwendung der Primer 5-Lst2-FLAG2 und 3-Lst5-Kpn. Von je zwei positiven Klonen (5-7, 5-8, 15-3 und 15-4) wurde Plasmid-DNS isoliert und mittels Restriktionsanalyse untersucht. Die Restriktionsanalysen mit den Enzymen *Xho* I und *Kpn* I konnten in sämtlichen Klonen Insertionen mit den erwarteten Größen freisetzen (FLAG-LST1.2345 = 348 bp, FLAG-LST1.245 = 255 bp). Für alle weiteren Versuche wurden die Klone 5-8 (FLAG-LST1.245-EGFP) und 15-4 (FLAG-LST1.2345-EGFP) verwendet.

#### **6.1.3.4 Klonierung eines FLAG-LST1-DsRed2 Expressionsvektors**

Bei der Untersuchung der Lokalisation von FLAG-LST1-EGFP in transfizierten Zellen hat es sich als notwendig erwiesen, eine mögliche Kolo-kalisation mit Tubulin zu untersuchen. Da hierfür lediglich ein EGFP-Tubulin-Expressionskonstrukt zur Verfügung stand, musste ein Konstrukt zur Expression eines LST1-DsRed2-Fusionsproteins hergestellt werden.

Die multiple Klonierstelle des pDsRed2-N1-Vektors hat dieselbe Sequenz, wie die des pEGFP-N1-Vektors. Dies ermöglichte eine direkte Umklonierung der FLAG-LST1.2345-Insertion vom pEGFP-N1-Vektor in den pDsRed2-N1-Vektor. Der Vektor pDsRed2-N1 und die Plasmid-DNS des Klon 15-4 (FLAG-LST1.2345 im pEGFP-N1) wurden mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Kpn* I verdaut und anschließend gereinigt. Der verdaute pDsRed2-Vektor wurde mit der FLAG-LST1-Insertion in eine Ligationreaktion eingesetzt und transformiert. Die resultierenden Transformandenklone wurden mittels PCR auf das Vorhandensein der FLAG-LST1-Insertion getestet, dazu wurde das Primerpaar 5-Lst2-FLAG2 / 3-Lst5-Kpn verwendet. Von drei positiven Klonen (16-4, 16-8 und 16-12) wurde Plasmid-DNS isoliert, diese wurde mittels Restriktionsanalyse, unter Verwendung der Enzyme *Xho* I und *Kpn* I, untersucht. Bei zwei der drei untersuchten Klonen (12-8 und 12-16) konnte durch den Verdau die Insertion mit den erwarteten Größen freigesetzt werden (348 bp). Für alle weiteren Versuche wurde der Klon 16-12 (FLAG-LST1.2345-DsRed2) verwendet.



**Abbildung 15: Hergestellte LST1-Expressionsvektoren.** Schematische Darstellung der hergestellten LST1-Expressionsvektoren, angegeben sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme und die Insertionslänge. Zusätzlich sind die Positionen der Start- und Stopp-Codons eingezeichnet.

## 6.2 Herstellung von monoklonalen LST1-Antikörpern

Die hergestellten Expressionsvektoren (Abb. 15) sollten in dieser Arbeit dazu eingesetzt werden überexprimiertes LST1 in transfizierten Zellen zu untersuchen. Um gesicherte Erkenntnisse über die Funktion und Struktur der LST1-Isoformen zu erhalten, war es jedoch unumgänglich auch die endogenen Proteine zu untersuchen. Da für die Proteincharakterisierung Antikörper-basierte Methoden essentiell sind und zu Beginn dieser Arbeit kein LST1-Antikörper vorhanden war, sollte mittels Hybridomtechnologie ein monoklonaler Antikörper gegen LST1 hergestellt werden.

### 6.2.1 Isolierung von rekombinantem HIS-LST1

Zur Immunisierung von Ratten sollte His<sub>6</sub>-etikettiertes LST1 in Bakterien rekombinant exprimiert und gereinigt werden. Dazu wurde ein bereits vorhandener Expressionsvektor (HIS-LST1.3Δ45', Klon 2.1 im pET-45b (+)-Vektor, Nitschké 2006) verwendet. Dieses Konstrukt kodiert ein N-terminal His<sub>6</sub>-etikettiertes LST1-Protein (Abb. 16A). Es handelt sich dabei um die LST1.2345'-Isoform, bei der jedoch die ersten 26 N-terminalen AS fehlen, diese enthalten u.a. die Transmembrandomäne und wurden deletiert um die Löslichkeit des rekombinanten Proteins zu gewährleisten.

Der Expressionsvektor für das HIS-LST1.3Δ45'-Protein wurde in BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL-Bakterien nach Herstelleranleitung transformiert. Dieser Bakterienstamm wurde aus zwei Gründen gewählt: Einerseits enthält er zusätzliche Kopien von „seltenen“ tRNS-Genen, die bei der Expression von eukaryotischen Proteinen in Bakterien oft zum limitierenden Faktor werden können. Andererseits besitzt der pET-45b (+)-Vektor einen T7-Promotor. Bei den verwendeten BL21-Bakterien kann die T7-Polymerase durch Zugabe von IPTG hochreguliert werden, wodurch die Expression des rekombinanten Proteins induziert wird. Die transformierten BL21-Bakterien wurden nach Herstelleranleitung über Nacht kultiviert. Zur Induktion der Expression von rekombinantem HIS-LST1 wurde ein Liter Bakterienkultur auf 1 mM IPTG eingestellt und drei Stunden lang bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurde, wie unter 5.4.2 beschrieben, aus der Bakterienkultur ein Lysat hergestellt. Die Reinigung des rekombinanten HIS-LST1 aus dem Bakterienlysat erfolgte mittels Bindung des His<sub>6</sub>-Etiketts an die mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladene Matrix der Pro Pur IMAC Midi-Säule. Die Beladung der Säule mit dem Lysat, die Waschschrte und die Elution der HIS-LST1-Proteine aus der Säulenmatrix wurden, wie unter 5.4.3 beschrieben, durchgeführt.

Die aus der Säulenreinigung erhaltenen Protein-Fraktionen wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, das mittels Coomassie gefärbt wurde. Auf dem gefärbten Gel war die IPTG-vermittelte Induktion der HIS-LST1-Expression deutlich zu erkennen (Abb. 16B). Sämtliche Elutionsfraktionen enthielten das rekombinante HIS-LST1 als Monomer, Dimer und Trimer (Abb. 16B, errechnete Molekulargewichte: 10,5 / 21,1 / 31,6 kDa). Die dimeren und trimeren HIS-LST1-Proteine wanderten in der Polyacrylamidgelelektrophorese langsamer als erwartet, lediglich das Monomer war auf der erwarteten Höhe zu beobachten. In den Elutionsfraktionen waren neben dem HIS-LST1 auch kontaminierende Proteine vorhanden, die vermutlich durch unspezifische Bindung an die Säulenmatrix ins Eluat gelangten (Abb. 16B). Da für die Immunisierung eine reine HIS-LST1-Proteinlösung von Nöten war, wurde an dieser Stelle

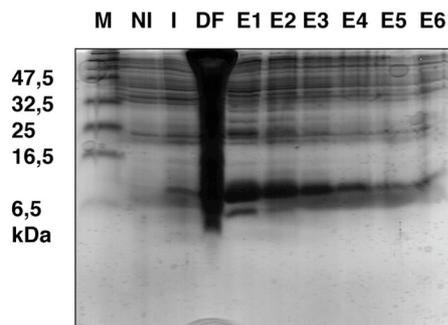
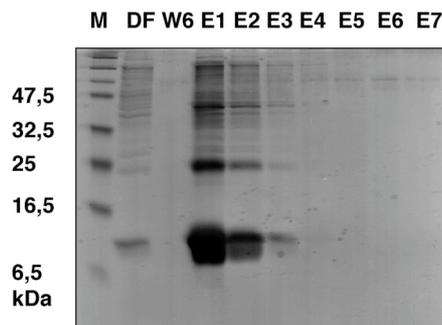
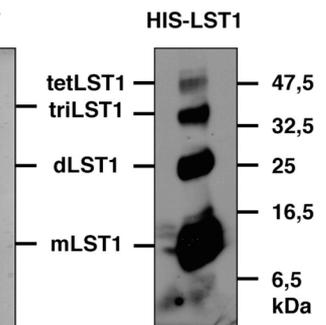
beschlossen die Elutionsfraktionen 1 – 4 zusammenzufassen und einer erneuten Säulenreinigung zu unterziehen. Dazu musste zunächst mittels Dialyse (gegen PBS + 2 M Harnstoff) das Imidazol aus der Proteinlösung entfernt werden. Imidazol wird im Elutionspuffer eingesetzt um gebundene, His<sub>6</sub>-etikettierte Proteine von den Bindungsstellen in der Säulenmatrix zu verdrängen und würde bei einer erneuten Beladung der Säule die Proteinbindung verhindern. Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung auf die Pro Pur IMAC Midi-Säule geladen und gereinigt. Die aus der zweiten Säulenreinigung resultierenden Fraktionen wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Coomassie gefärbt. Die Elutionsfraktionen 1 – 3 enthielten das HIS-LST1-Protein als Monomer, Dimer und Trimer (Abb. 16C). Die Reinheit der HIS-LST1-Proteinlösung war im Vergleich zum ersten Durchlauf erheblich höher und für die Immunisierung der Ratten ausreichend.

**A**

HIS<sub>6</sub>-Etikett    Linker                      Exon 3                      Exon 4                      Exon 5'

MAHHHHHHVVG TGSNDDDDKS PDLSACLCLWL HRRVKRLERS WAQGSSEQEL

HYASLQRLPV PSSEGPLLRG RDKRGTKEDP RADYACIAEN KPT\*

**B****C****D**

**Abbildung 16. A) Aminosäuresequenz von HIS-LST1.3Δ45'.** Die vom pET-45b (+)-Vektor kodierte AS des His<sub>6</sub>-Etiketts und der Verknüpfungssequenz (Linker) sind schwarz gezeichnet. Die von den LST1-Exonen 3, 4 und 5' kodierte AS sind farbig dargestellt. **B) Erste Säulenreinigung von HIS-LST1.** Proben aus der bakteriellen Expression und verschiedene Fraktionen aus der ersten Säulenreinigung wurden auf einem 15 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, das mittels Coomassie gefärbt wurde. Jeweils 20 µl Bakteriensuspension aus den nicht-induzierten (NI) und induzierten (I) Kulturen wurden direkt aufgetragen. Aus der Säulenreinigung wurden je 20 µl vom Durchfluss (DF), sowie von den Elutionsfraktionen 1 – 6 (E1 – E6) aufgetragen. Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden (M) sind angegeben (B – D). **C) Zweite Säulenreinigung von HIS-LST1.** Fraktionen aus der zweiten Säulenreinigung wurden auf einem 15 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, das mittels Coomassie gefärbt wurde. Von den Fraktionen der Säulenreinigung wurden je 20 µl aufgetragen: Durchfluss = DF, Waschschritt 6 = W6, Elutionsfraktionen 1 – 6 = E1 – E6. Die Positionen des rekombinanten HIS-LST1 als Monomer (mLST1), Dimer (dLST1) und Trimer (triLST1) sind rechts markiert. **D) Western-Analyse vom gereinigten HIS-LST1.** Auf einem 15 %-igen Polyacrylamidgel wurde 1 µg gereinigtes HIS-LST1 aufgetragen. Die Chemilumineszenzdetektion der Western-Membran erfolgte mit dem anti-His<sub>6</sub>-Antikörper (1:1000), einem HRP-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000) und dem ECL Kit. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug 2 min. Die Positionen des rekombinanten HIS-LST1 als Monomer (mLST1), Dimer (dLST1), Trimer (triLST1) und Tetramer (tetLST1) sind links markiert.

Die Elutionsfraktionen 1 – 2 wurden zusammengefasst und dialysiert (gegen PBS + 2 M Harnstoff) um das Imidazol aus der Proteinlösung zu entfernen. Die Proteinkonzentration der dialysierten Lösung wurde mit der Bradford-Methode bestimmt und lag bei 0,427 mg/ml, damit betrug die Proteinausbeute nach den zwei sukzessiven Säulenreinigungen 5,12 mg.

Die Proteinkonzentration war für die Immunisierung noch zu niedrig, deshalb wurden die im Pro Pur IMAC Kit enthaltenen Konzentratoren nach Herstelleranleitung eingesetzt. Dadurch konnte die Proteinkonzentration auf 0,710 mg/ml erhöht werden, was für die Immunisierung ausreichend war. Die konzentrierte Proteinlösung wurde in der Western-Analyse untersucht um sicherzustellen, dass es sich bei dem gereinigten Protein aus der Abb. 16C tatsächlich um das rekombinante HIS-LST1 als Monomer, Dimer und Trimer handelte. Es konnte das rekombinante HIS-LST1 in seiner monomeren, dimeren, trimeren und tetrameren Form (Abb. 16D, errechnete Molekulargewichte: 10,5 / 21,1 / 31,6 / 42,2 kDa) detektiert werden. Letztere zeigte das schwächste Signal und war vermutlich aus diesem Grund beim Testen der Elutionsfraktionen nicht identifiziert worden (Abb. 16B, 16C).

## **6.2.2 Immunisierung und Etablierung von Hybridomzelllinien**

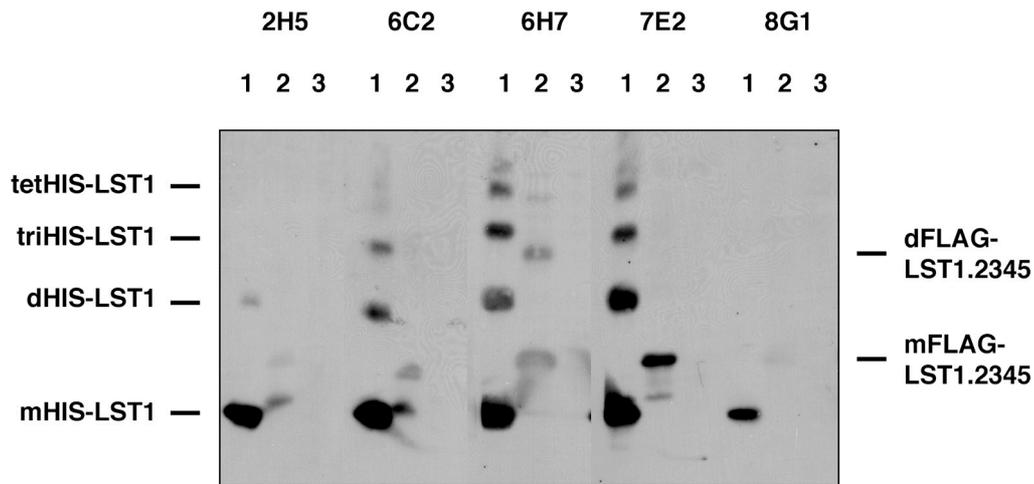
Die Immunisierung der Ratten und die anschließende Etablierung von antikörpersezernierenden Hybridomzelllinien wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Elisabeth Kremmer im Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München durchgeführt. Das gereinigte HIS-LST1-Protein aus 6.2.1 wurde zur Immunisierung von Lou/C-Ratten verwendet. Die Immunisierung und die Etablierung der Hybridomzelllinien wurde, wie unter 5.2.12 beschrieben, durchgeführt. LST1-spezifische Antikörper konnten in den Überständen von 58 der resultierenden Hybridomklone nachgewiesen werden. Diese monoklonalen LST1-Antikörper wurden im nächsten Schritt näher charakterisiert.

## **6.2.3 Charakterisierung der monoklonalen LST1-Antikörper**

### **6.2.3.1 Detektion von denaturiertem LST1 mittels monoklonaler Antikörper**

Die LST1-spezifischen Antikörper wurden zunächst auf ihre Fähigkeit hin untersucht denaturiertes LST1 in der Western-Analyse zu erkennen. Gereinigtes HIS-LST1.3Δ45' (siehe 6.2.1) und Lysate aus transient transfizierten (mit dem FLAG-LST1.2345-Expressionsvektor) und untransfizierten HEK 293T-Zellen wurden untersucht. Die Membranen wurden parallel mit den 58 zu testenden Hybridomüberständen detektiert (exemplarisch gezeigt in Abb. 17, Ergebnisse im Anhang unter 9.4 zusammengefasst).

Das gereinigte HIS-LST1 konnten in der Western-Analyse 43 der getesteten Hybridomüberstände nachweisen, wobei manche Antikörper nur HIS-LST1 in der monomeren und nicht in der dimeren, trimeren und tetrameren Form erkennen konnten (Abb. 17, errechnete Molekulargewichte: 10,5 / 21,1 / 31,6 / 42,2 kDa). Das in HEK 293T-Zellen transient exprimierte FLAG-LST1.2345 konnten 29 der getesteten Hybridomüberstände erkennen. Auch hier wiesen einige Antikörper lediglich das Monomer und nicht das Dimer nach (Abb. 17, errechnete Molekulargewichte: 11,8 / 23,6 kDa). Einige der Hybridomüberstände (10) reagierten mit dem Lysat der HEK 293T-Zellen. Diese Antikörper detektierten eine Vielzahl von Banden (über 15) in den Lysaten der transfizierten und untransfizierten HEK 293T-Zellen, konnten aber das rekombinante FLAG-LST1 nicht detektieren (nicht gezeigt). Die Unfähigkeit dieser Antikörper rekombinantes FLAG-LST1 nachzuweisen spricht eher dagegen, dass es sich bei den detektierten Banden um endogene LST1-Isoformen handelt. Wahrscheinlicher erscheint es, dass diese Banden durch Kreuzreaktivität der verwendeten Hybridomüberstände zustande kommen.



**Abbildung 17: Western-Analyse mit LST1-spezifischen Hybridomüberständen.** Auf 15 %-ige Polyacrylamidgelen wurden 1 µg gereinigtes HIS-LST1 (1) und das Lysat von  $2 \times 10^5$  FLAG-LST1.2345-transient-transfizierten (2) und untransfizierten (3) HEK 293T-Zellen aufgetragen. Die Chemilumineszenzdetektion der Western-Membran erfolgte mit den LST1-spezifischen Hybridomüberständen (1:100, 2H5, 6C2, 6H7, 7E2 und 8G1), einem HRP-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (1:10000) und dem ECL Kit. Die Expositionszeit der Röntgenfilme betrug 10 min. Die Positionen des rekombinanten HIS-LST1 als Monomer (mHIS-LST1), Dimer (dHIS-LST1), Trimer (triHIS-LST1) und Tetramer (tetHIS-LST1) sind links angegeben. Die Positionen des rekombinanten FLAG-LST1 als Monomer (mFLAG-LST1.2345) und Dimer (dFLAG-LST1.2345) sind rechts angegeben.

Aus den 29 Hybridomüberständen, die in der Lage waren sowohl HIS-LST1 als auch FLAG-LST1.2345 zu detektieren, wurden die 4 Überstände ausgewählt, die die stärksten Signale lieferten. Diese Antikörper wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht endogene LST1-Isoformen in der Western-Analyse zu erkennen (nicht gezeigt). Der Hybridomklon 7E2, dessen sezernierte Antikörper (Isotyp IgG2b) endogenes LST1 im Lysat von U-937-Zellen am deutlichsten nachweisen konnten, wurde für den Einsatz in der Western-Analyse ausgewählt und im nächsten Schritt näher charakterisiert.

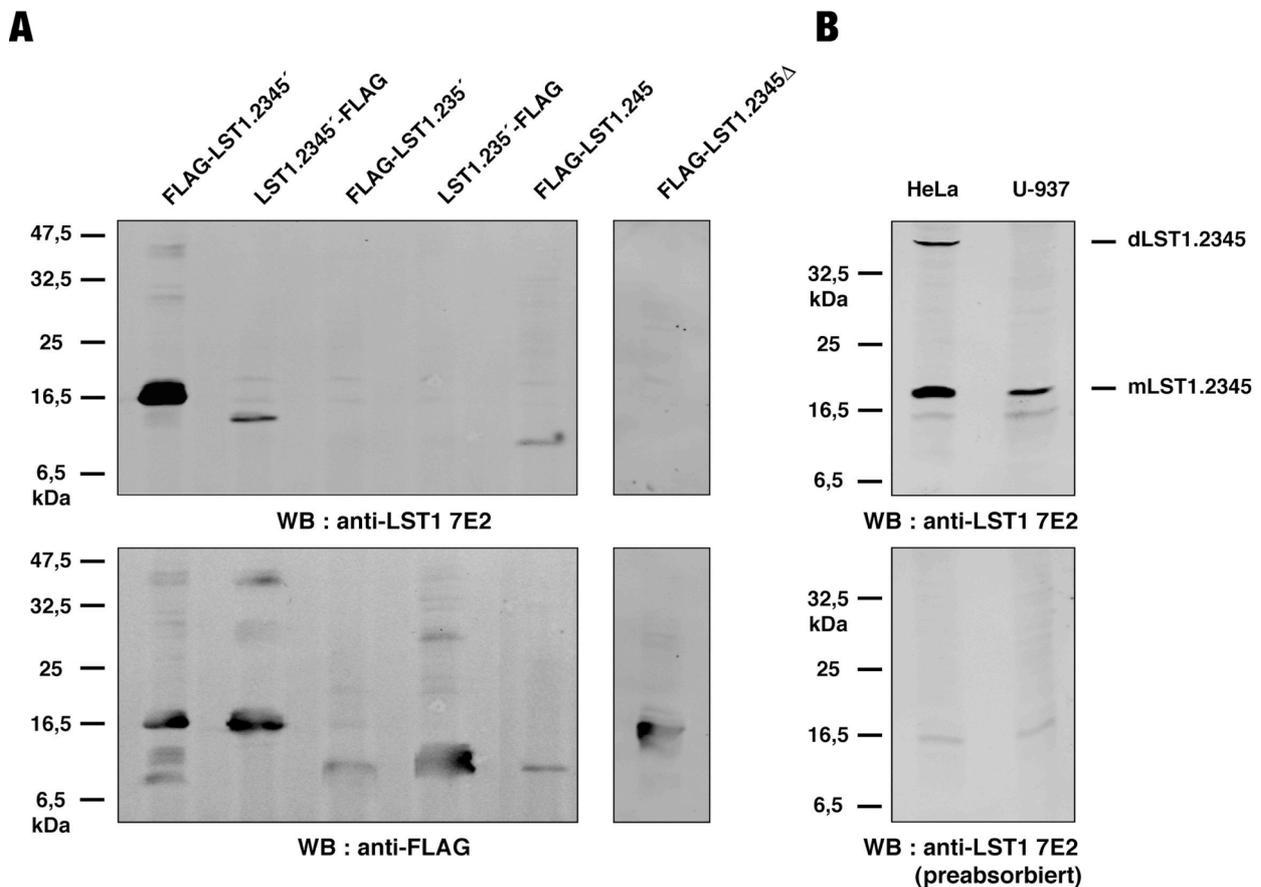
### 6.2.3.2 Charakterisierung des monoklonalen LST1-Antikörpers 7E2

Um festzustellen welche LST1-Isoformen vom 7E2-Antikörper detektiert werden können, wurden HEK 293T-Zellen transient mit Expressionsvektoren für N- und C-terminal FLAG-etikettierte LST1-Isoformen transfiziert. Zelllysate der transienten Transfektanten wurden in Western-Analysen eingesetzt und mit dem 7E2-Antikörper detektiert. Um sicherzustellen, dass in den Lysaten tatsächlich rekombinantes Protein vorhanden war, wurden die Membranen nach der Detektion gestrippt und mit dem FLAG-Antikörper nachdetektiert.

Der 7E2-Antikörper konnte die transmembrane FLAG-LST1.2345'-Isoform und ihre Multimere (errechnete Molekulargewichte: 11,8 / 23,6 / 35,4 kDa) detektieren, aber keines ihrer C-terminal verkürzten Abbauprodukte (Abb. 18A). Die LST1.2345'-FLAG-Isoform wurde nicht erkannt, ein Abbauprodukt dieses Proteins wurde aber wiederum vom 7E2-Antikörper erkannt (Abb. 18A). Die fehlende Erkennung dieser Bande bei der FLAG-Nachdetektion (Abb. 18A, unteres Bild) deutet darauf hin, dass es sich um ein Abbauprodukt handelt, dem das FLAG-Etikett fehlt. Aus diesem Befund wurde gefolgert, dass entweder die Anwesenheit des FLAG-Etiketts am C-Terminus die Bindung des 7E2-Antikörpers behindert, oder, dass der Antikörper zur Bindung einen freien C-Terminus benötigt. Die LST1.235'-Isoform (errechnetes Molekulargewicht: 7,1 kDa) wurde, unabhängig von der Position des FLAG-Etiketts, vom 7E2-Antikörper nicht erkannt

(Abb. 18A). Dies lag innerhalb der Erwartungshaltung da die Sequenz der LST1.235'-Isoform einer Leserasterverschiebung unterliegt, was zur Folge hat, dass sich ihre Sequenzhomologie zum HIS-LST1.3 $\Delta$ 45'-Immunogen auf 11 AS beschränkt. Die lösliche FLAG-LST1.245-Isoform (errechnetes Molekulargewicht: 9,2 kDa) konnte wiederum vom 7E2-Antikörper eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 18A).

Zur Bestimmung des Bindeepitops vom 7E2-Antikörper wurde ein mutiertes LST1-Konstrukt (FLAG-LST1.2345 $\Delta$ ) verwendet, welchem die letzten 13 C-terminalen AS der Volle-Länge transmembranen FLAG-LST1.2345-Isoform fehlten. Der 7E2-Antikörper konnte das mutierte Protein nicht erkennen (Abb. 18A). Daraus konnte geschlossen werden, dass sich das Bindeepitop in der C-terminalen Region vom Volle-Länge LST1 befindet (Abb. 19). Somit ist der 7E2-Antikörper in der Lage sämtliche LST1-Isoformen zu erkennen, die durch Exon 4-enthaltende Transkripte kodiert werden: LST1.2345, LST1.2345', LST1.2345'', LST1.245, LST1.245' und LST1.245''.



**Abbildung 18. A) Western-Analyse von rekombinantem LST1 mit dem 7E2-Antikörper.** Auf 15 %-ige Polyacrylamidgele wurden Lysate von je  $1 \times 10^6$  transient transfizierten HEK 293T-Zellen aufgetragen. Die Fluoreszenzdetektion der Western-Membranen erfolgte mit dem 7E2-Hybridomüberstand (1:100) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (1:10000). Nach der Detektion wurde die Membran gestrippt und mit dem FLAG-M2-Antikörper (1:1000) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000) nachdetektiert. Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind angegeben (A und B). **B) Western-Analyse von endogenem LST1 mit dem 7E2-Antikörper.** Lysate von je  $1 \times 10^6$  U-937-, bzw. HeLa-Zellen wurden wie unter A) beschrieben in die Western-Analyse eingesetzt. Die Fluoreszenzdetektion der Western-Membran erfolgte mit dem 7E2-Hybridomüberstand (1:10) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (1:10000). In einem Parallelansatz wurden Lysate mit einem HIS-LST1-präabsorbierten 7E2-Hybridomüberstand (1:10) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (1:10000) detektiert. Die Positionen von endogenem LST1 in seiner monomeren (mLST1.2345) und dimeren Form (dLST1.2345) sind rechts angegeben.

FLAG-LST1.2345'	MDYKDDDDKL SRNDDICIYG GLGLGGLLLL AVVLLSACLC WLHRRVKRLE RSW-----AQGSS
LST1.2345'-FLAG	ML SRNDDICIYG GLGLGGLLLL AVVLLSACLC WLHRRVKRLE RSW-----AQGSS
FLAG-LST1.2345 $\Delta$	MDYKDDDDKL SRNDDICIYG GLGLGGLLLL AVVLLSACLC WLHRRVKRLE RSWHLLSWSQ AQGSS
FLAG-LST1-245	MDYKDDDDKL SRND-----VKRLE RSWHLLSWSQ AQGSS
LST1.235'-FLAG	ML SRNDDICIYG GLGLGGLLLL AVVLLSACLC WLHRR-----GPGLL
FLAG-LST1.235'	MDYKDDDDKL SRNDDICIYG GLGLGGLLLL AVVLLSACLC WLHRR-----GPGLL
FLAG-LST1.2345'	EQELH YASLQRLPVP SSEGPDLRGR DKRGTKEDPR ADYACIAENK PT*
LST1.2345'-FLAG	EQELH YASLQRLPVP SSEGPDLRGR DKRGTKEDPR ADYACIAENK PTDYKDDDDK*
FLAG-LST1.2345 $\Delta$	EQELH YASLQRLPVP SSEGPDLRGR DKRGTKEDP-----SSVPSLSLNR*
FLAG-LST1-245	EQELH YASLQRLPVP SSEGPDLRGR DKRGTKEDPR ADYACIAENK PT*
LST1.235'-FLAG	RAGTP LCISAEAASA QQDYKDDDDK*
FLAG-LST1.235'	RAGTP LCISAEAASA QQ*

**Abbildung 19: Vergleich der Aminosäuresequenzen rekombinanter LST1-Isoformen.** Die Aminosäuresequenzen, die in der Abb. 18A verwendeten, rekombinanten LST1-Proteine sind angegeben. AS, die nicht durch *LST1* kodiert werden, wie die vom FLAG-Etikett oder Vektor-kodierte AS (bei FLAG-LST1.2345 $\Delta$ ), sind kursiv angegeben. Die von der Exon 4-Sequenz kodierten AS sind unterstrichen. Das vom LST1-7E2-Antikörper erkannte Bindeepitop, ist in der Sequenz der detektierten LST1-Isoformen grau hinterlegt.

Die Fähigkeit des 7E2-Antikörpers endogenes LST1 zu detektieren, wurde durch Western-Analysen mit Lysaten aus U-937- und HeLa-Zellen überprüft. Nur die Volle-Länge transmembrane Isoform LST1.2345 konnte als Monomer und als mögliches Homodimer detektiert werden (Abb. 18B, errechnete Molekulargewichte: 11,7 / 23,4 kDa). Die Spezifität des 7E2-Antikörpers wurde durch die Paralleldetektion von Lysaten mit einem HIS-LST1-präabsorbierten 7E2-Hybridomüberstand überprüft. Dieser konnte kein endogenes LST1 detektieren, lediglich eine schwache Bande bei 16,5 kDa erwies sich als unspezifisch (Abb. 18B).

Sowohl die rekombinanten als auch die endogenen LST1-Transmembranisoformen wanderten in der Polyacrylamidgelelektrophorese langsamer als erwartet, was wahrscheinlich auf das Vorhandensein der Transmembranhelix zurückzuführen ist. Ähnliche Beobachtungen wurden von Raghunathan et al. bei der Detektion von endogenem LST1 im DC-Lysat mit einem polyklonalen LST1-Antikörper gemacht. Die Bildung von Multimeren durch rekombinante und endogene LST1-Transmembranisoformen wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit thematisiert.

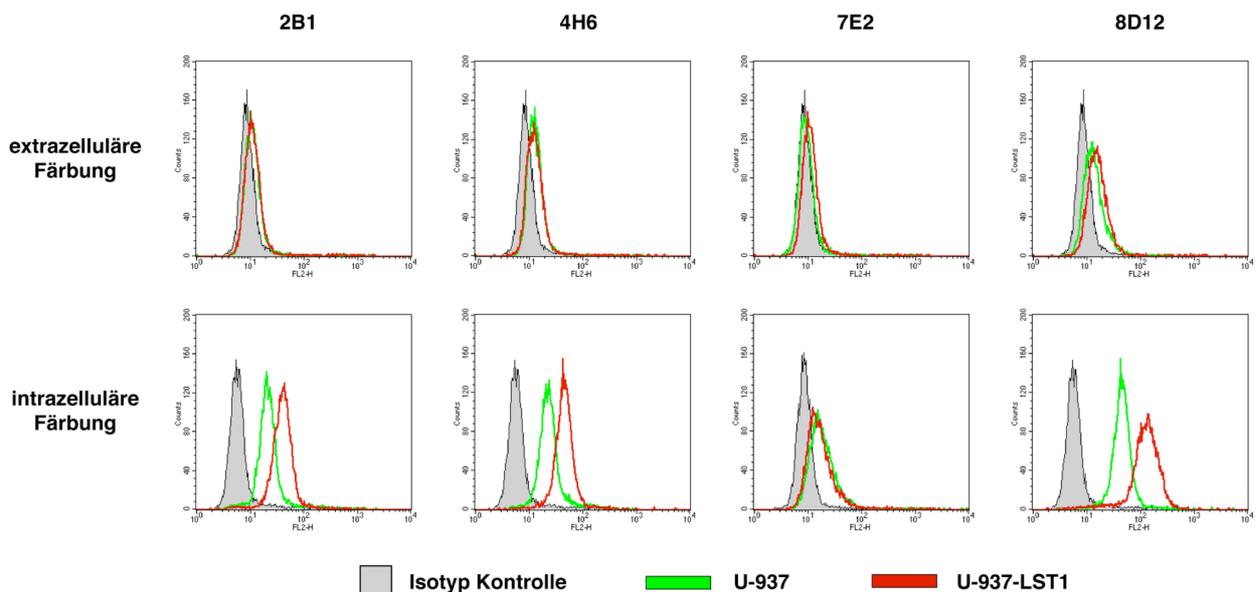
### 6.2.3.3 Detektion von nativem LST1 mittels monoklonaler Antikörper

Nachdem die Fähigkeit der Hybridomüberstände, denaturiertes LST1 in der Western-Analyse zu erkennen überprüft wurde, sollte nun deren Affinität für natives LST1 untersucht werden.

Ziel war es einen Antikörper zu erhalten, der sowohl rekombinantes als auch endogenes LST1 in der nativen Konformation binden kann. Als Testmethode wurde die Durchflusszytometrie gewählt. Endogenes LST1 sollte in der U-937-Zelllinie mittels extrazellulärer, bzw. intrazellulärer Färbung detektiert werden. Als Negativkontrolle wurden für die FACS-Analyse U-937-Zellen mit einem irrelevanten Ratten-Hybridomüberstand (anti-RMC 16D2) vom Isotyp IgG2a gefärbt. Als positive Kontrolle wurde eine U-937-Transfektante etabliert, die stabil LST1.2345'-FLAG exprimiert. Dazu wurden U-937-Zellen mittels Elektroporation transfiziert und selektiert. Die resultierenden Klone wurden auf die Expression von rekombinantem LST1-FLAG mittels Western-Analyse, unter Verwendung des FLAG-Antikörpers, untersucht. Der Klon U-937 D2 zeigte die stärkste LST1-FLAG-Expression (nicht gezeigt) und wurde für die weiteren Versuche verwendet. Eine stabile U-937-Transfektante, die das N-terminal etikettierte

FLAG-LST1.2345' exprimiert, konnte trotz wiederholter Versuche, nicht etabliert werden. Die oben beschriebene Testmethode wurde zunächst eingesetzt um zu überprüfen ob der etablierte 7E2-Antikörper auch natives LST1 erkennen kann. Es konnte keine extrazelluläre und nur eine sehr schwache intrazelluläre Färbung mit dem 7E2-Antikörper festgestellt werden (Abb. 20). Weiterhin konnte keine höhere LST1-Expression bei der U-937 LST1 D2-Transfektante beobachtet werden, dies lag aber innerhalb der Erwartungshaltung, da der 7E2-Antikörper die intakte LST1.2345'-FLAG-Isoform in der Western-Analyse nicht nachweisen konnte (Abb. 18A). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass der 7E2-Antikörper das native, endogene LST1 nur schwach erkennen kann. Zur Detektion von nativem LST1 musste also ein anderer Hybridomklon verwendet werden. Es wurden 9 Hybridomüberstände ausgesucht, die in der Western-Analyse das rekombinante FLAG-LST1 deutlich gebunden hatten (siehe 6.2.3.1). Um auszuschließen, dass ein Großteil der LST1 Antikörper, die denaturiertes LST1 erkennen können, nicht in der Lage sind natives LST1 zu detektieren, wurden auch drei Hybridomüberstände ausgesucht, die negativ in der Western-Analyse getestet wurden. Sämtliche untersuchte Antikörper konnten LST1 in der extrazellulären Färbung nicht erkennen, während die meisten in der intrazellulären Färbung deutliche Signale lieferten (exemplarisch gezeigt in Abb. 20, Ergebnisse im Anhang unter 9.4 zusammengefasst).

Die Bedeutung dieses Befundes für die Membrantopologie von LST1 wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit thematisiert. Die meisten der untersuchten Hybridomüberstände detektierten, wie erwartet, eine höhere LST1-Expression in der U-937-LST1-D2-Transfektante im Vergleich zu der U-937-Zelllinie (Abb. 20). Der 8D12-Antikörper zeigte in der intrazellulären Färbung die stärkste Signalintensität und der LST1-Expressionsunterschied zwischen der U-937-Zelllinie und der Transfektante, wurde von diesem Hybridomüberstand am deutlichsten nachgewiesen. Daher wurde der 8D12-Antikörper (Isotyp IgG2a) für die Detektion von nativem LST1 ausgewählt und im nächsten Abschnitt näher charakterisiert.

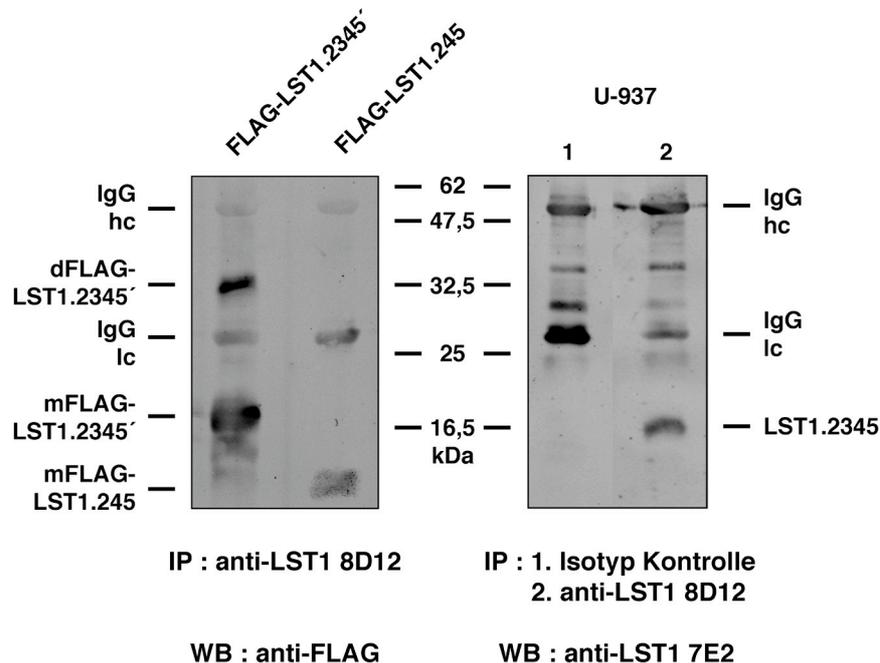


**Abbildung 20: Durchflusszytometrische Untersuchung mit LST1-spezifischen Hybridomüberständen.** Die LST1-Expression in der U-937-Zelllinie (grüne Linie) und in der stabilen U-937-LST1.2345'-FLAG-Transfektante (rote Linie) wurde mittels extrazellulärer, bzw. intrazellulärer Färbung, unter Verwendung von LST1-spezifischen Hybridomüberständen (unverdünnt, 2B1, 4H6, 7E2 und 8D12), in der Durchflusszytometrie untersucht. Zur Kontrolle wurden U-937-Zellen in einem Parallelansatz mit dem RMC 16D2-Hybridomüberstand (unverdünnt, graue Kurve) gefärbt. Die Detektion der gebundenen Primäntikörper erfolgte mit einem RPE-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (1:50).

### 6.2.3.4 Charakterisierung des monoklonalen LST1-Antikörpers 8D12

Um zu untersuchen, welche LST1-Isoformen vom 8D12-Antikörper erkannt werden können, wurde dieser zur Immunpräzipitation (IP) von rekombinantem FLAG-LST1 eingesetzt. In die IP wurden Lysate von transient transfizierten HEK 293T-Zellen eingesetzt. Die Präzipitate wurden anschließend in der Western-Analyse mit dem FLAG-Antikörper detektiert. Der 8D12-Hybridomüberstand konnte das transmembrane FLAG-LST1.2345' als Monomer und Dimer präzipitieren (Abb. 21, errechnete Molekulargewichte: 11,8 / 23,6 kDa). Die lösliche FLAG-LST1.245-Isoform konnte ebenfalls vom 8D12-Antikörper präzipitiert werden (Abb. 21, errechnetes Molekulargewicht: 9,2 kDa). Aus dem Ergebnis der IP lässt sich folgern, dass der 8D12-Antikörper mindestens 4 LST1-Isoformen in der nativen Konformation binden kann: LST1.2345, LST1.2345', LST1.245 und LST1.245'.

Die Fähigkeit des 8D12-Hybridomüberstandes auch endogenes LST1 zu präzipitieren, wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurden Lysate von U-937-Zellen parallel mit dem 8D12-Hybridomüberstand und mit einem Kontrollüberstand selben Isotyps (anti-RMC 16D2) präzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels Western-Analyse, unter Verwendung des LST1-7E2-Antikörpers detektiert. Der 8D12-Antikörper konnte nur das Volle-Länge transmembrane LST1.2345 aus dem U-937-Lysat präzipitieren (Abb. 21, errechnetes Molekulargewicht: 11,7 kDa). Dies deckt sich weitgehend mit dem Ergebnis der Western-Analyse, diese konnte in U-937-Zellen lediglich eine endogene LST1-Isoform nachweisen (siehe 6.2.3.2).

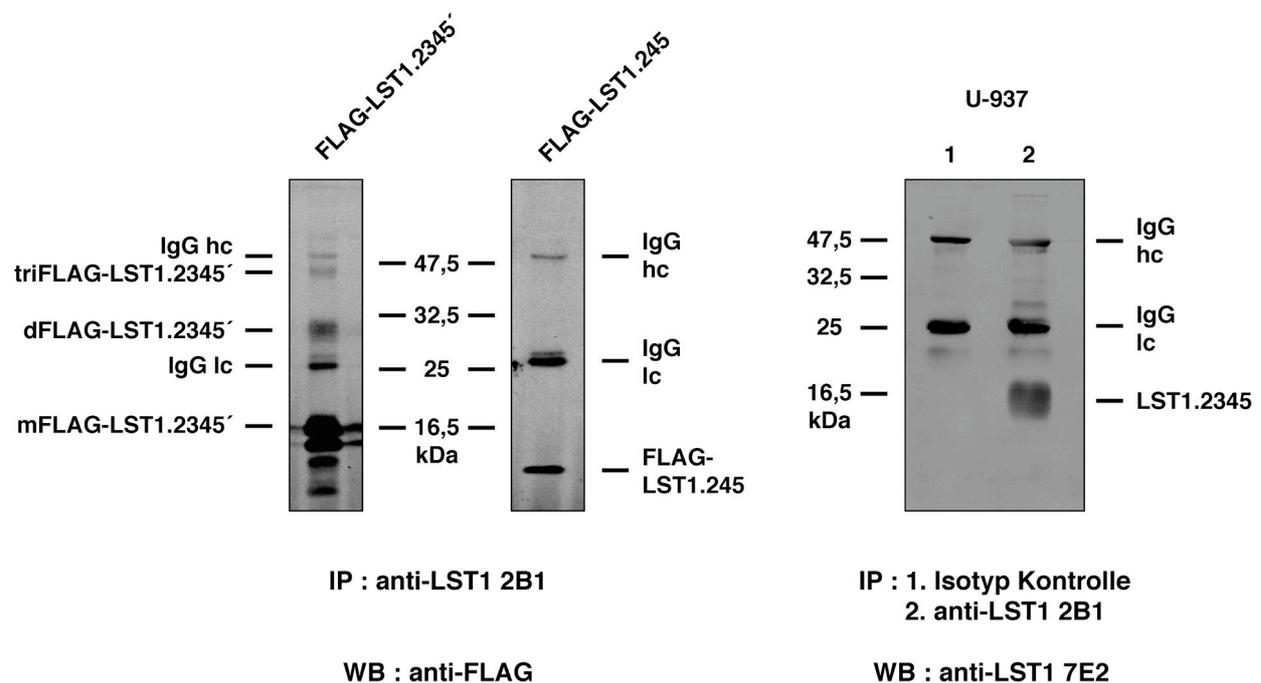


**Abbildung 21: Immunpräzipitation von LST1 mit dem 8D12-Antikörper.** HEK 293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für FLAG-LST1 transient transfiziert. Das Lysat von je  $1 \times 10^7$  HEK 293T-Transfektanten, bzw.  $3 \times 10^7$  U-937-Zellen wurde in IP mit dem 8D12-Antikörper, bzw. einem Isotyp-Kontrollüberstand (anti-RMC 16D2) eingesetzt. Die Präzipitate wurden auf 15 %-ige Polyacrylamidgele aufgetrennt. Die Detektion der Western-Membranen erfolgte mit dem FLAG-M2-Antikörper (1:1000, linkes Bild), bzw. mit dem LST1-7E2-Hybridomüberstand (1:10, rechtes Bild). Als zweite Antikörper wurden IRDye800CW-fluoreszenzgekoppelte anti-Maus-, bzw. anti-Ratte-Antikörper (1:10000) verwendet. Die Positionen der schweren (hc) und leichten (lc) Ketten des Ratte IgG sind angegeben. Zusätzlich sind die rekombinanten und endogenen LST1-Isoformen gekennzeichnet. Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind zwischen den beiden Bildern markiert.

Die subzelluläre Lokalisation von endogenem LST1 wurde von Ina Rohwedder in verschiedenen Zelllinien mittels Immunzytochemie untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der in der Durchflusszytometrie und IP erfolgreich eingesetzte 8D12-Antikörper, endogenes LST1 nur schwach in der Immunzytochemie detektieren konnte (Rohwedder 2008). Daraufhin wurde nach einem Hybridomklon gesucht, dessen sezernierte Antikörper erfolgreich in der Immunzytochemie eingesetzt werden konnten. Bei der Färbung von HeLa-Zellen mit 22 verschiedenen Hybridomüberständen konnte der 2B1-Antikörper endogenes LST1 am deutlichsten nachweisen (Rohwedder 2008). Da im Verlauf dieser Arbeit endogenes LST1 auch mittels Immunzytochemie untersucht werden sollte, wurde der 2B1-Antikörper näher charakterisiert.

### 6.2.3.5 Charakterisierung des monoklonalen LST1-Antikörpers 2B1

Um das Bindespektrum des 2B1-Antikörpers (Isotyp IgG2a) zu charakterisieren, wurde dieser zur IP von rekombinantem FLAG-LST1 eingesetzt. Die IP und die Analyse der Präzipitate wurden, wie unter 6.2.3.4 beschrieben, durchgeführt. Der 2B1- Hybridomüberstand konnte das transmembrane FLAG-LST1.2345' als Monomer, Dimer und Trimer präzipitieren (Abb. 22, errechnete Molekulargewichte: 11,8 / 23,6 / 35,4 kDa). Die lösliche FLAG-LST1.245-Isoform konnte ebenfalls vom 2B1-Antikörper präzipitiert werden (errechnetes Molekulargewicht: 9,2 kDa). Somit ist das Bindespektrum des 2B1-Antikörpers identisch mit dem des 8D12-Antikörpers: Beide können mindestens 4 LST1-Isoformen in der nativen Konformation binden (LST1.2345, LST1.2345', LST1.245 und LST1.245').



**Abbildung 22: Immunpräzipitation von LST1 mit dem 2B1-Antikörper.** HEK 293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für FLAG-LST1 transient transfiziert. Das Lysat von je  $1 \times 10^7$  HEK 293T-Transfektanten, bzw.  $3 \times 10^7$  U-937-Zellen wurde in IP mit dem 2B1-Antikörper, bzw. einen Isotyp-Kontrollüberstand (anti-RMC 16D2) eingesetzt. Die Präzipitate wurden auf 15 %-ige Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Detektion der Western-Blotmembranen erfolgte mit dem FLAG-M2-Antikörper (1:1000, Bilder links, verändert nach Rohwedder 2008), bzw. mit dem LST1-7E2-Hybridomüberstand (1:10, Bild rechts). Als zweite Antikörper wurden IRDye800CW-fluoreszenzgekoppelte anti-Maus-, bzw. anti-Ratte-Antikörper (1:10000) verwendet. Die Positionen der schweren (hc) und leichten (lc) Kette des Ratte IgG sind angegeben. Zusätzlich sind die rekombinanten und endogenen LST1-Isoformen gekennzeichnet. Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind markiert.

Der 2B1-Antikörper wurde auch zur Präzipitation von endogenem LST1 eingesetzt. Die IP und die Analyse der Präzipitate wurden, wie unter 6.2.3.4 beschrieben, durchgeführt. Der Hybridomüberstand 2B1 konnte, wie der 8D12-Antikörper, nur das Volle-Länge transmembrane LST1.2345 (Abb. 22, errechnetes Molekulargewicht: 11,7 kDa) aus dem U-937-Lysat präzipitieren.

Die Menge an präzipitiertem LST1.2345-Protein war höher, als bei der IP mit dem 8D12-Antikörper. Dies deutet darauf hin, dass der 2B1-Antikörper eine höhere Affinität für das endogene Protein aufweist. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass das stärkere Signal durch zwei eng beieinander liegende Proteinbanden zustande kommt. Der 2B1-Antikörper wurde in dieser Arbeit zum Nachweis von endogenem LST1 in der IP und Immunzytochemie eingesetzt.

## 6.3 Proteincharakterisierung von LST1

### 6.3.1 LST1 kodiert evolutionär konservierte Proteine

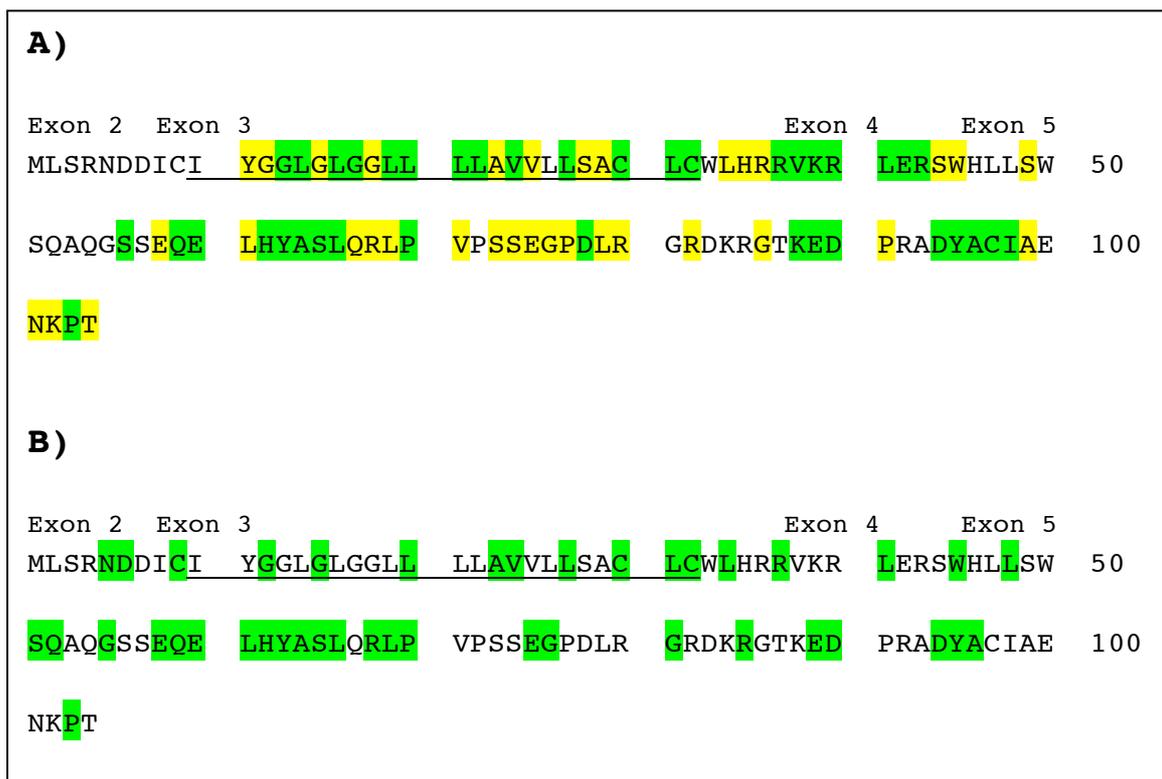
Die funktionellen Domänen eines Proteins sind meistens evolutionär konserviert. Der Vergleich der Aminosäuresequenz eines Proteins, mit der Sequenz seiner homologen Proteine in anderen Arten kann wertvolle Hinweise darauf liefern, welche Bereiche des Proteins für seine Funktion wichtig sind.

Zusätzlich zu den bereits bekannten homologen Proteinen in der Maus (*Mus musculus*, NCBI Eintrag NP\_034864) und Ratte (*Rattus norvegicus*, NP\_072156) wurden LST1-Homologe in den Proteomen einer Vielzahl von Säugetieren gefunden. Es konnten beim Schimpansen (*Pan troglodytes*, XP\_061154035), Rhesusaffen (*Macaca mulatta*, XP\_001105095), Rind (*Bos taurus*, XP\_873759), Hund (*Canis familiaris*, XP\_848911), Schwein (*Sus scrofa*, CAN59685) und Schnabeltier (*Ornithorhynchus anatinus*, ABU86911) LST1-Homologe identifiziert werden. Die meisten dieser Proteine waren Homologe der transmembranen LST1.2345-Isoform (Schimpanse: 99 % Sequenzübereinstimmung, Rhesusaffe: 82 %, Rind: 60 %, Hund: 60 %, Ratte: 51 %, Maus: 50 % und Schnabeltier 41 %). Die Ausnahme bildete das LST1-Homolog beim Schwein, dieses ähnelte eher der löslichen LST1.245-Isoform (48 % Sequenzübereinstimmung).

LST1-Homologe wurden ausschließlich in den Proteomen von Säugetieren gefunden, in anderen Vertebraten-Klassen konnten keine verwandten Proteine ermittelt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass das *LST1*-Gen spezifisch für die Klasse der Säugetiere ist. Das Schnabeltier gehört der Ordnung der Monotremata an, deren Abstammungslinie trennte sich schon vor etwa 210 Millionen Jahren von den restlichen Säugetieren (Belov et al. 2006). Somit stellt das Schnabeltier einen der „primitivsten“ heute noch lebenden Säuger dar. Das Vorhandensein eines *LST1*-Orthologs beim Schnabeltier rückt die Entstehung des *LST1*-Gens in die Zeit, in der der älteste gemeinsame Säugervorfahre vermutet wird (vor 240 – 310 Millionen Jahren, Potrzebowski et al. 2008).

Durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem LST1.2345 und seinen ermittelten Homologen, wurden die evolutionär konservierten Bereiche des LST1-Proteins bestimmt (Abb. 23A). Bei eng verwandten Arten weist eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen jedoch nicht zwangsläufig auf evolutionär konservierte Domänen hin. Ähnlichkeiten in der Sequenz können auch auf geringe Divergenz statt auf evolutiven Druck zurückzuführen sein. Die LST1.2345-Isoform wurde in einem separaten Vergleich dem Schnabeltier-Homolog gegenübergestellt (Abb. 23B), da von den ermittelten Homologen, dieser die größte Sequenzabweichung und evolutionäre Entfernung zum menschlichen Protein aufweist. Die Sequenzvergleiche zeigten mehrere konservierte AS im Bereich der Transmembrandomäne von LST1.2345 (Abb. 23, AS 10 – 32). Es sind zwar nicht sämtliche AS in diesem Bereich konserviert, aber alle Homologe weisen fast ausschließlich hydrophobe AS in dieser Region auf. Somit kann gefolgert werden, dass die Transmembranhelix von LST1 evolutionär konserviert ist. Am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne befinden sich zwei konservierte Cysteine (Abb. 23, AS 29 – 32), diese könnten für die Bildung von LST1-Multimeren (wie in Abb. 17, 18, 21 und 22 gezeigt) über Disulfidbrücken verantwortlich sein.

Diese Möglichkeit wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher untersucht. Weiterhin konnten im LST1-Protein zwei Tyrosin-haltige Motive (Abb. 23, AS 61 – 66 und 94 – 98) als konserviert eingestuft werden. Das erste dieser Motive erfüllt die Konsensussequenz für ein ITIM (Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Inhibitorisches Motiv, [I/V/L] X Y X X [I/V/L]) und ist identisch mit den ITIM-Sequenzen von SIGLEC 3, 5 und 11 (Sialylsäure-bindende, Ig-ähnliche Lektine, NCBI Einträge P20138, O15389 und Q96RL6). Dieser Befund deutet darauf hin, dass LST1 in Signalweiterleitungsprozessen des Immunsystems eine Rolle spielen könnte und wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher thematisiert. Die vollständigen Vergleiche der AS-Sequenzen sind im Anhang unter 9.5 zu finden.

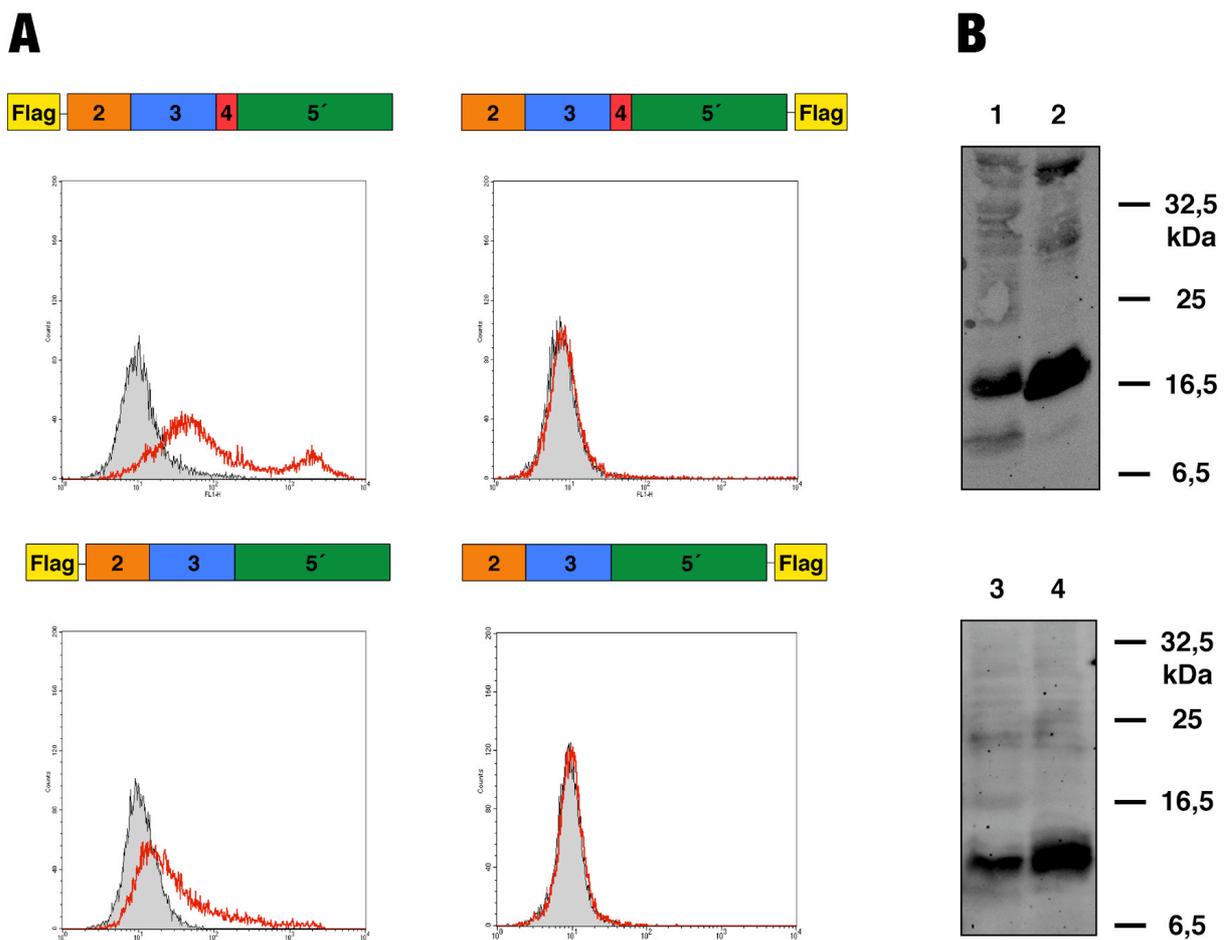


**Abbildung 23. A) Vergleich der Aminosäuresequenzen von LST1.2345 und seinen homologen Proteinen.** Die Aminosäuresequenzen von menschlichem LST1.2345 und seinen homologen Proteinen aus dem Schimpansen, Rhesusaffen, Rind, Hund, Ratte und Maus wurden, unter Verwendung des MacVector-Programms (Version 7.2.3, Accelrys, San Diego, USA), verglichen. Dargestellt ist die Sequenz von menschlichem LST1.2345, die durch die Exone 2 – 5 kodierten Abschnitte sind gekennzeichnet. Die AS der Transmembranhelix (vohergesagt mit dem Programm TMHMM, Krogh et al. 2001) sind unterstrichen. Evolutionär konservierte AS, die in sämtlichen Homologen vorkommen, sind grün unterlegt. Evolutionär konservierte AS, die in mindestens 4 der 7 verglichenen Sequenzen vorkommen sind gelb unterlegt. **B) Vergleich der Aminosäuresequenzen von LST1.2345 und seinem Homolog aus dem Schnabeltier.** Die Aminosäuresequenzen von menschlichem LST1.2345 und seinem homologen Protein aus dem Schnabeltier, wurden, wie unter A) beschrieben, verglichen. Evolutionär konservierte AS, die in beiden verglichenen Sequenzen vorkommen, sind grün unterlegt.

Die hier identifizierten, evolutionär konservierten Bereiche des transmembranen LST1-Proteins wurden im Folgenden näher untersucht besonders im Hinblick auf ihre potentielle Funktion und die sich daraus ergebenden Konsequenzen für das LST1-Protein.

### 6.3.2 LST1 kodiert Typ-I-Transmembranproteine

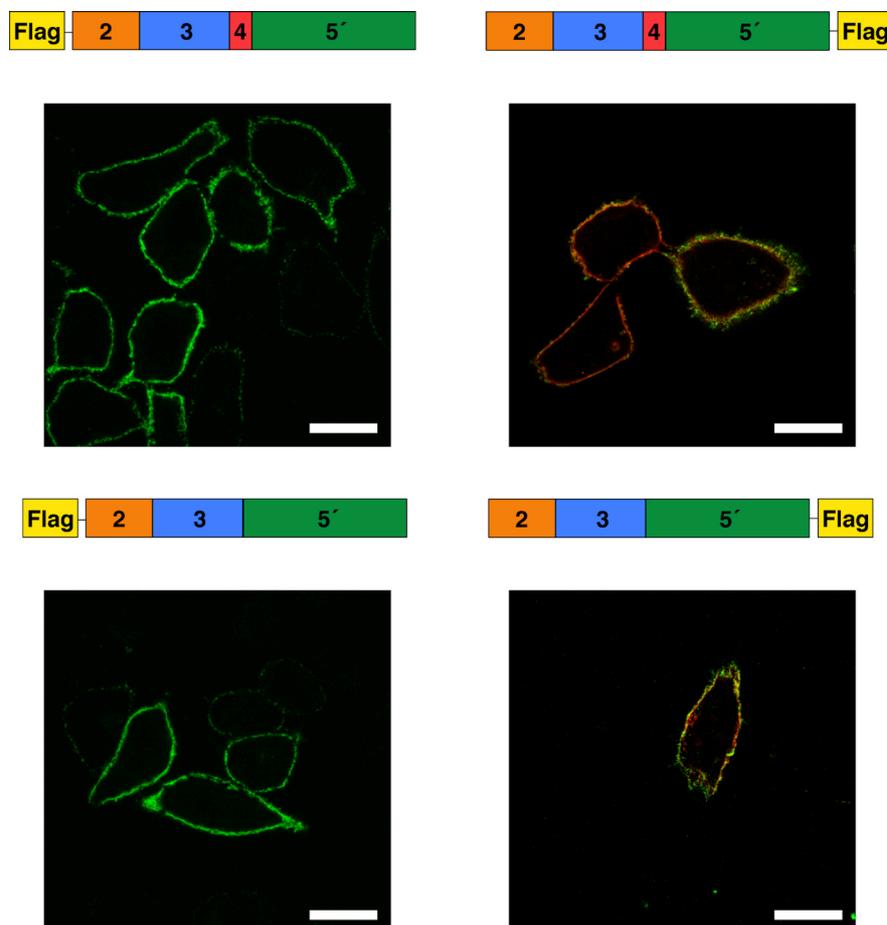
Das *LST1*-Gen kodiert 6 transmembrane Isoformen, die jedoch kein Signalpeptid aufweisen. Aus diesem Grund musste die Membranorientierung experimentell bestimmt werden. Transmembrane *LST1*-Isoformen (*LST1.2345'* und *LST1.235'*) wurden, als N- oder C-terminal FLAG-etikettierte Proteine, in HEK 293T-Zellen transient exprimiert. Die Zelloberflächenexpression von rekombinantem *LST1* wurde mittels extrazellulärer Färbung, unter Verwendung des FLAG-Antikörpers, in der Durchflusszytometrie untersucht. Transfektanten, die die N-terminal etikettierte Proteine (FLAG-*LST1.2345'* und FLAG-*LST1.235'*) exprimierten, zeigten eine deutliche Zelloberflächenfärbung (Abb. 24A). Bei HEK 293T-Zellen, die mit Konstrukten für C-terminal etikettierte Isoformen (*LST1.2345'*-FLAG und *LST1.235'*-FLAG) transfiziert wurden, konnte dagegen keine Zelloberflächenfärbung nachgewiesen werden (Abb. 24A).



**Abbildung 24: Untersuchung der Membrantopologie von LST1, Teil 1. A)** FACS-Analyse nach extrazellulärer Färbung von transient transfizierten HEK 293T-Zellen, die N-, bzw. C-terminal FLAG-etikettierte *LST1*-Transmembranisoformen exprimieren. Die rekombinanten Proteine sind jeweils oberhalb der Histogramme schematisch dargestellt. Für die Färbung wurden der FLAG-M2-Antikörper (1:200) und ein Cy2-gekoppelter anti-Maus-Antikörper (1:50, rote Linie) verwendet. Als Kontrolle wurden Transfektanten in Parallelansätzen mit einem IgG1-Kontrollantikörper (1:100) und dem Cy2-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:50, graue Kurve) gefärbt. **B)** Western-Analyse der unter A) analysierten Transfektanten. Die Lysate von je  $1 \times 10^6$  HEK 293T-Transfektanten wurden auf 15 %-ige Polyacrylamidgele aufgetrennt. Die Detektion der Western-Membranen erfolgte mit dem FLAG-M2-Antikörper (1:1000) und einem IRDye800CW-fluoreszenzgekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000). Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind rechts angegeben. Die berechneten und beobachteten Molekulargewichte der rekombinanten *LST1*-Proteine sind in der Tab. 3 auf S. 79 aufgelistet. 1 = FLAG-*LST1.2345'*, 2 = *LST1.2345'*-FLAG, 3 = FLAG-*LST1.235'*, 4 = *LST1.235'*-FLAG.

Diese Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche. Um sicherzustellen, dass alle Transfektanten vergleichbare Mengen an rekombinantem LST1 exprimiert haben, wurden Lysate aus diesen Zellen mittels Western-Analyse untersucht (Abb. 24B).

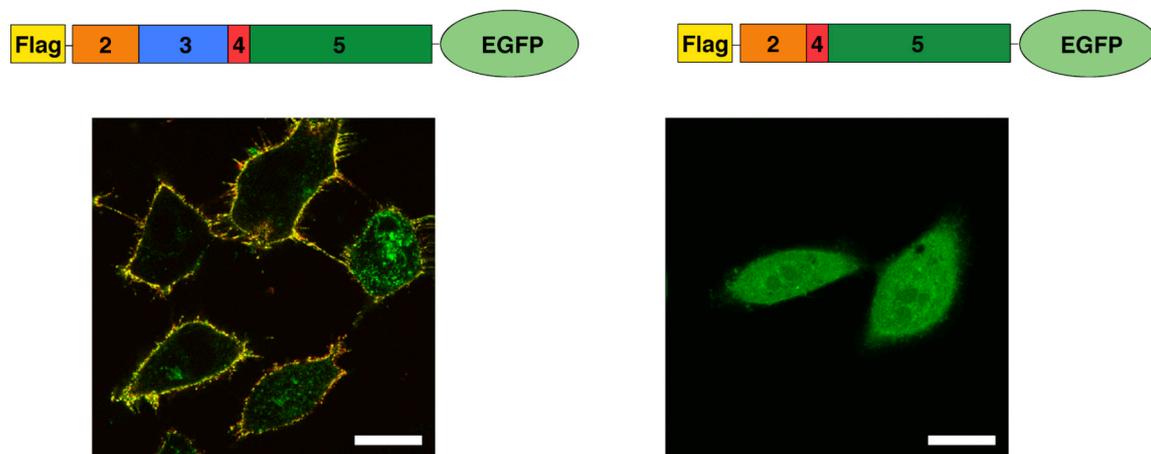
Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden durch immunzytochemische Färbungen bestätigt. HeLa-Zellen wurden mit den zuvor verwendeten, transmembranen LST1-Konstrukten transient transfiziert, fixiert und mit dem FLAG-Antikörper gefärbt. Die N-terminal FLAG-etikettierten LST1-Isoformen wurden mittels extrazellulärer Färbung detektiert, während die C-terminal etikettierten Isoformen nur auf der zytoplasmatischen Membranseite von permeabilisierten Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 25). Bei der intrazellulären Färbung kolokalisierten die LST1-FLAG-Isoformen mit dem Aktin-Zytoskelett an der zytoplasmatischen Seite der Membran (Abb. 25, Phalloidininfärbung).



**Abbildung 25: Untersuchung der Membrantopologie von LST1, Teil 2.** Immunzytochemische Färbung von transient transfizierten HeLa-Zellen, die N-, bzw. C-terminal FLAG-etikettierte LST1-Transmembranisoformen exprimieren. Die rekombinanten Proteine sind jeweils oberhalb der Bilder schematisch dargestellt. Die gefärbten Transfektanten wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Gezeigt sind einzelne z-Schnitte, Maßstab: 20 µm. Für die Färbung wurde der FLAG-M2-Antikörper (1:200) und ein Cy2-gekoppelter anti-Maus-Antikörper (1:50, grün) verwendet. Die FLAG-LST1-Transfektanten wurden extrazellulär gefärbt (linke Bilder). Bei den Transfektanten, die C-terminal FLAG-etikettiertes LST1 exprimierten, konnte in der extrazellulären Färbung das FLAG-Epitop nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Transfektanten in einem Parallelansatz intrazellulär mit dem FLAG-Antikörper, wie oben beschrieben, gefärbt. Zusätzlich wurden diese Zellen mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin (1:1000, rot) inkubiert um das Aktin-Zytoskelett sichtbar zu machen und die erfolgreiche Permeabilisierung der Zellmembran zu zeigen (rechte Bilder, Überlagerungen der intrazellulären FLAG- und Aktin-Färbung).

Die Membrantopologie von LST1 wurde in einem weiteren Versuch untersucht. N-terminal etikettierte FLAG-LST1-EGFP-Fusionsproteine wurden transient in HeLa-Zellen exprimiert und mittels Immunzytochemie mit dem FLAG-Antikörper gefärbt. Nur das transmembrane FLAG-LST1.2345-EGFP-Fusionsprotein konnte in der extrazellulären Färbung an der Membran nachgewiesen werden (Abb. 26). Das FLAG-LST1.245-EGFP-Fusionsprotein diente als Kontrolle und konnte nicht mit dem FLAG-Antikörper angefärbt werden. Das lösliche Fusionsprotein war im Zytoplasma und Zellkern der transfizierten Zellen lokalisiert (Abb. 26).

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und Immunzytochemie zeigen eindeutig, dass *LST1* Typ-I-Transmembranproteine kodiert. Die festgestellte Membranorientierung konnte für endogenes LST1 bestätigt werden. Beim Testen der LST1-Antikörper wurden U-937-Zellen nach extra-, bzw. intrazellulärer Färbung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Endogenes LST1 konnte nur mit der intrazellulären Färbung detektiert werden (siehe Abb. 20), was klar auf eine Typ-I-Membrantopologie hinweist.



**Abbildung 26: Untersuchung der Membrantopologie von LST1, Teil 3.** Immunzytochemische Färbung von FLAG-LST1-EGFP-HeLa-Transfektanten. Die exprimierten Proteine sind jeweils oberhalb der Bilder schematisch dargestellt. Die gefärbten Transfektanten wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Gezeigt sind Überlagerungen von einzelnen z-Schnitten, Maßstab: 20 µm. Die FLAG-LST1-EGFP-Transfektanten (grün) wurden extrazellulär mit dem FLAG-M2-Antikörper (1:200) und einem Cy5-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:50, rot) gefärbt.

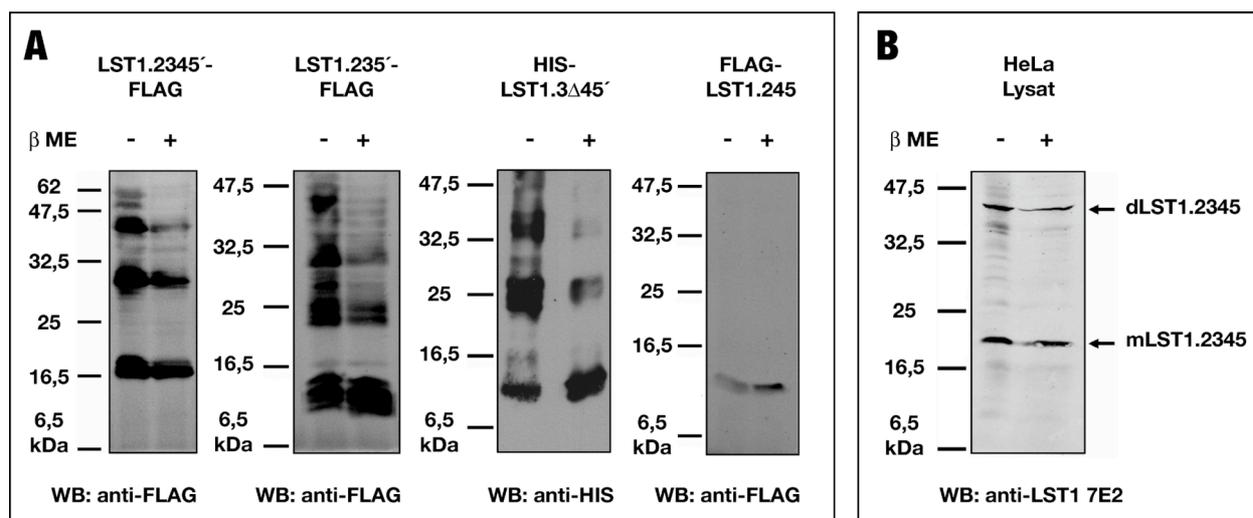
Unter Berücksichtigung der potentiellen ITIM-Sequenz im C-terminalen Bereich und der am C-terminalen Ende der Transmembranhelix angrenzenden, positiv geladenen AS (siehe Abb. 23), erscheint die Typ-I-Membranorientierung von LST1 logisch. Da jedoch frühere Untersuchungen eine Typ-II-Membrantopologie impliziert hatten (Rollinger-Holzinger et al. 2000), musste dies dennoch experimentell untersucht werden.

Bei transmembranen Proteinen ohne Signalpeptid wird die Membranorientierung oft durch positiv geladene AS am cytoplasmatischen Ende der Transmembranhelix bestimmt (nach der „positive-inside“-Regel, von Heijne 1992). Die festgestellte Typ-I-Membranorientierung wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass bei LST1, die am C-terminalen Ende der Transmembranhelix angrenzenden, positiv geladenen AS größtenteils konserviert sind (siehe Abb. 23 und Proteinvergleich im Anhang unter 9.5). Mangels eines Signalpeptides könnten diese positiv geladenen AS dazu dienen die „richtige“ LST1-Membrantopologie zu gewährleisten.

### 6.3.3 LST1-Transmembranisoformen bilden Multimere mittels Disulfidbrücken

In den bisherigen Western-Analysen wurden transmembrane LST1-Isoformen, u.a. auch als Multimere detektiert (siehe Abb. 16, 17, 18, 21 und 22). Die Bestimmung der evolutionär konservierten Bereiche des LST1-Proteins (siehe 6.3.1) warf die Frage auf, ob die Bildung dieser Multimere durch Disulfidbrückenbindungen vermittelt wird. Diese Fragestellung wurde durch Reduktion der vermeintlichen Disulfidbrücken mittels  $\beta$ -Mercaptoethanol und anschließender Western-Analyse untersucht.

Lysate von transient transfizierten HEK 293T-Zellen, die rekombinantes LST1.2345'-FLAG, LST1.235'-FLAG oder FLAG-LST1.245 exprimierten, wurden zusammen mit gereinigtem HIS-LST1.3 $\Delta$ 45' unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen aufgekocht und mittels Western-Analyse untersucht. Für die Detektion wurden der FLAG-, bzw. der His<sub>6</sub>-Antikörper verwendet. Die rekombinanten LST1-Polypeptide wurden, mit Ausnahme der löslichen FLAG-LST1.245-Isoform, unter nicht-reduzierenden Bedingungen stärker in der multimeren Form detektiert als unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 27A). Diese Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 4 unabhängige Versuche, die berechneten und beobachteten Molekulargewichte der rekombinanten LST1-Proteine sind in der Tab. 3 auf S. 79 aufgelistet.



**Abbildung 27: Multimerbildung durch transmembrane LST1-Isoformen.** **A)** Rekombinante LST1-Isoformen wurden transient in HEK 293T-Zellen exprimiert. Das Lysat von je  $1 \times 10^6$  HEK 293T-Transfektanten, bzw.  $1 \mu\text{g}$  gereinigtes HIS-LST1 (siehe 6.2.1) wurden mit Proteinauftragungspuffer (mit / ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol [ $\beta$ ME]) versetzt, aufgekocht und auf 15 %-ige Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Detektion der Western-Membranen erfolgte mit dem FLAG-M2-Antikörper, bzw. dem His<sub>6</sub>-Antikörper (beide 1:1000). Als zweiter Antikörper wurde ein IRDye800CW-fluoreszenzgekoppelter anti-Maus-Antikörper (1:10000) verwendet. Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind markiert (A und B). **B)** Das Lysat von je  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen wurde, wie unter A) beschrieben, in die Western-Analyse eingesetzt. Zur Detektion wurde der LST1-7E2-Antikörper und ein IRDye800CW-fluoreszenzgekoppelter anti-Ratte-Antikörper (1:10000) verwendet. Die Positionen von endogenem LST1 in seiner monomeren (mLST1.2345) und dimeren Form (dLST1.2345) sind rechts angegeben.

Die Bildung von Multimeren wurde auch beim endogenen LST1-Protein überprüft. Lysate von HeLa-Zellen wurden unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen mittels Western-Analyse untersucht. Für die Detektion wurde der LST1-spezifische 7E2-Antikörper eingesetzt. Ähnlich dem rekombinanten LST1, wurde das endogene LST1.2345 unter nicht-reduzierenden Bedingungen stärker in der dimeren Form detektiert als unter reduzierenden

Bedingungen (Abb. 27B). Dieses Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche, das berechnete und beobachtete Molekulargewicht des endogenen LST1-Proteins ist in der Tab. 3 auf S. 79 aufgelistet. Die verstärkte Detektion von LST1-Multimeren unter nicht-reduzierenden Bedingungen bestätigt die Hypothese, dass die Multimerbildung durch Disulfidbrückenbindungen vermittelt wird.

Um die Cysteine, zwischen denen die Disulfidbrücken gebildet werden, zu identifizieren, wurden die Aminosäuresequenzen der untersuchten rekombinanten LST1-Isoformen verglichen. Die Gegenüberstellung der Sequenzen zeigte, dass die Multimer-bildenden LST1-Proteine lediglich einen 11 AS-langen Abschnitt gemeinsam hatten (Abb. 28). Die einzigen Cysteine in dem gemeinsamen Abschnitt befinden sich in dem evolutionär konservierten CLC-Motiv (Abb. 28). Somit lässt sich folgern, dass die Multimerbildung bei transmembranen LST1-Isoformen durch Disulfidbrücken zwischen diesen Cysteinen vermittelt wird. Das CLC-Motiv ist am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne lokalisiert und ist somit auf allen 6 transmembranen LST1-Isoformen zu finden. Die Tatsache, dass dieses CLC-Motiv in sämtlichen LST1-Homologen konserviert ist (siehe Abb. 23), lässt darauf schließen, dass die Bildung von Multimeren wichtig für die Funktion der transmembranen LST1-Isoformen ist.

<b>LST1.2345'-FLAG</b>	M----- LSRNDDICIYGGGLGGLGGLLLAVVLLSACLCLWLHRRVKRLERSW
<b>LST1.235'-FLAG</b>	M----- LSRNDDICIYGGGLGGLGGLLLAVVLLSACLCLWLHRRGPGLLRAG
<b>HIS-LST1.3Δ45'</b>	-----LSACLCLWLHRRVKRLERSW
<b>FLAG-LST1.245</b>	MDYKDDDDKLSRND----- VKRLERSW

**Abbildung 28: Aminosäuresequenzvergleich der rekombinanten LST1-Isoformen.** Die Aminosäuresequenzen der in der Abb. 27 analysierten, rekombinanten LST1-Isoformen wurden verglichen. Gezeigt sind die durch die Exone 2, 3 und 4 kodierten AS. Die AS, die bei allen Multimer-bildenden Isoformen vorkommen, sind grau hinterlegt.

Wie bereits im Abschnitt 6.2.3.2 beschrieben, wandern transmembrane LST1-Isoformen in der Polyacrylamidgelelektrophorese langsamer als erwartet. Wie der Tab. 3 zu entnehmen ist, stimmen die berechneten und beobachteten Molekulargewichte lediglich für die lösliche Isoform FLAG-LST1.245 und für das monomere HIS-LST1.3Δ45'-Protein (ohne vollständige Transmembrandomäne) in etwa überein. Dies bestätigt die Vermutung, dass die hydrophobe Transmembranhelix für das aberrante Laufverhalten der transmembranen Isoformen verantwortlich ist.

Weiterhin wurde ein unterschiedliches Laufverhalten von rekombinatem und endogenem LST1 in der Polyacrylamidgelelektrophorese festgestellt. Für das rekombinante LST1.2345'-FLAG und das endogene LST1.2345 wurde fast ein identisches Molekulargewicht berechnet (Tab. 3), dennoch läuft das endogene Protein in der monomeren und dimeren Form erkennbar langsamer als das rekombinante Protein (Abb. 27). Das unterschiedliche Auftrennungsverhalten könnte auf die negativ geladenen AS des FLAG-Etiketts zurückzuführen sein, so liegt der isoelektrische Punkt für das rekombinante Protein bei pH 6,1 während für das endogene Protein ein pH von 8,4 errechnet wurde (mit dem ProtParam-Programm, siehe Tab. 3). Es erscheint also wahrscheinlich, dass das rekombinante LST1.2345'-FLAG, trotz der Ladungsmaskierung durch SDS, wegen seiner negativeren Ladung schneller in der Polyacrylamidgelelektrophorese wandert als das endogene LST1.

**Tabelle 3: Berechnete und beobachtete Molekulargewichte von LST1-Isoformen.** Das erwartete Molekulargewicht, der in der Abb. 27 analysierten LST1-Isoformen, wurde mit dem ProtParam-Programm ([www.expasy.org/tools/protparam](http://www.expasy.org/tools/protparam)) berechnet. Das beobachtete Molekulargewicht wurde mittels direkter Messung bestimmt (nach der Methode von See 1989). Die Molekulargewichte sind aufgerundet in Kilodalton angegeben, n.b. = nicht beobachtet.

	LST1.2345'- FLAG	LST1.235'- FLAG	HIS- LST1.3Δ45'	FLAG- LST1.245	LST1.2345
Tetramer (beobachtet)	53,6	41,4	45,8	n.b.	n.b.
Trimer (beobachtet)	41,5	29,6	34,4	n.b.	n.b.
Dimer (beobachtet)	29,1	22,8	25,2	n.b.	36,9
Monomer (beobachtet)	16,7	11,3	10,8	10,8	18,8
Monomer (berechnet)	11,8	7,1	10,5	9,2	11,7

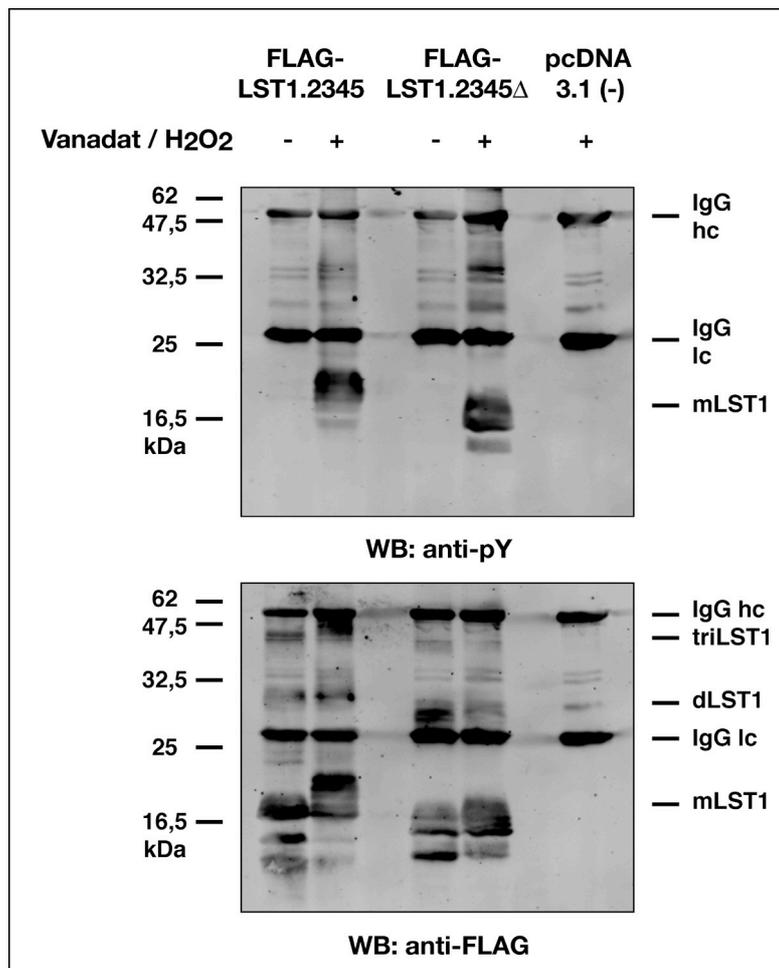
### 6.3.4 Tyrosin-Phosphorylierung von LST1

Die Bestimmung der evolutionär konservierten Bereiche von LST1 ermöglichte es zwei Tyrosin-enthaltende Motive zu identifizieren, die in sämtlichen homologen Proteinen zu finden sind (Abb. 23). Eins dieser Motive entsprach der ITIM-Konsensussequenz. Diese intrazellulären Motive werden durch Phosphorylierung des zentralen Tyrosins aktiviert und lösen daraufhin inhibitorische Signalkaskaden aus. Um zu testen, ob das potentielle LST1-ITIM funktionell ist, wurde die Tyrosin-Phosphorylierung von LST1 untersucht, dabei wurde das Reagenz Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) verwendet. Es handelt sich um einen Phosphatasehemmer, der in der Zelle das Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen in Richtung Phosphorylierung verändern kann. Durch die  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Behandlung wird also die Dephosphorylierung blockiert, was den Nachweis der Phosphorylierung eines Proteins erleichtert.

Das potentielle ITIM ist in den transmembranen LST1.2345- und LST1.2345'-Isoformen vorhanden, zusätzlich ist es auch in den löslichen LST1.245- und LST1.245'-Isoformen zu finden. Das zweite, am C-Terminus gelegene, Tyrosin-enthaltende Motiv ist auf allen Isoformen vorhanden, die durch Transkripte kodiert werden, die die Exon 4-Sequenz beinhalten. Die Tyrosin-Phosphorylierung wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich für die transmembranen Isoformen untersucht.

HEK 293T-Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor für FLAG-LST1.2345, dem pcDNA 3.1 (-)-Leervektor und dem FLAG-LST1.2345Δ-Vektor transfiziert. Letzterer kodiert ein mutiertes Protein, dem die letzten 13 C-terminalen AS der Volle-Länge transmembranen FLAG-LST1.2345-Isoform fehlen (siehe 6.2.3.2). Im mutierten Protein ist somit das potentielle ITIM vorhanden, das zweite Tyrosin-haltige Motiv fehlt jedoch. Die HEK 293T-Transfektanten wurden mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  behandelt und lysiert. Das rekombinante FLAG-LST1 wurde mittels IP, unter Verwendung des FLAG-Antikörpers, präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mittels Western-Analyse untersucht, zur Detektion wurde der pY-Antikörper verwendet, dieser erkennt spezifisch phosphoryliertes Tyrosin.

Die aus den Lysaten von  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -behandelten Transfektanten präzipitierten FLAG-LST1.2345- und FLAG-LST1.2345 $\Delta$ -Proteine (errechnete Molekulargewichte: 12,6 bzw. 12,2 kDa) zeigten eine deutliche Tyrosin-Phosphorylierung ihrer Monomere, aber keine erkennbare Phosphorylierung ihrer Multimere (Abb. 29). Die Western-Membran wurde gestrippt und mit dem FLAG-Antikörper nachdetektiert. Eine Nachdetektion mit dem LST1-spezifischen 7E2-Antikörper war nicht möglich, da dieser zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch nicht zur Verfügung stand. Die Nachdetektion zeigte, dass die durch die Phosphorylierung bedingte Zunahme des Molekulargewichtes bei FLAG-LST1.2345 höher ausfiel als bei FLAG-LST1.2345 $\Delta$  (Abb. 29). Dies deutet darauf hin, dass bei FLAG-LST1.2345 beide Tyrosinhaltigen Motive phosphoryliert waren, während beim mutierten FLAG-LST1.2345 $\Delta$  lediglich das potentielle ITIM phosphoryliert war.



**Abbildung 29: Phosphorylierung von rekombinantem LST1.** Zwei rekombinante FLAG-LST1-Isoformen wurden transient in HEK 293T-Zellen exprimiert. Zusätzlich wurden HEK 293T-Zellen mit dem Leervektor pcDNA 3.1 (-) transient transfiziert. Je  $1 \times 10^7$  HEK 293T-Transfektanten wurden entweder mit  $0,2 \text{ mM Na}_3\text{VO}_4$  /  $0,03 \text{ \% H}_2\text{O}_2$  (in DMEM F12 Medium [+]) oder nur mit Medium (-) versetzt und für 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die behandelten und unbehandelten Zellen wurden lysiert (im Triton-Lysepuffer +  $0,2 \text{ mM Na}_3\text{VO}_4$ ) und mit dem FLAG-M2-Antikörper präzipitiert. Die Präzipitate wurden auf einem 15 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der Western-Membran erfolgte mit dem pY-4G10-Antikörper (1:1000) und einem IRDye800CW-fluoreszenzgekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000, oberes Bild). Anschließend wurde die Membran gestrippt und mit dem FLAG-M2-Antikörper und dem fluoreszenzgekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000, unteres Bild) nachdetektiert. Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind links markiert. Die Positionen der schweren (hc) und leichten (lc) Ketten des Maus IgG sind rechts angegeben. Zusätzlich sind die Positionen der rekombinanten LST1-Isoformen als Monomer (mLST1), Dimer (dLST1) und Trimer (triLST1) rechts markiert.

Weiterhin konnten bei der FLAG-Nachdetektion Dimere und Trimere der FLAG-LST1-Isoformen beobachtet werden. Diese zeigten keine erkennbare Zunahme des Molekulargewichtes, was den Befund der pY-Detektion bestätigt. Wie bereits mehrmals bei FLAG-LST1-Transmembranisoformen beobachtet (Abb. 18, 21 und 22), wurden auch bei diesem Versuch C-terminal verkürzte Abbauprodukte der rekombinanten Proteine nachgewiesen (Abb. 29). Diese Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Nachdem die Phosphorylierung der beiden Tyrosin-enthaltenden Motive in den rekombinanten FLAG-LST1-Proteinen nachgewiesen wurde, sollte nun die Tyrosin-Phosphorylierung von endogenem LST1 untersucht werden. Dies war inzwischen durch die Etablierung der monoklonalen LST1-Antikörper möglich geworden. In einem ersten Versuch wurden U-937-Zellen, wie schon die HEK 293T-Transfektanten, mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  behandelt und lysiert. Endogenes LST1 wurde mit dem LST1-2B1-Hybridomüberstand aus den Lysaten präzipitiert.

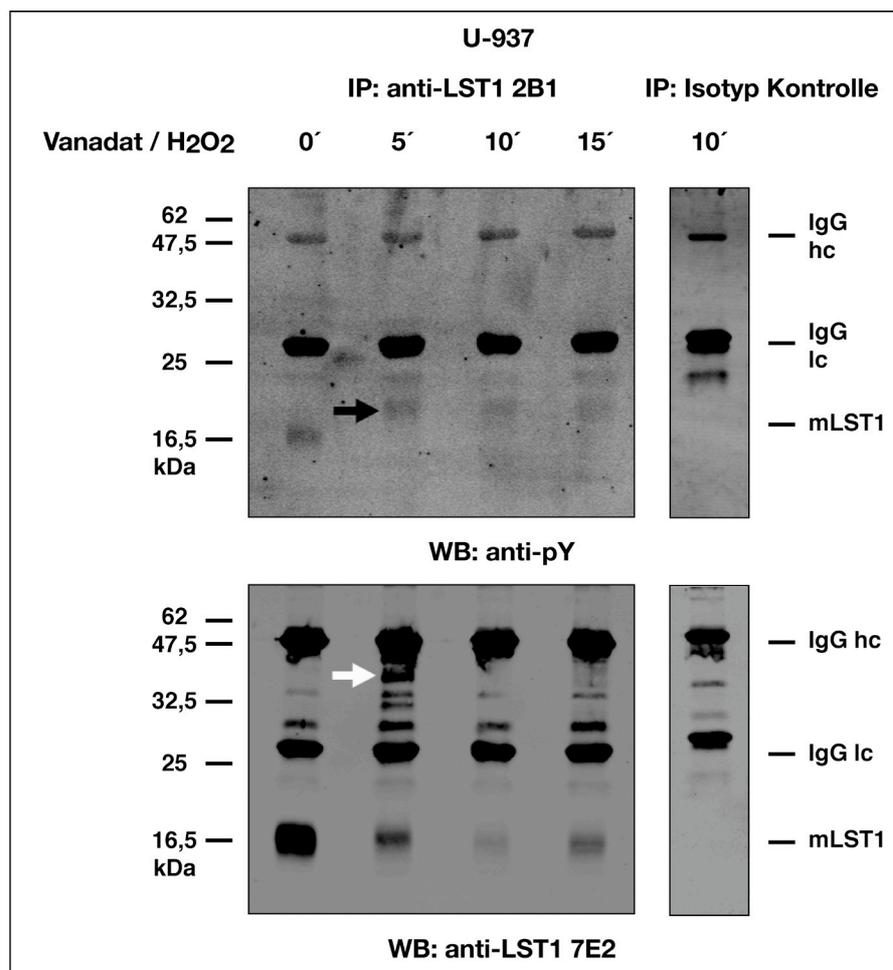
Die Präzipitate wurden in der Western-Analyse mit dem pY-Antikörper untersucht, anschließend wurde die Membran gestrippt und mit dem LST1-7E2-Antikörper detektiert. Es konnte kein phosphoryliertes LST1 und insgesamt sehr wenig präzipitiertes Protein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde die Dauer der  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Behandlung reduziert. Endogenes LST1 wurde aus den Lysaten von U-937-Zellen, wie oben beschrieben, präzipitiert und anschließend in der Western-Analyse untersucht. Die Detektion mit dem pY-Antikörper zeigte, dass aus dem Lysat nicht-behandelter Zellen Tyrosin-phosphoryliertes LST1.2345 präzipitiert wurde (Abb. 30). Aus dem Lysat behandelter U-937-Zellen wurde ebenfalls phosphoryliertes LST1.2345 präzipitiert, wobei dieses im Präzipitat der Zellen, die 5 min lang behandelt wurden, am deutlichsten detektiert werden konnte (Abb. 30). Das phosphorylierte LST1, das aus dem Lysat der behandelten Zellen präzipitiert wurde, zeigte ein größeres Molekulargewicht als das phosphorylierte LST1 aus dem Lysat der unbehandelten Zellen. Wie schon für die rekombinanten FLAG-LST1-Isoformen festgestellt, konnte keine Phosphorylierung von LST1-Multimeren nachgewiesen werden.

Die Western-Membran wurde gestrippt und mit dem LST1-7E2-Antikörper nachdetektiert. Das monomere LST1.2345 wurde im Präzipitat der unbehandelten U-937-Zellen am deutlichsten detektiert, die Behandlung mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  hat eindeutig zu einer Abnahme der nachgewiesenen Proteinmenge geführt (Abb. 30). Das phosphorylierte LST1, das aus dem Lysat der behandelten Zellen präzipitiert wurde, konnte mit dem 7E2-Antikörper nicht detektiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass das monomere LST1.2345 z.T. konstitutiv am potentiellen ITIM phosphoryliert ist und die Behandlung mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  die Dephosphorylierung des zweiten Tyrosins blockiert hat. Dieses Tyrosin ist am C-Terminus von LST1 lokalisiert und könnte im phosphorylierten Zustand die Erkennung durch den 7E2-Antikörper behindern, da es innerhalb seines Bindeepitops liegt (siehe Abb. 19).

Bei der Nachdetektion mit dem 7E2-Antikörper wurde in sämtlichen Präzipitaten das monomere LST1.2345 detektiert. Die dimere Form dieses Proteins konnte nur in einem Präzipitat der  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -behandelten U-937-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 30, 5 min). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Behandlung mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  zur Dimerisierung von LST1 geführt hat. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Aus den, in diesem Abschnitt beschriebenen, Ergebnissen wurde gefolgert, dass das transmembrane LST1.2345-Protein potentiell ITIM-vermittelte Signalkaskaden auslösen kann. Bedingt durch die Lage der Transmembranhelix weist das Protein lediglich 9 extrazelluläre AS auf, was eine Funktion als Zelloberflächenrezeptor unwahrscheinlich macht. Es wäre allerdings

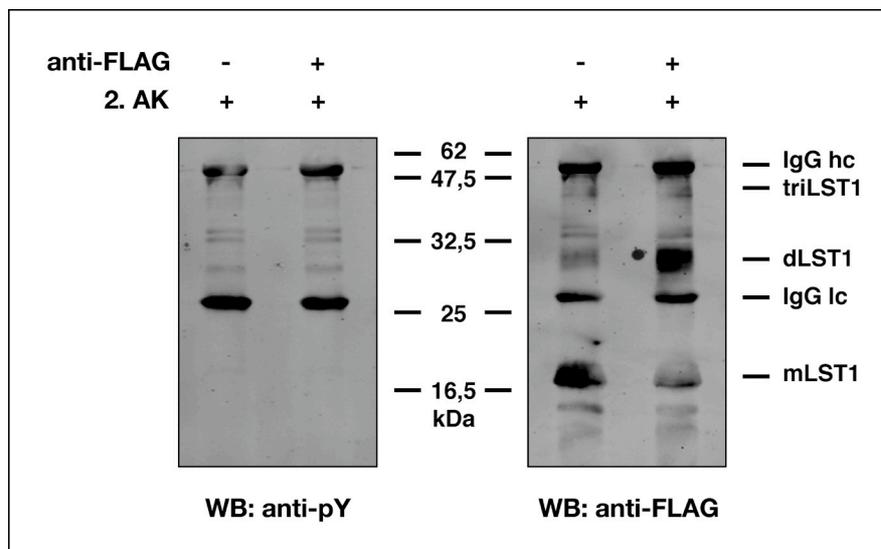
denkbar, dass das LST1.2345-Protein zur Klasse der transmembranen Adaptorproteine (TRAP) gehört (für eine Übersicht siehe Simeoni et al. 2008). Diese besitzen meistens wenige extrazelluläre AS und eine längere intrazelluläre Domäne, die in den meisten Fällen mindestens ein aktivierendes oder inhibierendes Tyrosin-basiertes Motiv (ITAM, bzw. ITIM) aufweist. TRAP sind mit Rezeptoren an der Zelloberfläche assoziiert. Wurde ein solcher Rezeptor durch Ligandenbindung aktiviert, kann das assoziierte TRAP-Molekül auf der zytosolischen Membranseite aktivierende oder inhibitorische Signalkaskaden auslösen.



**Abbildung 30: Phosphorylierung von endogenem LST1.** Je  $3 \times 10^7$  U-937-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume (5', 10', und 15') mit 0,2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  / 0,03 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (in DMEM F12 Medium) oder nur mit Medium (0') versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert (im Triton-Lysepuffer + 0,2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) und das endogene LST1 wurde mit dem LST1-2B1-Antikörper präzipitiert. In einem Parallelansatz wurde das Lysat von  $3 \times 10^7$  behandelten U-937-Zellen mit einem Isotyp-Kontrollüberstand (anti-RMC 16D2) präzipitiert. Die Präzipitate wurden auf einem 15 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der Western-Membran erfolgte mit dem pY-4G10-Antikörper (1:1000) und einem IRDye800CW-fluoreszenzgekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000, oberes Bild). Anschließend wurde die Membran gestrippt. Die Nachdetektion erfolgte mit dem LST1-7E2-Antikörper und einem IRDye800CW-fluoreszenzgekoppelten anti-Ratte-Antikörper (1:10000, unteres Bild). Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind links markiert. Die Positionen der schweren (hc) und leichten (lc) Ketten des Ratte IgG sind rechts angegeben. Zusätzlich ist das endogene, monomere LST1.2345 (mLST1) rechts gekennzeichnet. Das phosphorylierte mLST1, das aus dem Lysat der behandelten Zellen präzipitiert wurde ist mit einem schwarzen Pfeil markiert (oberes Bild). Das dimere LST1.2345 ist mit einem weißen Pfeil markiert (unteres Bild).

### 6.3.5 LST1 dimerisiert nach Kreuzvernetzung

Die Untersuchung der Tyrosin-Phosphorylierung von rekombinantem und endogenem LST1 lieferte Hinweise darauf, dass die LST1.2345-Isoform als TRAP agieren könnte. Bei mehreren dieser Adaptorproteinen (z.B. DAP12, LIME und NTAL) wird nach Kreuzvernetzung eine Phosphorylierung ihrer aktivierenden oder inhibierenden Tyrosin-basierten Motive (ITAM, bzw. ITIM) beobachtet (Lanier et al. 1998, Ahn et al. 2006 und Brdicka et al. 2002). Um zu untersuchen, ob das LST1-Protein ebenfalls nach Kreuzvernetzung Tyrosin-phosphoryliert wird, wurden HEK 293T-Zellen transient mit dem FLAG-LST1.2345-Expressionsvektor transfiziert. Die Kreuzvernetzung des rekombinanten FLAG-LST1 wurde durch serielle Inkubationen der Transfektanten mit dem FLAG-Antikörper und einem anti-Maus-Antikörper induziert. In einem Parallelansatz wurden die Transfektanten lediglich mit dem anti-Maus-Antikörper inkubiert. Die Transfektanten wurden anschließend lysiert und das rekombinante FLAG-LST1 wurde mit dem FLAG-Antikörper präzipitiert. Eine Präzipitation mit dem LST1-spezifischen 2B1-Antikörper war nicht möglich, da dieser zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch nicht zur Verfügung stand. Die Präzipitate wurden in der Western-Analyse mit dem pY-Antikörper untersucht, es konnte keinerlei Tyrosin-Phosphorylierung von FLAG-LST1.2345 nachgewiesen werden (Abb. 31). Die Western-Membran wurde gestrippt und mit dem FLAG-Antikörper nachdetektiert. Das präzipitierte FLAG-LST1.2345 konnte, in beiden Ansätzen, hauptsächlich als Monomer und Dimer nachgewiesen werden (auch schwach als Trimer, Abb. 31).



**Abbildung 31: Kreuzvernetzung von rekombinantem LST1.** Die transmembrane FLAG-LST1.2345-Isoform wurde transient in HEK 293T-Zellen exprimiert. Je  $1 \times 10^7$  HEK 293T-Transfektanten wurden entweder mit  $10 \mu\text{g}$  FLAG-M2-Antikörper in DMEM-Kulturmedium (+) oder nur mit Medium (-) versetzt und für 20 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Transfektanten mit einem Ziege anti-Maus-Antikörper (1:250, in DMEM-Kulturmedium) versetzt und für weitere 20 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert (im Triton-Lysepuffer +  $0,2 \text{ mM Na}_3\text{VO}_4$ ) und mit dem FLAG-M2-Antikörper präzipitiert. Die Präzipitate wurden auf einem 15 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der Western-Membran erfolgte mit dem pY-4G10-Antikörper (1:1000) und einem IRDye800CW-fluoreszenzgekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000, linkes Bild). Anschließend wurde die Membran gestrippt. Die Nachdetektion erfolgte mit dem FLAG-M2-Antikörper und dem fluoreszenzgekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000, rechtes Bild). Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind zwischen den beiden Bildern markiert. Die Positionen der schweren (hc) und leichten (lc) Ketten des Maus IgG sind rechts angegeben. Zusätzlich sind die Positionen der rekombinanten FLAG-LST1-Isoform als Monomer (mLST1), Dimer (dLST1) und Trimer (triLST1) rechts gekennzeichnet.

Aus dem Lysat der Transfektanten, die mit beiden Antikörpern inkubiert wurden, konnte deutlich mehr dimeres als monomeres FLAG-LST1 präzipitiert werden. Aus dem Lysat der Transfektanten, die nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert wurden, konnte dagegen deutlich mehr monomeres als dimeres FLAG-LST1 präzipitiert werden (Abb. 31). Dies lässt den Schluss zu, dass die Kreuzvernetzung von FLAG-LST1 nicht zur Tyrosin-Phosphorylierung sondern lediglich zur Dimerisierung des Proteins geführt hat.

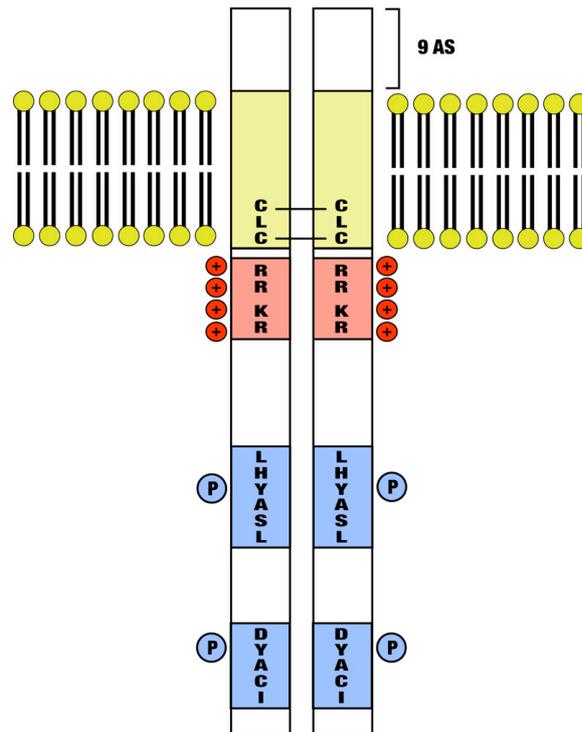
### 6.3.6 Funktionelle Bereiche der LST1-Transmembranisoformen

Die Ergebnisse der Abschnitte 6.3.1 – 6.3.5 wurden zusammengefasst um die funktionellen Bereiche der LST1-Transmembranisoformen zu definieren (Abb. 32). Für die meisten der evolutionär konservierten AS-Motive (Abb. 23) konnte eine Funktion bestimmt, bzw. postuliert werden.

Die AS der Transmembranhelix waren bei den meisten LST1-Homologen nicht durchgängig konserviert, aber alle homologen Proteine wiesen fast ausschließlich hydrophobe AS in dieser Region auf (Abb. 23). Die LST1-Transmembranisoformen konnten als Typ-I-Transmembranproteine charakterisiert werden (Abb. 24 - 26). Für die Membranorientierung sind höchstwahrscheinlich mehrere z.T. konservierte, positiv-geladene AS (RR und KR) verantwortlich, die unmittelbar C-terminal der Transmembrandomäne lokalisiert sind. Bei sämtlichen transmembranen LST1-Isoformen sind mindestens zwei dieser positiv-geladenen AS (RR) vorhanden. Die transmembranen Isoformen, die von Exon 4-enthaltenden Transkripten kodiert werden, weisen zwei zusätzliche positiv-geladene AS (KR) an dieser Stelle auf.

Die Bildung von Multimeren bei rekombinanten und endogenen LST1-Transmembranisoformen konnte auf die Interaktion mittels Disulfidbrückenbindungen zurückgeführt werden. Diese werden zwischen den Cysteinen des evolutionär konservierten CLC-Motivs gebildet, das am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne lokalisiert ist (Abb. 28).

Die Phosphorylierung der beiden evolutionär konservierten, Tyrosin-enthaltenden Motive konnte bei rekombinanten und endogenen LST1-Transmembranisoformen nachgewiesen werden (Abb. 30 und 31). Die Phosphorylierung des potentiellen ITIM und die Membrantopologie deuten auf eine mögliche Funktion von LST1 als TRAP.



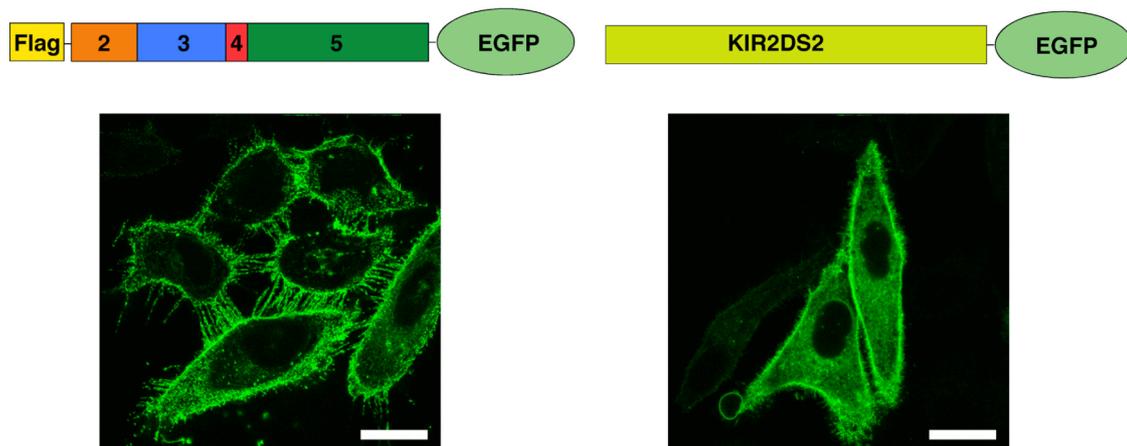
**Abbildung 32: Funktionelle Bereiche der transmembranen LST1.2345-Isoform.** Schematische Darstellung der Volle-Länge transmembranen LST1.2345-Isoform als Dimer. Die evolutionär konservierten AS, denen eine potentielle Funktion zugeordnet werden konnte, sind angegeben. Die Transmembranhelix (vorhergesagt mit dem TMHMM-Programm, Krogh et al. 2001) ist gelb, die positiv geladenen AS rot markiert. Das potentielle ITIM (AS-Sequenz: LHYASL) und das zweite Tyrosin-haltige Motiv (AS-Sequenz: DYACI) sind blau markiert.

## 6.4 Charakterisierung der Zellmorphologie-Modulation durch LST1

### 6.4.1 LST1-Überexpression induziert morphologische Veränderungen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe 2.3.6), konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass die Überexpression von LST1-Transmembranisoformen in Säugerzellen zu einer deutlichen Veränderung der Zellmorphologie führt. LST1-Transfektanten zeigten eine erhöhte Anzahl von Filopodien und Mikrospiques, weiterhin wurden dünne zelluläre Fortsätze gebildet, die eine Länge von bis zu 300  $\mu\text{m}$  erreichen konnten (Raghunathan et al. 2001).

Der von Raghunathan et al. beobachtete Effekt wurde zunächst durch Überexpression des FLAG-LST1.2345-EGFP-Fusionsproteins in HeLa-Zellen verifiziert. Als Kontrolle wurde ein EGFP-fusionierter NK-Zell-Rezeptor (KIR2DS2) in HeLa-Zellen überexprimiert. Die Transfektanten wurden fixiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Beide EGFP-Fusionsproteine waren hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert. Nur die FLAG-LST1.2345-EGFP-Transfektanten zeigten die von Raghunathan et al. beschriebenen morphologischen Veränderungen (Abb. 33).



**Abbildung 33: Die Überexpression von LST1 induziert morphologische Veränderungen.** HeLa-Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für FLAG-LST1.2345-EGFP (linkes Bild) und KIR2DS2-EGFP (rechtes Bild) transfiziert. Die Transfektanten wurden fixiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Gezeigt sind Maximumintensitätsprojektionen von ausgewählten, konfokalen z-Schnitten, Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

Die durch die Überexpression von transmembranem LST1 induzierten zellulären Fortsätze zeigten ähnliche Eigenschaften wie die in der Einleitung beschriebenen TNT (siehe 2.3.6.3). In diesem Kontext erscheint es auch interessant, dass *LST1*-Transkripte am stärksten in Makrophagen und DC exprimiert werden (Holzinger et al. 1995 und Rollinger-Holzinger et al. 2000). Die ausgeprägte LST1-Expression in zwei Zelltypen, die erwiesenermaßen TNT ausbilden können, und die beobachtete Modulation der Zellmorphologie deuten zusammen darauf hin, dass LST1 eine Rolle bei der Bildung von TNT spielen könnte. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden in den folgenden Versuchen die LST1-induzierten Fortsätze näher untersucht.

### 6.4.2 LST1 induziert die Bildung von TNT

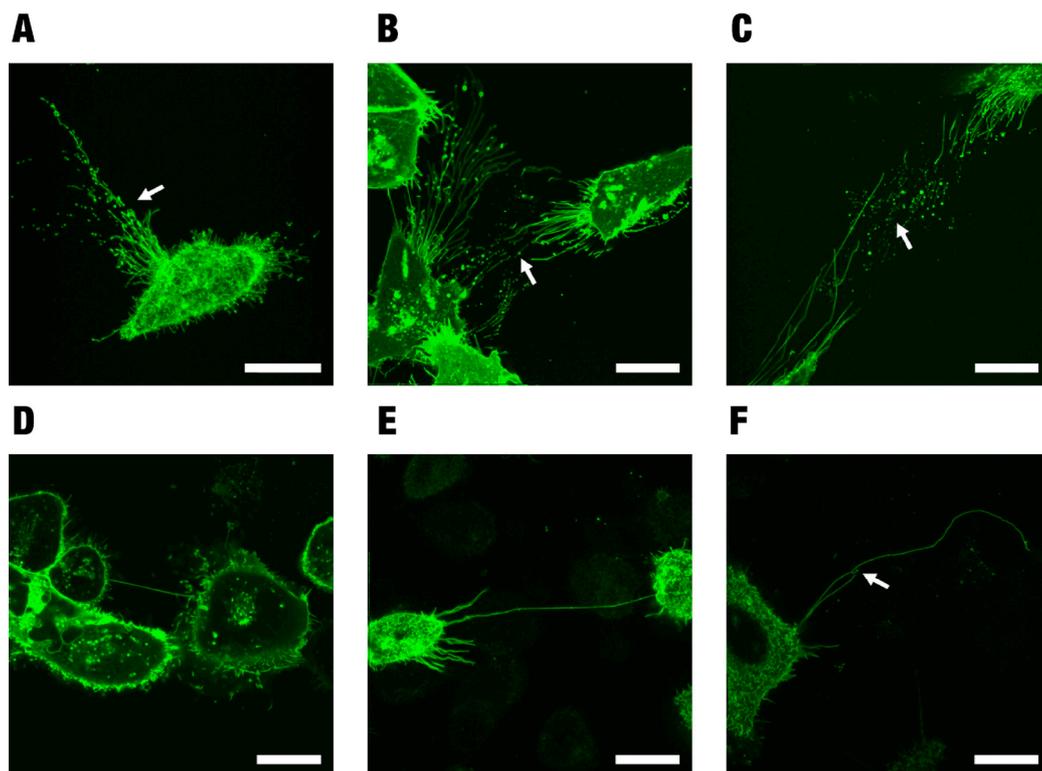
Die Eigenschaften der LST1-induzierten, zellulären Fortsätze sollten untersucht und mit den Charakteristika der TNT verglichen werden. Zunächst war es jedoch nötig eine differenziertere Einordnung dieser Fortsätze vorzunehmen. Bei der Untersuchung von Raghunathan et al. wurde die Länge als Kriterium zur Unterscheidung zwischen Mikrospikes ( $< 10 \mu\text{m}$ ), Filopodien ( $10 - 30 \mu\text{m}$ ) und CLF ( $> 30 \mu\text{m}$ ) herangezogen. Da Mikrospikes nur einige  $\mu\text{m}$  lang sind und sich ausschließlich entlang der x-y-Ebene von Lamellipodien erstrecken (Faix und Rottner 2006), fällt ihre Unterscheidung von Filopodien und CLF leicht. Die Unterscheidung zwischen Filopodien und CLF ist dagegen schwieriger, vor allem wenn diese Fortsätze mit den TNT verglichen werden sollen. Die von Raghunathan et al. angewendeten Kriterien würden manche TNT als Filopodien klassifizieren, so wurden bei T-Zellen TNT mit einer Länge von bis zu  $100 \mu\text{m}$  beobachtet, deren durchschnittliche Länge lag allerdings bei  $22 \mu\text{m}$  (Sowinski et al. 2008). Ähnliche Charakteristika der Filopodien und der TNT, wie die Fragilität bei Fixierung und die Fähigkeit Kontakt mit der Oberfläche anderer Zellen aufzunehmen (Wood und Martin 2002 und Rustom et al. 2004), erschweren eine Abgrenzung weiter. Aus diesem Grund wurden bei den folgenden Untersuchungen die Eigenschaften der LST1-induzierten Fortsätze mit denen der TNT verglichen, ohne dabei die LST1-induzierten Fortsätze in Kategorien wie Filopodien oder CLF einzuordnen.

Die LST1-induzierten zellulären Ausläufer wurden nun näher charakterisiert. Dazu wurden HeLa-Zellen transient mit dem Expressionsvektor für FLAG-LST1.2345-EGFP transfiziert, fixiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Transfektanten zeigten die bereits beschriebenen morphologischen Veränderungen (siehe Abb. 33), die durch die LST1-Überexpression induzierten Ausläufer wurden aber offensichtlich bei der Fixierung mit PFA beschädigt. Betroffen waren vor allem Fortsätze, die länger als ein Zelldurchmesser waren. Im interzellulären Raum zwischen den Transfektanten konnten auf der Substratebene sehr häufig Bruchstücke dieser Fortsätze beobachtet werden (exemplarisch gezeigt in Abb. 34A - C). Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass die durch die LST1-Überexpression induzierten Ausläufer, fixierungssensitiv sind. Weiterhin kann gefolgert werden, dass die Fragilität der Fortsätze mit ihrer Länge zunimmt. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche. Die TNT wurden bei ihrer Erstbeschreibung ebenfalls als fixierungssensitiv charakterisiert (Rustom et al. 2004). Diese Fragilität lässt sich dadurch erklären, dass in vitro TNT meistens zwischen zwei Zellen mehr oder weniger straff gespannt vorliegen, ohne dabei in Kontakt mit dem Substrat zu treten. Wegen ihres geringen Durchmessers, sind vor allem längere TNT meistens nicht in der Lage den mechanischen Stress der Fixierung und der darauf folgenden Waschschriffe intakt zu überstehen. Die Beobachtung, dass vor allem die längeren LST1-induzierten Fortsätze für mechanischen Stress anfällig sind, lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass es sich bei diesen Fortsätzen um TNT handeln könnte.

Um den mechanischen Stress der Fixierung zu vermeiden und intakte zelluläre Fortsätze beobachten zu können, wurden HeLa-Zellen, wie bereits beschrieben, transfiziert und mittels Lebendzell-konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Im Gegensatz zu den fixierten Transfektanten wurden bei den lebenden Zellen keine Bruchstücke von Fortsätzen zwischen den Zellen beobachtet (nicht gezeigt). Die LST1-Transfektanten waren oft durch lange und dünne Fortsätze verbunden, in denen das FLAG-LST1-EGFP-Fusionsprotein angereichert war (exemplarisch gezeigt in Abb. 34D - F). Die LST1-induzierten Ausläufer hatten keinen Kontakt

mit dem Substrat und wiesen, je nach Länge, eine variable Struktur auf. Kurze Fortsätze zeigten keinerlei Verkrümmung und verbanden Zellen über die kürzestmögliche Entfernung (exemplarisch gezeigt in Abb. 34D: 29  $\mu\text{m}$  Länge). Mittellange Fortsätze zeigten eine leichte Verkrümmung und waren nicht so straff gespannt, wie die kurzen Ausläufer (exemplarisch gezeigt in Abb. 34E: 63  $\mu\text{m}$  Länge). Lange Fortsätze waren stark verkrümmt, gelegentlich verzweigt und verbanden keine Zellen miteinander (exemplarisch gezeigt in Abb. 34F: 93  $\mu\text{m}$  Länge). Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für mindestens 6 unabhängige Versuche.

Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass die Verkrümmung der LST1-induzierten Fortsätze mit steigender Länge zunimmt. Eine mit der Länge zunehmende Verkrümmung konnte auch für die TNT von T-Zellen *in vitro* und DC *in vivo* nachgewiesen werden (Sowinski et al. 2008 und Chinnery et al. 2008). Letztere zeigten zwei unterschiedliche Klassen von Nanoröhren: Kurze TNT hatten eine durchschnittliche Länge von 22  $\mu\text{m}$ , zeigten keine Verkrümmung und verbanden stets zwei Zellen miteinander. Lange TNT dagegen hatten eine Länge von 100 – 333  $\mu\text{m}$ , waren stark verkrümmt, gelegentlich verzweigt und verbanden oft keine Zellen miteinander (Chinnery et al. 2008). Die Untersuchung der LST1-Transfektanten mittels Lebendzell-Mikroskopie und die Charakterisierung der induzierten Ausläufer lieferten weitere Hinweise darauf, dass es sich bei diesen Fortsätzen um TNT handelt.



**Abbildung 34: Charakterisierung der LST1-induzierten Ausläufer, Teil 1.** Das FLAG-LST1.2345-EGFP-Fusionsprotein wurde transient in HeLa-Zellen exprimiert. **A) – C)** Die Transfektanten wurden fixiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Auf der Substratebene konnten oft Bruchstücke von zellulären Fortsätzen beobachtet werden (Pfeile). Gezeigt sind Maximumintensitätsprojektionen der konfokalen z-Schnitte, die Substratebene wurde einbezogen. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ . **D) – F)** Die Transfektanten wurden mittels Lebendzell-konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zwischen den Transfektanten konnten LST1-induzierte Ausläufer beobachtet werden (D, E). Bei längeren Fortsätzen konnten gelegentlich Verzweigungen festgestellt werden (F, Pfeil). Gezeigt sind Maximumintensitätsprojektionen von ausgewählten, konfokalen z-Schnitten, die Substratebene wurde nicht einbezogen. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

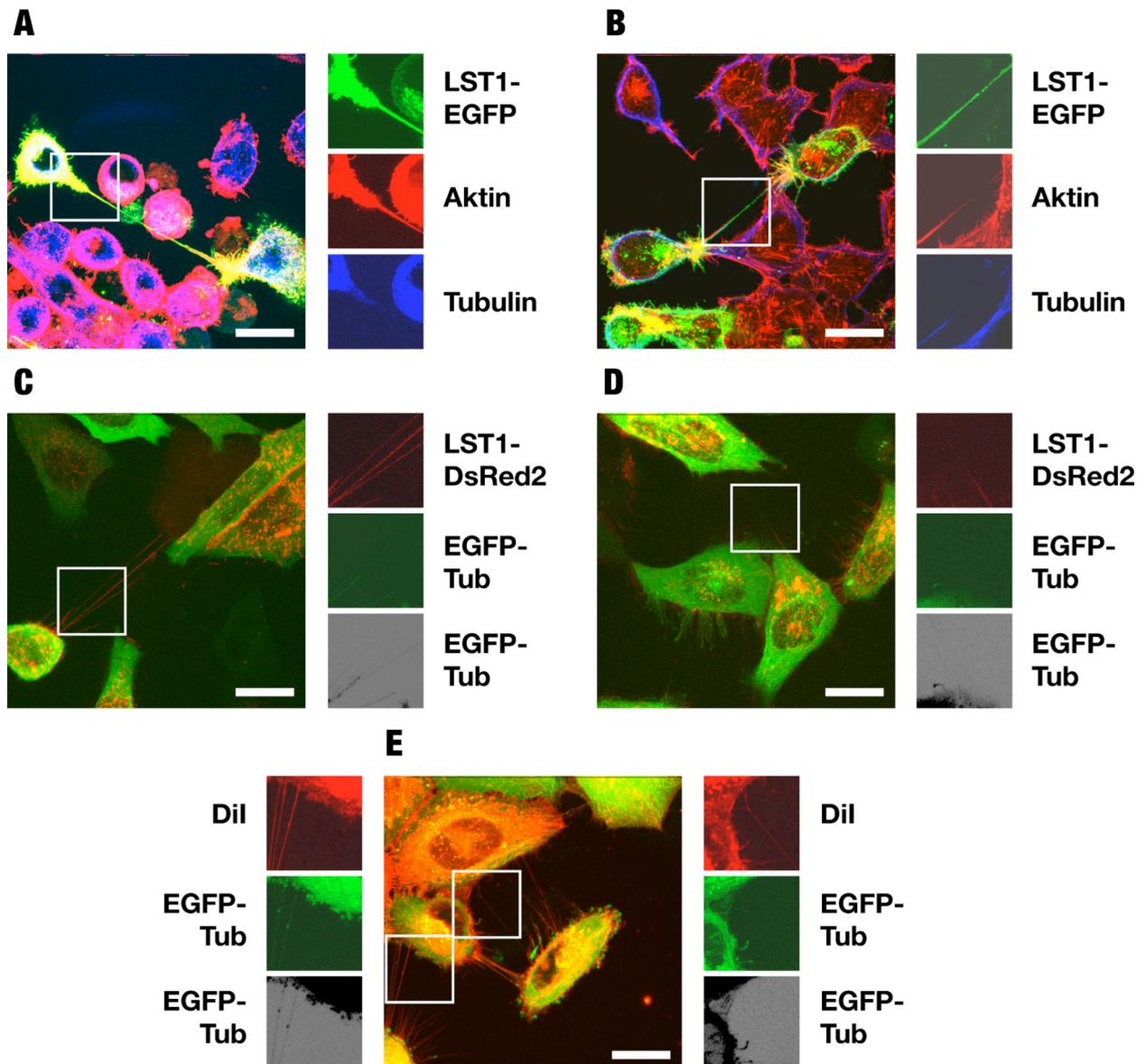
Bei der Erstbeschreibung der TNT durch Rustom et al. im Jahr 2004 wurde festgestellt, dass diese Fortsätze Aktin aber kein Tubulin enthielten. Aus diesem Grund wurden die LST1-induzierten Ausläufer auf das Vorhandensein von Aktin und Tubulin untersucht. HeLa-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für FLAG-LST1.2345-EGFP transient transfiziert und fixiert. Anschließend wurde mittels Immunzytochemie in den Transfektanten Aktin und Tubulin angefärbt. Die LST1-EGFP-Transfektanten zeigten die bereits charakterisierten morphologischen Veränderungen, es konnten aber nur wenige lange Fortsätze zwischen den Zellen beobachtet werden. Dies war auf die bereits beschriebene Fragilität der Fortsätze für mechanischen Stress zurückzuführen, dieser wurde in diesem Versuch durch die immunzytochemische Färbung zusätzlich verstärkt. Aus diesem Grund blieben nur die kürzeren und robusteren Fortsätze größeren Durchmessers erhalten (Abb. 35A: 49  $\mu\text{m}$  und Abb. 35B: 33  $\mu\text{m}$  Länge). Das LST1-EGFP-Fusionsprotein war in den Fortsätzen angereichert, weiterhin konnte festgestellt werden, dass diese Aktin-reich waren und Spuren von Tubulin enthielten (exemplarisch gezeigt in Abb. 35A – B). Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für 5 unabhängige Versuche.

Der Nachweis von Tubulin-Spuren in den LST1-induzierten Ausläufern sprach gegen der Hypothese, dass es sich bei diesen Strukturen um TNT handelt. Allerdings wurden zwei Jahre nach der Erstbeschreibung zwei strukturell unterschiedliche Klassen von TNT definiert: Dünne TNT (Durchmesser 50 – 700 nm) sind Aktin-reich und enthalten kein Tubulin, während dicke TNT (Durchmesser > 700 nm) sowohl Aktin als auch Tubulin enthalten (Onfelt et al. 2006). Diese Unterscheidung erlaubte eine alternative Interpretation der Ergebnisse der Immunzytochemie. So erscheint es wahrscheinlich, dass bedingt durch den Versuchsaufbau nur Fortsätze größeren Durchmessers erhalten blieben. Der Nachweis von Tubulin-Spuren erlaubte es diese Strukturen als potentielle dicke TNT einzuordnen.

Um den mechanischen Stress der Fixierung und der anschließenden immunzytochemischen Färbung zu vermeiden, wurde versucht, in lebenden Zellen, das Vorhandensein von Tubulin in den LST1-induzierten Fortsätzen zu untersuchen. Dazu wurden die Fusionsproteine FLAG-LST1.2345-DsRed2 und EGFP-Tubulin zusammen in HeLa-Zellen überexprimiert. Die Kotransfektanten wurden mittels Lebendzell-konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Während für das EGFP-Tubulin eine zufriedenstellende Expression in den Kotransfektanten erreicht werden konnte, war die Expression von LST1-DsRed2 erheblich schwächer als die Expression von LST1-EGFP in früheren Versuchen. Dies ist wahrscheinlich auf spezifische Eigenschaften des DsRed2-Proteins zurückzuführen. Trotz der schwachen Expression konnten in den Kotransfektanten LST1-induzierte Fortsätze beobachtet werden, in denen das LST1-DsRed2-Fusionsprotein angereichert war (exemplarisch gezeigt in Abb. 35C – D). Die Fortsätze variierten im Durchmesser und im EGFP-Tubulin-Gehalt: Dicke Fortsätze enthielten Spuren des Fusionsproteins (Abb. 35C, 52  $\mu\text{m}$  Länge) während in dünnen Ausläufern kein EGFP-Tubulin nachgewiesen werden konnte (Abb. 35D, 34  $\mu\text{m}$  Länge). Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für 5 unabhängige Versuche. Bei diesen Versuchen konnte erstmals beobachtet werden, dass sich die LST1-induzierten Fortsätze nicht ausschließlich zwischen Transfektanten bilden müssen, so war eine LST1-DsRed2-EGFP-Tubulin-Kotransfektante mit einer nicht-transfizierten Zelle durch mehrere Ausläufer verbunden (Abb. 35C)

Wegen der schwachen LST1-DsRed2-Expression waren bei diesem Versuch dünne Fortsätze schwer zu erkennen (Abb. 35D). Um eine bessere Charakterisierung dieser Strukturen zu ermöglichen, wurde eine weitere Kotransfektion durchgeführt. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für FLAG-LST1.2345 und EGFP-Tubulin transient kotransfiziert.

Die Koftransfektanten wurden mittels Lebendzell-konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Vor der Mikroskopie wurden die Zellen mit dem lipophilen Farbstoff Dil gefärbt, dieser wurde direkt ins Medium gegeben, ohne dieses davor oder danach zu wechseln (analog zu der WGA-Alexa594-Färbung von Rustom et al.).



**Abbildung 35: Charakterisierung der LST1-induzierten Ausläufer, Teil 2.** Gezeigt sind überlagerte Maximumintensitätsprojektionen von ausgewählten, konfokalen z-Schnitten, die Substratebene wurde nicht einbezogen. Maßstab: 20 µm. Die Bildausschnitte sind in den jeweiligen Kanälen, vergrößert dargestellt, Helligkeit und Kontrast dieser Bilder wurden zur besseren Sichtbarkeit verändert. Bei den Abbildungen C – E war das EGFP-Tubulin-Fusionsprotein in den Bildausschnitten kaum sichtbar, aus diesem Grund wurde der EGFP-Kanal zusätzlich in Graustufen dargestellt. **A) – B)** Das FLAG-LST1.2345-EGFP-Fusionsprotein (grün) wurde transient in HeLa-Zellen überexprimiert. Die Transfektanten wurden fixiert und mittels Immunzytochemie gefärbt. Aktin wurde mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin (1:1000, rot) angefärbt. Tubulin wurde mit einem spezifischen Antikörper (WA-3, unverdünnt) und einem Cy5-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:50, blau) detektiert. Die Präparate wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. **C) – D)** HeLa-Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für FLAG-LST1.2345-DsRed2 (rot) und EGFP-Tubulin (grün) koftransfiziert. Die Transfektanten wurden mittels Lebendzell-konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. **E)** HeLa-Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für FLAG-LST1.2345 und EGFP-Tubulin (grün) koftransfiziert. Die Transfektanten wurden mit dem lipophilen Farbstoff Dil gefärbt (rot), dieser wurde direkt ins Medium gegeben (10 µl Dil in 2 ml Medium) bevor die Zellen mittels Lebendzell-konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht wurden.

Die Kotransfektanten, die das EGFP-Tubulin exprimierten, wiesen die charakteristischen LST1-induzierten morphologischen Veränderungen auf (exemplarisch gezeigt in Abb. 35E). Die Färbung der Zellen mit Dil ermöglichte es feine Strukturen zu erkennen, die Transfektanten waren durch Fortsätze unterschiedlichen Durchmessers verbunden. In den Fortsätzen größeren Durchmessers konnte EGFP-Tubulin nachgewiesen werden (Abb. 35E, Vergrößerungsbilder links, Länge: 30 - 32  $\mu\text{m}$ ), während die Fortsätze mit geringem Durchmesser das Fusionsprotein nicht enthielten (Abb. 35E, Vergrößerungsbilder rechts, Länge: 33  $\mu\text{m}$ ). Letztere konnten gelegentlich in verzweigter Form beobachtet werden, wodurch ein Fortsatz in der Lage war drei Zellen miteinander zu verbinden (Abb. 35E, Vergrößerungsbilder rechts). Eine solche Struktur wurde bereits bei TNT zwischen Zellen einer Maus-Makrophagenlinie dokumentiert (Onfelt et al. 2004).

Die Charakterisierung von LST1-induzierten Fortsätzen, die den beiden von Onfelt et al. beschriebenen TNT-Klassen (dick/dünn) entsprechen, bestätigt die bisherigen Hinweise die darauf deuteten, dass es sich bei diesen Fortsätzen um TNT handelt.

In den im Abschnitt 6.4.2 beschriebenen Versuchen wurden die LST1-induzierten Fortsätze charakterisiert. Dabei wurden sämtliche Eigenschaften untersucht, die auch zur Beschreibung von TNT bisher herangezogen wurden. Abgesehen von den offensichtlichen Ähnlichkeiten hinsichtlich Länge und Durchmesser, wiesen die LST1-induzierten Fortsätze sämtliche Charakteristika der TNT auf: Sie waren anfällig für mechanischen Stress, zeigten mit zunehmender Länge eine deutliche Verkrümmung, bzw. Verzweigung, verbanden meistens zwei bis drei Zellen miteinander, waren Aktin-reich und konnten je nach Durchmesser und Tubulin-Gehalt in zwei strukturell unterschiedliche Klassen eingeordnet werden. Diese Ergebnisse können nur zur Schlussfolgerung führen, dass die Überexpression von transmembranem LST1 die Bildung von TNT induziert.

### **6.4.3 LST1 induziert die Bildung von funktionellen TNT**

Im vorigen Abschnitt konnte nachgewiesen werden, dass die von LST1 induzierten Fortsätze alle bisher beschriebenen Charakteristika der TNT aufwiesen. In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob die LST1-induzierten TNT funktionell waren und den interzellulären Transport zwischen entfernten Zellen vermitteln konnten.

Um die Funktionalität der LST1-induzierten TNT zu überprüfen, wurde deren Fähigkeit untersucht, einen löslichen Farbstoff zwischen verbundenen Zellen zu übertragen. Ein solcher Versuchsansatz wurde schon von Watkins und Salter 2005 verwendet, um die Funktionalität von TNT in THP-1-Zellen zu analysieren. Den THP-1-Zellen wurde ein Gemisch aus unlöslichem Dextran (mit dem Farbstoff Texas Red gekoppelt) und dem löslichen Farbstoff Lucifer Yellow mikroinjiziert. Nach einer Minute konnte beobachtet werden, dass das Lucifer Yellow auf mehrere Nachbarzellen übertragen wurde, während das Dextran nicht übertragen wurde (Watkins und Salter 2005).

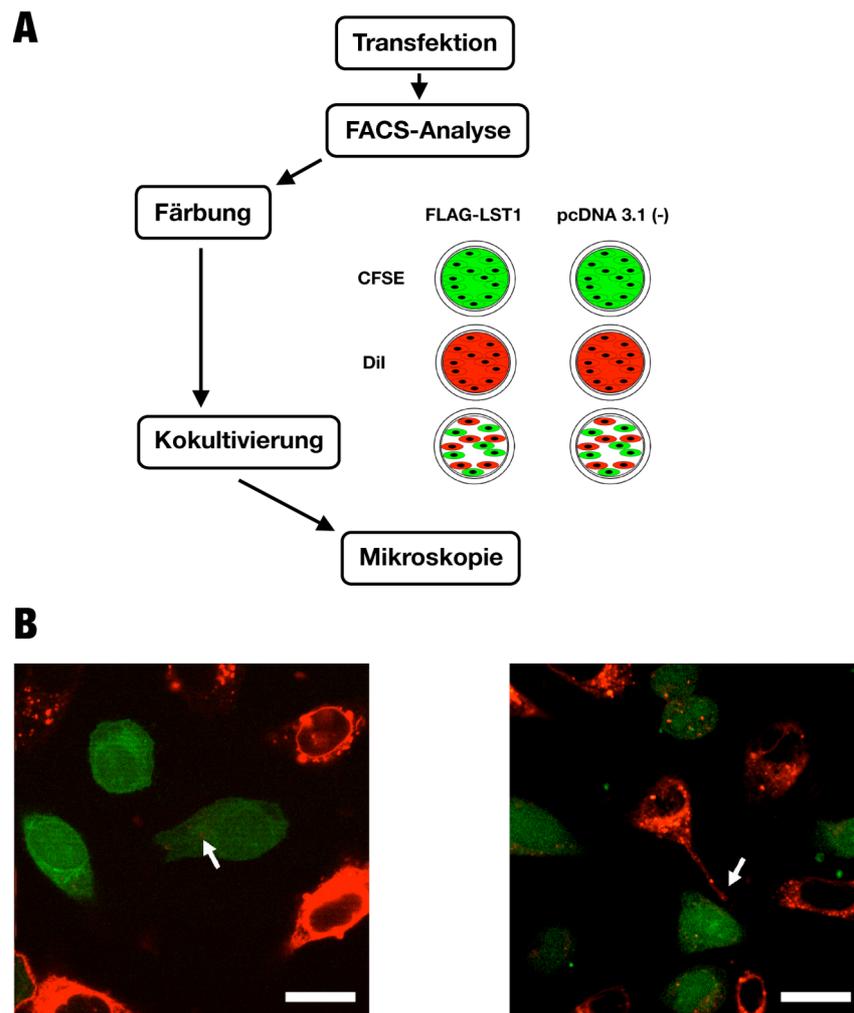
In Zusammenarbeit mit dem BiImaging-Zentrum der LMU München wurde ein ähnlicher Versuchsansatz entworfen und durchgeführt. HeLa-Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor für das FLAG-LST1.2345-EGFP-Fusionsprotein transfiziert. Den Transfektanten wurde Lucifer Yellow (4 % w/v in PBS) mikroinjiziert und die Lokalisation des

Farbstoffes wurde mittels Lebendzell-Fluoreszenzvideomikroskopie untersucht. In drei unabhängigen Versuchen wurde zwar vereinzelt eine Übertragung des Farbstoffes auf benachbarte Transfektanten beobachtet, dieser Effekt war jedoch nicht reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Es wurde postuliert, dass das C-terminal fusionierte EGFP-Protein die Funktionalität der LST1-induzierten TNT beeinträchtigen könnte. Aus diesem Grund wurde der Mikroinjektionsversuch mit FLAG-LST1.2345-Transfektanten wiederholt. Da bei diesem Versuchsansatz die transfizierten Zellen nicht erkennbar waren, musste ihre Farbstoffübertragungsrate mit der von Leervektor-Transfektanten verglichen werden. In 4 unabhängigen Versuchen konnte zwar zweimal eine erhöhte Farbstoffübertragungsrate bei den FLAG-LST1-Transfektanten festgestellt werden, dieser Effekt war jedoch nicht reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Aus den Ergebnissen dieser Versuche wurde gefolgert, dass der mechanische Stress der Mikroinjektion zum Brechen der meisten LST1-induzierten TNT geführt hat. Trotz mehrerer Anläufe ist es leider nicht gelungen, den durch die Mikroinjektion verursachten mechanischen Stress zu reduzieren. Aus diesem Grund wurde entschieden, dass die beschriebenen Versuchsansätze nicht zur Untersuchung der Funktionalität von TNT geeignet waren.

Bei der Erstbeschreibung der TNT, wurde der interzelluläre Transport von Organellen, bzw. Vesikeln durch differentielle Färbung mit den lipophilen Farbstoffen DiO, bzw. Dil und anschließende Kokultivierung der gefärbten Zellen, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die kokultivierten Zellen gefärbte Organellen, bzw. Vesikel über TNT austauschen (Rustom et al. 2004). Dieser Versuchsansatz wurde in abgewandelter Form verwendet um die Funktionalität der LST1-induzierten TNT zu untersuchen. HeLa-Zellen wurden, entweder mit dem Leervektor pcDNA 3.1 (-), oder mit dem Expressionsvektor für FLAG-LST1.2345' transient transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wurde mittels FACS-Analyse überprüft. Die Transfektanten wurden mit den Farbstoffen CFSE, bzw. Dil gefärbt. Der Farbstoff CFSE wird passiv über die Membran aufgenommen und verteilt sich über die gesamte Zelle, während Dil zunächst in die Membran eingebaut wird und nach etwa einer Stunde größtenteils in endosomalen und lysosomalen Vesikeln zu finden ist. Die CFSE-, bzw. Dil-gefärbten LST1-Transfektanten wurden kokultiviert, in einem Parallelansatz wurden die differentieell gefärbten Leervektor-Transfektanten ebenfalls kokultiviert. Die Kokultivierungsansätze wurden nach 6 h fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (für eine Übersicht des Versuchsaufbaus siehe Abb. 36A). Die Auswertung der Mikroskopie zeigte, dass sowohl beim Ansatz mit den Leervektor-Transfektanten, wie beim Ansatz mit den LST1-Transfektanten, Dil-gefärbte Vesikel in den CFSE-gefärbten Zellen beobachtet werden konnten (exemplarisch gezeigt in Abb. 36B). Der Prozentsatz der CFSE-gefärbten Zellen, die Dil-gefärbte Vesikel enthielten, wurde durch Auswertung der Mikroskopieaufnahmen ermittelt.

Die Ergebnisse aus 5 unabhängigen Versuchen wurden zusammengefasst (Abb. 37), in den Kokultivierungsansätzen mit den LST1-Transfektanten zeigten 74,7 % der untersuchten Zellen einen Transfer von Dil-gefärbten Vesikeln (Standardabweichung = 1,4 %; 556 untersuchte Zellen [n = 556]). In den Ansätzen mit den Leervektor-Transfektanten zeigten deutlich weniger Zellen eine Übertragung der gefärbten Vesikel (53,4 %; Standardabweichung = 4,6 %; n = 550). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die Überexpression von LST1 zu einer signifikanten Zunahme ( $p = 0,0079$ ; Mann-Whitney-Test) des TNT-vermittelten Vesikeltransfers führt.

Die Aktinpolymerisation spielt bei der Bildung von TNT eine zentrale Rolle, ihre Hemmung führt zur Blockade des TNT-vermittelten Vesikeltransfers (Rustom et al. 2004).

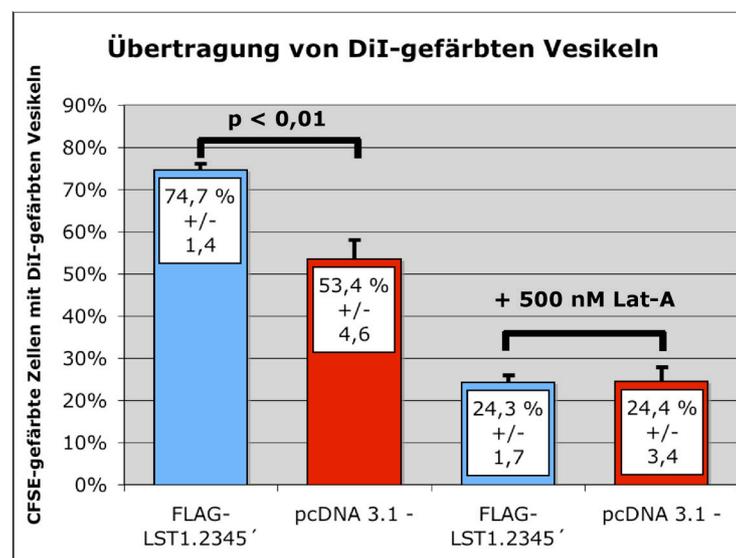


**Abbildung 36: LST1 induziert die Bildung von funktionellen TNT.** **A)** Übersicht über den Kokultivierungsversuch. HeLa-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für FLAG-LST1.2345' oder dem Leervektor pcDNA 3.1 (-) transient transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels FACS-Analyse ermittelt. Für die extrazelluläre Färbung wurden der FLAG-M2-Antikörper (1:200) und ein Cy2-gekoppelter anti-Maus-Antikörper (1:50) verwendet. Der Kokultivierungsversuch wurde nur durchgeführt, wenn die Transfektionseffizienz mindestens 60 % betrug. Bei erfolgreichen Transfektionen, lag die Effizienz zwischen 68 und 77 %. Die Transfektanten wurden, wie unter 5.2.10 beschrieben, mit CFSE, bzw. Dil gefärbt und für eine Stunde im Begasungsbrutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen abtrypsiniert, gezählt und in die Kokultivierungsansätze eingesetzt. Es wurden je  $1 \times 10^5$  CFSE-, bzw. Dil-gefärbte LST1-Transfektanten gemischt und in einer 6-Loch-Platte auf einem Poly-Lysin-beschichteten Deckgläschen kokultiviert. In einem Parallelansatz wurden differentiell gefärbte Leervektor-Transfektanten kokultiviert. Die Ansätze wurden 6 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit, wie unter 5.2.8 beschrieben, fixiert und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es wurden pro Versuchsansatz mindestens 100 CFSE-gefärbte Zellen im grünen (CFSE) und roten (Dil) Kanal aufgenommen. Anhand der Überlagerungsbilder beider Kanäle, konnte der Anteil der CFSE-Zellen, die Dil-gefärbte Vesikel enthielten, in Prozent ermittelt werden. Die Auswertung wurde von zwei unabhängigen Personen (I. Rohwedder und C. Schiller) durchgeführt, die resultierenden Werte wurden gemittelt. **B)** Fixierte Präparate aus dem Kokultivierungsversuch wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Im Kokultivierungsansatz mit den Leervektor-Transfektanten konnten Dil-gefärbte Vesikel in CFSE-gefärbten Zellen beobachtet werden (linkes Bild, Pfeil). Im Kokultivierungsansatz mit den LST1-Transfektanten konnten ebenfalls Dil-gefärbte Vesikel in CFSE-gefärbten Zellen beobachtet werden, zusätzlich konnten Vesikel-enhaltende TNT nachgewiesen werden, diese waren aber meistens durch die Fixierung beschädigt worden (rechtes Bild, Pfeil). Gezeigt sind überlagerte Maximumintensitätsprojektionen von ausgewählten, konfokalen z-Schnitten, die Substratebene wurde nicht einbezogen. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

Um sicherzustellen, dass die LST1-induzierten TNT tatsächlich den Transfer von gefärbten Vesikeln vermittelten wurden Kokultivierungsansätze, wie bereits beschrieben, angesetzt. Nach einstündiger Inkubation wurden die Zellen mit dem Inhibitor der Aktinpolymerisation Latrunculin-A (500 nM in Kulturmedium) behandelt und nach weiteren 5 h fixiert. Die Auswertung erfolgte wie bereits beschrieben.

Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen wurden zusammengefasst (Abb. 37). Die Behandlung mit Latrunculin-A führte, sowohl in den Ansätzen mit den LST1-Transfektanten (24,3 %; Standardabweichung = 1,7 %; n = 335), als auch in den Ansätzen mit den Leervektor-Transfektanten (24,4 %; Standardabweichung = 3,4 %; n = 333) zu einer deutlichen Reduktion des Vesikeltransfers. Weiterhin wurde durch die Latrunculin-A-Behandlung der Effekt der LST1-Überexpression auf den Vesikeltransfer komplett aufgehoben. Dies legt den Schluss nahe, dass die erhöhte Vesikeltransfertrate der LST1-Transfektanten, tatsächlich auf die Bildung von TNT zurückzuführen ist.

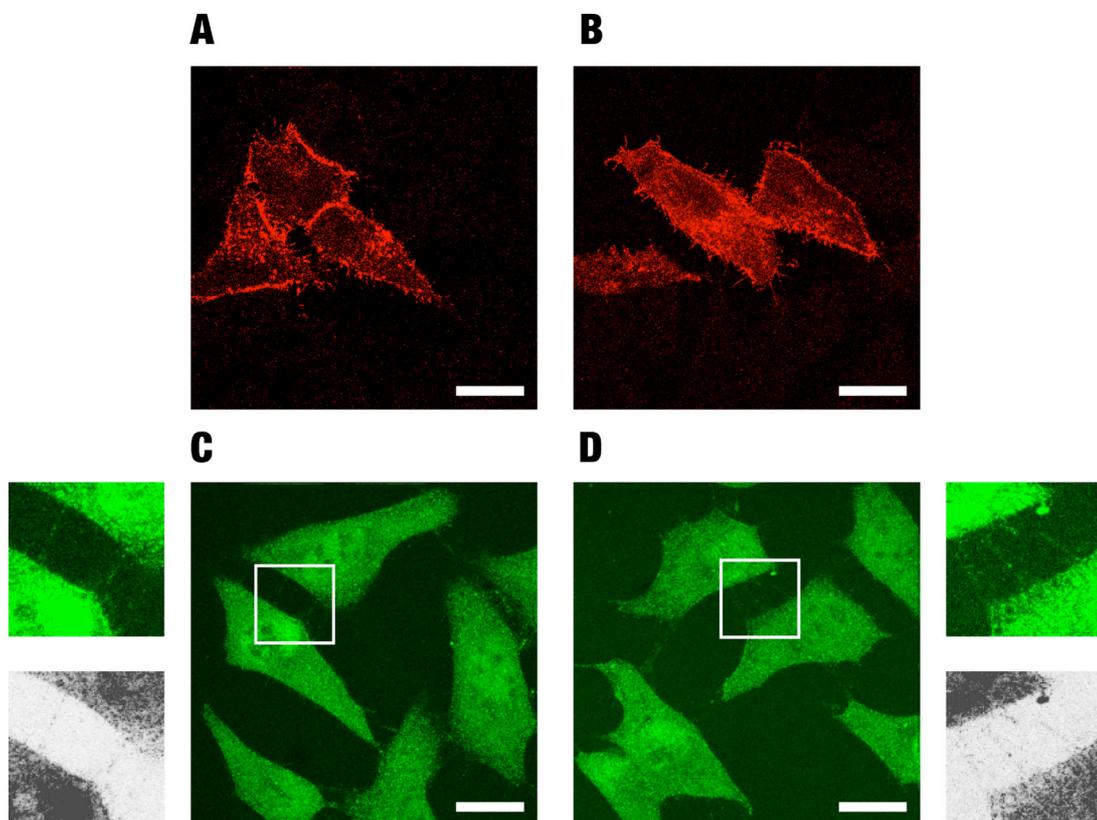
Bei der Quantifizierung des Vesikeltransports wurden im Ansatz mit den Leervektor-Transfektanten und in beiden Latrunculin-A-behandelten Ansätzen ähnliche Transferraten wie bei der Untersuchung von Rustom et al. festgestellt. In jener Arbeit wurde bei unbehandelten PC12-Zellen eine Transferrate von 54,5 % festgestellt, während bei Latrunculin-behandelten Zellen eine Rate von 29,5 % ermittelt wurde. Dies legt den Schluss nahe, dass HeLa-Zellen in der Lage sind TNT auszubilden und, dass die LST1-Überexpression zur verstärkten Bildung dieser Strukturen führt.



**Abbildung 37: LST1 induziert den TNT-vermittelten, interzellulären Vesikeltransfer.** Gezeigt ist, als Maß für den TNT-vermittelten Vesikeltransport, der Anteil der CFSE-gefärbten Zellen, die DiI-gefärbte Vesikel enthielten (in Prozent). Die Durchschnittswerte +/- der Standardabweichung sind innerhalb der Säulen angegeben. Die Kokultivierungsversuche wurden, wie in der Abb. 36 beschrieben, durchgeführt. Die Behandlung mit Latrunculin-A erfolgte nach einstündiger Inkubation, dabei wurde das Kulturmedium auf 500 nM Latrunculin-A eingestellt und die Zellen für weitere 5 h im Brutschrank inkubiert. In den Kokultivierungsansätzen mit den LST1-Transfektanten (5 unabhängige Versuche [N = 5]; 556 Zellen ausgewertet [n = 556]), konnte eine signifikant höhere ( $p = 0,0079$ ; Mann-Whitney-Test; die statistische Auswertung wurde, wie unter 5.4.11 beschrieben, durchgeführt) Vesikeltransfertrate, als in den Ansätzen mit den Leervektor-Transfektanten (N = 5; n = 550), festgestellt werden. Die Behandlung der Zellen mit Latrunculin-A (Lat-A) führte, sowohl im Ansatz mit den LST1-Transfektanten (N = 3; n = 335), als auch im Ansatz mit den Leervektor-Transfektanten (N = 3; n = 333) zu einer deutlichen Verringerung des Vesikeltransfers.

### 6.4.4 Nachweis von endogenem LST1 in TNT

In den bisherigen Versuchen war rekombinantes, transmembranes LST1 stets in den induzierten TNT der Transfektanten angereichert. Aus den Ergebnissen der Untersuchung des TNT-vermittelten Vesikelaustausches wurde gefolgert, dass HeLa-Zellen TNT ausbilden und die LST1-Überexpression zur verstärkten Bildung dieser Strukturen führt. Diese beiden Befunde warfen die Frage auf ob, endogenes LST1 in TNT nachgewiesen werden kann. Zur Detektion von endogenem LST1 wurde der LST1-2B1-Antikörper verwendet, dieser wurde von Ina Rohwedder für den Einsatz in der Immunzytochemie ausgetestet (Rohwedder 2008). Der 2B1-Antikörper konnte rekombinantes LST1.2345 an der Plasmamembran und in der perinukleären Region von Transfektanten nachweisen (Abb. 38A - B). Bei der Charakterisierung der monoklonalen Antikörper wurde zudem festgestellt, dass der 2B1-Hybridomüberstand endogenes LST1.2345 aus dem Lysat von U-937-Zellen präzipitieren kann (siehe Abb. 22).



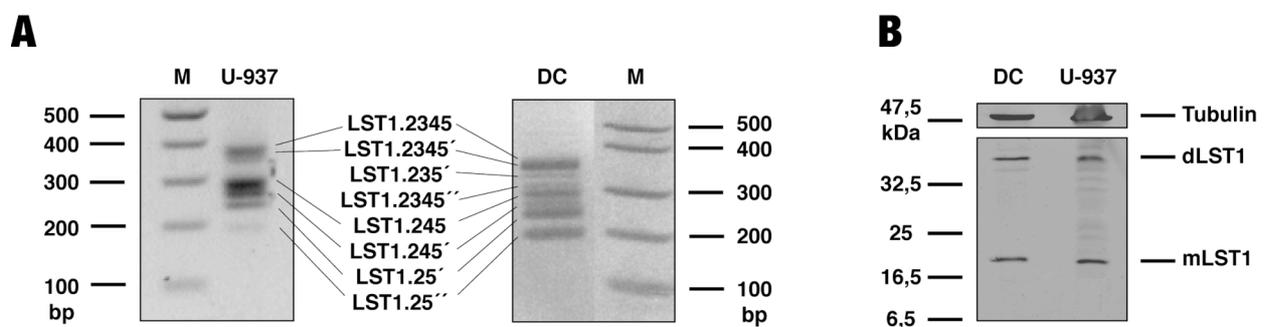
**Abbildung 38: Zelluläre Lokalisation von rekombinantem und endogenem LST1.** Gezeigt sind Maximumintensitätsprojektionen von ausgewählten, konfokalen z-Schnitten, die Substratebene wurde nicht einbezogen. Maßstab: 20 µm. **A) – B)** HeLa-Zellen wurden transient mit dem LST1.2345-pIRES2-EGFP-Expressionsvektor transfiziert. Die Transfektanten wurden fixiert und mittels Immunzytochemie gefärbt. Das rekombinante LST1 wurde mit dem LST1-2B1-Hybridomüberstand (unverdünnt, Inkubation: 1h) und einem RPE-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (1:50, rot) detektiert. Für die Aufnahmen wurden Transfektanten ausgewählt, die EGFP-positiv waren (nicht gezeigt, Quelle: verändert nach Rohwedder 2008). **C) – D)** Endogenes LST1 wurde in HeLa-Zellen mittels Immunzytochemie angefärbt. Um die Intensität der Färbung zu erhöhen, wurden die Zellen, statt 1 h, über Nacht mit dem LST1-2B1-Hybridomüberstand (unverdünnt) inkubiert. Weiterhin wurde ein DTAF-gekoppelter anti-Ratte-Antikörper (1:50) für die Detektion verwendet, da das DTAF-Fluorochrom mit dem Laser des konfokalen Mikroskops effizienter als das RPE-Fluorochrom angeregt werden kann. Die Bildausschnitte sind vergrößert dargestellt, Helligkeit und Kontrast dieser Bilder wurden zur besseren Sichtbarkeit verändert. Das endogene LST1 ist in den Bildausschnitten kaum sichtbar, aus diesem Grund wurde der DTAF-Kanal zusätzlich in Graustufen dargestellt.

Die Detektion von endogenem LST1 in HeLa-Zellen zeigte eine unerwartete subzelluläre Verteilung des transmembranen Proteins. Das endogene LST1 war im Zellkern und Zytoplasma gleichmäßig verteilt, während an der Plasmamembran keine Anreicherung festgestellt werden konnte (Abb. 38C – D). Einige der angefärbten Zellen waren durch einen oder mehrere TNT verbunden, diese enthielten endogenes LST1 und wiesen, wie schon in vorhergehenden Versuchen beobachtet, punktuelle Verdickungen auf (Abb. 38C – D). Um auszuschließen, dass die beobachtete Färbung durch unspezifische Bindung des verwendeten Antikörpers zustande kam, wurden in einem Parallelansatz HeLa-Zellen mit einem Isotyp-Kontrollüberstand (anti-RMC 16D2) gefärbt (keine nachweisbare Färbung, nicht gezeigt).

## 6.5 Charakterisierung der LST1-Proteinexpression

### 6.5.1 Regulation der LST1-Proteinexpression

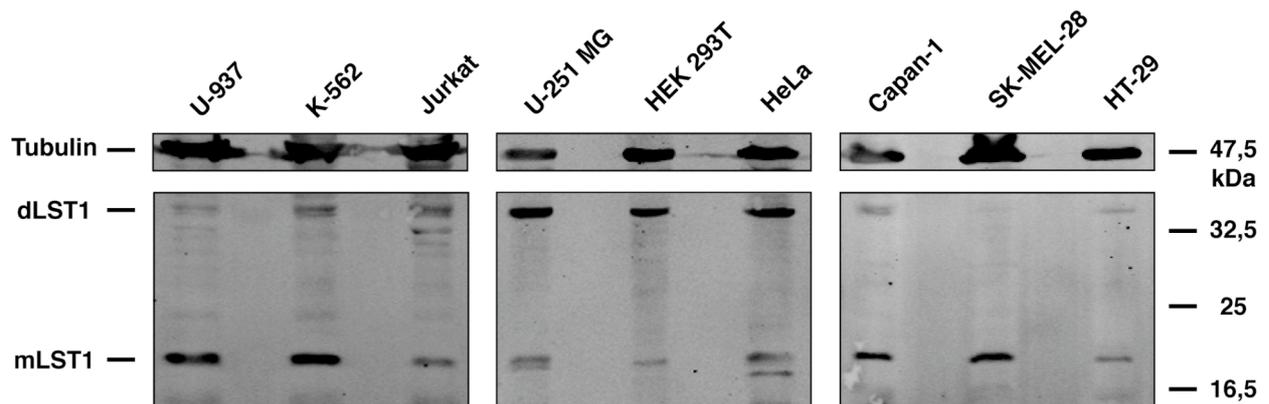
Die Charakterisierung des monoklonalen LST1-7E2-Antikörpers erlaubte einen ersten Einblick in die Proteinexpression von LST1. In den untersuchten Lysaten konnte nur die Volle-Länge transmembrane LST1.2345-Isoform mittels Western-Analyse nachgewiesen werden (siehe Abb. 18). Dieser überraschende Befund wurde nun näher untersucht. Zunächst wurde die LST1-Proteinexpression mit der Transkriptexpression in unreifen DC und U-937-Zellen verglichen. Aus Gesamt-RNS dieser Zellen wurden *LST1*-Transkripte mittels RT-PCR amplifiziert und auf Agarosegelen aufgetrennt (siehe 6.1.1, bzw. Hirner 2004). Die aufgetrennten Amplifikate konnten 6 (U-937), bzw. 8 (unreife DC) verschiedenen Spleißvarianten zugeordnet werden (Abb. 39A). Zum Vergleich wurde die LST1-Proteinexpression in Lysaten von unreifen DC und U-937-Zellen mittels Western-Analyse, unter Verwendung des LST1-7E2-Antikörpers, untersucht. In beiden Zelltypen konnte ausschließlich die Volle-Länge transmembrane LST1.2345-Isoform als Monomer und potentielles Homodimer nachgewiesen werden (Abb. 39B). Das berechnete und beobachtete Molekulargewicht dieser Isoform kann der Tab. 3 auf S. 79 entnommen werden. Dieser Befund steht im Widerspruch zu der Vielzahl an Spleißvarianten, die aus der Gesamt-RNS der beiden Zelltypen amplifiziert werden konnten. So kodieren die 8 in unreifen DC nachgewiesenen alternativen Transkripte mindestens 5 Isoformen, die vom 7E2-Antikörper erkannt werden können (siehe 6.2.3.2).



**Abbildung 39. A) *LST1*-Transkriptexpression.** *LST1*-Transkripte wurden aus der Gesamt-RNS von U-937-Zellen, wie in der Abb. 10 beschrieben, amplifiziert und aufgetrennt (linkes Bild). Die Amplifikation und Auftrennung von *LST1*-Transkripten aus der Gesamt-RNS von unreifen DC erfolgte, wie von H. Hirner beschrieben (rechtes Bild, Quelle: verändert nach Hirner 2004). Die, anhand der Größe, identifizierten Spleißvarianten sind zwischen den beiden Bildern aufgelistet. Die Größen der Markerfragmente (M) sind in Basenpaaren angegeben. **B) *LST1*-Proteinexpression.** Auf ein 15 %-iges Polyacrylamidgel wurden Lysate von je  $1 \times 10^6$  unreifen DC und U-937-Zellen aufgetragen. Die unreifen DC wurden von S. Spranger (Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München), wie unter 5.2.13 beschrieben, generiert. Die Fluoreszenzdetektion der Western-Membran erfolgte mit dem 7E2-Hybridomüberstand (1:10) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (1:10000). Nach der Detektion wurde die Membran gestrippt und mit dem WA-3-Tubulin-Antikörper (1:100) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000) nachdetektiert (oberes Bild). Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind links markiert. Die Positionen von Tubulin und von endogenem LST1.2345 in seiner monomeren (mLST1) und dimeren Form (dLST1) sind rechts angegeben.

Der Vergleich der Transkript- und Proteinexpression lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass die LST1-Proteinexpression einer stringenten Regulation unterliegt.

Um die LST1-Proteinexpression in einem breiteren Kontext zu untersuchen, wurde diese bei einer Vielzahl von Zellen mittels Western-Analyse charakterisiert. In den Lysaten aller untersuchten Zelllinien konnte, wie im vorherigen Versuch, ausschließlich die LST1.2345-Isoform als Monomer und als mögliches Homodimer nachgewiesen werden (Abb. 40). Das LST1-Monomer wurde im Lysat der HeLa- und U-251 MG-Zellen als Doppelbande detektiert. In sämtlichen untersuchten Zelllinien konnte eine vergleichbare LST1-Proteinexpression beobachtet werden. In den Zellen hämatopoetischen Ursprungs (U-937, K-562 und Jurkat) wurde keine erhöhte Proteinmenge festgestellt (Abb. 40). Diese Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche.



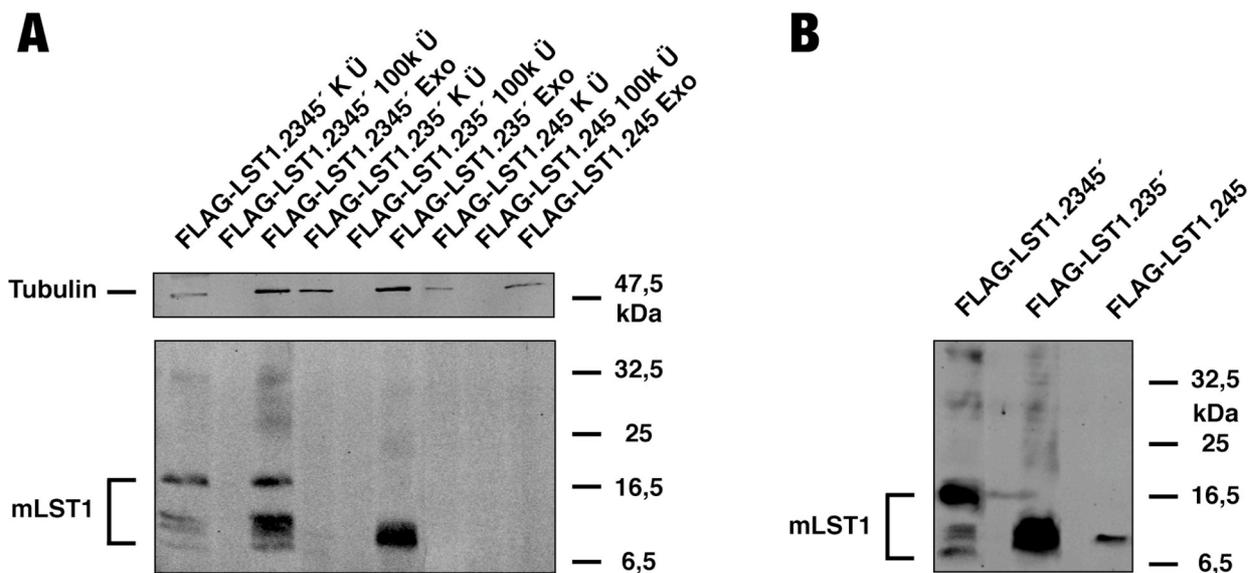
**Abbildung 40: LST1-Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien.** Auf 15 %-ige Polyacrylamidgele wurden Lysate von je  $1 \times 10^6$  Zellen aufgetragen. Die Fluoreszenzdetektion der Western-Membranen erfolgte mit dem 7E2-Hybridomüberstand (1:10) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (1:10000). Nach der Detektion wurden die Membranen gestrippt und mit dem WA-3-Tubulin-Antikörper (1:100) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000) nachdetektiert (obere Bilder). Die Positionen von Tubulin und von endogenem LST1 in seiner monomeren (mLST1) und dimeren Form (dLST1) sind links angegeben. Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind rechts markiert.

Die festgestellte, ubiquitäre LST1-Proteinexpression steht im Widerspruch zu den vorhandenen mRNS-Expressionsdaten. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *LST1*-Transkripte stärker in Immunzellen exprimiert werden und die Anzahl der nachweisbaren Spleißvarianten höher ist als in Zellen nicht-lymphoiden Ursprungs (de Baey et al. 1997). Weiterhin wurde in der Abb. 39A gezeigt, dass aus Gesamt-RNS der U-937-Zelllinie mindestens 6 verschiedene LST1-Spleißvarianten sichtbar amplifiziert werden konnten. Die Auftrennung der RT-PCR-Produkte zeigte, dass die stärksten Fragmente den Spleißvarianten LST1.245 und LST1.245' zugeordnet werden konnten (Abb. 39A). Diese Transkripte kodieren lösliche Proteine, die vom LST1-7E2-Antikörper erkannt werden können (siehe 6.2.3.2). In den Lysaten der bislang untersuchten Zellen konnten die löslichen Isoformen LST1.245/5' allerdings nicht detektiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass diese löslichen Isoformen sezerniert werden, ein entsprechendes Signalpeptid besitzen diese Proteine jedoch nicht. Es ist aber eine wachsende Zahl von Proteinen bekannt, die auch ohne ein solches Signalpeptid sezerniert werden können (Prudovsky et al. 2008). Aus diesem Grund wurde als Nächstes untersucht, ob die löslichen LST1.245/5'-Isoformen sezerniert werden.

Um eine mögliche Sekretion der LST1-Isoformen nachzuweisen, wurden die Kulturüberstände von HEK 293T-Transfektanten untersucht. Diese wurden jeweils mit den Expressionsvektoren für FLAG-LST1.2345', FLAG-LST1.235' und FLAG-LST1.245 transient transfiziert. Die Kulturüberstände der Transfektanten wurden mittels Western-Analyse auf das Vorhandensein der rekombinanten FLAG-LST1-Proteine untersucht.

Das lösliche FLAG-LST1.245-Protein konnte im Kulturüberstand nicht nachgewiesen werden, die transmembranen Proteine FLAG-LST1.2345' und FLAG-LST1.235' wurden jedoch deutlich im Überstand detektiert (nicht gezeigt). Der Nachweis der transmembranen FLAG-LST1-Proteine im Kulturüberstand warf die Frage auf, wie diese sezerniert wurden. Um dies zu untersuchen wurden HEK 293T-Zellen, wie oben beschrieben, transfiziert und die Kulturüberstände wurden abgenommen. Exosomen wurden mittels differentieller Zentrifugation (wie unter 5.2.11 beschrieben) aus den Überständen isoliert und mittels Western-Analyse, unter Verwendung des FLAG-Antikörpers, untersucht.

Das rekombinante, lösliche FLAG-LST1.245-Protein konnte weder im Kulturüberstand, noch in den Exosomen, bzw. im Überstand der Exosomenfraktion (100000 g-Überstand) nachgewiesen werden (Abb. 41A, Spuren 7 - 9). Im Kulturüberstand der FLAG-LST1.2345'-Transfektanten wurde das rekombinante Protein inklusive mehrerer Abbauprodukte eindeutig nachgewiesen (Abb. 41A, Spur 1). In der Exosomenfraktion konnten diese Proteine deutlicher detektiert werden (Abb. 41A, Spur 3). Im Gegensatz dazu wurden im 100000 g-Überstand keine Proteine nachgewiesen (Abb. 41A, Spur 2). Ähnliche Beobachtungen wurden bei den Proben der FLAG-LST1.235'-Transfektanten gemacht, das rekombinante Protein konnte im Kulturüberstand schwach und in der Exosomenfraktion deutlich stärker nachgewiesen werden (Abb. 41A, Spuren 4 und 6).



**Abbildung 41. A) Ausschleusung von rekombinantem LST1.** In je ein Loch einer 6-Loch-Platte wurden HEK 293T-Zellen mit den Expressionsvektoren für FLAG-LST1.2345', FLAG-LST1.235' und FLAG-LST1.245 transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium durch FCS-freies Medium ausgetauscht und die Transfektanten für weitere 24 h kultiviert. Aus dem Kulturüberstand wurden Exosomen mittels differentieller Zentrifugation isoliert. Auf ein 15 %-iges Polyacrylamidgel wurden 20 µl vom Kulturüberstand (K Ü) direkt aufgetragen, weiterhin wurden 20 µl vom 100000 g-Überstand (100k Ü) und die in Auftragspuffer gelösten Exosomen (Exo) aufgetragen. Die Fluoreszenzdetektion der Western-Membran erfolgte mit dem FLAG-M2-Antikörper (1:1000) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000). Nach der Detektion wurde die Membran gestrippt und mit dem WA-3-Tubulin-Antikörper (1:100) und dem IRDye800CW-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000) nachdetektiert (oberes Bild). Die Positionen von Tubulin und von rekombinantem LST1 in der monomeren Form (mLST1) sind links angegeben. Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind markiert (A und B). **B) Nachweis der Expression von rekombinantem LST1.** Auf ein 15 %-iges Polyacrylamidgel wurden Lysate von je  $1 \times 10^6$  HEK 293T-Transfektanten aufgetragen. Die Fluoreszenzdetektion der Western-Membranen erfolgte wie unter A) beschrieben. Die Positionen der rekombinanten LST1-Isoformen in der monomeren Form (mLST1) sind links angegeben.

Das berechnete und beobachtete Molekulargewicht der rekombinanten LST1-Isoformen kann der Tab. 3 auf S. 79 entnommen werden. In einer früheren Untersuchung wurde das Vorhandensein von Tubulin in Exosomen beschrieben (Wubbolts et al. 2003). Um sicherzustellen, dass in den Exosomenfraktionen tatsächlich Exosomen vorhanden waren, wurde Tubulin auf der Western-Membran nachdetektiert (Abb. 41A, oberes Bild). Weiterhin konnte durch Western-Analyse von Lysaten der HEK 293T-Transfektanten sichergestellt werden, dass die rekombinanten Proteine tatsächlich exprimiert wurden (Abb. 41B). Diese Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

Der Nachweis der transmembranen FLAG-LST1-Isoformen im Kulturüberstand der Transfektanten war insofern unerwartet als aufgrund der LST1-Proteinexpressionsdaten (siehe Abb. 39 und 40) eher eine Sekretion des löslichen FLAG-LST1.245-Proteins vermutet wurde. Die Tatsache, dass die transmembranen FLAG-LST1-Isoformen in der Exosomenfraktion viel deutlicher als im Überstand detektiert werden konnten, zeigt, dass diese Isoformen in Exosomen ausgeschleust wurden. In einem weiteren Versuch konnte nachgewiesen werden, dass die transmembranen LST1-Isoformen unabhängig von der Position des FLAG-Etiketts (N- oder C-terminal) in Exosomen ausgeschleust werden (nicht gezeigt).

Der in der Abb. 41A gezeigte Versuch wurde mit HeLa-Transfektanten wiederholt, es konnten jedoch keine rekombinanten Proteine im Überstand oder in den Exosomen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auch konnte keine stärkere Ausschleusung von Exosomen in den Transfektanten, die transmembranes FLAG-LST1 exprimierten, festgestellt werden (nicht gezeigt). Obwohl Exosomen aus dem Kulturüberstand der HeLa-Transfektanten isoliert wurden, kann allerdings formal nicht ausgeschlossen werden, dass der Nachweis der transmembranen LST1-Isoformen durch eine allgemein stärkere Ausschleusung von Exosomen in HEK 293T-Zellen zustande kam. Wahrscheinlicher erscheint es allerdings, dass der Nachweis der FLAG-LST1-Isoformen in den Exosomen auf die starke Überexpression in den HEK 293T-Zellen zurückzuführen ist. Diese exprimieren das große SV40-T-Antigen, was zur starken Replikation von transfizierten Plasmiden (mit SV40-Replikationsursprung) und somit zu einer starken Expression der kodierten Proteine führt.

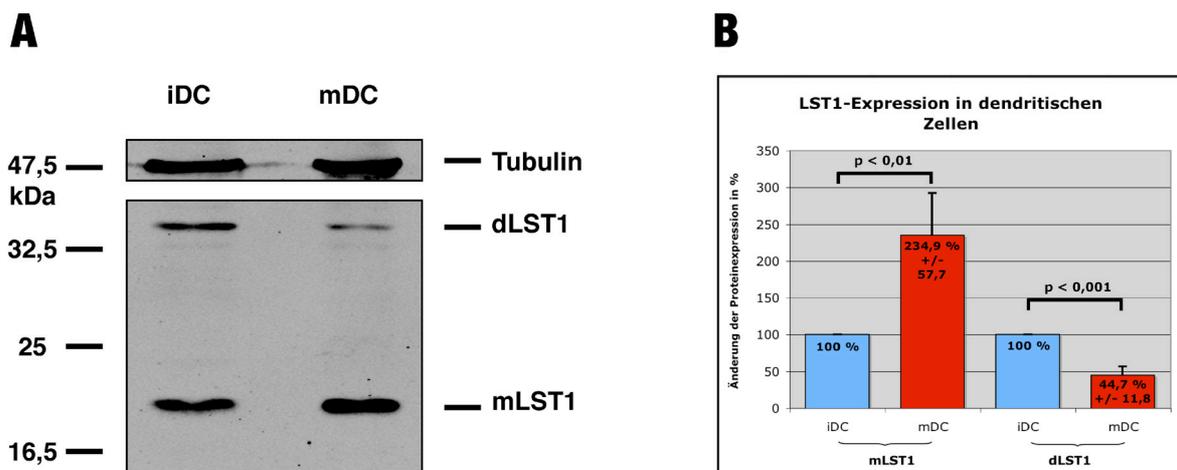
In weiteren Versuchen wurde überprüft, ob eine Sekretion von endogenem LST1 aus verschiedenen Zelllinien nachweisbar war. In konzentrierten Überständen (10 – 50-fach) und Exosomen aus den Zelllinien U-937, K-562, HEK 293T und HeLa konnte kein endogenes LST1 detektiert werden (nicht gezeigt).

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Ergebnisse, konnte eine effiziente Sekretion von endogenem LST1.245/5' als Grund für die fehlende Detektion dieser Isoformen in den Lysaten verschiedener Zelllinien ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass bei mehr als 10 transienten Transfektionen (mit den Zelllinien HEK 293T und HeLa), das lösliche FLAG-LST1.245-Protein stets schwächer exprimiert wurde als die transmembranen FLAG-LST1-Isoformen (siehe Abb. 41B).

Basierend auf den vorhandenen Erkenntnissen kann also postuliert werden, dass die löslichen LST1.245/5'-Isoformen einer strengen translationellen oder posttranslationellen Regulation unterliegen, diese könnte für die relativ geringe Menge an rekombinantem Protein und für die komplette Suppression des endogenen Proteins verantwortlich sein.

### 6.5.2 LST1-Proteinexpression in DC

In einer früheren Untersuchung wurde festgestellt, dass die Reifung von DC mit einer Veränderung des Spleißmusters von LST1 einhergeht (Hirner 2004). Während der Reifung wird die Expression einer Vielzahl von Proteinen, wie z.B. kostimulatorische Moleküle und Adhäsionsmoleküle, hochreguliert. Um zu untersuchen, ob sich bei der Reifung auch die LST1-Proteinexpression verändert, wurde diese in Lysaten von unreifen und reifen DC analysiert. Dazu wurden quantitative Western-Analysen dieser Lysate durchgeführt, zur Detektion wurde der LST1-7E2-Antikörper verwendet. Wie schon bei den vorherigen Untersuchungen der LST1-Proteinexpression, konnte in den Lysaten der unreifen und reifen DC nur das Volle-Länge transmembrane LST1.2345 in der monomeren Form und als potentielles Homodimer nachgewiesen werden (Abb. 42A). Die Änderung des Spleißmusters bei der Reifung der DC führt also nicht zu einem veränderten Proteinexpressionsmuster. Die quantitative Auswertung der Western-Analyse zeigte, dass sich die Expression der einzigen nachweisbaren LST1-Isoform allerdings deutlich verändert. So konnte in reifen DC, im Vergleich zu unreifen DC, eine signifikant erhöhte Expression des monomeren LST1.2345 nachgewiesen werden (Abb. 42B, Erhöhung auf 234,9 %; Standardabweichung = 57,7;  $p = 0,0064$ ; t-Test). Die Expressionsänderung beim Dimer verhielt sich genau entgegengesetzt. In reifen DC wurde, im Vergleich zu unreifen DC, eine signifikant verringerte Proteinmenge detektiert (Abb. 42B, Abnahme auf 44,7 %; Standardabweichung = 11,8;  $p = 0,0005$ ; t-Test).



**Abbildung 42: LST1-Proteinexpression in DC. A) Western-Analyse der LST1-Expression.** Auf ein 15 %-iges Polyacrylamidgel wurden Lysate von je  $1 \times 10^6$  unreifen und reifen DC (iDC, bzw. mDC) aufgetragen. Die iDC und mDC wurden von S. Spranger (Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München) nach der Cocktail-6-Methode generiert. Die Fluoreszenzdetektion der Western-Membran erfolgte mit dem 7E2-Hybridomüberstand (1:10) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (1:10000). Nach der Detektion wurde die Membran gestrippt und mit dem WA-3-Tubulin-Antikörper (1:100) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000) nachdetektiert (oberes Bild). Die Positionen von Tubulin und von endogenem LST1.2345 in seiner monomeren (mLST1) und dimeren Form (dLST1) sind rechts angegeben. Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind links markiert. **B) Quantitative Auswertung der Western-Analysen.** Die LST1-Proteinexpression wurde in 5 Western-Analysen, wie unter 5.4.11 beschrieben, quantifiziert. Gezeigt ist die prozentuale Veränderung der LST1-Proteinexpression zwischen unreifen (iDC) und reifen DC (mDC). Die Durchschnittswerte +/- der Standardabweichung sind innerhalb der Säulen angegeben. Die statistische Auswertung wurde, wie unter 5.4.11 beschrieben, durchgeführt. Die Expression des monomeren LST1.2345 (mLST1) war in den mDC, im Vergleich zu den iDC, signifikant erhöht (234,9 % +/- 57,7;  $N = 5$ ;  $p = 0,0064$ ; t-Test.). Die Expression des dimeren LST1.2345 (dLST1) war in den mDC, im Vergleich zu den iDC, signifikant verringert (44,7 % +/- 11,8;  $N = 5$ ;  $p = 0,0005$ ; t-Test.).

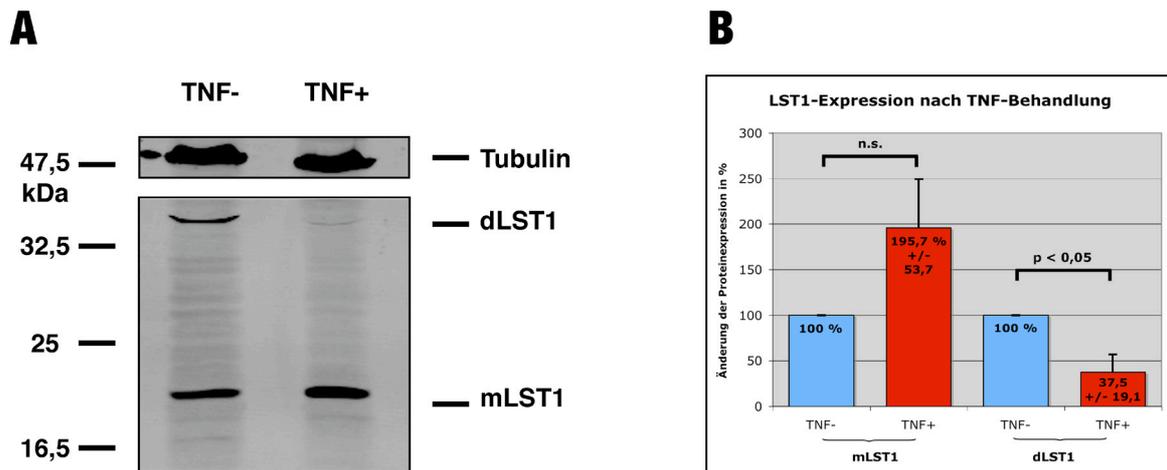
Die quantitative Auswertung wurde mit den Daten von 5 Western-Analysen durchgeführt. Die untersuchten DC wurden in zwei unabhängigen Ansätzen generiert. Die quantitative Analyse konnte keine signifikante Änderung der LST1-Gesamtexpression während der Reifung der DC nachweisen (nicht gezeigt). Die Verteilung der LST1-Proteinmenge auf die monomere und dimere Form, wurde durch die Reifung jedoch signifikant verändert (Abb. 42B). Die Reifung führte ungefähr zu einer Verdoppelung der Menge des monomeren LST1, bzw. zu einer Halbierung der LST1-Dimer-Menge. Dieser Befund deutet auf eine Regulation der LST1-Konformation, die durch die DC-Reifung induziert wurde, hin.

Als Nächstes wurde der Regulationsmechanismus, dem der beobachtete Effekt zugrunde liegt, näher untersucht. Für die Induktion der Regulation kamen zwei grundsätzliche Möglichkeiten in Frage. Einerseits könnte die Regulation direkt durch einen der proinflammatorischen Faktoren, die den unreifen DC zugegeben wurden, induziert worden sein. Andererseits könnte die, durch die Reifung ausgelöste, weitreichende Veränderung der Proteinexpression, sekundär zur Regulation von LST1 geführt haben.

Zur Generierung der reifen DC wurde von S. Spranger ein in der Arbeitsgruppe von Prof. Schendel (Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München) entwickeltes Verfahren angewendet (Cocktail-6-Methode). Dabei wurden die unreifen DC mit 6 verschiedenen proinflammatorischen Faktoren behandelt. Bei der klassischen Methode zur Induktion der Reifung werden die unreifen DC mit 4 unterschiedlichen Faktoren behandelt (Jonuleit et al. 1997). Reife DC, die mit dieser Methode generiert wurden, zeigten im Vergleich zu unreifen DC eine ähnliche Regulation der LST1-Konformation, wie sie im vorherigen Versuch beobachtet wurde (nicht gezeigt). Falls also die Regulation direkt durch einen der zugesetzten Faktoren induziert wird, muss es sich dabei um einen Faktor handeln, der bei beiden Methoden eingesetzt wird (IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, und TNF- $\alpha$ ). Von diesen proinflammatorischen Faktoren, hat TNF- $\alpha$  die stärkste regulatorische Wirkung auf Immunzellen, aus diesem Grund wurde zuerst untersucht ob TNF- $\alpha$  die Regulation der LST1-Konformation induziert.

Um die Wirkung von TNF- $\alpha$  unabhängig von den Effekten der DC-Reifung zu untersuchen, wurden bei diesem Versuch HeLa-Zellen verwendet. Diese wurden mit TNF- $\alpha$  behandelt, die LST1-Proteinexpression wurde mittels Western-Analyse untersucht. In den Lysaten der unbehandelten und behandelten Zellen konnte LST1.2345 als Monomer und Dimer detektiert werden (Abb. 43A). Wie schon bei den DC beobachtet, konnte keine signifikante Änderung der LST1-Gesamtexpression festgestellt werden (nicht gezeigt). Allerdings wurde in den behandelten Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, eine etwas höhere Expression des monomeren LST1 beobachtet, die jedoch wegen der starken Streuung der einzelnen Werte nicht signifikant war (Abb. 43B, Erhöhung auf 195,7 %; Standardabweichung = 53,7; p = 0,0910; t-Test). Ähnlich wie bei den DC, verhielt sich die Expressionsänderung beim Dimer genau entgegengesetzt. In den behandelten Zellen wurde, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, eine signifikant verringerte Proteinmenge detektiert (Abb. 43B, Abnahme auf 37,5 %; Standardabweichung = 19,1; p = 0,0299; t-Test). Die quantitative Auswertung wurde mit den Daten von 3 Western-Analysen durchgeführt. Die untersuchten Zellen stammten aus drei unabhängigen Behandlungen.

Die Behandlung der HeLa-Zellen mit TNF- $\alpha$  hatte in etwa den gleichen Effekt auf das Verhältnis zwischen monomeres und dimeres LST1, wie die Reifung der DC. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass TNF- $\alpha$  die Regulation der LST1-Konformation induziert.



**Abbildung 43: LST1-Proteinexpression nach Behandlung mit TNF- $\alpha$ .** **A) Western-Analyse der LST1-Expression.** Auf ein 15 %-iges Polyacrylamidgel wurden Lysate von je  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen aufgetragen. Die HeLa-Zellen wurden entweder mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (TNF+) oder nur mit Kulturmedium (TNF-) für 24 h inkubiert. Die Fluoreszenzdetektion der Western-Membran erfolgte mit dem 7E2-Hybridomüberstand (1:10) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper (1:10000). Nach der Detektion wurde die Membran gestrippt und mit dem WA-3-Tubulin-Antikörper (1:100) und einem IRDye800CW-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:10000) nachdetektiert (oberes Bild). Die Größen der relevanten Proteinmarkerbanden sind links markiert. Die Positionen von Tubulin und von endogenem LST1.2345 in seiner monomeren (mLST1) und dimeren Form (dLST1) sind rechts angegeben. **B) Quantitative Auswertung der Western-Analysen.** Die LST1-Proteinexpression wurde in 3 Western-Analysen, wie unter 5.4.11 beschrieben, quantifiziert. Gezeigt ist die prozentuale Änderung der LST1-Proteinexpression zwischen TNF- $\alpha$ -behandelten (TNF+) und unbehandelten (TNF-) HeLa-Zellen. Die Durchschnittswerte +/- der Standardabweichung sind innerhalb der Säulen angegeben. Die statistische Auswertung wurde, wie unter 5.4.11 beschrieben, durchgeführt. Die Expression des monomeren LST1.2345 (mLST1) war in den behandelten Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, leicht erhöht (195,7 % +/- 53,7; N = 3; p = 0,0910; t-Test.). Die Expression des dimeren LST1.2345 (dLST1) war in den behandelten Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, signifikant verringert (37,5 % +/- 19,1; N = 3; p = 0,0299; t-Test.).

## 7 Diskussion

### 7.1 Charakterisierung und Funktionsanalyse von LST1

#### 7.1.1 Evolution des *LST1*-Gens

Im Jahr 2003 wurde die Sequenzierung des menschlichen Genoms abgeschlossen. Seitdem wurden, dank wesentlich verbesserter Methoden, die Genome einer Vielzahl von Säugetieren sequenziert. Die dazugehörigen Proteome wurden *in silico* durch Vorhersageprogramme ermittelt (Gnomon, NCBI-Datenbank). Die dadurch gewonnene Datenfülle ermöglichte es, in verschiedenen Säugetier-Proteomen, sechs bis dato unbekannte, homologe *LST1*-Proteine zu identifizieren. Die meisten dieser Proteine ähnelten der Volle-Länge transmembranen *LST1.2345*-Isoform. Dieser Befund erlaubt es allerdings nicht, Aussagen über die *LST1*-Proteinexpression in anderen Spezies zu treffen. Dass mit lediglich einer Ausnahme stets das Volle-Länge Protein vorhergesagt wurde, lässt sich dadurch erklären, dass die Proteome durch Transkription und Translation *in silico* ermittelt wurden. Die verwendeten Programme begünstigen hauptsächlich die Vorhersage des Volle-Länge *LST1*-Transkriptes, das die längste Isoform kodiert.

In den letzten Jahren wurden auch zahlreiche Genome von Nicht-Säugetieren sequenziert, dies ermöglichte es, die Suche nach homologen *LST1*-Proteinen auf Organismen, wie z.B. den Frosch (*Xenopus tropicalis*), den Zebrafisch (*Danio rerio*) oder die Fliege (*Drosophila melanogaster*) zu erweitern. Homologe Proteine konnten jedoch nur bei Säugetieren identifiziert werden, das *LST1*-Gen ist also spezifisch für die Klasse der Säugetiere.

Die Identifizierung eines homologen *LST1*-Proteins beim Schnabeltier (*Ornithorhynchus anatinus*), ermöglichte es über die Entstehung des *LST1*-Gens zu spekulieren. Die Abstammungslinie des heutigen Schnabeltieres trennte sich vor ca. 210 Mio. Jahren von der der restlichen Säuger (Belov et al. 2006), was darauf hindeutet, dass das *LST1*-Gen relativ früh in der Entwicklung der Säugetiere entstanden ist. Beim Schnabeltier ist *Lst1* von den Genen *Aif1* und *Ltb* flankiert, ein Ortholog zum *NCR3*-Gen, das *LST1* in der menschlichen HLA-Klasse-III-Region zentromerisch flankiert, konnte nicht identifiziert werden (Dohm et al. 2007). Dies liefert einen ersten Hinweis darauf, dass die unmittelbare genomische Umgebung von *LST1* während der Säugerevolution Veränderungen durchlaufen hat. Es erscheint wahrscheinlich, dass sich ein Großteil dieser Veränderungen vor ca. 180 - 210 Mio. Jahren ereignet haben. Vor ca. 180 Mio. Jahren trennten sich die Abstammungslinien der heute lebenden Opossums (*Didelphis marsupialis*) und Wallabys (*Macropus eugenii*) von der menschlichen Linie (Deakin et al. 2006). In den Genomen vom Opossum und Wallaby ist kein *LST1*-Ortholog zwischen den Genen *Aif1* und *Ltb* lokalisiert, beim Wallaby konnte an dieser Stelle lediglich ein *NCR3*-Ortholog identifiziert werden (Deakin et al. 2006). Somit kann postuliert werden, dass beim gemeinsamen Vorfahren von Mensch, Opossum und Wallaby sowohl ein *LST1*, wie auch ein *NCR3*-Ortholog im fraglichen Bereich vorhanden war. Die abweichende Genstruktur dieser Region beim Opossum und Wallaby könnte durch Rekombinations- oder Umlagerungsereignisse, nach der Trennung von der menschlichen Abstammungslinie, zustande gekommen sein.

## 7.1.2 Proteincharakterisierung von LST1 und Funktion als potentielles TRAP

### 7.1.2.1 Membrantopologie von LST1

Als erster Schritt zur Funktionsanalyse von LST1 wurden die evolutionär konservierten Motive des Volle-Länge transmembranen Proteins (LST1.2345) bestimmt. Da meistens nur die funktionellen Bereiche eines Proteins konserviert sind, sollte die Ermittlung dieser Motive Hinweise auf die Funktion von LST1 liefern. Die mögliche funktionelle Bedeutung jedes der konservierten Motive wurde gesondert untersucht.

Am N-Terminus zeigen die homologen LST1-Proteine nur eine geringe Übereinstimmung ihrer AS-Sequenzen und eine große Variabilität in der Länge dieses Bereiches. So ist beim menschlichen Protein das erste konservierte Motiv 9 AS vom N-Terminus entfernt, während beim homologen Protein der Ratte dieser Bereich 34 AS umfasst. Das erste konservierte Motiv des menschlichen LST1.2345-Proteins ist die 22 AS-lange Transmembranhelix (vorhergesagt mit dem TMHMM-Programm, Krogh et al. 2001). Die Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne war in sämtlichen LST1.2345-Homologen teilweise konserviert, bei allen verglichenen Sequenzen umfasste sie aber fast ausschließlich hydrophobe AS (Abb. 23 und Proteinvergleich im Anhang unter 9.5).

Schon nach der Bestimmung des längsten offenen Leserahmens von *LST1*, wurde eine Transmembrandomäne in der Exon 3-kodierten AS-Sequenz vorhergesagt (Holzinger et al. 1995). Da bei LST1 allerdings kein Signalpeptid vorhanden ist, war eine Klassifizierung als Typ-I- oder Typ-II-Transmembranprotein zunächst nicht möglich. In einer späteren Arbeit wurde die Zelloberflächenexpression der LST1.235-Isoform mit einem polyklonalen Kaninchen-Antiserum untersucht. Der Nachweis des LST1-Proteins an der Zelloberfläche von U-937-Zellen implizierte eine Typ-II-Membrantopologie für die transmembranen LST1-Isoformen (Rollinger-Holzinger et al. 2000). Diese Membrantopologie konnte später für keines der rekombinanten LST1-Proteine bestätigt werden. In K-562-Transfektanten, die stabil LST1.2345'-FLAG exprimierten, konnte das FLAG-Epitop nur mittels intrazellulärer Färbung in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Weiterhin konnte beim rekombinanten LST1-FLAG-Protein, das aus dem Lysat von zelloberflächenbiotinylierten K-562-Transfektanten präzipitiert wurde, keine nachweisbare Biotinylierung festgestellt werden (Schiller 2005). Diese Ergebnisse deuteten erstmals darauf hin, dass *LST1* Typ-I-Transmembranproteine kodiert.

Im Rahmen der Diplomarbeit von Maximilian Nitschké wurde die Membrantopologie von N- und C-terminal FLAG-etikettierten LST1-Transmembranisoformen mittels extrazellulärer Färbung in der Durchflusszytometrie untersucht (Nitschké 2006). Der Versuch wurde im Rahmen dieser Arbeit mindestens noch dreimal wiederholt, nur die N-terminal etikettierten Isoformen konnten an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 24A). Die Intensität der Färbung war beim FLAG-LST1.2345'-Protein deutlich stärker als bei der FLAG-LST1.235'-Isoform. In mindestens 6 unabhängigen Versuchen, wurden bei FLAG-LST1.2345'-Transfektanten stets zwei Zellpopulationen beobachtet: Eine zeigte eine relativ schwache Zelloberflächenexpression und die zweite eine deutlich stärkere. Im Gegensatz dazu konnte in mindestens 4 unabhängigen Versuchen bei FLAG-LST1.235'-Transfektanten nur eine schwach-positive Population angefärbt werden (Abb. 24A), während das carboxyterminal FLAG-modifizierte LST1.235' nicht auf der Zelloberfläche der entsprechenden Transfektanten nachweisbar war. Western-Analysen zeigten, dass vergleichbare Proteinmengen der FLAG-LST1-Isoformen exprimiert

wurden (Abb. 24B). In den gezeigten Western-Analysen wurden die C-terminal FLAG-etikettierten LST1-Isoformen etwas stärker nachgewiesen als die N-terminal etikettierten Proteine, dieser Effekt konnte aber in weiteren Analysen nicht reproduziert werden. Die unterschiedliche Ergebnisse für FLAG-LST1.2345' und FLAG-LST1.235' in der Durchflusszytometrie deuten darauf hin, dass die Zelloberflächenexpression der rekombinanten FLAG-LST1-Proteine differentiell reguliert wurde.

Die Ergebnisse der FACS-Analysen wurden mittels Immunzytochemie bestätigt, wie schon beim vorherigen Versuch konnten nur die N-terminal FLAG-etikettierten Isoformen an der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 25). Die stärkere Zelloberflächenexpression des FLAG-LST1.2345'-Proteins, die bei der FACS-Analyse festgestellt wurde, konnte bei der Immunzytochemie nicht beobachtet werden. Die FACS-Analyse wurde mit HEK 293T-Transfektanten durchgeführt, bei der Immunzytochemie wurden HeLa-Transfektanten angefärbt. Es wäre möglich, dass die unterschiedliche Zelloberflächenexpression der beiden transmembranen FLAG-LST1-Proteine durch die starke Überexpression in den HEK 293T-Transfektanten zustande kam. Dies würde aber dennoch bedeuten, dass ein Mechanismus vorhanden ist, der bei großen Proteinmengen die Zelloberflächenexpression der transmembranen FLAG-LST1-Proteine differentiell reguliert.

In einem weiteren Versuch konnte das transmembrane FLAG-LST1.2345-EGFP-Fusionsprotein mittels Immunzytochemie an der Zelloberfläche angefärbt werden. Als Kontrolle wurden Transfektanten, die das lösliche FLAG-LST1.245-EGFP transient exprimierten ebenfalls angefärbt, erwartungsgemäß wurde keine Zelloberflächenfärbung detektiert. Das lösliche Fusionsprotein war über Zytoplasma und Zellkern der Transfektanten verteilt (Abb. 26). Eine Zellkernlokalisierung der löslichen LST1-Isoformen kann aber daraus nicht abgeleitet werden, da das nicht-fusionierte EGFP bei Leervektor-Transfektanten ebenfalls im Zellkern beobachtet werden konnte (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der FACS-Analysen und der immunzytochemischen Färbungen zeigten, dass die rekombinanten, transmembranen FLAG-LST1-Isoformen eine Typ-I-Membrantopologie aufwiesen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte diese Membrantopologie für das endogene LST1.2345 bestätigt werden. Bei der Charakterisierung der monoklonalen LST1-Antikörper konnte endogenes LST1 in der U-937-Zelllinie nur mittels intrazellulärer Färbung in der Durchflusszytometrie detektiert werden (Abb. 20). Da das Immunogen, das für die Herstellung der Antikörper verwendet wurde, nicht den N-Terminus der LST1.2345'-Isoform umfasst, lässt sich aus der vorhandenen, intrazellulären Färbung und der fehlenden, extrazellulären Färbung eine Typ-I-Membrantopologie ableiten.

Da die transmembranen LST1-Isoformen kein Signalpeptid besitzen, ist es sehr wahrscheinlich, dass die ermittelte Typ-I-Membrantopologie durch die positiv geladenen AS am C-terminalen Ende der Transmembranhelix bestimmt wird (nach der „positive-inside“-Regel, von Heijne 1992). Drei dieser AS (R-KR) sind bei den meisten homologen LST1-Proteinen konserviert (Abb. 23). Beim menschlichen LST1.2345 sind 4 positiv geladene AS (RR-KR) in diesem Bereich vorhanden, die LST1.235'-Isoform weist aber dort nur zwei positiv geladene AS (RR) auf. Da für diese Isoform auch eine Typ-I-Membrantopologie ermittelt wurde, kann an dieser Stelle postuliert werden, dass die Anwesenheit von zwei positiven AS am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne ausreicht, um die „richtige“ Membrantopologie zu gewährleisten.

### 7.1.2.2 Multimerbildung durch LST1

In den Western-Analysen wurden auch unter reduzierenden Bedingungen größere LST1-Moleküle nachgewiesen, die Homodimere, bzw. Homooligomere darstellen können. Daher wurde die Multimerbildung der transmembranen LST1-Isoformen untersucht. Rekombinantes LST1.2345'-FLAG, LST1.235'-FLAG, FLAG-LST1.245 und das gereinigte HIS-LST1.3Δ45'-Protein wurden unter reduzierenden, bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Western-Analyse untersucht. Außer beim löslichen FLAG-LST1.245-Protein konnten bei allen untersuchten Isoformen verstärkt Multimere unter nicht-reduzierenden Bedingungen nachgewiesen werden (Abb. 27A). Dieser Befund konnte für das endogene LST1.2345-Protein, das im Lysat von HeLa-Zellen detektiert wurde, bestätigt werden (Abb. 27B). Die verstärkte Detektion von Multimeren unter nicht-reduzierenden Bedingungen bestätigte die Vermutung, dass die Multimerbildung durch Disulfidbrückenbindungen vermittelt wird.

Ein Vergleich der AS-Sequenzen der rekombinanten LST1-Isoformen, die untersucht wurden, ermöglichte es festzustellen, dass die Multimer-bildenden Polypeptide lediglich einen 11 AS-langen Bereich gemeinsam haben (Abb. 28). In diesem Abschnitt befindet sich das bei allen homologen Proteinen konservierte CLC-Motiv. Aus diesem Befund wurde gefolgert, dass die bei transmembranen LST1-Isoformen beobachtete Multimerbildung durch Disulfidbrückenbindungen zwischen den Cysteinen dieses Motivs vermittelt wird.

In der Western-Analyse konnten die rekombinanten LST1-Transmembranisoformen als Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer nachgewiesen werden (Abb. 27A). Das endogene LST1.2345-Protein konnte dagegen nur in der monomeren und dimeren Form detektiert werden (Abb. 27B). Die Überexpression der rekombinanten LST1-Proteine könnte also ihre Oligomerisierung fördern. Dies muss jedoch nicht zwangsläufig bedeuten, dass das endogene LST1-Protein nicht in der trimeren oder tetrameren Form vorkommt. Der zur Detektion verwendete LST1-7E2-Antikörper kann zwar rekombinante Transmembranisoformen als Trimere und Tetramere erkennen (siehe Abb. 17 und 18), es wäre aber möglich, dass endogenes LST1 in der trimeren und tetrameren Form Modifikationen aufweist, die eine Erkennung durch den Antikörper behindern könnten. So wurde bei der Untersuchung der Phosphorylierung festgestellt, dass LST1-Proteine, die am C-terminalen Tyrosin (Pos. 95, siehe Abb. 23) phosphoryliert waren, nicht vom 7E2-Antikörper erkannt werden konnten (siehe Abb. 30).

In einer früheren Untersuchung wurde ein polyklonales, affinitätsgereinigtes Kaninchen-Antiserum verwendet, um die Proteinexpression von LST1 nachzuweisen (Bindeepitop = RDKRGTKEDPRADYAC, beim 7E2-Antikörper = RADYACIAENKPT). Rekombinantes LST1.2345' wurde als Monomer, Dimer und Trimer detektiert, während endogenes LST1.2345 lediglich als Monomer detektiert wurde (Raghunathan et al. 2001). Diese Beobachtung bestätigt zwar die festgestellte Diskrepanz in der Multimerbildung zwischen den rekombinanten und endogenen Proteinen, lässt sich aber mit beiden oben genannten Hypothesen ähnlich gut erklären.

Die Auftrennung der rekombinanten LST1-Isoformen unter reduzierenden Bedingungen führte, im Vergleich zu der Auftrennung unter nicht-reduzierenden Bedingungen, zu einer offensichtlichen Abnahme der nachgewiesenen Multimere (Abb. 27A). Beim endogenen LST1-Protein war dieser Unterschied zwar auch erkennbar, aber nicht so deutlich, wie bei den rekombinanten Isoformen (Abb. 27B). Es erscheint also möglich, dass das endogene

LST1.2345-Dimer, im Vergleich zu den rekombinanten LST1-Multimeren, resistenter gegenüber reduzierenden Reagenzien ist. Aus der Literatur sind mehrere Beispiele bekannt, bei denen die Anfälligkeit der Disulfidbrückenbindungen für reduzierende Reagenzien von der Proteinstruktur bestimmt wird (z.B. beim E1-Protein des Sindbis-Virus [Carleton und Brown 1997], beim Zelloberflächenprotein MSP-1 von *Plasmodium falciparum* [Sanders et al. 2007] und beim menschlichen Wachstumshormon hGH [Grigorian et al. 2005]).

### 7.1.2.3 Tyrosin-Phosphorylierung von LST1

Die weiter C-terminal der Transmembrandomäne gelegenen, konservierten Motive wurden als Nächstes untersucht. Zwei Tyrosin-enthaltende Motive in diesem Bereich waren in allen homologen Proteinen konserviert, das erste dieser Motive erfüllte die Konsensussequenz eines ITIM.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Tyrosin-Phosphorylierung von LST1 näher untersucht. HEK 293T-Transfektanten, die FLAG-LST1.2345 (zwei mögliche pY) und FLAG-LST1.2345 $\Delta$  (nur 1 mögliches pY) transient exprimierten, wurden mit Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> behandelt und lysiert, anschließend wurden die rekombinanten Proteine präzipitiert. Die Tyrosin-Phosphorylierung der präzipitierten Proteine wurde mittels Western-Analyse untersucht.

Die aus den behandelten Transfektanten präzipitierten FLAG-LST1.2345- und FLAG-LST1.2345 $\Delta$ -Proteine zeigten eine deutliche Tyrosin-Phosphorylierung (Abb. 29). Da das zweite Tyrosin-Motiv im mutierten FLAG-LST1.2345 $\Delta$ -Protein fehlt, konnte in diesem Versuch die Tyrosin-Phosphorylierung des potentiellen ITIM nachgewiesen werden. Die Nachdetektion der Präzipitate zeigte eine stärkere Zunahme des Molekulargewichts beim FLAG-LST1.2345-Protein im Vergleich zum FLAG-LST1.2345 $\Delta$ -Protein (Abb. 29). Dies wird darauf zurückgeführt, dass beim FLAG-LST1.2345-Protein beide Tyrosin-enthaltenden Motive phosphoryliert wurden. Die Tyrosin-Phosphorylierung konnte nur für die monomere Form des FLAG-LST1.2345-Proteins gezeigt werden, die dimeren und trimeren Formen waren weder phosphoryliert noch konnte eine Zunahme des Molekulargewichts festgestellt werden.

Die Etablierung der monoklonalen LST1-Antikörper ermöglichte es im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Tyrosin-Phosphorylierung von endogenem LST1.2345 zu untersuchen. In der Western-Analyse konnte eine deutliche Tyrosin-Phosphorylierung des endogenen LST1.2345-Proteins, das aus dem Lysat der nicht mit Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> behandelten Zellen präzipitiert wurde, festgestellt werden. Weiterhin wurde aus dem Lysat der behandelten Zellen Tyrosin-phosphoryliertes LST1 präzipitiert, das im Vergleich zum Protein aus den nicht-behandelten Zellen, ein größeres Molekulargewicht aufwies (Abb. 30).

Aus der Untersuchung der Tyrosin-Phosphorylierung des endogenen LST1 ließen sich folgende Erkenntnisse ableiten: Ein Tyrosin-enthaltendes Motiv von LST1.2345 ist konstitutiv phosphoryliert, das zweite Motiv wird zwar ebenfalls phosphoryliert, unterliegt aber ständiger Dephosphorylierung. Aus diesem Grund konnte das an beiden Motiven phosphorylierte Protein, nur aus dem Lysat von Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-behandelten Zellen präzipitiert werden.

Bei der Nachdetektion der präzipitierten Proteine konnte das Tyrosin-phosphorylierte LST1 aus den nicht-behandelten Zellen deutlich detektiert werden, das an beiden Motiven Tyrosin-phosphorylierte Protein konnte aber mit dem LST1-7E2-Antikörper nicht detektiert werden (Abb. 30). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass beim endogenen LST1.2345 das

potentielle ITIM konstitutiv phosphoryliert ist, die Phosphorylierung des zweiten Tyrosin-enthaltenden Motivs aber erst nach Blockade der Dephosphorylierung durch  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  nachweisbar wird. Dieses zweite Tyrosin liegt im Bindeepitop des 7E2-Antikörpers und könnte im phosphorylierten Zustand die Detektion verhindern.

Weiterhin zeigte die Nachdetektion, dass die  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Behandlung zu einer deutlichen Verringerung der detektierten Menge an monomeren LST1 geführt hat. Die Detektion des dimeren Proteins könnte zwar diese Abnahme erklären, das Dimer wurde jedoch nur in einem Präzipitat (5') nachgewiesen (Abb. 30). Die Unfähigkeit des 7E2-Antikörpers, das an beiden Tyrosinen phosphorylierte Protein zu detektieren, kann die beobachtete Abnahme auch nicht erklären, da dieses Protein mit dem pY-Antikörper in den Präzipitaten der behandelten (5', 10' und 15') U-937-Zellen in vergleichbaren Mengen nachgewiesen wurde. Die Abnahme der detektierten Monomer-Menge kann nur dadurch erklärt werden, dass die Phosphorylierung des LST1-Proteins am zweiten Tyrosin zur Dimerisierung und anschließend zum Abbau des Dimers geführt hat. Eine Tyrosin-Phosphorylierung des dimeren LST1-Proteins konnte zwar nicht nachgewiesen werden, es wäre jedoch möglich, dass die Konformation des Proteins eine Detektion mit dem pY-Antikörper nicht zulässt. Ein Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung über die Änderung des Molekulargewichtes ist ebenfalls nicht möglich, da das Dimer nur in einem Präzipitat (5') detektiert werden konnte.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Tyrosin-Phosphorylierung von endogenem LST1 in U-937-Zellen deuten darauf hin, dass das potentielle ITIM konstitutiv phosphoryliert ist und, dass die Konformation und der anschließende Abbau des Proteins über die Phosphorylierung des zweiten Tyrosin-enthaltenden Motivs gesteuert werden. In dieser Hinsicht zeigt das LST1.2345-Protein Ähnlichkeit zum SIGLEC3-Protein (Sialinsäure-bindendes, Ig-ähnliches Lektin 3, CD33). SIGLEC3 besitzt ein ITIM, das die gleiche AS-Sequenz wie das potentielle LST1-ITIM aufweist. Weiterhin ist bei beiden Proteinen am C-Terminus ein zweites Tyrosin-enthaltendes Motiv lokalisiert. Bei SIGLEC3 handelt es sich um ein ITSM (Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Switch Motiv, Konsensussequenz: T X Y X X [I/V]), diese Motive können je nach Art der rekrutierten Proteine inhibitorische oder aktivierende Signalkaskaden auslösen. Im Falle von SIGLEC3 rekrutiert das phosphorylierte ITSM das SOCS3-Protein (Suppressor of Cytokine Signaling 3), dieses vermittelt den proteasomalen Abbau von SIGLEC3 (Orr et al. 2007). Das C-terminal gelegene Tyrosin-enthaltende Motiv des menschlichen LST1-Proteins (ADYACI) erfüllt nicht die Konsensussequenz für ein ITSM. Es wäre dennoch möglich, dass die Phosphorylierung dieses Motivs den Abbau des LST1-Dimers über einen ähnlichen Mechanismus wie beim SIGLEC3-Protein steuert. In diesem Zusammenhang erscheint es interessant, dass das zweite Tyrosin-enthaltende Motiv in den homologen LST1-Proteinen der Ratte (TDYACI), Maus (TDYACI) und Hund (TEYACI) die Konsensussequenz für einen ITSM erfüllt.

Wie schon bei der Untersuchung der Multimerbildung beobachtet, konnten auch bei der Analyse der Tyrosin-Phosphorylierung deutliche Unterschiede zwischen den rekombinanten FLAG-LST1-Isoformen und dem endogenen Protein festgestellt werden. Im Gegensatz zum endogenen LST1.2345, waren die rekombinanten FLAG-LST1-Proteine nicht konstitutiv phosphoryliert. Eine, durch die  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Behandlung der Transfektanten bedingte Abnahme der Menge an präzipitiertem FLAG-LST1 konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Weiterhin konnte keine Dimerisierung der rekombinanten Proteine nach  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Behandlung der Transfektanten detektiert werden. Die rekombinanten Proteine wurden allerdings nur in einem Ansatz (Behandlungsdauer der Transfektanten: 15 min) untersucht, daher würde der Vergleich

mit dem endogenen Protein keinen Nachweis der Dimerisierung erwarten lassen. Die Untersuchung der Tyrosin-Phosphorylierung von LST1 hat dennoch entscheidende Unterschiede zwischen dem rekombinanten und endogenen Protein aufgezeigt. Es wäre also möglich, dass die überexprimierten Proteine sich in ihrer Struktur und Funktionalität stark vom endogenen Protein unterscheiden. Andererseits könnte die beobachtete Diskrepanz auch auf die unterschiedlichen Zelltypen zurückgeführt werden, die für die Versuche benutzt wurden. Die FLAG-LST1-Isoformen wurden in der adhärenzten Nierenzelllinie HEK 293T überexprimiert, das endogene Protein wurde aus Suspensionzellen der U-937-Lymphomlinie präzipitiert. Es besteht also die Möglichkeit, dass der Tyrosin-Phosphorylierungsstatus von LST1 in beiden Zelltypen grundsätzlich unterschiedlich ist, was die gegensätzlichen Ergebnisse erklären könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich die Tyrosin-Phosphorylierung von LST1 untersucht, aus diesem Grund kann über die funktionelle Bedeutung einer evtl. vorhandenen Serin- oder Threonin-Phosphorylierung keine Aussage getroffen werden. Eine *in silico*-Untersuchung des LST1.2345-Proteins (mit dem NetPhos 2.0-Programm, Blom et al. 2001) detektierte 5 AS mit einer hohen Phosphorylierungswahrscheinlichkeit. Zwei davon waren die in dieser Arbeit untersuchten Tyrosine, bei den restlichen AS handelte es sich um zwei Serine und ein Threonin (Pos. 56, 73 und 87, siehe Abb. 23). Das erste dieser Serine war in sämtlichen homologen Proteinen konserviert, das zweite Serin war bei einigen Spezies konserviert und das Threonin war nicht konserviert (Abb. 23). Ob eine mögliche Phosphorylierung des konservierten Serins (Pos. 56) für die Funktion von LST1 von Bedeutung ist, könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

#### **7.1.2.4 Kreuzvernetzung von LST1**

Die Charakterisierung der Membrantopologie, Multimerbildung und Tyrosin-Phosphorylierung der Volle-Länge LST1-Isoform offenbarte Ähnlichkeiten zu den TRAP. Diese transmembranen Proteine weisen meistens nur wenige extrazelluläre AS auf. In der intrazellulären Domäne dieser Proteine sind Tyrosin-enthaltende Motive lokalisiert, die bei Kreuzvernetzung phosphoryliert werden und aktivierende, bzw. inhibierende Signalkaskaden auslösen können. Einige dieser Proteine bilden Homodimere (z.B. DAP12), bei mehreren sind zwei Cysteine am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne vorhanden, die die Membranlokalisierung regulieren (z.B. LAT, NTAL, PAG und LIME, Tedoldi et al. 2006). Die festgestellten Ähnlichkeiten zum LST1.2345-Protein legten den Schluss nahe, dass LST1 als TRAP fungieren könnte.

Um dies experimentell zu überprüfen wurde rekombinantes FLAG-LST1.2345 an der Zelloberfläche von transienten Transfektanten kreuzvernetzt. Die Zellen wurden lysiert und das FLAG-LST1-Protein wurde präzipitiert, dieses konnte anschließend in der Western-Analyse auf Phosphorylierung seiner Tyrosin-enthaltenden Motive untersucht werden.

Es konnte keinerlei Tyrosin-Phosphorylierung des FLAG-LST1-Proteins festgestellt werden (Abb. 31). Aus dem Lysat der kreuzvernetzten Transfektanten wurde das Protein verstärkt in der dimeren Form präzipitiert, während aus dem Lysat der nicht-behandelten Zellen FLAG-LST1 hauptsächlich als Monomer präzipitiert wurde (Abb. 31). Die Kreuzvernetzung des FLAG-LST1 an der Zelloberfläche führte also zur Dimerisierung, aber nicht zur Tyrosin-Phosphorylierung des Proteins. In einem weiteren Versuch, bei dem die Dauer der Kreuzvernetzung reduziert wurde (2-, bzw. 5-minütige Inkubation mit dem zweiten Antikörper),

konnte dieser Befund bestätigt werden (nicht gezeigt). Es konnte also die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die Kreuzvernetzung zu einer transienten Tyrosin-Phosphorylierung des FLAG-LST1-Proteins in HEK 293T-Zellen führt. Die Ergebnisse des Kreuzvernetzungsversuchs konnten nicht in stabilen LST1-Transfektanten bestätigt werden, da exogen quervernetzbare U-937-LST1-Transfektanten nicht zur Verfügung standen.

Einerseits deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass LST1 nicht, wie die genannten Adaptorproteine (DAP12, LIME und NTAL), auf Kreuzvernetzung reagiert. Andererseits wurden bei der Untersuchung der Tyrosin-Phosphorylierung von LST1 (siehe 6.3.4) deutliche Unterschiede zwischen den rekombinanten und endogenen Proteinen festgestellt. Im Bezug auf die Tyrosin-Phosphorylierung können also die Ergebnisse der rekombinanten FLAG-LST1-Proteine nicht auf das endogene LST1 übertragen werden. Dadurch erscheint es möglich, dass im Gegensatz zum rekombinanten FLAG-LST1, beim endogenen LST1 die Kreuzvernetzung einen Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierung haben könnte. Diese Fragestellung konnte leider im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, da die hergestellten Antikörper nur mit dem intrazellulären Teil des LST1-Proteins reagierten und somit nicht für Kreuzvernetzungsversuche geeignet waren.

Insgesamt hat die Charakterisierung des Volle-Länge LST1-Proteins zwar einige Hinweise auf eine mögliche Funktion als TRAP geliefert, dies konnte aber nicht zweifelsfrei belegt werden. Die LST1-Isoformen, die beide Tyrosin-enhaltenden Motive aufweisen (LST1.2345 und LST1.2345'), konnten also nur als potentielle TRAP charakterisiert werden. Um dies zu bestätigen, müsste in zukünftigen Untersuchungen gezeigt werden, dass das potentielle LST1-ITIM tatsächlich inhibitorische Signalkaskaden auslösen kann. Ferner könnte die Identifizierung eines evtl. vorhandenen Korezeptors dazu beitragen die Wirkungsweise von LST1 als TRAP aufzuklären.

### **7.1.3 Modulation der Zellmorphologie durch LST1**

#### **7.1.3.1 LST1-vermittelte Bildung von TNT**

Eine Rolle von LST1 bei der Modulation der Zellmorphologie wurde erstmals im Jahr 2001 postuliert. Es konnte beobachtet werden, dass die Überexpression von transmembranen LST1-Isoformen in verschiedenen eukaryotischen Zellen, die Bildung von Filopodien und CLF induziert (Raghunathan et al. 2001). Diese Beobachtung konnte in einer späteren Untersuchung, durch Überexpression eines LST1.2345-EGFP-Fusionsproteins in HeLa-Zellen, bestätigt werden (siehe Abb. 9, Hirner 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Modulation der Zellmorphologie durch LST1 genauer charakterisiert.

Zunächst wurde die Induktion der Bildung von zellulären Fortsätzen durch Überexpression des FLAG-LST1.2345-EGFP-Fusionsproteins überprüft. In den oben erwähnten Untersuchungen, wurde jeweils der EGFP-Leervektor als negative Kontrolle verwendet. Das unfusionierte EGFP-Protein verteilt sich über den gesamten Zellkörper der Transfektanten, ist aber im Gegensatz zum LST1-EGFP-Fusionsprotein nicht an der Membran angereichert. Dadurch kann formal nicht ausgeschlossen werden, dass das LST1-EGFP-Fusionsprotein nicht die Bildung der zellulären Fortsätze induziert, sondern diese nur durch dessen Anreicherung in der Membran sichtbar werden. Aus diesem Grund wurde bei der erneuten Untersuchung der Zellmorphologiemodulation durch LST1 das transmembrane KIR2DS2-EGFP-Fusionsprotein als Kontrolle verwendet.

Die durch Überexpression des FLAG-LST1.2345-EGFP-Fusionsproteins induzierte Bildung von zellulären Fortsätzen, konnte deutlich beobachtet werden. Die Transfektanten, die das Kontrollprotein exprimierten, zeigten dagegen keinerlei Auffälligkeiten ihrer Zellmorphologie (Abb. 33).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe 2.3.6.3), zeigen die LST1-induzierten Fortsätze erstaunliche Ähnlichkeiten zu den 2004 erstmals beschriebenen „tunneling nanotubes“ (TNT). Deswegen wurde in den weiteren Versuchen untersucht, ob es sich bei den LST1-induzierten Fortsätzen um TNT handelt. Wie bereits in den Ergebnissen diskutiert (siehe 6.4.2), erwies sich die von Raghunathan et al. vorgenommene Klassifizierung dieser Fortsätze in Filopodien und CLF als problematisch. Wegen der ähnlichen Charakteristika von Filopodien und TNT wurden die LST1-induzierten Fortsätze nicht nach den Kriterien von Raghunathan et al. klassifiziert. Stattdessen wurden die Charakteristika der LST1-induzierten Fortsätze mit denen der TNT verglichen.

Es bedarf sicherlich noch weiterer Analysen um eine klare Unterscheidung zwischen Filopodien und TNT hinsichtlich ihrer Funktion, Struktur und Ausbildungsmechanismen treffen zu können. Es ist nicht ausgeschlossen, dass es sich bei manchen Strukturen, die in der Vergangenheit als lange Filopodien charakterisiert wurden, tatsächlich um TNT handelt (z.B. zwischen Zellen von Seeigel-Embryonen, Miller et al. 1995).

Ob es sich bei manchen der LST1-induzierten Fortsätze tatsächlich um Filopodien handelt, kann allerdings angezweifelt werden. Bei der Untersuchung von Raghunathan et al. wurde festgestellt, dass die Bildung der zellulären Fortsätze in HeLa-Zellen unabhängig von Cdc42, Rho und Rac war. Ein Cdc42-unabhängiger Signalweg für die Filopodienbildung ist zwar bekannt, die durch Überexpression von Rif und mDia2 induzierten Filopodien zeigten jedoch in HeLa-Zellen einen „haarigen“ Phänotyp und waren deutlich kürzer ( $< 10 \mu\text{m}$ ) als die LST1-induzierten Fortsätze (Pellegrin und Mellor 2005).

Die Charakterisierung der LST1-induzierten Fortsätze in HeLa-Zellen, die das FLAG-LST1.2345-EGFP-Fusionsprotein überexprimierten, zeigte eine mit der Länge zunehmende Fragilität dieser Strukturen (Abb. 34A – C), welche für die TNT ebenfalls beschrieben wurde (Rustom et al. 2004). Diese Fragilität ist vermutlich auch der Grund dafür, dass die TNT erst im Jahr 2004 als neuer Mechanismus der interzellulären Kommunikation beschrieben wurden und bei zahlreichen früheren Untersuchungen nicht detektiert wurden. Um den mechanischen Stress der Fixierung zu vermeiden, wurden die nächsten Versuche, nach Möglichkeit, mit lebenden Zellen durchgeführt. Die Lebendzell-Mikroskopie zeigte, dass die Verkrümmung und Verzweigung der LST1-induzierten Fortsätze mit ihrer Länge korreliert (Abb. 34D – E), Ähnliches konnte in zwei unabhängigen Untersuchungen bei TNT festgestellt werden (Chinnery et al. 2008 und Sowinski et al. 2008).

Bei der Erstbeschreibung wurden TNT als Aktin-reich und Tubulin-arm charakterisiert (Rustom et al. 2004). Aus diesem Grund wurde das Vorhandensein von Aktin und Tubulin in den LST1-induzierten Fortsätzen untersucht. In FLAG-LST1.2345-EGFP-HeLa-Transfektanten wurden Aktin und Tubulin gefärbt. Die LST1-induzierten Fortsätze waren Aktin-reich und enthielten teilweise auch Spuren von Tubulin (Abb. 35A – B). Durch den mechanischen Stress der immunzytochemischen Färbung blieben nur die relativ kurzen Fortsätze größeren Durchmessers erhalten, dies konnte auch bei der Färbung von TNT durch Rustom et al. beobachtet werden, keiner der gefärbten TNT war länger als  $15 \mu\text{m}$ .

Die Beschreibung von zwei strukturell unterschiedlichen Klassen von TNT (Onfelt et al. 2006) lieferte eine mögliche Erklärung für den Nachweis von Tubulin-Spuren in den LST1-induzierten Fortsätzen. So erscheint es wahrscheinlich, dass es sich bei den gefärbten Fortsätzen um die von Onfelt et al. beschriebenen dicken, Tubulin-haltigen TNT, handelt.

In der Studie von Onfelt et al. wurde der Tubulin-Gehalt der dünnen TNT mit einem EB1-GFP-Fusionsprotein untersucht, dieses bindet am Plus-Ende von wachsenden Mikrotubuli. Um die immunzytochemische Färbung zu vermeiden und den Tubulin-Gehalt der dünnen LST1-induzierten Fortsätze untersuchen zu können, wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau gewählt. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für FLAG-LST1.2345-DsRed2 und EGFP-Tubulin kotransfiziert und mittels Lebendzell-Mikroskopie untersucht. In den Kotransfektanten konnten LST1-induzierte Fortsätze beobachtet werden, die den von Onfelt et al. beschriebenen TNT-Klassen entsprachen: Dicke Fortsätze enthielten Spuren von EGFP-Tubulin (Abb. 35C), während in dünnen Fortsätzen kein EGFP-Tubulin nachgewiesen werden konnte (Abb. 35D). Diese Ergebnisse lieferten weitere Hinweise darauf, dass die LST1-Überexpression die Bildung von TNT induziert.

Ob die dünnen TNT tatsächlich kein Tubulin enthalten, kann nicht als gesichert angesehen werden. Der fehlende Nachweis von Tubulin in dünnen TNT (Rustom et al. 2004 und Onfelt et al. 2006) könnte auch dadurch erklärt werden, dass die Proteinmenge in diesen Strukturen nicht ausreicht um eine Detektion zu ermöglichen. Die Koexpression von LST1-DsRed2 und EGFP-Tubulin zeigte, dass selbst in Fortsätzen größeren Durchmessers das EGFP-Tubulin-Fusionsprotein nur schwach nachgewiesen werden konnte. Aus dem fehlenden Nachweis des Fusionsproteins in den dünnen Fortsätzen kann also nicht gefolgert werden, dass diese kein Tubulin enthalten. Die Expression des FLAG-LST1.2345-DsRed2-Proteins, war im Vergleich zu früheren Transfektionen mit dem FLAG-LST1.2345-EGFP-Expressionsvektor, sehr schwach. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei diesem Versuch nicht alle LST1-induzierten Fortsätze sichtbar wurden. Der Grund für die schwache Expression ist höchstwahrscheinlich beim DsRed2-Fluoreszenzprotein zu finden. Dieses fluoresziert nur als Tetramer und benötigt eine gewisse Zeit bis zur vollständigen Reifung, weiterhin kann das Protein in größeren Mengen toxisch für die exprimierenden Zellen sein (Baird et al. 2000). Diese Nachteile wurden in Kauf genommen, weil lange Zeit echte Alternativen für den roten Spektralbereich fehlten, mittlerweile sind aber monomere DsRed2-Mutanten mit schnellerer Reifungszeit und verringerter Toxizität entwickelt worden (z.B. mCherry, Shaner et al. 2004).

Die schwache Expression von FLAG-LST1.2345-DsRed2 hatte zur Folge, dass sehr dünne Fortsätze nicht untersucht werden konnten. Um dieses Problem zu umgehen wurden die Expressionsvektoren für FLAG-LST1.2345 und EGFP-Tubulin in HeLa-Zellen kotransfiziert. Die Kotransfektanten wurden kurz vor der Lebendzell-Mikroskopie mit Dil gefärbt, dies ermöglichte es, selbst sehr dünne Fortsätze sichtbar zu machen. Die gefärbten Zellen waren vereinzelt durch dünne Fortsätze verbunden, die Transfektanten, die das EGFP-Tubulin-Fusionsprotein exprimierten, zeigten aber eine deutlich erhöhte Anzahl an zellulären Fortsätzen (nicht gezeigt). Dies deutete auf eine erfolgreiche Kotransfektion der beiden Expressionsvektoren hin. Zwischen den Transfektanten, die das Fusionsprotein exprimierten, konnten Fortsätze verschiedenen Durchmessers beobachtet werden. Die Fortsätze größeren Durchmessers enthielten das EGFP-Tubulin-Fusionsprotein, während in Fortsätzen mit geringerem Durchmesser dieses nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 35E). Dies wäre ein weiterer Beleg dafür, dass die LST1-Überexpression zur Bildung von TNT führt, die den beiden von Onfelt et al. beschriebenen Klassen entsprechen.

Die hier erörterten Untersuchungen der LST1-induzierten Fortsätze zeigten, dass diese alle bisher beschriebenen Charakteristika der TNT aufweisen. Aus den vorliegenden Ergebnissen muss also gefolgert werden, dass die Überexpression der transmembranen LST1-Isoformen die Bildung von TNT induziert.

### 7.1.3.1 LST1-vermittelte Bildung von funktionellen TNT

In den vorherigen Versuchen konnten die LST1-induzierten Fortsätze als TNT klassifiziert werden, es wurde jedoch nicht untersucht, ob diese funktionell waren und die interzelluläre Kommunikation ermöglichten. Um die Funktionalität der induzierten TNT nachzuweisen, wurden in einem ersten Versuch FLAG-LST1.2345-EGFP-Transfektanten mit dem Farbstoff Lucifer Yellow mikroinjiziert (wie von Watkins und Salter 2005 beschrieben). Die Farbstoff-Lokalisation wurde anschließend mittels Lebendzell-Mikroskopie untersucht. In einzelnen Fällen wurde zwar eine Übertragung des Farbstoffes zwischen den Transfektanten beobachtet, dies konnte aber in unabhängigen Versuchen nicht zuverlässig reproduziert werden (nicht gezeigt). Der Grund hierfür war, dass der mechanische Stress der Mikroinjektion zur Beschädigung der meisten LST1-induzierten TNT geführt hat. Damit erwies sich die Farbstoff-Mikroinjektion als nicht geeignet für die Analyse der Funktionalität von TNT.

Als Alternative zur Mikroinjektion wurde die Funktionalität der LST1-induzierten TNT durch differentielle Färbung von LST1-Transfektanten untersucht. HeLa-Zellen wurden entweder mit dem Expressionsvektor für FLAG-LST1.2345' oder dem Leervektor transient transfiziert und mit Dil, bzw. CFSE gefärbt. Die differentiell gefärbten Leervektor-, bzw. FLAG-LST1-Transfektanten wurden kokultiviert. Anschließend wurde der Anteil der CFSE-gefärbten Zellen, die Dil-gefärbte Vesikel enthielten, als Maß für den TNT-vermittelten interzellulären Transport, ermittelt (Abb. 36A). In den Ansätzen mit den FLAG-LST1-Transfektanten konnte eine, im Vergleich zu den Leervektor-Transfektanten, signifikant erhöhte Vesikeltransferrate festgestellt werden (Abb. 37).

Bei der Erstbeschreibung der TNT wurde festgestellt, dass ihre Bildung durch Hemmung der Aktinpolymerisation unterbunden werden konnte. Um sicherzustellen, dass die erhöhte Vesikeltransferrate bei den LST1-Transfektanten, tatsächlich durch die verstärkte de novo-Bildung von TNT zustande kam, wurde die Aktinpolymerisation in den untersuchten Zellen gehemmt. Dies führte zu einer deutlichen Reduktion des Vesikelaustausches und hob den Effekt der LST1-Überexpression komplett auf (Abb. 37). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Vesikeltransferrate auf die LST1-induzierte Bildung von TNT zurückzuführen ist. Die Inhibition der Aktinpolymerisation konnte den Austausch von gefärbten Vesikeln zwischen den kokultivierten Zellen nicht komplett unterbinden. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass die Zellen vor der Latrunculin-Behandlung eine Stunde lang kokultiviert wurden um ihre Adhäsion an das Substrat zu gewährleisten. Der festgestellte Vesikelaustausch erfolgte wahrscheinlich während dieses Zeitraums.

In der von Rustom et al. durchgeführten Untersuchung des TNT-vermittelten Vesikeltransfers wurde durch einen Kontrollversuch die Möglichkeit ausgeschlossen, dass die Übertragung der Vesikel nicht durch TNT, sondern durch Exosomen vermittelt wurde. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Ausschleusung von LST1 in Exosomen untersucht, es konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von transmembranen LST1-Isoformen in HeLa-Zellen nicht zu einer verstärkten Ausschleusung von Exosomen führt (siehe 6.5.1). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Vesikeltransferrate durch verstärkte Sekretion von Exosomen zustande kommt.

Die Ergebnisse, die beim Vesikeltransferversuch für die Leervektor-Transfektanten und die Latrunculin-behandelten Zellen erhalten wurden, ähnelten den von Rustom et al. ermittelten Werten stark. Dies deutete darauf hin, dass HeLa-Zellen TNT bilden können. Die Beobachtung, dass untransfizierte Dil-gefärbte HeLa-Zellen vereinzelt durch Fortsätze verbunden waren (siehe 6.4.2), bestätigte diese Schlussfolgerung. Einen weiteren Beleg für die Bildung von TNT durch untransfizierte HeLa-Zellen, lieferte die Färbung mit dem LST1-2B1-Antikörper. Zwischen den Zellen konnten dünne Verbindungen angefärbt werden, die keinen Kontakt zum Substrat hatten (Abb. 38C – D). Bei den detektierten Strukturen handelt es sich höchstwahrscheinlich um TNT, die Tatsache, dass nur kurze Verbindungen ( $< 15 \mu\text{m}$ ) nachgewiesen wurden, ist vermutlich auf den mechanischen Stress der immunzytochemischen Färbung zurückzuführen.

Bei der Charakterisierung des 2B1-Antikörpers wurde festgestellt, dass dieser in der Lage war, das endogene Volle-Länge LST1.2345-Protein aus dem Lysat von U-937-Zellen zu präzipitieren (Abb. 22). Weiterhin konnte der 2B1-Antikörper rekombinantes LST1.2345 (ohne Etikett) an der Zellmembran von HeLa-Transfektanten detektieren (Abb. 38A – B). Es erscheint also wahrscheinlich, dass bei der LST1-Färbung der untransfizierten HeLa-Zellen ausschließlich das endogene LST1.2345-Protein detektiert wurde. Die beobachtete Lokalisation war allerdings überraschend, statt der erwarteten Membranlokalisation war das endogene Protein über Zytoplasma und Zellkern der gefärbten Zellen verteilt. Eine unspezifische Bindung durch den zweiten Antikörper konnte mittels mehrerer Färbungen mit einem Isotyp-Kontrollantikörper ausgeschlossen werden. Die bei den HeLa-Zellen beobachtete Lokalisation des endogenen LST1 wurde in weiteren Färbungen bei den folgenden Zellen bestätigt: HEK 293T, U-937, K-562, Jurkat, unreife und reife DC (nicht gezeigt). In sämtlichen Zelltypen konnte zwar LST1 schwach an der Membran nachgewiesen werden, eine Anreicherung war aber nicht zu beobachten. Ähnlich verhielt es sich bei den in HeLa-Zellen detektierten TNT, das endogene Protein konnte in diesen Strukturen detektiert werden, eine deutliche Anreicherung war aber nicht zu beobachten (Abb. 38C – D).

Es bedarf sicherlich noch weiterer Untersuchungen um den Grund für die Diskrepanz der Lokalisation zwischen den rekombinanten und endogenen Proteinen zu ermitteln. Vorstellbar wäre, dass die Membranlokalisation des endogenen Proteins durch Modifikationen oder interagierende Proteine reguliert wird und, dass die überexprimierten transmembranen Isoformen nicht oder nur teilweise dieser Regulation unterliegen.

Die Charakterisierung der Zellmorphologie-Regulation durch die transmembranen LST1-Isoformen hat gezeigt, dass diese die Bildung von funktionellen TNT induzieren. Ob dies aber mit der potentiellen Rolle von LST1 als TRAP in Zusammenhang steht, kann allerdings bezweifelt werden. In der Studie von Raghunathan et al. wurde festgestellt, dass auch die transmembranen LST1-Isoformen, die von Transkripten kodiert werden die das Exon 4 nicht enthalten, die Bildung von zellulären Fortsätzen induzieren können. Diese Isoformen unterliegen einer Leserasterverschiebung und beinhalten keines der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, Tyrosin-enthaltenden Motive.

Auf die Frage nach der Funktion von LST1 kann also keine einfache Antwort gegeben werden. Einerseits sprechen die Ergebnisse aus der Proteincharakterisierung dafür, dass zwei transmembrane Isoformen (LST1.2345 und LST1.2345') als TRAP agieren könnten. Andererseits wurde gezeigt, dass die transmembranen LST1-Isoformen die Bildung von funktionellen TNT induzieren und somit die interzelluläre Kommunikation regulieren könnten.

## 7.2 Expression von LST1

### 7.2.1 Regulation der LST1-Expression

Bereits bei der Charakterisierung des monoklonalen LST1-7E2-Antikörpers konnte in den untersuchten Zelllinien ausschließlich die Volle-Länge transmembrane LST1.2345-Isoform nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die LST1-Proteinexpression näher untersucht. Zunächst wurde diese in Zellen untersucht, aus denen unterschiedliche *LST1*-Transkripte amplifiziert werden konnten (U-937 und DC, Abb. 39A). Die relativ genaue Kartierung des Bindeepitops vom 7E2-Antikörper (Abb. 19) und die Identifizierung der exprimierten *LST1*-Transkripte in den zu untersuchenden Zellen, erlaubte es die Anzahl der detektierbaren Isoformen vorherzusagen (U-937: 4 und DC: 5). Von den erwarteten Isoformen konnte jedoch, basierend auf der Größe, nur das LST1.2345-Protein als Monomer und als Homodimer detektiert werden (Abb. 39B). Im Rahmen der LST1-Proteincharakterisierung wurde die Bildung von Multimeren auch beim endogenen Protein untersucht, dies ermöglichte es das potentielle Dimer als ein Disulfid-gekoppeltes Homodimer zu identifizieren (Abb. 27B).

In weiteren Untersuchungen wurde die LST1-Proteinexpression in einer Vielzahl von Zelllinien untersucht, es konnte allerdings stets nur ein Polypeptid entsprechend der LST1.2345-Isoform nachgewiesen werden (Abb. 40). In den Lysaten der HeLa- und U-251 MG-Zellen wurde das LST1-Monomer als Doppelbande detektiert, der Abstand zwischen beiden Banden war aber zu gering, als dass es sich um zwei unterschiedliche Isoformen handeln könnte. Die LST1-Proteinexpression in den untersuchten Zelllinien war in etwa vergleichbar, nur in der Verteilung des Proteins auf die monomere und dimere Form konnten Unterschiede ausgemacht werden (Abb. 40). Die bei dieser Untersuchung festgestellte, ubiquitäre LST1-Proteinexpression zeigte erstmals, dass die vorhandenen Transkript-Expressionsdaten nicht mit der Proteinexpression korrelieren. So wurde in früheren Untersuchungen beschrieben, dass die Expression von *LST1*-Transkripten in Immunzellen stärker und die Anzahl der nachweisbaren Spleißvarianten höher ist als in Zellen nicht-lymphoiden Ursprungs (de Baey et al. 1997). Weiterhin wurde bei der Quantifizierung der *LST1*-Transkriptexpression mittels Real-Time-PCR festgestellt, dass die Exon 3-enhaltenden Transkripte in U-937-Zellen weniger als 4 % der gesamten *LST1*-Transkriptmenge ausmachen (Mulcahy et al. 2005). Bei dieser Untersuchung wurde postuliert, dass die löslichen LST1-Isoformen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen spielen und die, von den Exon 3-enhaltenden Transkripten kodierten, transmembranen Isoformen eher von untergeordneter Bedeutung seien (Mulcahy et al. 2005).

Zwei der aus der U-937-Zelllinie amplifizierten Transkripte, kodieren lösliche Isoformen, die vom 7E2-Antikörper erkannt werden können (LST1.245 und LST1.245'). Diese Transkripte zeigten bei der Auftrennung der RT-PCR-Produkte die stärksten Banden (Abb. 39A), daher wurde auch erwartet, dass die kodierten Isoformen entsprechend deutlich detektiert wurden. Die fehlende Detektion dieser löslichen Isoformen in den untersuchten Zelllinien (Abb. 39B und 40) verdeutlichte erneut die Diskrepanz zwischen der Transkript- und Proteinexpression von *LST1*.

Als mögliche Erklärung für die fehlende Detektion der löslichen LST1-Isoformen wurde eine effiziente Sekretion dieser Proteine in Erwägung gezogen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen,

wurden in einem ersten Versuch, die Kulturüberstände von HEK 293T-Transfektanten auf das Vorhandensein von rekombinanten FLAG-LST1-Isoformen hin untersucht. Das lösliche FLAG-LST1.245-Protein konnte nicht im Kulturüberstand nachgewiesen werden, die transmembranen FLAG-LST1.2345', bzw. FLAG-LST1.235'-Isoformen konnten dagegen deutlich detektiert werden (nicht gezeigt).

In einem Folgeversuch sollte geklärt werden, wie die transmembranen Isoformen in den Überstand sezerniert wurden. Aus den Kulturüberständen von HEK 293T-Transfektanten, die die oben genannten Isoformen exprimierten, wurden die Exosomen isoliert. Die transmembranen FLAG-LST1-Isoformen konnten in der Exosomenfraktion stärker als im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Abb. 41A), was deutlich für eine Ausschleusung dieser Proteine in Exosomen sprach. Das lösliche FLAG-LST1.245-Protein konnte weder im Kulturüberstand noch in der Exosomenfraktion nachgewiesen werden. Um die rekombinante Expression der FLAG-LST1-Proteine zu überprüfen, wurden Lysate aus den HEK 293T-Transfektanten mittels Western-Analyse untersucht (Abb. 41B). Wie in früheren Analysen bereits festgestellt (Abb. 18), wurden die transmembranen FLAG-LST1-Isoformen stärker als das lösliche FLAG-LST1.245-Protein exprimiert.

Einen Einfluss der Position des FLAG-Etiketts (N- oder C-terminal) auf die Ausschleusung der transmembranen Isoformen in Exosomen konnte mit einem weiteren Versuch in HEK 293T-Zellen ausgeschlossen werden (nicht gezeigt). Die Ausschleusung von rekombinantem LST1 in Exosomen wurde auch in einer anderen Zelllinie untersucht. In den Kulturüberständen und Exosomen von transfizierten HeLa-Zellen konnten jedoch keine rekombinanten FLAG-LST1-Proteine nachgewiesen werden, eine verstärkte Exosomen-Ausschleusung in den Transfektanten, die die transmembranen LST1-Isoformen exprimierten, konnte auch nicht festgestellt werden (nicht gezeigt). Letzteres war eine wichtige Kontrolle für den Vesikelübertragungsversuch, mit dem die Funktionalität der LST1-induzierten TNT gezeigt werden konnte (Abb. 37). In weiteren Versuchen konnte in den Kulturüberständen verschiedener Zelllinien keine Sekretion endogener LST1-Proteine detektiert werden (nicht gezeigt).

In zahlreichen Versuchen mit rekombinantem und endogenem LST1 konnte keine Sekretion der löslichen LST1.245/5'-Isoformen nachgewiesen werden. In den transienten Transfektanten wurde nur eine reduzierte Menge dieser Proteine im Lysat nachgewiesen. Somit kann gefolgert werden, dass die löslichen LST1-Isoformen, die von Exon 4-haltigen Transkripten kodiert werden, einer stringenten translationellen oder posttranslationellen Regulation unterliegen. Über die endogenen LST1-Polypeptide, die sich von Transkripten ohne die Exon 4-Sequenz ableiten, kann keine Aussage gemacht werden, da sie wegen der Leserasterverschiebung beträchtlich verkürzt (13 bis 66 AS) sind und nicht von den hergestellten monoklonalen Antikörpern erkannt werden können.

### 7.2.2 Regulation der LST1-Expression in DC

Nachdem die LST1-Proteinexpression in mehreren Zelllinien analysiert worden war, wurde diese nun in primären Zellen untersucht. Für die Analyse wurden menschliche DC ausgewählt, da in früheren Untersuchungen eine Änderung des LST1-Spleißmusters während der DC-Reifung nachgewiesen werden konnte (Hirner 2004).

In den Lysaten von unreifen und reifen DC konnte nur die LST1.2345-Isoform nachgewiesen werden (Abb. 42A), die differentielle Transkriptexpression wurde also auf der Proteinebene nicht bestätigt. Dies ist ein weiterer Beleg für die, bereits im Abschnitt 6.2.1 diskutierte, grundsätzliche Diskrepanz zwischen der Transkript- und Proteinexpression von *LST1*. Quantitative Analysen der *LST1*-Proteinexpression zeigten keine signifikante Veränderung der Gesamtmenge während der DC-Reifung (nicht gezeigt). Bei der Verteilung des Proteins auf die monomere und dimere Konformation konnten allerdings signifikante Veränderungen nachgewiesen werden. In reifen DC, im Vergleich zu unreifen DC, verdoppelte sich in etwa die Proteinmenge des monomeren *LST1*, während sich die Menge des Dimers in etwa halbierte (Abb. 42B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass während der DC-Reifung die *LST1*-Konformation differentiell reguliert wurde.

Die Expressionsanalysen wurden mit Lysaten durchgeführt, die vor der Auftrennung mit reduzierendem, SDS-haltigen Auftragspuffer versetzt und aufgeköcht wurden. Der verwendete PAGE-Auftragspuffer enthält 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (Roti-Load 1, nach Cannon-Carlson und Tang 1997), dieser sollte die Reduktion der Disulfidbrückenbindungen beim *LST1*-Dimer vermitteln. Bei der Untersuchung der endogenen *LST1*-Multimere in HeLa-Zellen, wurde allerdings festgestellt, dass die Dimer-Menge durch die Behandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol nur geringfügig verringert wurde (Abb. 27B). Daher wurde angenommen, dass beim endogenen *LST1* der Großteil des Dimers reduktionsresistent ist.

Die *LST1*-Proteinexpression wurde auch in reifen DC untersucht, die mit der „klassischen“ Jonuleit-Methode generiert wurden. Wie in den vorherigen Analysen, konnte keine Änderung der *LST1*-Gesamtproteinexpression (m*LST1* + d*LST1*) festgestellt werden. Die bereits beschriebene Regulation der *LST1*-Konformation konnte bei den reifen „Jonuleit-DC“ bestätigt werden, diese ist also nicht von der Art der DC-Generierung abhängig (nicht gezeigt). Der Vergleich der Generierungsprotokolle eröffnete die Möglichkeit zu untersuchen, welche der in beiden Methoden eingesetzten proinflammatorischen Faktoren (IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> und TNF- $\alpha$ ) für die Regulation der *LST1*-Konformation verantwortlich ist.

Der Effekt von TNF- $\alpha$  auf die *LST1*-Proteinexpression wurde in HeLa-Zellen untersucht. Der Versuch wurde mit HeLa-Zellen durchgeführt, weil diese eine *LST1*-Proteinexpression aufweisen, die hinsichtlich der Verteilung des Proteins auf die monomere und dimere Form, der Expression in unreifen DC ähnelt. Ein weiterer Grund für die Verwendung der HeLa-Zellen war, dass der Effekt von TNF- $\alpha$  auf die *LST1*-Proteinexpression unabhängig von der DC-Reifung untersucht werden sollte.

Die Behandlung der HeLa-Zellen mit TNF- $\alpha$  hatte keinen Effekt auf die *LST1*-Gesamtproteinexpression (m*LST1* + d*LST1*), führte aber zu einer Erhöhung der nachgewiesenen *LST1*-Monomermenge und zu einer signifikanten Verringerung der Dimermenge (Abb. 43B). Die Behandlung der HeLa-Zellen mit TNF- $\alpha$  führte also zur differentiellen Regulation der *LST1*-Konformation. Die Ergebnisse waren mit denen der unreifen und reifen DC vergleichbar. Die Expressionswerte, die für die behandelten, bzw. unbehandelten HeLa-Zellen ermittelt wurden, zeigten eine stärkere Streuung und die Signifikanz der festgestellten Unterschiede war geringer als bei der Untersuchung der DC. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass für die Auswertung der *LST1*-Expression in den behandelten, bzw. unbehandelten HeLa-Zellen, nur die Ergebnisse aus drei Western-Analysen zusammengefasst wurden. Bei der Untersuchung der *LST1*-Expression in unreifen und reifen DC wurden die Expressionsdaten aus 5 Western-Analysen zusammengefasst.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass TNF- $\alpha$  die LST1-Konformation differentiell reguliert, die Identifizierung der zellulären Mechanismen, die für diese Regulation verantwortlich sind, könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Weiterhin wäre es von Interesse zu klären, ob die anderen, zur Induktion der DC-Reifung verwendeten Faktoren (IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>), ebenfalls eine Änderung des Mengenverhältnis zwischen monomeren und dimeren LST1 verursachen können.

Die Aktivierung von DC nach der Antigenaufnahme veranlasst sie zur Wanderung in die Lymphknoten. Dort können sie als reife DC Antigene präsentieren und T-Lymphozyten aktivieren. In den, in diesem Abschnitt diskutierten Versuchen, konnte gezeigt werden, dass reife DC signifikant weniger LST1.2345 in der dimeren Form aufweisen. Es wäre durchaus vorstellbar, dass das LST1.2345-Dimer konstitutiv inhibitorische Signalkaskaden aktiviert (siehe 6.3.4). Die durch TNF- $\alpha$  induzierte Unterdrückung des LST1-Dimers könnte der Hemmung dieser inhibitorischen Signalkaskaden dienen und so den aktivierten Status der reifen DC aufrechterhalten.

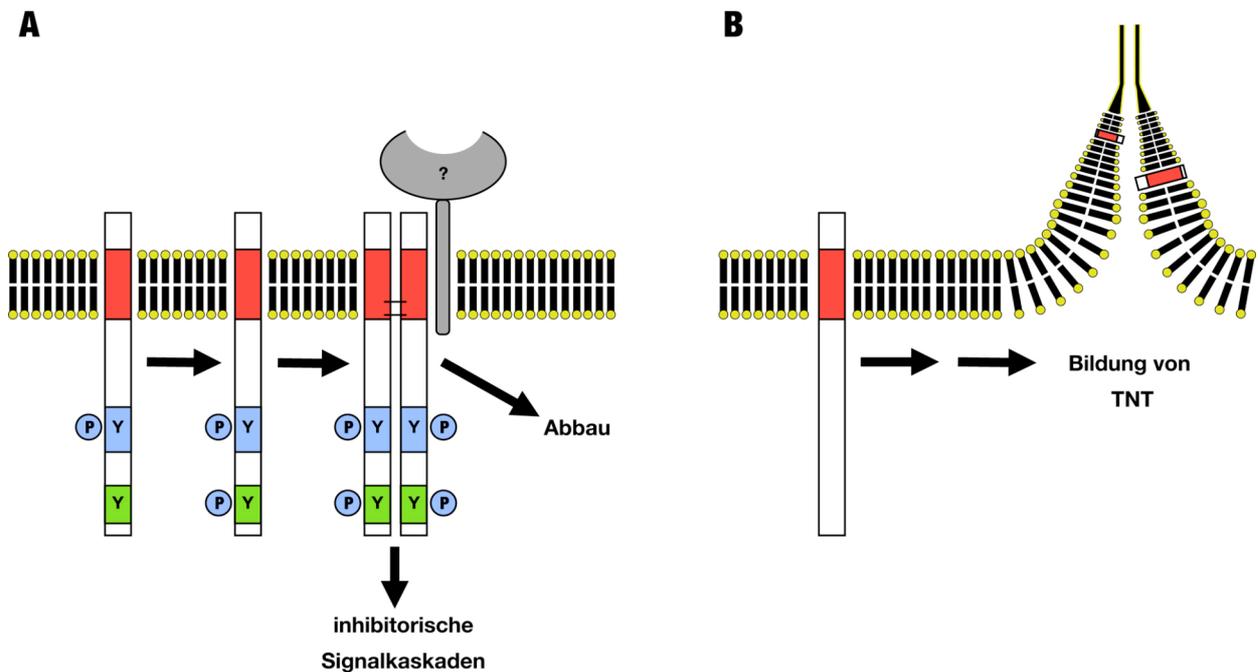
### 7.3 Arbeitsmodell

Die Ergebnisse dieser Arbeit erlauben es ein hypothetisches Arbeitsmodell für die Funktion der transmembranen LST1-Isoformen aufzustellen (Abb. 44). Einerseits könnten diese Isoformen als potentielle Adaptorproteine inhibitorische Signalkaskaden auslösen (Abb. 44A). Andererseits können die transmembranen LST1-Isoformen, über die Induktion von funktionellen TNT die interzelluläre Kommunikation ermöglichen, bzw. regulieren (Abb. 44B).

Die Untersuchung der Membrantopologie, Multimerbildung und Phosphorylierung lieferte Hinweise darauf, dass die transmembranen Isoformen LST1.2345 und LST1.2345' als TRAP agieren könnten (Abb. 44A). Sie sind bei U-937-Zellen am potentiellen ITIM konstitutiv phosphoryliert, die Phosphorylierung des zweiten Tyrosin-enthaltenden Motivs führt zur Dimerisierung des Proteins und zur Abnahme der LST1-Proteinmenge. Die partielle Suppression der LST1.2345-Homodimere bei reifen DC deutet darauf hin, dass die dimere Form inhibitorisch wirkt. Weiterhin ist bei TRAP, die Disulfid-vermittelte Homodimere bilden, stets die dimere Form für die Signaltransduktion verantwortlich (z.B. DAP12 und TRIM, Lanier et al. 1998, bzw. Bruyns et al. 1998). Die vorhandenen Daten erlauben es also zu postulieren, dass das dimere LST1-Protein inhibitorische Signalkaskaden auslösen kann. Die durch Phosphorylierung des C-terminalen Tyrosins induzierten LST1-Dimere sind aber nicht stabil und werden innerhalb kurzer Zeit abgebaut. Die Menge der inhibitorisch wirkenden, dimeren Form kann also über die Phosphorylierung des C-terminalen Tyrosins und über den Abbau reguliert werden. Die Charakterisierung der ausgelösten Signalkaskaden und die Identifizierung eines möglichen Korezeptors, dessen Signale von LST1.2345/5' in den Intrazellulärraum weitergeleitet werden, könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein und zum besseren Verständnis der Rolle von LST1 als TRAP führen.

Die Charakterisierung der Zellmorphologie-Regulation zeigte, dass LST1 die Bildung von funktionellen TNT induziert (Abb. 44B). Es erscheint also möglich, dass LST1 die TNT-vermittelte interzelluläre Kommunikation regulieren kann. Im Gegensatz zu der Funktion als potentielles TRAP spielen die Tyrosin-enthaltenden Motive von LST1.2345/5' bei der Bildung von TNT keine Rolle. In der Untersuchung von Raghunathan et al. konnte festgestellt werden,

dass für die Bildung der zellulären Fortsätze lediglich die LST1-Transmembrandomäne benötigt wurde. Der beobachtete Effekt war unabhängig von der C-terminalen AS-Sequenz der transmembranen LST1-Isoformen und von der Anwesenheit von Cysteinen, die die Multimerbildung vermitteln könnten (Raghunathan et al. 2001). Folglich sind alle transmembranen LST1-Isoformen in der Lage, die Bildung von funktionellen TNT zu induzieren. In einer früheren Untersuchung konnte eine direkte Interaktion zwischen LST1 und Aktin sowie ein Einfluss auf die Aktinpolymerisation ausgeschlossen werden (Schiller 2005). Die Überexpression von LST1 muss also auf indirektem Wege die Bildung von TNT induzieren. Die Untersuchung der molekularen Ursachen für die LST1-vermittelte Bildung von TNT könnte auch zur Aufklärung des zellulären Mechanismus, welcher die Bildung von TNT steuert, beitragen.



**Abbildung 44: Arbeitsmodell für die Funktion der transmembranen LST1-Isoformen. A) Funktion als transmembranes Adaptorprotein.** Dargestellt ist die transmembrane LST1.2345-, bzw. LST1.2345'-Isoform, die Transmembranhelix ist rot markiert. Das potentielle ITIM ist blau, das C-terminale Tyrosin-Motiv grün dargestellt. Ein potentiell vorhandener Korezeptor ist grau gezeichnet. Das monomere LST1-Protein ist am potentiellen ITIM konstitutiv phosphoryliert, die Phosphorylierung des C-terminalen Tyrosinmotivs führt zur Dimerisierung und anschließend zum Abbau des Dimers. Die vorhandenen Daten deuten darauf hin, dass das LST1-Dimer über das ITIM inhibitorische Signalkaskaden auslösen kann. **B) Induktion von tunneling nanotubes.** Dargestellt ist eine transmembrane LST1-Isoform, die Transmembranhelix ist rot markiert. Die Überexpression von transmembranem LST1 induziert über einen noch zu ermittelnden Mechanismus die Bildung von funktionellen tunneling nanotubes (TNT).

## 8 Literaturverzeichnis

1. Ahn E, Lee H, Yun Y. LIME acts as a transmembrane adapter mediating BCR-dependent B-cell activation. *Blood* 2006; 107(4):1521-7.
2. Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(22):11984-9.
3. Bednarczyk T, Hiromatsu Y, Seki N, Poski R, Fukutani T, Kuryowicz A, Jazdzewski K, Chojnowski K, Itoh K, Nauman J. Association of tumor necrosis factor and human leukocyte antigen DRB1 alleles with Graves' ophthalmopathy. *Hum Immunol* 2004; 65(6):632-9.
4. Belov K, Deakin JE, Papenfuss AT, Baker ML, Melman SD, Siddle HV, Gouin N, Goode DL, Sargeant TJ, Robinson MD, Wakefield MJ, Mahony S, Cross JG, Benos PV, Samollow PB, Speed TP, Graves JA, Miller RD. Reconstructing an ancestral mammalian immune supercomplex from a marsupial major histocompatibility complex. *PLoS Biol* 2006; (3):e46.
5. Bettens F, Passweg J, Gratwohl A, Chalandon Y, Helg C, Chapuis B, Schanz U, Libura J, Roosnek E, Tiercy JM. Association of TNF $\alpha$  and IL-10 polymorphisms with mortality in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 2006; 81(9):1261-7.
6. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 1999; 294(5):1351-62.
7. Brdicka T, Imrich M, Angelisová P, Brdicková N, Horváth O, Spicka J, Hilgert I, Lusková P, Dráber P, Novák P, Engels N, Wienands J, Simeoni L, Osterreicher J, Aguado E, Malissen M, Schraven B, Horejsí V. Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. *J Exp Med* 2002; 196(12):1617-26.
8. Bruyns E, Marie-Cardine A, Kirchgessner H, Sagolla K, Shevchenko A, Mann M, Autschbach F, Bensussan A, Meuer S, Schraven B. T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. *J Exp Med* 1998; 188(3):561-75.
9. Cannon-Carlson S, Tang J. Modification of the Laemmli sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels. *Anal Biochem* 1997; 246(1):146-8.
10. Carleton M, Brown DT. The formation of intramolecular disulfide bridges is required for induction of the Sindbis virus mutant ts23 phenotype. *J Virol* 1997; 71(10):7696-703.

11. Chao MJ, Ramagopalan SV, Herrera BM, Lincoln MR, Dymant DA, Sadovnick AD, Ebers GC. Epigenetics in multiple sclerosis susceptibility: difference in transgenerational risk localizes to the major histocompatibility complex. *Hum Mol Genet* 2009; 18(2):261-6.
12. Chinnery HR, Pearlman E, McMenamin PG. Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *J Immunol* 2008; 180(9):5779-83.
13. Davis DM, Sowinski S. Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(6):431-6.
14. Deakin JE, Papenfuss AT, Belov K, Cross JG, Coggill P, Palmer S, Sims S, Speed TP, Beck S, Graves JA. Evolution and comparative analysis of the MHC Class III inflammatory region. *BMC Genomics* 2006; 7:281.
15. de Baey A, Holzinger I, Scholz S, Keller E, Weiss EH, Albert E. Pvu II Polymorphism in the Primate Homologue of the Mouse B144 (LST-1). A Novel Marker Gene Within the Tumor Necrosis Factor Region. *Hum Immunol* 1995; 42(1):9-14.
16. de Baey A, Fellerhof B, Maier S, Martinnozi S, Weidle U, Weiss EH. Complex expression pattern of the TNF region gene LST1 through Differential Regulation, Initiation and Alternative Splicing. *Genomics* 1997; 45(3):591-600.
17. Dohm JC, Tsend-Ayush E, Reinhardt R, Grützner F, Himmelbauer H. Disruption and pseudoautosomal localization of the major histocompatibility complex in monotremes. *Genome Biol* 2007; 8(8):R175.
18. Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 2002; 297(5583):1007-13.
19. Faix J, Rottner K. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18(1):18-25.
20. Feichtlbauer P, Gomolka M, Brännler G, Eisenhut T, Truckenbrodt H, Albert ED. HLA region microsatellite polymorphisms in juvenile arthritis. *Tissue Antigens* 1998; 52(3):220-9.
21. Field M, Gallagher G, Eskdale J, McGarry F, Richards SD, Munro R, Oh HH, Campbell C. Tumor necrosis factor locus polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; 50(3):303-7.
22. Galkina SI, Sud'ina GF, Ullrich V. Inhibition of neutrophil spreading during adhesion to fibronectin reveals formation of long tubulovesicular cell extensions (cytonemes). *Exp Cell Res* 2001; 266(2):222-8.
23. Galkina SI, Molotkovsky JG, Ullrich V, Sud'ina GF. Scanning electron microscopy study of neutrophil membrane tubulovesicular extensions (cytonemes) and their role in anchoring, aggregation and phagocytosis. The effect of nitric oxide. *Exp Cell Res* 2005; 304(2):620-9.

24. Galkina SI, Sud'ina GF, Klein T. Metabolic regulation of neutrophil spreading, membrane tubulovesicular extensions (cytonemes) formation and intracellular pH upon adhesion to fibronectin. *Exp Cell Res* 2006; 312(13):2568-79.
25. Gambelungho G, Ghaderi M, Cosentino A, Falorni A, Brunetti P, Falorni A, Sanjeevi CB. Association of MHC Class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with Type I diabetes. *Diabetologia* 2000; 43(4):507-14.
26. González S, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, García-Fernández S, Torre-Alonso JC, López-Larrea C. MICA rather than MICB, TNFA, or HLA-DRB1 is associated with susceptibility to psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29(5):973-8.
27. Grigorian AL, Bustamante JJ, Hernandez P, Martinez AO, Haro LS. Extraordinarily stable disulfide-linked homodimer of human growth hormone. *Protein Sci* 2005; 14(4):902-13.
28. Gupta N, DeFranco AL. Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation. *Mol Biol Cell* 2003; 14(2):432-44.
29. Harlow E, Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory* 1988.
30. von Heijne G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* 1992; 225(2):487-94.
31. Hillier LD, Lennon G, Becker M, Bonaldo MF, Chiapelli B, Chissole S, Dietrich N, DuBuque T, Favello A, Gish W, Hawkins M, Hultman M, Kucaba T, Lacy M, Le M, Le N, Mardis E, Moore B, Morris M, Parsons J, Prange C, Rifkin L, Rohlfing T, Schellenberg K, Bento Soares M, Tan F, Thierry-Meg J, Trevaskis E, Underwood K, Wohldman P, Waterston R, Wilson R, Marra M. Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags. *Genome Res* 1996; 6(9):807-28.
32. Hirner H. Funktionelle Analyse von *LST1*: Untersuchung der mRNA-Expression in Monozyten und Dendritischen Zellen und rekombinante Expression in HeLa-Zellen. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München 2004.
33. Holzinger I, de Baey A, Messer G, Kick G, Zwierzina H, Weiss EH. Cloning and genomic characterization of *LST1*: a new gene in the human TNF region. *Immunogenetics* 1995; 42(5):315-22.
34. Iida A, Ozaki K, Ohnishi Y, Tanaka T, Nakamura Y. Identification of 46 novel SNPs in the 130-kb region containing a myocardial infarction susceptibility gene on chromosomal band 6p21. *J Hum Genet* 2003; 48(9):476-9.
35. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology 6th Edition. *Garland Science* 2005.

36. Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*; 27(12):3135-42.
37. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 2001; 305(3):567-80.
38. Kilding R, Iles MM, Timms JM, Worthington J, Wilson AG. Additional genetic susceptibility for rheumatoid arthritis telomeric of the DRB1 locus. *Arthritis Rheum* 2004; 50(3):763-9.
39. Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 1998; (6):693-701.
40. Lehner B, Semple JI, Brown SE, Counsell D, Campbell RD, Sanderson CM. Analysis of a high-throughput yeast two-hybrid system and its use to predict the function of intracellular proteins encoded within the human MHC class III region. *Genomics* 2004; 83(1):153-67.
41. Lei H, Vorechovsky I. Identification of splicing silencers and enhancers in sense Alus: a role for pseudoacceptors in splice site repression. *Mol Cell Biol* 2005; 25(16):6912-20.
42. Lim LP, Burge CB. A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(20):11193-8.
43. MacGregor A, Ollier W, Thomson W, Jawaheer D, Silman A. HLA-DRB1\*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity. *J Rheumatol* 1995; 22(6):1032-6.
44. McNally LM, McNally MT. An RNA splicing enhancer-like sequence is a component of a splicing inhibitor element from Rous sarcoma virus. *Mol Cell Biol* 1998; 18(6):3103-11.
45. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, Riethmuller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an Nco I polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 1991; 173(1):209-19.
46. Mewar D, Marinou I, Lee ME, Timms JM, Kilding R, Teare MD, Read RC, Wilson AG. Haplotype-specific gene expression profiles in a telomeric major histocompatibility complex gene cluster and susceptibility to autoimmune diseases. *Genes Immun* 2006; 7(8):625-31.
47. Miller J, Fraser SE, McClay D. Dynamics of thin filopodia during sea urchin gastrulation. *Development* 1995; 121(8):2501-11.

48. Mrazek F, Holla LI, Hutyrova B, Znojil V, Vasku A, Kolek V, Welsh KI, Vacha J, du Bois RM, Petrek M. Association of tumour necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha and HLA-DRB1 gene polymorphisms with Löfgren's syndrome in Czech patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2005; 65(2):163-71.
49. Mulcahy H, O'Rourke KP, Adams C, Molloy MG, O'Gara F. LST1 and NCR3 expression in autoimmune inflammation and in response to IFN-gamma, LPS and microbial infection. *Immunogenetics* 2006; 57(12):893-903.
50. Nagy GR, Györfy B, Galamb O, Molnár B, Nagy B, Papp Z. Use of routinely collected amniotic fluid for whole-genome expression analysis of polygenic disorders. *Clin Chem* 2006; 52(11):2013-20.
51. Nalabolu SR, Shukla H, Nallur G, Parimoo S, Weissman SM. Genes in a 220-kb region spanning the TNF cluster in human MHC. *Genomics* 1996; 31(2):215-22.
52. Nejentsev S, Howson JM, Walker NM, Szeszko J, Field SF, Stevens HE, Reynolds P, Hardy M, King E, Masters J, Hulme J, Maier LM, Smyth D, Bailey R, Cooper JD, Ribas G, Campbell RD, Clayton DG, Todd JA, Wellcome Trust Case Control Consortium. Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature* 2007; 450(7171):887-92.
53. Nitschké M. Topografie von LST1-Isoformen in der Zellmembran und Reinigung LST1-spezifischer Antikörper. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München 2006.
54. Onfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K, Davis DM. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* 2004; 173(3):1511-3.
55. Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, Purbhoo MA, Sowinski S, Hume AN, Seabra MC, Neil MA, French PM, Davis DM. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* 2006; 177(12):8476-83.
56. Orr SJ, Morgan NM, Elliott J, Burrows JF, Scott CJ, McVicar DW, Johnston JA. CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover. *Blood* 2007; 109(3):1061-8.
57. Pellegrin S, Mellor H. The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol* 2005; 15(2):129-33.
58. Potrzebowski L, Vinckenbosch N, Marques AC, Chalmel F, Jégou B, Kaessmann H. Chromosomal gene movements reflect the recent origin and biology of therian sex chromosomes. *PLoS Biol* 2008; 6(4):e80.
59. Prudovsky I, Tarantini F, Landriscina M, Neivandt D, Soldi R, Kirov A, Small D, Kathir KM, Rajalingam D, Kumar TK. Secretion without Golgi. *J Cell Biochem* 2008; 103(5):1327-43.

60. Raghunathan A, Sivakamasundari R, Wolenski J, Poddar R, Weissman SM. Functional analysis of B144/LST1: a gene in the tumor necrosis factor cluster that induces formation of long filopodia in eukaryotic cells. *Exp Cell Res* 2001; 268(2):230-44.
61. Ramírez-Weber FA, Kornberg TB. Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 1999; 97(5):599-607.
62. Remberger M, Jaksch M, Uzunel M, Mattsson J. Serum levels of cytokines correlate to donor chimerism and acute graft-vs.-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 2003; 70(6):384-91.
63. Reveille JD. The genetic basis of ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18(4):332-41.
64. Rohwedder I. Nachweis der Interaktion von LST1 und der potenziellen E3-Ligase KIAA1333 Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München 2008.
65. Rollinger-Holzinger I, Eibl B, Pauly M, Griesser U, Hentges F, Auer B, Pall G, Schratzberger P, Niederwieser D, Weiss EH, Zwierzina H. LST1: a gene with extensive alternative splicing and immunomodulatory function. *J Immunol* 2000; 164(6):3169-76.
66. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 2004; 303(5660):1007-10.
67. Sanders PR, Cantin GT, Greenbaum DC, Gilson PR, Nebl T, Moritz RL, Yates JR 3rd, Hodder AN, Crabb BS. Identification of protein complexes in detergent-resistant membranes of *Plasmodium falciparum* schizonts. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 154(2):148-57.
68. Sargent CA, Dunham I, Campbell RD. Identification of multiple HTF-island associated genes in the human major histocompatibility complex class III region. *EMBO J* 1989; 8(8):2305-12.
69. Schlecker E. Etablierung eines DAP12-vermittelten Reportersystems. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München 2007.
70. See YP, Jackowski G, Creighton TE. Protein Structure: A Practical Approach. *IRL Press Oxford* 1989.
71. Seidl A. Nachweis der Interaktion von LST1 und der potenziellen E3-Ligase KIAA1333. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München 2007.
72. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004; 22(12):1567-72.

73. Sharma JB, Gulati N. Potential relationship between dengue fever and neural tube defects in a northern district of India. *Int J Gynaecol Obstet* 1992; 39(4):291-5.
74. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004; 64(6):631-49.
75. Simeoni L, Lindquist JA, Smida M, Witte V, Arndt B, Schraven B. Control of lymphocyte development and activation by negative regulatory transmembrane adapter proteins. *Immunol Rev* 2008; 224:215-28.
76. Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A, Köhler K, Oddos S, Eissmann P, Brodsky FM, Hopkins C, Onfelt B, Sattentau Q, Davis DM. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 2008; 10(2):211-9.
77. Spink CF, Keen LJ, Middleton PG, Bidwell JL. Discrimination of suballeles present at the TNFd microsatellite locus using induced heteroduplex analysis. *Genes Immun* 2004; 5(1):76-9.
78. Spink CF, Keen LJ, Mensah FK, Law GR, Bidwell JL, Morgan GJ. Association between non-Hodgkin lymphoma and haplotypes in the TNF region. *Br J Haematol* 2006; 133(3):293-300.
79. Spranger S. Professionelle Antigen-präsentierende Zellen: Einfluss negativer kostimulatorischer Moleküle auf die Induktion von angeborenen und adaptiven Immunantworten. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München 2008.
80. Tedoldi S, Paterson JC, Hansmann ML, Natkunam Y, Rüdiger T, Angelisova P, Du MQ, Robertson H, Roncador G, Sanchez L, Pozzobon M, Masir N, Barry R, Pileri S, Mason DY, Marafioti T, Horejsí V. Transmembrane adaptor molecules: a new category of lymphoid-cell markers. *Blood* 2006; 107(1):213-21.
81. Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1988; 27(16):6008-13.
82. Tsuge I, Shen FW, Steinmetz M, Boyse EA. A gene in the H-2S:H-2D interval of the major histocompatibility complex which is transcribed in B cells and macrophages. *Immunogenetics* 1987; 26(6):378-80.
83. Tuglular S, Berthoux P, Berthoux F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor alpha gene at position -308 and TNFd microsatellite in primary IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(4):724-31.
84. Udalova IA, Nedospasov SA, Webb GC, Chaplin DD, Turetskaya RL. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. *Genomics* 1993; 16(1):180-6.

85. Wang Z, Rolish ME, Yeo G, Tung V, Mawson M, Burge CB. Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell* 2004; 119(6):831-45.
86. Watkins SC, Salter RD. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity* 2005; 23(3):309-18.
87. Wood W, Martin P. Structures in focus—filopodia. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34(7):726-30.
88. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Möbius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 2003; 278(13):10963-72.
89. Xie T, Rowen L, Aguado B, Ahearn ME, Madan A, Qin S, Campbell RD, Hood L. Analysis of the Gene-Dense Major Histocompatibility Complex Class III Region and Its Comparison to Mouse. *Genome Res* 2003; 13(12):2621-36.
90. Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, Rodríguez-Pérez JM, Zuñiga J, Granados J. Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and the HLA-DRB1 locus in Mexican mestizo patients with ulcerative colitis. *Immunol Lett* 2004; 95(1):31-5.
91. Yoo YK, Ke X, Hong S, Jang HY, Park K, Kim S, Ahn T, Lee YD, Song O, Rho NY, Lee MS, Lee YS, Kim J, Kim YJ, Yang JM, Song K, Kimm K, Weir B, Cardon LR, Lee JE, Hwang JJ. Fine-scale map of encyclopedia of DNA elements regions in the Korean population. *Genetics* 2006; 174(1):491-7.
92. Yu MC, Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. Association of TAP2 gene polymorphisms in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2004; 23(1):35-9.
93. Yu X, Weissman SM. Characterization of the promoter of human leukocyte-specific transcript 1. A small gene with a complex pattern of alternative transcripts. *J Biol Chem* 2000; 275(44):34597-608.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

AK	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
Amp	<u>A</u> mpicillin
APS	<u>A</u> mmoniumperoxid <u>s</u> ulfat
AS	<u>A</u> minosäure
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin (Rinderserumalbumin)
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation (Oberflächenantigenomenklatur)
CFSE	<u>C</u> arboxy- <u>F</u> luoresceinacetat <u>S</u> uccinimidyl- <u>E</u> ster
CLF	<u>C</u> ytoneme- <u>L</u> ike <u>F</u> ilopodium (Zytoneme-ähnliches Filopodium)
DC	<u>D</u> endritic <u>C</u> ells (Dendritische Zellen)
Dil	1,1- <u>D</u> ilinoleyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanin
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
dNTP	2'- <u>D</u> esoxy-Nukleosid-5'- <u>T</u> riphosphat
DsRed2	<u>D</u> iscosoma <u>s</u> p. <u>R</u> ed fluorescent protein <u>2</u> ( <i>Discosoma</i> sp. rot fluoreszierendes Protein 2)
DTAF	4,6- <u>D</u> ichlortriazinylaminofluorescein
<i>E. coli</i>	<i>E</i> scherichia <i>c</i> oli
EGFP	<u>E</u> nhanced <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein (Verbessertes grün fluoreszierendes Protein)
ESE	<u>E</u> xonic <u>S</u> plicing <u>E</u> nhancer (Exonischer Spleiß-Verstärker)
ESS	<u>E</u> xonic <u>S</u> plicing <u>S</u> ilencer (Exonischer Spleiß-Unterdrücker)
EtBr	<u>E</u> thidiumbromid
FACS	<u>F</u> luorescent <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting (Durchflusszytometrie)
FCS	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum (Fötales Kälberserum)
G418	<u>G</u> eneticin-418
GM-CSF	<u>G</u> ranulocyte- <u>M</u> acrophage <u>C</u> olony- <u>S</u> timulating <u>F</u> actor
GTE-Puffer	<u>G</u> lucose- <u>T</u> ris- <u>E</u> DTA-Puffer
HLA	<u>H</u> uman <u>L</u> eukocyte <u>A</u> ntigen (Humanes Leukozytenantigen)
HEPES	2-(4-[2- <u>H</u> ydroxyethyl]-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<u>H</u> orse <u>R</u> adish <u>P</u> eroxidase (Meerrettichperoxidase)
IFN- $\gamma$	<u>I</u> nterferon- $\gamma$
Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IL	<u>I</u> nterleukin
IP	<u>I</u> mmunpräzipitation
IPTG	<u>I</u> sopropyl- $\beta$ - <u>D</u> - <u>T</u> hiogalactosid
ITAM	<u>I</u> mmunrezeptor <u>T</u> yrosin-basiertes <u>a</u> ktivierendes <u>M</u> otiv
ITIM	<u>I</u> mmunrezeptor <u>T</u> yrosin-basiertes <u>i</u> nhibitorisches <u>M</u> otiv
ITSM	<u>I</u> mmunrezeptor <u>T</u> yrosin-basiertes <u>S</u> witch <u>M</u> otiv
kDa	<u>K</u> ilodalton

Lat-A	<u>L</u> atrunculin- <u>A</u>
LB-Medium	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Medium
MHC	<u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NC	<u>N</u> itrozellulose
NK-Zellen	<u>N</u> atürliche <u>K</u> illerzellen
PA	<u>P</u> olyacrylamid
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Polymerasekettenreaktion)
PBS	<u>P</u> hosphate- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (Phosphat-gepufferte Saline)
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> thylenglykol
PEI	<u>P</u> oly <u>e</u> thylenimin
PFA	<u>P</u> araformaldehyd
PGE <sub>2</sub>	<u>P</u> rostaglandin
PVDF	<u>P</u> olyvinylidenfluorid
RNase	<u>R</u> ibonuklease
RPE	<u>R</u> -Phycoerithrin
RPMI-Medium	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute-Medium
RT-PCR	<u>R</u> everse- <u>T</u> ranskriptase- <u>P</u> CR
SOC-Medium	<u>S</u> uper <u>O</u> ptimal broth with <u>C</u> atabolite repression-Medium
TAE-Puffer	<u>T</u> ris- <u>A</u> acetat- <u>E</u> DTA-Puffer
Taq	hitzestabile Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE-Puffer	<u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA-Puffer
TBS	<u>T</u> ris- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (Tris-gepufferte Saline)
TEMED	<u>N,N,N',N'</u> - <u>T</u> etramethylethylendiamin
TE-Puffer	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA-Puffer
TNF- $\alpha$	<u>T</u> umor <u>N</u> ekrose <u>F</u> aktor- $\alpha$
TNT	<u>T</u> unneling <u>N</u> anotubes (Tunnel-bildende Nanoröhren)
TPA	<u>T</u> etradecanoylphorbolacetat
TRAP	<u>T</u> ransmembranes <u>A</u> daptorprotein
Tris	<u>T</u> ris-(hydroxymethyl) aminomethan
Tub	<u>T</u> ubulin
Tween 20	Polyoxymethylensorbitan Monolaurat
U	<u>U</u> nit (Einheit für die Enzymaktivität)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ - <u>D</u> - <u>G</u> alactosid

## 9.2 *LST1*-Sequenz

Dargestellt ist die genomische Sequenz von *LST1* (aus Rollinger-Holzinger et al. 2000). Die Exone sind farbig gekennzeichnet. Die bei der RT-PCR (siehe 6.1.1) verwendeten Primer sind gelb hinterlegt. Die Positionen der bekannten Basenaustausch-Polymorphismen sind blau hinterlegt. Der Translationsstart, sowie das reguläre Stopp-Codon sind ebenfalls markiert (grün, bzw. rot hinterlegt).

			Exon 1A		
AACACCAAAT	ATGCCAGAGC	TCCCAGTCTG	AACTGGAGCA	GGGTACATGT	50
GTCCACAGAC	ATATGCCAAG	ATCAAGAGGT	CTCAACAGAT	GCAGTGTAAG	100
AGGTAATAGA	GAAGAGTTAA	TCAAGGAAGA	CACCTGAAGG	TGGTGGGTGT	150
TTGCTGACTA	GTGGCAGGAT	CAGTGAAATG	ACTGGAGCTG	AGGCAGATTA	200
TGGCCCTAGC	TACAGGCCCA	GAAGTTTGAA	AAGAAAGATG	TTGTAACCCT	250
AACCCTGGAG	CCGAACTTCC	TCTCCTAACA	ATGCTGGGGA	GGAACCCAGG	300
	Exon 1B			Exon 1B'	
CTGGGGGAGA	AGTTAAAGCC	AGAGGAGGGG	CAGGAATGTC	TGAGGTGGCA	350
ACACTTCTCT	TCAGCCAGAC	AGCACTGGCC	AGTTTGGAGT	CTGTCCATCC	400
TGCAGGCCAC	AAGCTCTGGG	TAAGCTGGGA	ATGGGCAGGG	ACCTTGGTGG	450
AAGGATGGTC	ACACCCCAAG	GTGGGGTGAA	GCTAAGATGA	GGGGAGGGAG	500
AGTATGGGTT	TGAGTTTCCC	TGGGCCGTCG	AGGAATCCTC	TGAGTCTCTG	550
CTCCCCAAAG	AAATTAAGA	CAATTCATTT	CTGTGCCAC	GGCCCTTATG	600
GCTCCACCTG	CACTTCTGCT	CCCCACCCC	CAGAATTCCT	CTTAAACCCA	650
GAAGGTCCCA	GTTTCCAGAC	CCTAGTCAGT	ATATCTGGCT	CTGGGGTGAA	700
GAGAACGGCC	CCCTCTTCAC	CCTCAAACAG	GAACCAGTGG	TTGGAGGGGA	750
GGAAGTGCCT	GAGGGGAAGT	TATGGGGCCC	CAGATACTCC	TCCATGCCCC	800
	Exon 1C				
ACTTCAGCCC	TAGCAGCATC	TGCCTGTGGG	AAGCAGCTCT	CCACACCAGC	850
CAAGGGGGCC	CCCACACTCC	CGCGCTGCTC	TGCGGCTCAG	GGAGCAGCCC	900
ACCTGCTGGG	TGTGCTGATA	TCACCCTCCC	TTCTTCCCCC	CAGTGCCAC	950
	Exon 1D				
ACCCACCCAG	GCCCAGGCTC	CTTCCCCTCC	ATCATCCCCT	TACCAGCACC	1000
TAGAACCATC	CAGGGCTGAA	AAGTCCCCTC	CAAACCACGT	GGTCAGCCCA	1050
GGGCAGAGGA	AAGGGCTGGG	CTCTGGAGTT	GGGCAGAGCT	GGCCTTAAAC	1100
			Exon 1E		
CCCAGCTCCA	CCTTCTGGG	ATGGGTGACC	TAGTAAAGTC	CAGGCTTGAA	1150
TCTCGGGTCT	TTACTTGGGC	AACGGGCACC	ATGATACCCT	ATGTTCTGGG	1200
GATTAGCAGT	GAGGAATGGA	AAGTGCCAG	CTCGGGTTGG	CACATAAGGG	1250
AGGCTCCCCA	GCCTGGGAAC	GATTATAACA	GAGGGCCCCCT	CACTTCACAG	1300
	Exon 2				
ATGAGGAACT	TGAGGCAAGT	CACCAGCCCC	TGATCATTTT	GCCTAAAAGA	1350
Lst2s					
GCAAGGACTA	GAGTTCCTGA	CCTCCAGGCC	AGTCCCTGAT	CCCTGACCTA	1400
START					
ATCTTATCGC	GGAATGATGG	TAAGTAAAGT	GTCTCTTGCA	TCTGCATAGA	1450
GAGAGTCCTG	GGAGCTTAGG	AAGTGATGGG	GAACAGTGAT	GTATGCAGCT	1500



### 9.3 LST1-Polymorphismen

Die bislang beschriebenen Polymorphismen sind mit der Bezeichnung, Lokalisation im *LST1*-Gen und der umgebenden Sequenz aufgelistet.

Bezeichnung	Lokalisation	Sequenz	Beschreibung
i-LST1-1	5'-UTR	TCTGTGTTCAATGCCAGAATG TCTGTGTTCA <b>G</b> TGCCAGAATG	lida et al. 2003
i-LST1-2	Intron 1B	TGAAGAGAAC <b>A</b> GCCCCCTCTT TGAAGAGAAC <b>G</b> GCCCCCTCTT	lida et al. 2003
i-LST1-3	Intron 1C	CACCCTCCCTTCTTCCCCCA CACCCTCCCT <b>A</b> CTTCCCCCA	lida et al. 2003
LST1*2	Intron 2	GCATAGAGAG <b>A</b> GCCTGGGAG GCATAGAGAG <b>G</b> GCCTGGGAG	Kilding et al. 2004
TNFd	Intron 4	GAGAGAGAGAGAGAGA <b>GA</b> GG GAGAGAGAGAGAGAGA ( <b>GA</b> ) <sub>2-8</sub> GG	Udalova et al. 1993
TNFe	Intron 4	AATGAAAGAGAGAGA <b>GA</b> GGC AATGAAAGAGAGAGA ( <b>GA</b> ) <sub>2-4</sub> GGC	Udalova et al. 1993
i-LST1-5	Exon 5	AAATTAAAAT <b>A</b> AAAAAACAC AAATTAAAAT <b>T</b> AAAAAACAC	lida et al. 2003
rs61720346	Exon 5	TCCGTTCAAATTGATCATCAT TCCGTTCAA <b>A</b> TGATCATCAT	Yoo et al. 2006
rs61180923	3'-UTR	TTGTTGGGT <b>G</b> AATGACAGTGT TTGTTGGGT <b>G</b> AATGACAGTGT	Yoo et al. 2006

## 9.4 Charakterisierung der monoklonalen LST1-Antikörper

### Detektion von denaturiertem LST1 mittels monoklonaler Antikörper

Western Blot									
	Blot #	HIS-LST1 (bakteriell)	HEK LST1 Transfekt. (eukaryo.)	HEK nicht transfekt. (eukaryo.)	LST1 Abbauprod. erkannt?	LST1 in U937 Lysat erkannt?	FLAG- LST1.2345 erkannt?	FLAG- LST1.2345' erkannt?	LST1.2345- FLAG erkannt?
1-B1	1A	+	-	-	-				
1-B2	1B	-	-	-	-				
1-C7	1C	+	-	-	-				
1-D2	1D, 13	+++	++	-	-	+			
1-E2	1E, 13	++	+	-	-				
1-F2	2A, 13, 16	+++	+++	+	+	-			
1-F4	2B	+	-	-	-				
1-H1	2C, 13	++	+	+	-				
2-A5	2D	-	-	-	-				
2-A9	2E	+	-	-	-				
2-A12	3A	++	++	++	+				
2-B1	3B	+++	++	+	++	+			
2-B7	3C	+++	+	+	-				
2C10	3D, 14	++	++	-	-	+			
2-D5	3E	++	++	+	+	+			
2-D10	4A	+++	++	-	++	+	+	+	+
2-F10	4B	+++	+	+	+				
2-H1	4C	+	+	+	+				
2-H5	4D, 14, 16	++	+	-	+				
3-B3	4E	+	-	-	-				
3-D7	5A	-	-	-	-	-			
3-D8	5B	+	+	-	-				
3-D9	5C	-	-	-	-				
3-D12	5D	-	-	-	-				
3-E2	5E, 14	+++	+	+	-				

Western Blot									
	Blot #	HIS-LST1 (bakteriell)	HEK LST1 Transfekt. (eukaryo.)	HEK nicht transfekt. (eukaryo.)	LST1 Abbauprod. erkannt?	LST1 in U937 Lysat erkannt?	FLAG- LST1.2345 erkannt?	FLAG- LST1.2345' erkannt?	LST1.2345- FLAG erkannt?
3-E5	6A, 14	++	++	-	-				
4-G12	6B	++	+	-	-				
4-H6	6C	+++	+++	-	-	+	++	++	++
5-D10	6D	-	-	-	-				
5-E4	6E	+++	++	++	+				
5-G5	7A	+	-	-	-				
5-G8	7B	+++	+++	-	+	++			
5-H8	7C	-	-	-	-				
6-B7	7D	+	+	-	-				
6-C2	7E, 14,16	+++	++	-	-				
6-D10	8A	+	-	-	-				
6-E3	8B	-	-	-	-				
6-F2	8C, 15	+++	++	++	+				
6-G4	8D, 15	+/-	+/-	-	-				
6-G9	8E	+	-	-	-				
6-H6	9A	-	-	-	-				
6-H7	9B, 15	++	++	-	+				
7-C11	9C	+	+	-	-				
7-D4	9D	-	-	-	-				
7-E2	9E	+++	+++	-	+	++	+++	+++	-
7-F1	10A	+	-	-	-				
7-G5	10B	++	+	-	-				
7-G6	10C	-	-	-	-				
8-B3	10D	-	-	-	-				
8-C2	10E	+	-	-	-				
8-C3	11A, 15	+	-	-	-				
8-D12	11B, 15	+++	+++	-	+	+	+++	+++	+++
8-E8	11C, 16	+++	+++	-	++	-			

Western Blot									
	Blot #	HIS-LST1 (bakteriell)	HEK LST1 Transfekt. (eukaryo.)	HEK nicht transfekt. (eukaryo.)	LST1 Abbauprod. erkannt?	LST1 in U937 Lysat erkannt?	FLAG- LST1.2345 erkannt?	FLAG- LST1.2345 erkannt?	LST1.2345- FLAG erkannt?
8-G1	11D, 16	+	-	-	-				
8-G6	11E	++	++	-	+				
8-G10	12A	-	-	-	-				
8-G12	12B	-	-	-	-				
8-H6	12C	-	-	-	-				
<b>Legende:</b>									
-	keine Erkennung								
+	sichtbare Erkennung								
++	deutliche Erkennung								
+++	starke Erkennung								

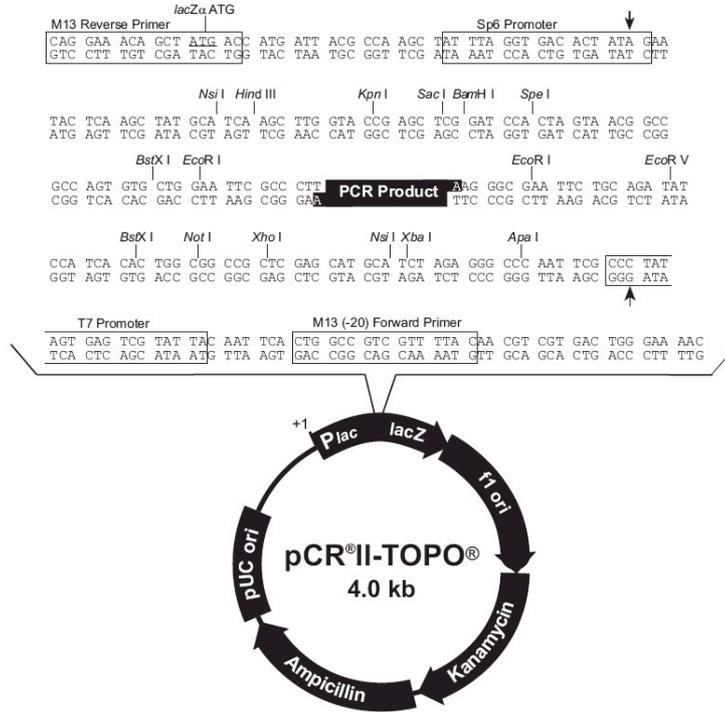
### Detektion von nativem LST1 mittels monoklonaler Antikörper

FACS		
Überstand	LST1 in der intrazellulären Färbung erkannt?	Unterschied zwischen U937 und U937 LST1 Transfektante erkannt?
1-B2	+	+
2-A5	+	-
2-B1	++	+
2-D10	+	-
3-D7	+	+
4-H6	++	+
5-G8	+	+
6-C2	+	-
6-H7	+	-
7-E2	+	-
8-D12	+++	++
8-E8	+	-
8-G6	+	-
<b>Legende:</b>		
-	keine Erkennung	
+	sichtbare Erkennung	
++	deutliche Erkennung	
+++	starke Erkennung	

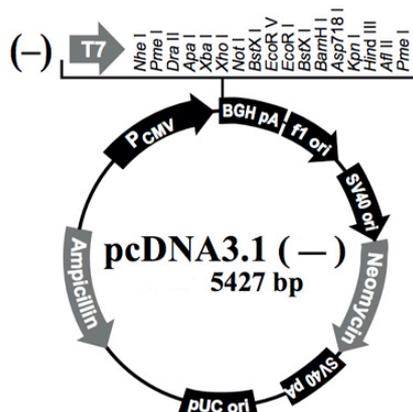
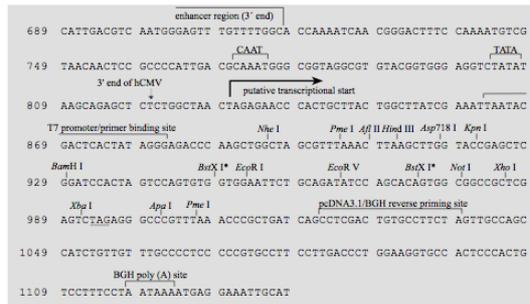


## 9.6 Verwendete Vektoren

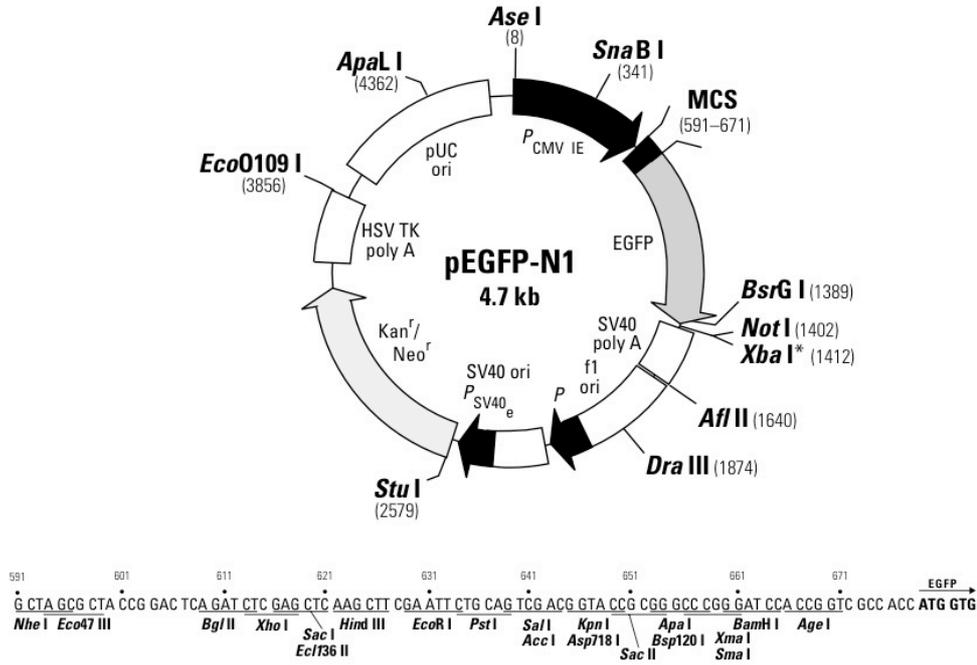
### Vektor pCR II-TOPO



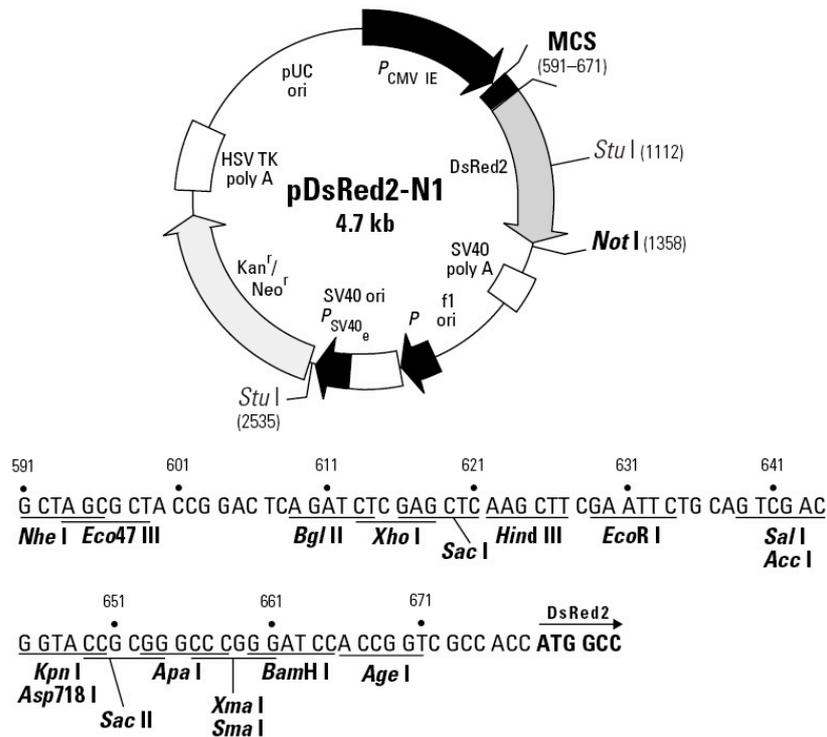
### Vektor pcDNA 3.1 (-)



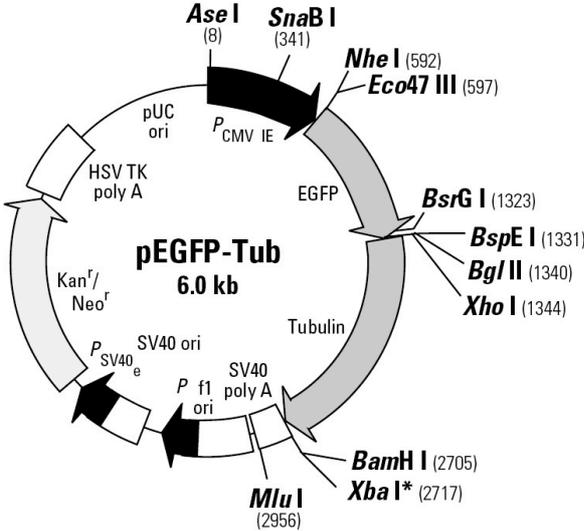
Vektor pEGFP-N1



Vektor pDS-Red2-N1



### Vektor pEGFP-Tub



## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die diesen langen Weg mit mir gegangen sind und so zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Mein herzlichster Dank gilt insbesondere:

**Prof. Elisabeth Weiß** für die hervorragende Betreuung, die unermüdliche Unterstützung und die lehrreichen Jahre in ihrer Arbeitsgruppe.

**Prof. Dolores Schendel** für die Unterstützung dieses Projekts im Rahmen des PhD-Programms vom Helmholtz Zentrum München.

**Dr. Elisabeth Kremmer** und ihrer Arbeitsgruppe für die Herstellung der monoklonalen LST1-Antikörpern.

**Prof. Michael Schleicher** für die geduldige Hilfe mit Rat und Tat bei meinen regelmäßigen Anfragen.

**John-Christian Eilert** für die Durchführung von zahllosen Mikroinjektionsversuchen.

**Dr. Wolfgang Klinkert** für die Benutzung des FACSCalibur-Zytometers am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried.

**Dr. Olga Alexandrova, Andrea Rottach** und **Hilmar Strickfaden** für sehr informative Einführungen in die wunderbare Welt der Mikroskopie.

**Anja Gahl** für den stetigen PEI-Nachschub.

**Dr. Boris Joffe** für seine Tätigkeit als Wegweiser durch den Statistik-Dschungel.

**Stefani Spranger** für die Generierung der DC.

**Tine** fürs Korrekturlesen und für die engagierte Unterstützung in allen Lebenslagen.

Den fleißigen LST1-, bzw. G2E3-Diplomanden **Max, Alex, Ina** und **Carina**, die allesamt zu dieser Arbeit und der schönen Zeit im Labor beigetragen haben.

Den ebenso fleißigen LST1-Praktikanten **Eva, Milena** und **Anna**, die mir ihre Betreuung erstaunlich leicht gemacht haben.

**Nicole** und **Tania**, die ich immer noch gerne als meine Labor-Lehrmeisterinnen bezeichne.

Meiner Lieblingsmitdotorandin **Marga** dafür, dass ich dir deine Zeit immer stehlen durfte.

**Steffi** dafür, dass ich jetzt unmöglich alle Gründe aufführen kann wieso Du das Leben in Laborien schöner und lustiger gemacht hast.

Allen **Laborianern**, die im Laufe der Jahre diese kleine Welt des Wahnsinns geprägt haben und das Leben in Laborien zu einer unvergesslichen Zeit haben werden lassen.

Meinen **Eltern** für euren Glauben an mich und euren Beistand.

**Brigitte** für deine bedingungslose Unterstützung und dafür, dass Du ein wunderbarer Mensch bist.

### Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den .....

(Unterschrift)

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, \*

- dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
- dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach .....  
und in den Nebenfächern .....  
bei der Fakultät für ..... der .....  
(Hochschule/Universität)  
unterzogen habe.
- dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den.....

(Unterschrift)

\*) Nichtzutreffendes streichen