

Aus dem Zentrum für Biochemie (Medizinische Fakultät) der Universität zu Köln  
Institut für Biochemie I

Direktorin: Frau Universitätsprofessor Dr. rer. nat. A. A. Noegel

Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen CAP2 und seine Anwendung bei der  
Analyse der Gehirnentwicklung

Inaugural Dissertation zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Ali Eskandarnaz  
aus Teheran / Iran

promoviert am 22.Mai 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln 2013

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter/in: Univ. –Prof. Dr. Angelika A. Noegel

2. Berichterstatter/in: Univ. –Prof. Dr. H. Schröder

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Univ. –Prof. Dr. Angelika A. Noegel

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaterin / eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 16. Oktober 2012

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente sind von mir selbst durchgeführt worden. Anleitungen oder Anregungen zu vielen Experimenten habe ich von Frau Prof. Noegel und Herrn Dr. Peche erhalten. Bei verschiedenen Experimenten wurde ich bei der Versuchsdurchführung von medizinisch- oder chemisch-technischem Personal unterstützt. Die Einzelheiten sind in der Danksagung angegeben.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Noegel für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit, der Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der sehr guten Betreuung und Unterstützung danken.

Besonders danke ich Dr. Vivek Shahhaji Peche und Frau Bhagyashri Burgute für die sehr gute Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ein großer Dank geht an Rolf Müller für die besonders gute Einweisung und Unterstützung im Labor.

Für die Antikörpergenerierung und die Arbeit in der Zellkultur möchte ich mich bei Berthold Gassen und Maria Stumpf bedanken.

Für die Freundlichkeit und die gute Arbeitsatmosphäre im Institut bedanke ich mich an dieser Stelle bei allen Mitarbeitern.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, meinen Bruder , meine Schwester und meine Freundin, die mich während dieser gesamten Zeit in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und mir zu jeder Zeit ihr Vertrauen zugesprochen haben.

*Diese Arbeit widme ich meiner Mutter.*

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Zytoskelett.....	1
1.2 Das Aktinzytoskelett.....	2
1.3 Nukleäres Aktin und Aktin-bindende Proteine in der Regulation der Transkription und Genexpression.....	4
1.4 Aktinfilamente und Elongation.....	6
1.5 Das Cyclase- assoziierte Protein (CAP), Struktur und Funktion.....	9
1.5.1 CAP und die Interaktion mit Aktin.....	12
1.5.2 CAP/Srv2 als Komponente des Adenylatzyklase-Komplexes.....	14
1.5.3 Die Prolin-reiche Region von CAP.....	16
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	18
<b>2 Material und Methode</b> .....	<b>19</b>
2.1 Material.....	19
2.1.1 Labormaterialien.....	19
2.1.2 Geräte.....	19
2.1.3 Substrate und Kits.....	20
2.1.4 Enzyme und Antikörper.....	20
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	21
2.1.7 Medien.....	22
2.1.8 Biologisches Material und Bakterienstämme.....	23
<b>2.2 Biochemische Methoden</b> .....	<b>23</b>

2.2.1	Expression in <i>E. coli</i> und Reinigung eines aminoterminalen Teilstücks von CAP	23
2.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	25
2.2.3	ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) für den Nachweis von monoklonalen Antikörpern	27
2.2.4	Western-Blot für die Transferierung von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran	32
2.2.5	Western-Blot aus Maus-Herzgewebelysat	33
2.2.6	Polyklonale Antikörper von CAP1 und CAP2	34
<b>2.3</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>34</b>
2.3.1	Immunisierung von Balb/C-Mäusen mit rekombinantem CAP2 Polypeptid	34
2.3.2	Die Hybridomtechnik	35
2.3.3	Deparaffinierung und Immunofluoreszmarkierung von Gewebeschnitten mit Antikörpern	38
<b>2.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>40</b>
2.4.1	Präparation monoklonaler Antikörper	40
2.4.2	PEG-Reaktion zur Zellfusion	43
2.4.3	Hybridomazellkultur und Selektion	44
2.5	Streifentest und Chemilumineszenz zum Nachweis monoklonaler Antikörper	46
2.6	Herstellung von Paraffingewebeschnitten aus Mausgewebe	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
3.1	Sequenzvergleich von CAP1 und CAP2 und Gewebsverteilung	49
3.2	Expression eines N-terminalen CAP2 Polypeptids für die Erzeugung von monoklonalen Antikörpern	50
3.3	Isolierung von Hybridomzellen, die Antikörper gegen NCAP2-WH2 produzieren	56
3.4	Embryonale Entwicklung des zerebralen Kortex von Säugern	63
3.5	Lokalisationsstudien von CAP2 mit Hilfe der generierten monoklonalen Antikörper und Lokalisation von CAP 1 im Mäusegehirn und Embryo	64
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1	Wahl des NCAP2-WH2 für die Antikörpergenerierung	73

---

4.2	Funktion von CAP als Aktin-bindendes Protein im Muskel und der Einfluss auf Aktin	75
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>92</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
ASPM	Abnormal Spindle-Like Microcephaly Associated
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-Toluidinsalz
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rindersrumalbumin
C	Cytosin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA (revers von RNA transkribierte DNA)
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA,DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LB	lysogeny broth
LMW	Low molecular weight (marker)
M	molar
mM	Millimolar
mAk	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minuten
mRNA	Boten-RNA
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
rH	relative Feuchtigkeit
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Tab.	Tabelle
T	Thymidin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
U	Unit, Umdrehung
UV	Ultraviolettes Licht
WDR	wide dynamic range
WH2	WASP homology

Chemische Elemente und Verbindungen, physikalische Größen und Einheiten werden entsprechend den internationalen Richtlinien abgekürzt.

## **1 Einleitung**

### **1.1 Das Zytoskelett**

Eukaryotische Zellen sind durch das Vorhandensein eines Zytoskeletts charakterisiert. Das Zytoskelett umfasst ein dynamisches Netzwerk aus drei verschiedenen Filamentstrukturen, den Aktin- bzw. Mikrofilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Es ist für die Stabilität und die Form der Zellen verantwortlich und besitzt die Fähigkeit sich den Ansprüchen, die an eine Zelle gestellt werden, anzupassen. Es verleiht den Zellen Stabilität und Form und ist für die Zellbewegung essentiell.

Die Zytoskelettfilamente werden anhand ihrer verschiedenen Einzelstrukturen und Größe charakterisiert. Aktinfilamente bestehen aus Aktin, einem 42 kDa Protein [Gettemans et al., 2005], und besitzen einen Durchmesser von etwa 6 nm. Die Mikrotubuli haben einen Durchmesser von 25 nm und Intermediärfilamente mit einen Durchmesser zwischen 7 und 10 nm. Aktin besitzt durch die Filamentbildung die besondere Eigenschaft in einer Zelle Bewegung ohne Motorproteine zu erzeugen. Es bildet ein dynamisches Zytoskelett, welches an der Regulation der Zellform, des Zellwachstums, der Zellteilung sowie der Zellbewegung beteiligt ist. Der Aufbau von Filamenten unterhalb der Zellmembran führt zur Bildung von Pseudopodien oder Lamellipodien mit denen sich Zellen bewegen. Zudem haben Mikrofilamente passive strukturelle Bedeutung und unterstützen und bilden die Verstärkungselemente in Mikrovilli. Diese Funktionen werden durch Aktin-bindende Proteine (ABP) unterstützt und kontrolliert [Dos Remedios et al., 2003].

## 1.2 Das Aktinzytoskelett

Aktin bildet ein polymeres Proteinnetzwerk, welches zum Erhalt der typischen Zellmorphologie dient. Aktin liegt sowohl als monomeres G- Aktin als auch als helikales Doppelfilament (F-Actin), bestehend aus tausenden von Aktin Monomeren. Die Filamente können in eukaryotischen Zellen zahlreiche Formen annehmen, dabei können Aktinbündel, orthogonale Netzwerke oder Aktinbögen im Zellkortex auftreten [Gettemans et al., 2005]. Die Filamente im Aktinzytoskelett erzeugen somit eine Aktindynamik, die aus der Aktinpolymerisation aus monomerem Aktin sowie der Depolymerisation besteht. Dabei stehen die Filamente für die Organisation und Struktur des Aktinzytoskelett in einem kontinuierlichen Zustand des Auf- und Abbaus. Der Zusammenbau der Aktinfilamente durch Polymerisation kann als Kondensationsreaktion charakterisiert werden. Im Polymerisationsprozess kommt es initial zu einer Bildung von einem Dimer aus Aktinmonomeren und im weiteren Verlauf zur Ausbildung eines stabilen Trimers, welches den Kern der Polymerisation darstellt. Diese Phase wird als Nukleationsphase bezeichnet. Bei der Trimerbildung liegt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Polymerisation vor. Aktinfilamente zeigen ein schnell wachsendes (+) Ende und ein langsam wachsendes (-) Ende.

An- und Abbau von Monomeren an den Filamenten kann an beiden Enden erfolgen [Lüllmann-Rauch, 2006]. Schließlich erfolgt die Elongation in der Aktinmonomere schnell zusammengebaut werden. Das Milieu, welches die Polymerisation fördert, beinhaltet hohe Ionenstärke, KCL-Konzentration  $>50$  mMol, neutralen bzw. leicht aziden pH, hohe  $Mg^{2+}$  Konzentration und erhöhte Temperatur. Diese Konditionen liegen in Zellen vor [Wang et al., 1989, Asakura et al., 1960, Grazi et al., 1985].

Aus dem Vorgang der Polymerisation und Depolymerisation entsteht ein Gleichgewichtszustand zwischen Auf- und Abbau der Aktinfilamente, wobei immer eine bestimmte Konzentration an Aktinmonomeren erhalten bleibt. Die Konzentration an freien Monomeren im Gleichgewichtszustand wird als kritische Konzentration bezeichnet. Im Gleichgewichtszustand laufen Polymerisation und Depolymerisation in gleicher Geschwindigkeit ab. Die Aktin Polymerisation und Depolymerisation sowie die kritische Konzentration werden durch zahlreiche akzessorische, sogenannte Aktin-bindende Proteine (ABP) kontrolliert [Dos Remedios et al., 2002]. Die verschiedenen Gruppen Aktin-bindender Proteine induzieren die Bildung der Aktinfilamente durch die Steuerung der Aktinpolymerisation, Fragmentierung, die Aktin-Nukleation und die Kreuzvernetzung der Filamente, andere verhindern die Filamentbildung durch eine Sequestrierungsaktivität [Gettemans et al., 2005] und ermöglichen im Zusammenspiel mit kleinen GTPasen als Regulatoren die Ausbildung verschiedener Aktinnetzwerke in einer Zelle (Abbildung 1).

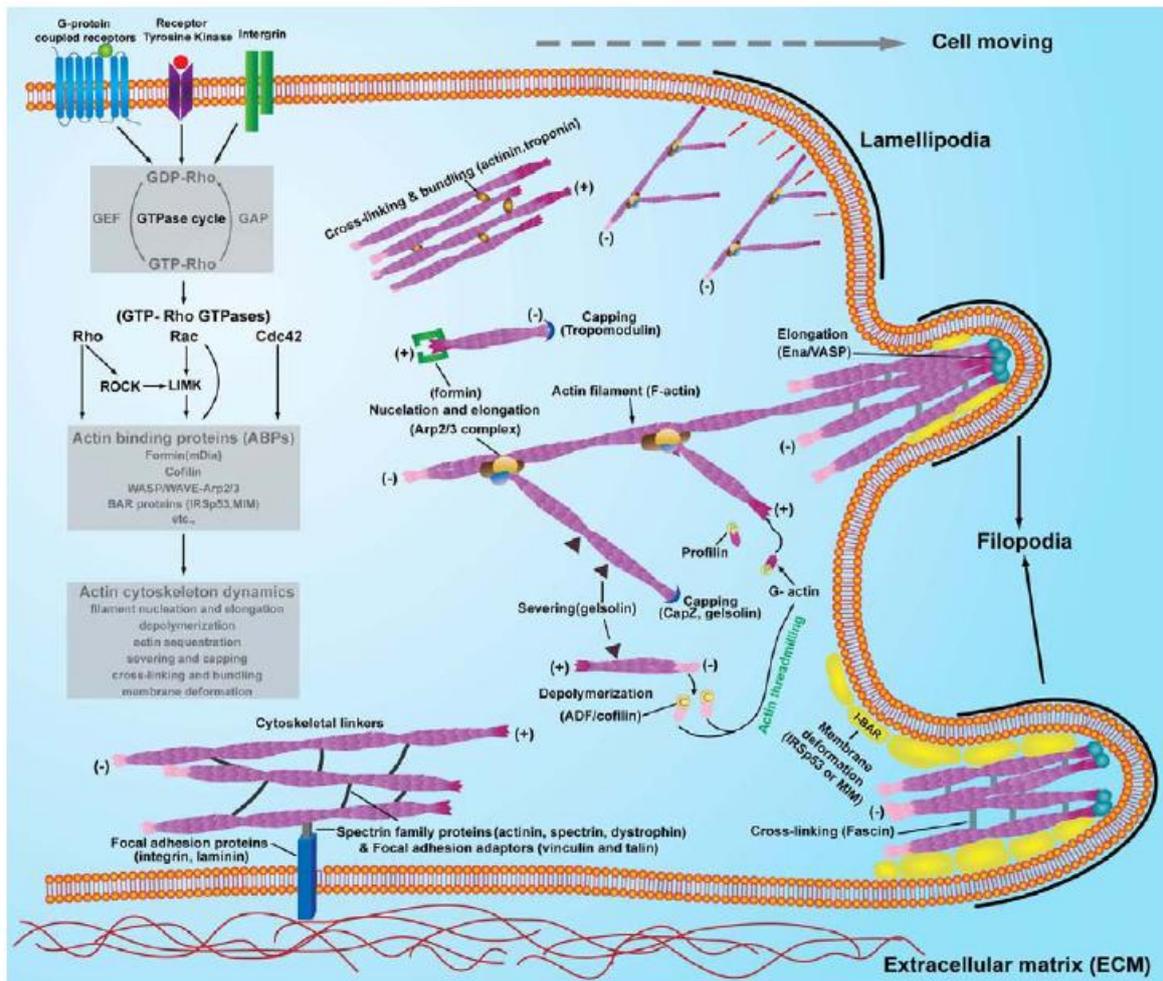


Abbildung 1. Aktinfilamentnetzwerke in der Zelle. Die verschiedenen Netzwerke werden durch unterschiedliche Proteine und Signaltransduktionsnetzwerke reguliert (aus Lee und Dominguez, 2010).

### 1.3 Nukleäres Aktin und Aktin-bindende Proteine in der Regulation der Transkription und Genexpression

Als eine Hauptkomponente des Zytoskeletts hat Aktin eine bedeutende Rolle in allen eukaryotischen Zellen. Aktin ist ein globuläres Polypeptid mit einer Größe von 42 kDa. Das Aktinzytoskelett reguliert zahlreiche Funktionen in zellulären Prozessen. Diese umfassen die Zellmotilität, Kontraktilität, Mitose, Zytokinese, intrazellulärer Transport, Endozytose sowie Sekretion. Neben mechanischen Funktionen beeinflusst Aktin die Regulation der Gentranskription, entweder durch zytoplasmatische Veränderungen von Aktin oder durch

Zusammenstellung von regulatorischen Komplexen der Transkription [Sotiropoulos et al., 1999; Grummt, 2006]. Zudem ist Aktin an der Chromosomenkondensation beteiligt [Rungger et al., 1979].

Die transkriptionelle Regulation kann zurückgeführt werden auf Veränderungen der subzellulären Lokalisation von Transkriptionsregulatoren durch Aktin-bindende Proteine. Weitere Faktoren der Transkriptionsregulation durch Aktin umfassen die molekulare Interaktion von Aktin mit RNA Polymerasen und mit weiteren Komponenten der Transkription im Kern [Zheng et al., 2009].

Aktin ist Bestandteil nukleärer Proteinkomplexe und wird für alle drei nukleären RNA-Polymerasen benötigt [Percipalle und Visa, 2006]. Es konnte gezeigt werden, dass Aktin für die Transkription aus den Balbiani Ringen durch die RNA Polymerase II notwendig ist. Weiterhin wurde Aktin als Komponente des Präinitiationskomplexes und als Stimulator der Transkription durch die RNA Polymerase II beschrieben [Hofmann et al., 2004; Kukalev et al., 2005]. Aktin steht auch mit nukleärem Myosin in Verbindung und stimuliert die RNA Polymerase I. Weiterhin zeigt nukleäres Aktin eine bedeutende Rolle in der mRNA Prozessierung, in dem es mit kleinen nukleären Ribonucleoproteinen (RNPs) assoziiert (Abbildung 2).

Aktin ist ebenfalls am Export der RNA und zellulärer Proteine aus dem Kern beteiligt. Darüber hinaus bildet Aktin Komplexe mit bestimmten heterogenen nukleären Ribonucleoproteinen (hnRNPs), welche die mRNA binden und diese aus dem Zellkern ins Zytoplasma begleiten [Obrdlik et al., 2008]. Nukleäres Aktin und Aktin-verwandte Proteine wurden in Verbindung mit dem Chromatin-Remodelling und Histoneacetyltransferase Komplexen gefunden, sodass sich Hinweise auf eine Rolle von Aktin beim Chromatin-Remodelling ergeben. Aktin beeinflusst die Komponenten der drei RNA Polymerasen, ATP-

abhängige Chromatin-Remodellierungskomplexe und RNA-Bestandteile im Zellkern [Shen et al., 2003].

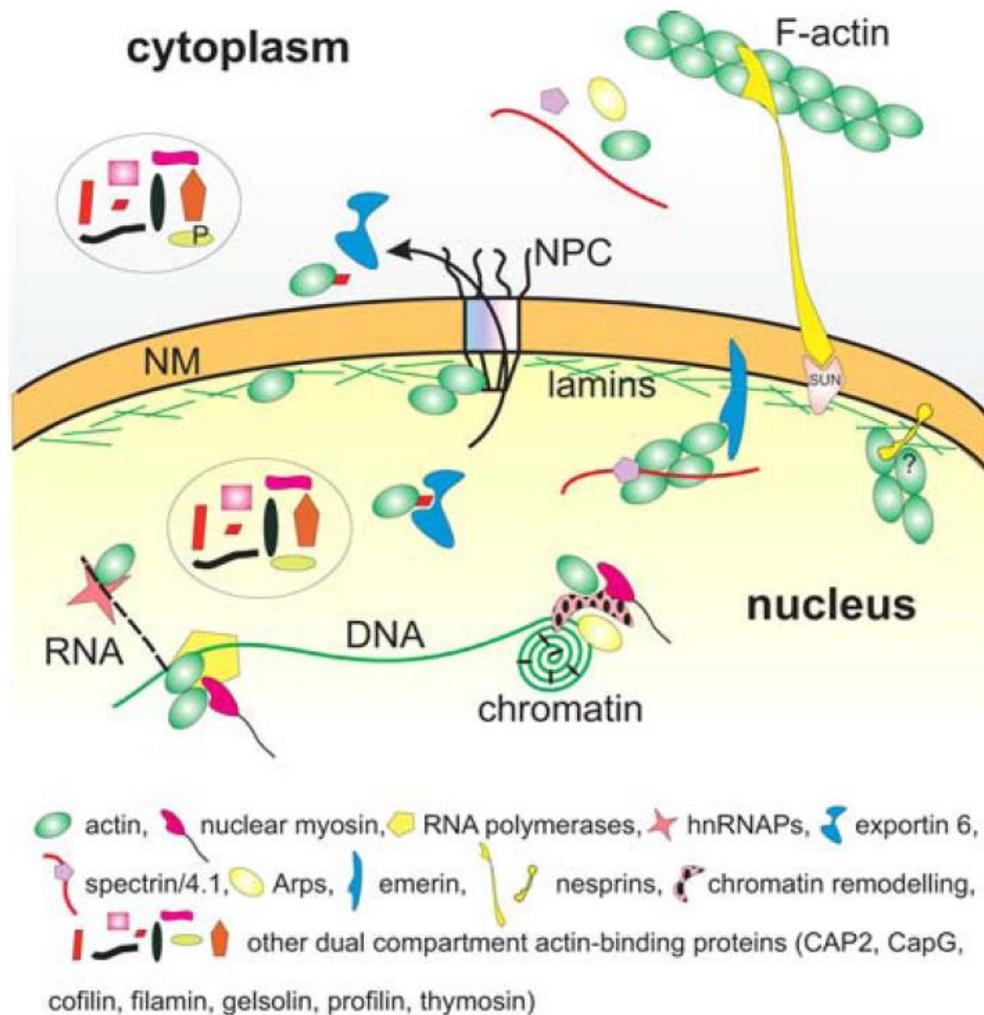
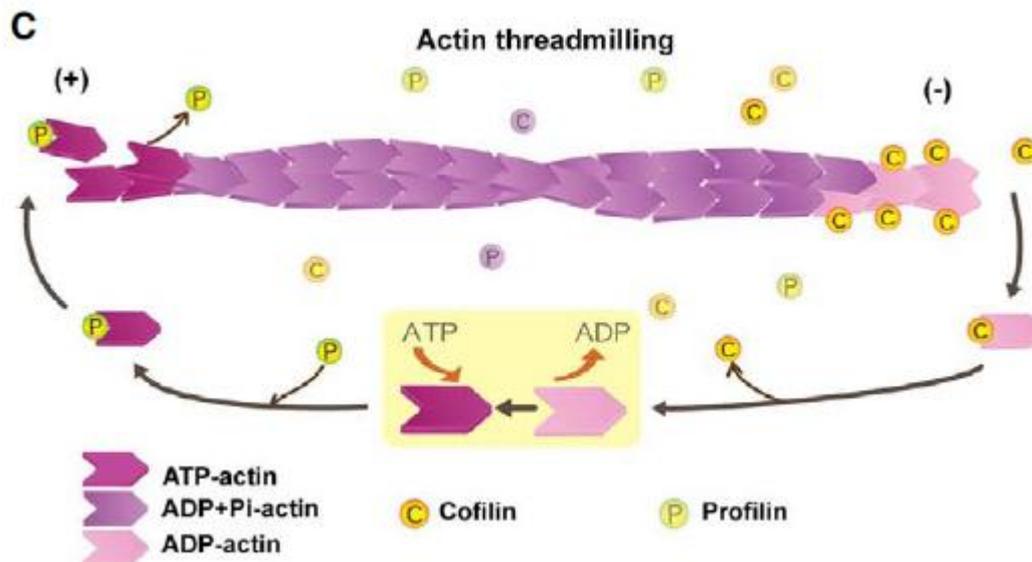


Abbildung 2. Vielfältige Funktionen von nukleärem Aktin (Jockusch und Schleicher, 2008). Aktin ist unter anderem an Chromatin-Remodellierung, an Transkriptionsprozessen, RNA-Splicing und RNA-Transport beteiligt.

#### 1.4 Aktinfilamente und Elongation

Die Bildung von Aktinfilamenten umfasst den Vorgang der Elongation. Dabei erfolgt bei der Elongation ein kontinuierlicher Prozess des An- und Abbaus von Monomeren an den Aktinfilamenten. Dieser Vorgang kann an beiden Enden der Filamente beobachtet werden, wobei die Assoziation von Monomeren vornehmlich am (+) Ende (schnell wachsend) der

Filamente und die Dissoziation am (-) Ende (langsam wachsend) erfolgt. Die Nukleotidbindungsstelle von monomerem Aktin ist in vivo mit ATP verbunden, wohingegen die meisten F-Aktin Einheiten ADP gebunden haben (Abbildung 3).



**Abbildung 3.** Das aus einer Doppelhelix bestehende Aktinfilament ist strukturell und kinetisch asymmetrisch und führt zu einem Prozess, der mit „actin filament treadmilling“ bezeichnet worden ist. Am (+) Ende werden ATP-Aktin Monomere eingebaut, am (-) Ende dissoziieren ADP-Aktin Monomere. In der Zelle ist der Prozess reguliert. ADF/Cofilin beschleunigt die Dissoziation von ADP-Aktin am (-) Ende, während Profilin den ADP-ATP Austausch am Aktin beschleunigt und den Einbau von Aktin Monomeren am (+) Ende fördert (aus Lee und Dominguez, 2010).

Das an G-Aktin gebundene ATP ist mit löslichen Nukleotiden austauschbar, während das ADP von F-Aktin essentiell nicht austauschbar ist [Hegyí et al., 1988]. Ursprünglich wurde die Hydrolyse des gebundenen ATPs stark an den Polymerisationsprozess gebunden [Oosawa et al., 1975; Wegner, 1976]. Neuere Untersuchungen verweisen auf eine Verzögerung zwischen der Anlagerung von ATP G-Aktin an die Filamentenden und der Hydrolyse des gebundenen Nukleotids [Carlier 1990]. Die ATP-Hydrolyse und die Freisetzung von Phosphat als Produkt deuten in der Kinetik daraufhin, dass das ATP von angelagerten Aktineinheiten in zwei unterschiedlichen Reaktionsschritten hydrolysiert wird.

In einem ersten Reaktionsschritt erfolgt die ATP-Hydrolyse von ATP-G-Aktin zu ADP-Pi-F-Aktin deutlich schneller als die Freisetzung von Pi aus ADP-Pi-F-Aktin in einem zweiten Schritt. Dies verweist darauf, dass ADP-Pi-F-Aktin das Hauptintermediat im Nukleotidhydrolyseprozess darstellt [Dos Remedios et al., 2002]. Die Hydrolyse des ATPs zu ADP-Pi und die darauffolgend Freisetzung des Pi treten primär am (-) Ende der Filamente auf [Carlier et al., 1987]. ATP kann nicht durch Aktin aus ADP und Pi regeneriert werden, sodass die Aktindepolymerisation nicht als einfacher Gegenprozess der Polymerisation angesehen werden kann [Carlier et al., 1988]. Bei diesem Prozess tauschen abgespaltene ADP-Aktineinheiten das ATP gegen ATP in Lösung aus. Dieser Prozess wird durch Profilin gefördert [Neidl und Engel, 1979]. Unter bestimmten Umständen besteht die Möglichkeit, F-Aktin aus G-Aktin ohne Nukleotidbindung zu bilden, sodass die Polymerisation von Aktin nicht abhängig von der Nukleotidhydrolyse ist [Kasai et al., 1965]. Für die normale F-Aktin Funktion wird jedoch die Nukleotidhydrolyse benötigt. Die Aktinfilamente mit ihrer strukturellen Polarität und die irreversible ATP-Hydrolyse bei der Aktinzusammenlagerung beeinflussen die Rate und die Richtung des Filamentwachstums an den entgegengesetzten Enden des F-Aktins. Die kritische G-Aktinkonzentration, die für eine Anlagerung von Monomeren an das (-) Ende des Filaments am benötigt wird, ist unter physiologischen Bedingungen 12-15 fach höher als die am (+) Endes [Wegner und Isenberg G, 1983]. Daraus ergibt sich eine kontinuierliche Bewegung von Aktineinheiten vom (+) zum (-) Ende der Filamente, sodass ein gerichtetes Wachstum der Aktinfilamente beobachtet werden kann. Dieser Prozess wird als „Treadmilling“ bezeichnet (Abbildung 3) [Wegner, 1976].

In Muskelzellen bewegen sich Monomere entlang der Filamente vom (+) Ende zum freien (-) Ende der Filamente hin. Das (+) Ende ist im Sarkomer mit der Z-Scheibe assoziiert. Das freie (-) Ende ist in der Mitte des Sarkomers lokalisiert.

Aktin-bindende Proteine steuern in vivo verschiedene Aspekte des Zusammenbaus und Abbaus der Aktinfilamente. Diese umfassen Proteine zu Filamentstabilisierung (Tropomyosin), Kappungsproteine (CapZ, Tropomodulin) sowie Proteine zur Herstellung von Verzweigungen (Arp2/3) und zur Sequestrierung von G-Aktin (Thymosin  $\beta$ 4, Profilin) (Abbildung 4). Die Sequestrierungsproteine sind für die Erhaltung von Monomeren in Lösung notwendig [Dos Remedios et al., 2002].

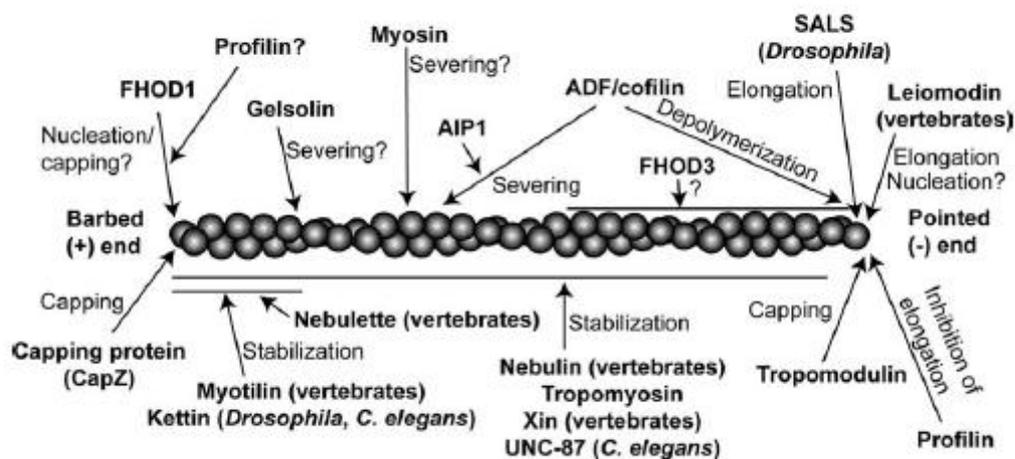


Abbildung 4. Regulatoren der Aktinfilament Dynamik im Skelettmuskel (aus Ono, 2010).

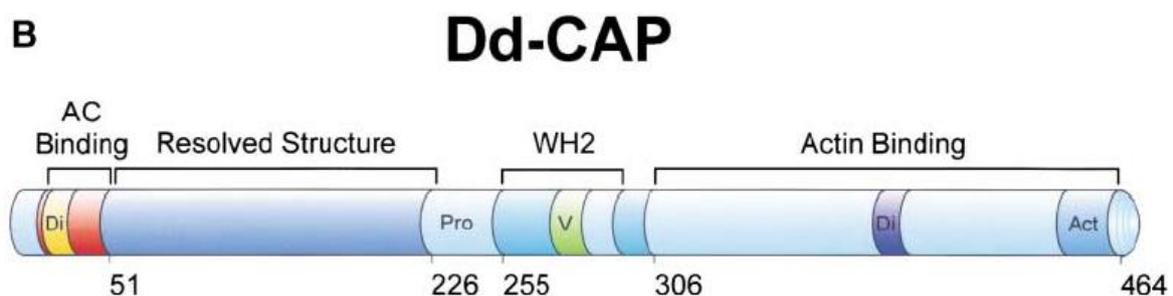
## 1.5 Das Cyclase-assozierte Protein (CAP), Struktur und Funktion

Das Cyclase-assozierte-Protein (CAP) ist ein G-Aktin-bindendes Protein bzw. G-Aktin Sequestrierungsprotein. Als Monomer-bindendes Protein kann es den Umbau zwischen G- und F-Aktin steuern und ist für das Filamentgleichgewicht verantwortlich. Für CAP aus Hefe, *Dictyostelium discoideum* und Säugern wurde die G-Aktin Sequestrierungsaktivität in der C-terminalen Domäne lokalisiert [Gottwald U et al., 1996].

CAP stellt ein hoch konserviertes und weit verteiltes Protein dar. Erstmals wurde es in Hefe nachgewiesen, wobei es mit biochemischen und genetischen Methoden als ein

Adenylatcyclase assoziiertes Protein beschrieben wurde. Es ist essentiell für die Aktinorganisation und Filamentstruktur, da der Verlust von CAP zu Defekten in der Zellmorphologie, Migration, Endozytose und Entwicklung führt [Bertling et al., 2004]. Cyclase-assoziierte-Proteine stellen multifunktionale Proteine mit einer 3-teiligen modularen Struktur dar (Abbildung 4). Bei *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Srv2/CAP an die Adenylatcyclase bindet und bei Ernährungssignalen als Effektor von Ras-Protein funktioniert. Die N-terminalen Domänen von CAP bei anderen Organismen zeigen keine Hinweise auf eine Interaktion mit der Adenylatcyclase [Hubberstey und Mottillo, 2002]. In *Dictyostelium* ist die N-terminale Domäne an der Dimerisierung und der kortikalen Lokalisation des Proteins beteiligt [Ksiazek et al., 2003; Noegel et al., 1999].

Diese Domäne beeinflusst die Funktion des Proteins in der Zellpolarität und der Entwicklung [Noegel et al., 1999; 2004]. Strukturell ist die N-terminale Domäne des Proteins von der C-terminalen Domäne durch eine Prolinreiche-Sequenz getrennt. Über diesen Bereich ist es möglich, Proteine mit SH3-Domänen zu binden wie z. B. das ABP1 in Hefe. Dieses stellt ein F-Aktin-Bindeprotein dar, das für die Lokalisation von Srv2/CAP im Zytoskelett verantwortlich ist [Lila und Drubin, 1997].



**Abbildung 5.** Übersicht über die Domänenstruktur von *Dictyostelium* CAP (aus Ksiazek et al., 2003). Die N-terminale Domäne wird gefolgt von einem Prolin-reichen Bereich. Daran schliesst sich eine WH2 Domäne an und ein C-terminaler Bereich, für den eine Aktinbindung beim Hefeprotein postuliert wurde. Im Gegensatz dazu konnte für Maus CAP2 die Aktinbindung in der WH2-Domäne lokalisiert werden [Peche, 2010].

Weitere Untersuchungen zeigten das Vorhandensein einer konservierten WH2-Domäne in allen Cyclase-assoziierten-Proteinen (Abbildung 5). Diese Domäne bindet an G-Aktin [Paunola et al., 2002]. Die C-terminale Domäne von Srv2/CAP kann G-Aktin binden und ist an der Oligomerisation beteiligt [Zelicof et al., 1996]. Dreidimensionale Strukturen gibt es für die N- und C-Domäne von CAP. Für das *D. discoideum* CAP ist die Struktur der N-Domäne bestimmt worden [Ksiazek et al., 2003]. Dieses Polypeptid (Abbildung 5) besteht aus einem  $\alpha$ -Helix Bündel, welches aus 6-antiparallelen Helices zusammengesetzt ist. Die Kristallstruktur wurde für das Dimer gelöst. Die Struktur der C-terminalen Domäne ist für das Hefeprotein bestimmt worden. Hier liegt ebenfalls ein Dimer vor, wobei jedes Monomer eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweist und Schlingen, die zu einer Helix arrangiert sind. Durch den Austausch der letzten beiden Stränge jedes Monomers wird das Dimer gebildet [Dodatko et al., 2004].

Bei höheren Eukaryoten werden zwei homologe Cyclase-assoziierte-Proteine, CAP1 und CAP2, unterschieden. CAP1 wird in fast allen Zellen und Organen der Maus exprimiert. Subzellulär kann es in Bereichen hoher Aktindynamik nachgewiesen werden. CAP2 dagegen ist in einer begrenzten Anzahl von Geweben vorhanden und weist subzellulär eine unterschiedliche Verteilung auf. In Myoblasten ist CAP2 ein weitgehend nukleäres Protein, während es im adulten Muskel ein M-Banden Protein ist [Peche et al., 2007].

### 1.5.1 CAP und die Interaktion mit Aktin

CAP wurde ursprünglich in *S. cerevisiae* als Interaktionspartner der Adenylatcyclase beschrieben, wobei die N-terminale Domäne für die Interaktion verantwortlich ist [Fedor-Chaikin et al., 1990; Field et al., 1990]. Diese Art der Interaktion und die entsprechende Funktion scheint in den Tier- und Pflanzen-Proteinen nicht konserviert zu sein [Hubberstey

und Mottilo, 2002]. Die C-terminale Domäne wurde bei allen bis jetzt untersuchten CAPs als Regulator des Aktinzytoskeletts charakterisiert. Der Verlust von CAP oder eine Deletion der C-terminalen Domäne führt zu Defekten im Aktinzytoskelett und zu Abnormalitäten der Zellmorphologie. In der Hefe konnten durch Überexpression von Profilin, einem Aktinmonomer bindenden Protein, diese Defekte unterdrückt werden [Vojtek et al., 1991]. In *Dictyostelium*, *Drosophila* und Säugerzellen führte der Verlust von CAP zur Anhäufung veränderter Aktinfilamentstrukturen und zu Defekten in Aktin-abhängigen zellulären Prozessen wie Bewegung und Endozytose [Noegel et al., 2004].

CAP reguliert die Aktindynamik durch eine Interaktion mit ADF/Cofilin und Aktinmonomeren und ist so in die Aktinfilament De- und Polymerisation eingebunden [Moriyama und Yahara, 2002; Balcer et al., 2003]. Somit kann CAP nicht nur als G-Aktin-Sequestrierungsprotein charakterisiert werden. In Säugerzellen kommt es in Folge eines Knockdowns von CAP1 zur Akkumulation von ADF/Cofilin in Form abnormaler zytoplasmatischer Aggregate und zu verminderter Aktinfilament De- und Polymerisation [Bertling et al., 2004].

Untersuchungen zeigten, dass sich Aktinmonomer-bindende Proteine in ihrer Affinität zu ATP- bzw. ADP-Aktin unterscheiden. Profilin und  $\beta$ -Tymosin binden ATP-G-Aktin mit einer stärkeren Affinität als ADP-G-Aktin [Carlier et al., 1993; Hertzog et al., 2002], dagegen binden ADF/Cofilin und Twinfilin bevorzugt an ADP-G-Aktin [Carlier et al., 1997; Ojala et al., 2002]. Die Nukleotidaffinitäten dieser verschiedenen Proteine in der Aktininteraktion haben große Bedeutung in der Steuerung der Aktindynamik. Untersuchungen mit Srv2/CAP von *S. cerevisiae* zeigten, dass die C-terminale Domäne stärker ADP-Aktinmonomere im Vergleich zu ATP-Aktinmonomeren binden. Deletionsanalysen verdeutlichten, dass in der Aktinbindungsstelle von Srv2/CAP eine  $\beta$ -Strangregion (369-526) sowie eine angrenzende Sequenz (253-368) notwendig sind. Innerhalb dieser  $\beta$ -Strangregion konnten spezifische

hochkonservierte Bereiche ermittelt werden, welche für die hochaffine Aktinbindung verantwortlich sind. In der Interaktion von CAP mit Aktin hemmt dieses die Aktinmonomer Anlagerung an die (+) Enden der Filamente. CAP steht in kompetitiver Interaktion mit Cofilin für die ADP-G-Aktinbindung und reguliert dadurch die Menge von Aktinmonomeren beim Aktinfilamentumsatz [Mattila et al., 2004]. Die unterschiedliche Affinität von CAP zu ATP- und ADP-Aktinmonomeren ermöglicht, dass Proteine wie Profilin ATP-Aktin binden und somit eine Anlagerung von Monomeren am (+) Ende induzieren. Die zahlreichen Interaktionen von CAP mit weiteren Aktin-bindenden Proteinen verdeutlichen, dass die Funktionen von CAP für die Aktinorganisation und für gerichtetes Zellwachstum notwendig sind.

### **1.5.2 CAP/Srv2 als Komponente des Adenylatcyclase-Komplexes**

Das CAP-Protein konnte erstmals in *S. cerevisiae* als Komponente des Adenylatcyclase-Komplexes mit einer Proteingröße von 70 kDa identifiziert werden [Field et al., 1990]. Im Rahmen der Signaltransduktion in *S. cerevisiae* erfolgt die Umwandlung von ATP zum zyklischen AMP durch die Adenylatcyclase. Sie wird durch das G-Protein Ras und durch CAP aktiviert und reguliert [Toda et al., 1985; Field et al., 1990]. Ras Proteine, die als Onkogene in Säugerzellen bekannt sind, und ihre Homologe stellen evolutionär hochkonservierte Proteine dar. In *S. cerevisiae* wurde die Funktion von Ras als Stimulator der Adenylatcyclase bereits 1985 beschrieben [Broek et al., 1985]. Hefe besitzt zwei Ras-Gene. Mutationen darin führen zu einer Störung des Zellwachstums. Expression von aktivierten Mutationsformen der Ras Proteine wie das Ras2-Valin19 Protein führte zu erhöhter Hitzeschocksensibilität und zur Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Stickstoffmangel [Gerst et al., 1991]. Vergleichbare Effekte konnten durch die Aktivierung von cAMP-Signalkaskaden erreicht werden [Kataoka et al., 1984; Sass et al., 1986].

Mit der Identifikation von Srv2/CAP als Komponente des Adenylatcyclase-Komplexes in *S. cerevisiae* kann dessen Funktion in der Ras-Adenylatcyclase-Signalkaskade bestätigt werden. Dies konnte auch durch weitere genetische Befunde unterstützt werden, in denen Zellen mit Mutationen im CAP-Gen die Stresssensitivität von Ras2-Valin19 exprimierenden Zellen und ihre Sensitivität gegenüber Stickstoffmangel aufheben konnten [Fedor-Chaiken et al., 1990; Field et al., 1990].

CAP konnte als bifunktionales Protein charakterisiert werden, wobei die Funktionen mit den verschiedenen Domänen des Proteins assoziiert sind (siehe Paragraph 1.5). Hefe Mutanten für CAP zeigten temperatursensitives Wachstum auf künstlichem Medium, Wachstumsunfähigkeit auf nährstoffreichem Medium sowie starke Sensitivität bezüglich Stickstoffmangel. Durch das Einbringen eines intakten Vollängen CAP-Gens konnten diese Veränderungen aufgehoben werden. Die gleiche Wirkung konnte auch mit der Expression einer C-terminalen-Region von CAP erreicht werden [Gerst et al., 1991]. Somit kann die Assoziation der oben genannten Eigenschaften der Zellen mit der Funktion der C-terminalen Region von CAP in Verbindung gebracht werden. Mit Untersuchungen an weiteren Mutanten konnte gezeigt werden, dass die N-terminale-Domäne von CAP für das Ansprechen der Zellen auf aktivierte Ras-Signale verantwortlich ist. In CAP defizienten Mutanten, die die N-terminale-Domäne exprimierten, konnte die Sensitivität der Zellen gegenüber aktivierten Ras-Signalen wiederhergestellt werden, wohingegen die normale Zellmorphologie nicht erreicht werden konnte. Im Unterschied dazu zeigten Mutantenzellen, die die C-terminale Domäne exprimierten, eine große Zahl morphologisch normaler Zellen. Dies verdeutlicht die Bedeutung der C-terminalen Domäne für die normale Zellmorphologie. Das CAP-Protein als bifunktionale Komponente des Adenylatcyclase-Komplexes ist einerseits für die normale Zellmorphologie, andererseits für die Reaktionsfähigkeit der Zelle auf Nährstoffmangel und Überschuss verantwortlich [Gerst et al., 1991], wobei die C-terminale-Domäne die Zellmorphologie, Temperatur- und Stickstoffsensibilität reguliert und die N-terminale-

Domäne für die Ras-Signaltransduktion im Rahmen der Adenylatcyclase-Aktivierung zuständig ist. Da das Ras-Protein die zelluläre Antwort auf Veränderung der Nährstoffsituation moduliert, übt CAP somit mit der N-terminalen Domäne die regulatorische Funktionen in der Nährstoff-Signaltransduktion aus. Neben der Regulation der Zellmorphologie hat auch die C-terminale-Domäne über andere Signalwege Bedeutung in der Reaktion der Zelle auf Veränderung der Nährstoffsituation [Kataoka et al., 1984; Tatchell et al., 1985; Gerst et al., 1991].

### 1.5.3 Die Prolin-reiche Region von CAP

CAP Proteine besitzen eine bedeutende Rolle in der Regulation des Aktinzytoskeletts. Die Organisation des Zytoskeletts durch CAP kann einerseits durch dessen Sequestrierungsfunktion von Aktinmonomeren erfolgen, andererseits kann es über seinen Prolin-reichen Bereich mit Proteinen interagieren, die SH3 (Sarc Homology 3) Domänen enthalten. Solche Domänen gibt es in vielen Zytoskelett-assoziierten Proteinen [Freeman et al., 1995; Gieselmann und Mann, 1992; Bar-Sagi et al., 1993]. Die SH3-Domänen stellen eine kurze Region von ~60 Aminosäuren dar, die mit Prolin-reichen Peptiden interagieren [Ren et al., 1993]. Sie sind konserviert und zeigen große Ähnlichkeiten mit Regionen von c-src Protoonkogen-Proteinen, von denen sich der Name ableitet. Da SH3-Domänen in vielen zytoskelettalen Proteinen vorhanden sind, kann auf ihren möglichen Einfluss in der Regulation des Zytoskeletts geschlossen werden [Pawson und Schlessinger, 1993; Drubin et al., 1990 ].

Für die CAP-Homologe von *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und Mensch konnte gezeigt werden, dass sie an SH3-Domänen bestimmter Proteine binden [Freeman et al., 1995]. Alle CAP Homologe tragen eine zentral-lokalisierte Prolin-reiche Region, die als P1-Sequenz charakterisiert werden kann und mit SH3-bindenden Bereichen korreliert. Die meisten Homologen zeigen auch eine weitere mögliche SH3-bindende Stelle, die P2-Sequenz



verschiedene Interaktionen mit SH3-Proteinen und Aktinmonomeren im Rahmen der Aktinzytoskelett Organisation auf.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit umfasste die Untersuchung der Expression und Lokalisation von CAP Homologen in der Maus. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, sollten spezifische monoklonale Antikörper für CAP hergestellt werden. Dazu sollte ein N-terminaler Bereich von CAP als rekombinantes Polypeptid in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Dieser Bereich von CAP2 sollte als spezifisches Antigen für die Produktion monoklonaler Antikörper genutzt werden und das Epitop für die Herstellung dieser monoklonale Antikörper in der Maus darstellen. Die Expression und Reinigung des Proteins sollte anhand der SDS-Gelelektrophorese überprüft werden. Gegen das hergestellte Protein sollten mit der Hybridomtechnik monoklonale Antikörper erzeugt werden. Es sollten Zellklone auf die Produktion von monoklonalen Antikörpern überprüft werden. Mit Hilfe von Westernblots sollte das als Antigen genutzte Protein für die Selektion der Zellklone verwendet werden. Durch ELISA und Streifentest sollte die Selektion geeigneter Zellklone erfolgen. Nach der Selektion geeigneter Zellklone sollten durch Subklonierung Zelllinien erfasst werden, welche die gesuchten monoklonalen Antikörper gegen das spezifische Antigen produzieren. Zudem sollte die Selektion geeigneter Zellklone sowie Subklone durch die Nutzung von Zellhomogenaten aus spezifischen Geweben der Maus überprüft werden. Weiterhin sollten durch Immunfluoreszenzmarkierungen mit spezifischen Antikörpern die Lokalisation von CAP1 im Gehirn der Maus sowie im Mausembryo untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Labormaterialien

Einfrierröhrchen, 1,8 ml und 2,2 ml	Nunc
Einweg-Pipetten, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner
Einweg-Pipettenspitzen	Greiner
Gewebekulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup>	Nunc
3MM Filterpapier	Whatman
Mikrotiterplatten, 96 Loch, flacher Boden	Nunc
Mikrotiterplatten, 96 Loch, U96 Maxisorb	Nunc
Nitrocellulose, Typ BA85	Schleicher und Schüll
Petrischalen, Typ 3003	Falcon
Plastikküvette	Greiner
15 ml Röhrchen, Typ 2095	Falcon
50 ml Röhrchen, Typ 2070	Falcon
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,2 ml	Sarstedt
Röntgenfilm X-omat AR-5	Kodak

#### 2.1.2 Geräte

Blotkammer Trans-Blot SD	BioRad
Magnetrührer, Typ MR 3001 K	Heidolph
<u>Mikroskope:</u>	
Lichtmikroskop	Olympus
Laser Scan Mikroskop	Leica
Multipipette, Multipipette plus	Eppendorf
<u>Rotoren:</u>	
Typ JA-10	Beckman
Typ JA-25.50	Beckman
SLA-1500	Sorvall
SLA-3000	Sorvall
SS-34	Sorvall
TLA 45	Beckman
Rüttler 3015 GFL	
Rüttler Lab-Shaker	Kühner

Spannungsverstärker Power Pac 200 und 300	Bio-Rad
Spektralphotometer, Typ Ultraspec 2000 Pharmacia	Biotech
pH-Meter 766	Knick
<u>Tischzentrifugen:</u>	
Centrifuge 541	Eppendorf
Centrifuge 5415 D Eppendorf	
Kühlzentrifuge Biotech fresco	Heraeus Instruments
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman
Vortex REAX top	Heidolph
Wasserbäder	GFL
<u>Zentrifugen:</u>	
Beckman Avanti J25	Beckman
Sorvall RC 5C plus	Sorvall

### 2.1.3 Substrate und Kits

Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat	Pierce
pNitrophenylphosphat(pNPP)-,Tris-Tabletten	Sigma Fast

### 2.1.4 Enzyme und Antikörper

#### Enzyme für molekularbiologische Methoden

Lysozym	Sigma
---------	-------

#### Primäre Antikörper

Anti CAP-2 (polyklonal aus Kaninchen)	Dr.V. Peche
Anti CAP-2 (monoklonal aus Maus, K82-381-1)	diese Arbeit
Anti CAP-1 (polyklonal aus Kaninchen)	Dr.V. Peche

#### Sekundäre Antikörper

Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen IgG alkalische Phosphatase Konjugat	Sigma
Anti-Kaninchen Alexa 568	
Anti-Maus Alexa 488	

### 2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)	Nat. Diagnostics
--	------------------

Agarose (Elektrophoresis Grade)	Gibco
BCIP/NBT Farbentwicklungssubstrat	Promega
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Coomassie-Brilliant-Blau R 250	Serva
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Dulbeccos's Modified Eagle's Medium, DMEM	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethanol	Riedel-de Haen
Ethylphenylpolyethylenglycol (NP-40)	Fluka
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES)	Biomol
Isopropanol	Merck
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Loewe Biochemica
Natriumcarbonat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumlaurylsarcosinat	Sigma
Natriumnitrit	Merck
Ponceau S Konzentrat	Sigma
Sigma Fast™ p-Nitrophenylphosphat-Tabletten	Sigma
N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Fluka, Riedel-de Haen
Triton X-100 (Octylphenylpoly(ethylenglykolether))	Merck
Trypsin/EDTA	Sigma
Tween 20	Roth

### 2.1.6 Puffer und andere Lösungen

#### 10x NCP-Puffer, pH 8,0:

12,1 g Tris/HCl  
 87,0 g NaCl  
 5,0 ml Tween 20  
 2,0 g Natriumchlorid  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 Liter auffüllen

#### PBG, pH 7,4:

0,5% Rinderserumalbumin  
 0,1% Gelatine (Kaltwasserfischhaut)  
 in 1x PBS, pH 7,4

1x PBS, pH 7,4:

8,0 g NaCl  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,2g KCl

mit H<sub>2</sub>O auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren und auf pH 7,4 einstellen

TE Puffer, pH 8,0:

10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
1 mM EDTA, pH 8,0

10x TBST-Puffer:

1 mM Tris-HCl, pH 8,0  
150 mM NaCl  
0,2 % Tween 20  
(Polyethylensorbitan-monolaurate)

50 x Tris/Acetatpuffer (pH 8,0):

2 M Tris  
50 mM EDTA  
auf 1 Liter mit Wasser auffüllen

5x SDS-Probenpuffer:

2,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,5  
4,0 ml 10% SDS  
2,0 ml Glyzerin  
1,0 ml 14,3 M  $\beta$ -Mercaptoethanol  
200  $\mu$ l 10% Bromphenolblau-Lösung

10x SDS-PAGE-Laufpuffer:

0,25 M Tris  
1,9 M Glycin  
1% SDS

Carbonatpuffer:

1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,2 g NaN<sub>3</sub>  
2,93 g NaHCO<sub>3</sub>  
pH 9,6 ad 11

Waschpuffer

PBS  
TritonX 100 (0,05%)  
NaN<sub>3</sub> (0,02%)

HEPES-Phenol:

1kg (10,6 mol) Phenol bei 60<sup>0</sup>C im Wasserbad lösen, mit HEPES pH 7,4 äquilibrieren, bei 4<sup>0</sup>C etwa 6 Monate haltbar

**2.1.7 Medien**LB-Medium:

1% (w/v) Bacto-Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt  
0,5% (w/v) NaCl  
in Wasser

LB-Medium ist ein Kultivierungsmedium für *E. coli*; der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

### **2.1.8 Biologisches Material und Bakterienstämme**

Vorratskultur in Glycerin:

Dies dient zur Langzeitaufbewahrung von Bakterienzellen. Es werden 850 µl Bakterienkultur, welche über Nacht in LB-Medium gewachsen ist, in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben. Zu der Kultur werden 150 µl sterile Glycerinlösung hinzugefügt. Die Lösung wird auf Trockeneis oder direkt bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Bei  $-70^{\circ}\text{C}$  sind die Zellen für lange Zeit lagerungsfähig. Zum Start einer neuen Kultur wird mit einer sterilen Impfnadel die Oberfläche des gefrorenen Glycerinstocks abgestreift. Die mit der Nadel abgenommenen Bakterienzellen werden auf eine Agar-Platte mit LB-Medium mit oder ohne Antibiotikum überführt und anschließend über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

## **2.2 Biochemische Methoden**

### **2.2.1 Expression in *E. coli* und Reinigung eines aminoterminalen Teilstücks von CAP2**

Für die Proteinexpression eines aminoterminalen Teilstücks von CAP2 in *E. coli* wird ein Glycerolstock verwendet. Diese Bakterien enthalten ein Plasmid, das für ein GST-NCAP2 (Aminosäuren 1-310) (Glutathion-S-Transferase) Fusionsprotein kodiert und ein Ampicillinresistenzgen trägt. Sie werden in LB-Medium, welches Ampicillin (50 µg/ml) enthält, bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln (250 rpm) kultiviert und bis zu einer Dichte von  $\text{OD}_{600}=0,65$  angezogen. Zur Induktion der Proteinexpression wird IPTG (0,5 mM

Endkonzentration) zugegeben. Nach der IPTG-Zugabe erfolgt eine Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur (250 rpm). Eine Kontrolle der Proteinexpression wird durch SDS-Gelelektrophorese an einem Aliquot durchgeführt. Dafür werden Zellen aus einem 1 ml für 5 Minuten bei 15.000 rpm pelletiert und das Zellpellet in 100 µl 2x SDS-Pobenpuffer aufgenommen und 4 Minuten bei 95<sup>0</sup>C inkubiert. 10 bis 20 µl dieser Lösung werden für die Gelelektrophorese verwendet. Nach der Ermittlung einer 60 kDa Proteinbande erfolgt die Proteinpurifikation. Die Proteinreinigung wird mit Hilfe einer Affinitätsreinigung über den GST-Anteil durchgeführt. Glutathion Sepharose 4B Beads binden an das GST-Fusionsprotein und ermöglichen seine Gewinnung.

Zur Extraktion des CAP2-Fusionsproteins erfolgt zunächst eine Lyse der Zellen. Dafür werden folgende Lösungen verwendet.

Lösungen:

- 0,5 M EDTA
- 0,5 M Benzamidin
- 100 mM PMSF
- 10 mg/ml Lysozym
- 1 % Sarcosyl
- 1 mM DTT

Das Lysat wird mit PBS-Puffer verdünnt. Triton-X-100 (Endkonzentration 1%) und Lysozym (100 µg/ml) werden hinzugefügt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation des Lysats bei 15000 U/min zur Trennung des Proteinüberstandes vom unlöslichen Zellpellet wird das Fusionsprotein im Überstand für 2 bis 4 Stunden bei 4<sup>0</sup>C an die Beads (0,5 ml Suspension für 20-30 ml Überstand) gekoppelt. Nach der Inkubation werden die Beads ~10 Mal mit PBS gewaschen, um die restlichen Zellproteine zu entfernen. Dabei werden die Beads jeweils für 1 Minute bei 1000 U/min pelletiert und anschliessend vorsichtig in Waschpuffer resuspendiert. Für die Kontrolle durch die Gelelektrophorese werden bei allen

Schritten Proben entnommen. Durch Thrombinspaltung kann das CAP2 Polypeptid vom GST-Anteil, der an den Beads gebunden bleibt, getrennt werden und bleibt als 35 kDa Protein in Lösung. Der Erfolg der Thrombinspaltung wird durch Gelelektrophorese kontrolliert.

### **2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mit der SDS-PAGE können Proteinen unterschiedlicher Größe aufgetrennt werden [Laemmli, 1970]. Dabei unterscheidet man zwischen dem oberen Sammelgelbereich und dem darunter liegendem Trenngel. Der Sammelgelbereich hat einen pH-Wert von 6,4 und weist eine Konzentration von 5% Acrylamid auf. Im Trenngelbereich liegt ein pH-Wert von 8,8 vor bei einer Acrylamid Konzentration zwischen 8 bis 15% (siehe Tabelle 1). Durch den pH-Sprung zwischen Sammel- und Trenngel erreicht man eine hervorragende Trennschärfe der Proteinbanden. Als Proteinmarker für die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts wird LMW-Marker verwendet. Zur Abdichtung der Gelelektrophoresekammer wird ein 3-5%iges Agarosegel verwendet. Dieses wird bis zum Erreichen eines flüssigen Zustands erwärmt und anschließend zur Abdichtung um die Gelplatte appliziert. Die Trenngele haben eine Größe von 7,5 x 10 x 0,05 cm. Je nach Proteingröße werden bei der Gelelektrophorese unterschiedliche Konzentrationen an Acrylamid verwendet, die die Auftrennung der Proteine beeinflussen.

Die Proteinlösungen werden zur Gelauftragung mit Probenpuffer versetzt und für 4 bis 5 Minuten auf 95<sup>0</sup>C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren (siehe Tabelle 1). Der Probenpuffer ist mit Bromphenolblau versetzt, das als Marker dient. Wenn dieser Marker das Ende des Gels erreicht hat, ist die Gelelektrophorese beendet. Die Proteine laufen im Gel vom Minus- zum Plus-Pol. Zunächst wird eine Spannung von 100 Volt angelegt und beim Abfall der Stromstärke auf 180 Volt erhöht. Nach Beendigung der Auftrennung wird das Gel von der Gelplatte entfernt und ca. 30 Minuten mit Coomassie-Blau-Färbelösung versetzt oder für den Western-Blot verwendet werden, für den die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Nach der Inkubation mit Coomassie-Blau wird der Färbelösungsüberstand

verworfen und der nicht gebundene Anteil der Färbelösung durch eine Entfärbelösung ausgewaschen.

Färbelösung:

0,1% Coomassie-Brilliant-Blau R 250  
50% Methanol  
10% Essigsäure  
vor Gebrauch filtrieren.

Entfärber:

10% Ethanol  
7% Essigsäure

Molekülmassenstandards:

LMW-Marker (GE Healthcare) [Da]: 94.000; 67.000; 43.000; 30.000; 20.100; 14.400

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Polyacrylamidgele<sup>1)</sup>

	Trenngel				Sammelgel
	8%	10%	12%	15%	5%
Acrylamid 30:0,8 <sup>2)</sup> [ml]:	15,7	19,7	23,6	30	4,08
H <sub>2</sub> O [ml]:	27,5	23	19,6	13,2	17,16
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 [ml]:	16	16	16	16	2,4
10% SDS [μl]:	590	590	590	590	240
TEMED [μl]:	23	23	23	23	20
10% APS [μl]:	240	240	240	240	360

1) Mengenangaben für 12 Minigele; 2) Acrylamid : Bisacrylamid

5x SDS-Probenpuffer:

2,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,5  
4,0 ml 10% SDS  
2,0 ml Glyzerin  
1,0 ml 14,3 M β-Mercaptoethanol

10x SDS-PAGE-Laufpuffer:

0,25 M Tris  
1,9 M Glycin  
1% SDS

200 µl 10% Bromphenolblau-Lösung

### **2.2.3 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) für den Nachweis von monoklonalen Antikörpern**

Für den Nachweis monoklonaler Antikörper, die durch die Hybridom-Technik produziert werden sollen, sind geeignete Testsysteme auszuwählen. Die Zellkulturüberstände der erzeugten Hybridomzellen werden für die Antikörpertestung verwendet. Nach der Zellfusion und der Selektion sezerniert nur ein kleiner Anteil der Hybridomzellen die gesuchten monoklonalen Antikörper (MAK) in das Zellüberstandsmedium. Das angewendete Testsystem sollte eine hohe Empfindlichkeit aufweisen mit der Möglichkeit 30-50 ng/ml spezifischen Antikörper nachzuweisen [Fazekas de St. Groth, 1980]. Geringere Sensitivität des Nachweissystems erfordert eine längere Kultivierungszeit der Zellklone in der Zellkultur. Für die primäre Selektion der Zellklone sollte ein sensitives jedoch wenig selektives Testverfahren genutzt werden, dabei sollte innerhalb kurzer Zeit eine hohe Anzahl von Testversuchen durchführbar sein. Der ELISA kann im Rahmen der primären Selektion der Zellklone angewendet werden.

Bei Immunoassays für lösliche Antigene werden verschiedene Systeme unterschieden. Homogene Systeme sind dadurch charakterisiert, dass die Enzymaktivität beispielsweise eines Hapten-Enzym-Konjugats mit der Antigen-Antikörper-Reaktion in Verbindung steht. Dabei werden keine Wasch- und Trennschritte benötigt. Diese Systeme sind jedoch unempfindlicher und auf Haptene beschränkt. Daher werden für die Antikörperselektion meist heterogene Testsysteme verwendet. Bei heterogenen Systemen sind Trennschritte notwendig.

Dies kann durch eine Bindung des unmarkierten Antigens an eine Festphase erfolgen. Beim ELISA werden Träger aus Kunststoff, Polystyrol und Polyvinyl verwendet. Diese Träger binden das Antigen unspezifisch. Dabei können freie Reaktanden entstehen, die durch Waschen entfernt werden können. Aufgrund der hohen Zahl der Proben werden die Tests in

Mikrotiterplatten mit 96 Löchern durchgeführt. Die Erkennung von monoklonalen Antikörpern in Zellkulturüberständen erfolgt mit enzymatischen Substratreaktionen, die photometrisch erfasst werden. Durch die Inkubation mit dem Zellklonüberstand wird der spezifische monoklonale Antikörper über das Antigen an die Festphase gebunden. Durch Waschen werden nicht gebundene Proteine entfernt. Der Immuntest mit Festphasengebundenem Antigen kann direkt sowie indirekt durchgeführt werden. Beim direkten Nachweis ist der Nachweis-Antikörper enzymmarkiert. Diese Methode wird verwendet, wenn ähnliche monoklonale Antikörper wie der bereits markierte beim Screening gefunden werden sollen (Verdrängungstest). Beim indirekten ELISA wird der monoklonale Antikörper nach Inkubation mit einem enzymmarkierten zweiten Antikörper gegen Maus-Immunglobuline nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt nach Waschgängen und Inkubation mit einem Substrat durch eine enzymatische Farbreaktion. Die enzymatische Reaktion wird quantitativ anhand von Extinktionsmessungen in der Photometrie erfasst. Als Enzym wurde alkalische Phosphatase verwendet, das Substrat war para-Nitrophenylphosphat, Die Farbreaktion wurde bei 405 nm bestimmt.

**Abbildung 7a-b: Darstellung der primären Zellklonselektion im ELISA anhand einer tabellarischen Übersicht des ELISA sowie den entsprechenden Extinktionswerten**

**a: Darstellung einer Auswahl von Zellklonen (jede Zahl entspricht einem bestimmten Zellklon aus der Fusion) in der primären ELISA-Selektion.** Die Übersicht stellt horizontal die Reihen 1-12 und vertikal die Reihen A-H auf der Elisa-Platte dar.

Medium	Medium	611	619	620	626	631	632	634	646	649	653
657	660	665	666	667	668	669	670	672	673	674	691
692	694	695	697	698	701	706	715	727	731	733	734
736	740	743	746	747	753	755	765	769	775	777	782
784	791	793	799	806	818	820	831	833	841	847	855
860	861	862	865	876	879	881	885	886	887	894	895
896	901	907	909	911	912	915	920	922	924	925	928
940	941	944	950	953	958	959					

**b:Extinktionsmesswerte:**

<b>0,087</b>	<b>0,085</b>	<b>0,208</b>	<b>0,152</b>	<b>0,213</b>	<b>0,735*</b>	<b>0,242</b>	<b>0,238</b>	<b>0,255</b>	<b>0,181</b>	<b>0,145</b>	<b>1,503*</b>
<b>0,136</b>	<b>0,556*</b>	0,177	0,197	0,156	0,199	0,187	0,176	<b>0,423*</b>	0,236	0,177	0,287
<b>0,296*</b>	<b>0,344*</b>	<b>0,285*</b>	0,156	0,162	<b>0,321*</b>	0,176	0,137	0,142	0,137	0,277	0,189
<b>0,18</b>	<b>0,252*</b>	<b>0,3*</b>	<b>2,12*</b>	0,18	0,221	<b>2,091*</b>	<b>0,36*</b>	0,154	<b>0,408*</b>	0,151	0,234
<b>0,191</b>	<b>0,277*</b>	<b>1,332*</b>	0,174	0,146	0,162	0,182	<b>0,446*</b>	0,176	0,166	0,142	<b>0,531*</b>
<b>0,305*</b>	0,183	0,188	<b>1,106*</b>	0,172	0,169	0,189	0,264	0,202	0,127	0,21	0,221
<b>0,149</b>	0,154	0,186	<b>0,316*</b>	0,17	0,176	0,159	0,271	0,13	<b>1,402*</b>	0,141	0,167
<b>0,155</b>	0,236	<b>1,046*</b>	<b>0,345*</b>	0,155	0,239	0,2					

Bei der Bindung des Antigens an die Festphase können noch freie Bindungsstellen auf der Festphase vorliegen, an die Antikörper aus dem Zellklonüberstand binden können. Diese können so zu einem hohen Leerwert beitragen. Um dies zu verhindern, werden die freien Bindungsstellen mit Proteinen blockiert. Zur Blockierung kann 1% Rinder-Serum-Albumin (BSA) in PBS-Puffer verwendet werden. Da hohe Leerwerte auch durch unspezifische Bindung des ersten und zweiten Antikörpers entstehen können, wird zur Reduktion der nicht-spezifischen Bindung Tween 20 bzw. Triton X-100 (0,01-0,05%) in den Inkubations- und Waschpuffer gegeben. Die Proteine bzw. Antigene binden in der Regel nicht kovalent an die Festphase. Dabei ist es möglich, dass sich diese während weiterer Inkubationsschritte von der Festphase lösen. Dies wird als „Bluten“ der Festphase bezeichnet. Dabei kann es so zur Erhöhung der Nachweisgrenze kommen, da ungebundene Antigene die Antikörper in der flüssigen Phase blockieren und somit deren Bindung an die Festphase verhindern. Das „Bluten“ kann bei hohen Beladungskonzentrationen der Mikrotiterplatten auftreten. Die Beschichtung sollte somit mit geringen Proteinkonzentrationen zwischen 0,5 bis 10 µg/ml erfolgen. Der ELISA wird zunächst für einen Vortest durchgeführt, um die Proteinkonzentration zu ermitteln, bei der das bestmögliche Extinktionsergebnis erreicht wird. Für die Beschichtung der ELISA-Platte wird für das CAP2 Polypeptid eine Verdünnungsreihe mit Proteinkonzentrationen von 0,5 bis 20 µg/ml hergestellt. Die Beschichtung der Platten erfolgt nach dem unten angegeben Schema [Peters et al., 1990].

**Verdünnungsreihe:**

Carbonatpuffer:     1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
                          0,2 g NaN<sub>3</sub>  
                          2,93 g NaHCO<sub>3</sub>  
                          pH 9,6 ad 11

Für die Antigenbeschichtung der ELISA-Platte wird eine Verdünnungsreihe beginnend mit einer Konzentration von 20 µg/ml hergestellt. Dazu werden 105 µl (Proteinprobe enthält eine Konzentration von ca. 400 µg/1000 µl) Proteinlösung in 1995 µl Vollers Puffer (Carbonatpuffer) hinzugegeben, sodass sich für die erste Antigenprobenlösung insgesamt 2,1 ml (20 µg/50 µl Proteinlösung =>2,1fache=105 µl) verdünnte Lösung ergeben. Von den 2,1 ml verdünnter Lösung wird 1 ml entnommen und mit 1 ml Carbonatpuffer gemischt, sodass man 2 ml Antigenprobelösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml erhält. Für die Herstellung der Konzentration von 5 µg/ml werden 1 ml der letzten Lösung (10 µg/ml) entnommen und wiederum mit 1 ml Carbonatpuffer versetzt. Für den Erhalt einer Konzentration von 1 µg/ml zu erhalten, werden 400 µl mit weiteren 1,6 ml Carbonatpuffer gemischt. Als letztes werden 1 ml dieser Probe mit 1 ml Carbonatpuffer verdünnt, sodass eine Konzentration des Antigens von 0,5 µg/ml erreicht wird. Alle Wells der Elisa-Platten werden über Nacht bei 4<sup>0</sup>C mit dem Antigen inkubiert. Nach der Inkubation der Antigenproben über Nacht werden die Platten in drei Waschschritten gewaschen. Als Waschpuffer wird eine Lösung aus PBS (500 ml), Triton-X 100 (0,05%) und NaN<sub>3</sub> (0,02%) hergestellt. Für die Herstellung der Lösung werden 10%iges Triton im Verhältnis von 1:200 und für 0,02%iges NaN<sub>3</sub> eine Verdünnung von 1:500 (Stocklösung 1%) verwendet. Die Blockung erfolgt in allen ELISA-Feldern mit jeweils 100 µl Blockpuffer (Waschpuffer mit 1% BSA). Die Blockung wird mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Blockung wird wiederum dreimal gewaschen, bevor der erste Antikörper hinzugegeben wird. Der erste Antikörper für die positiv Kontrolle wird in einem Verhältnis von 1:1000 (für den

polyklonalen Antikörper) mit Blockpuffer verdünnt (5 µl Antikörper in 5 ml Blockpuffer). In den Wells A1 und A2 werden 100 µl des polyklonalen Antikörpers als positive Testkontrolle hinzugegeben. Als negative Testkontrolle werden in den Wells B1 und B2 nur Carbonatpuffer verwendet. In den ELISA Versuchen zur Zellklontestung werden die Zellüberstandslösungen als Korrelat für die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper verwendet. Die Zugabe des monoklonalen Antikörpers erfolgt in allen restlichen Wells. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur (ELISA-Platte abgedeckt) mit den ersten Antikörpern, Polyklonale Kaninchen Anti CAP2 Antikörper zur Kontrolle bzw. Zellklonüberstände, wird eine dreimalige Waschung durchgeführt. Als zweiter Antikörper für den polyklonalen Antikörper wird Anti Kaninchen IgG bzw. Anti Mause IgG, die an alkalische Phosphatase gekoppelt sind, für die Zellklonüberstände verwendet. Die Verdünnung erfolgt in Blockpuffer 1:30.000 (1 µl in 30 ml) für den polyklonalen Antikörper und 1:10.000 (1 µl in 10 ml) für den monoklonalen Antikörper. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper dauert eine Stunde bei Raumtemperatur, wobei die ELISA-Platte im Dunklen gelagert wird. Das Substrat besteht aus zwei Komponenten in Tablettenform. Zwei Tabletten werden in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und bis zur Färbung der Platte dunkel gelagert. Die Komponenten des Substrats bestehen aus (Sigma Fast/TM pNitrophenylphosphat-Tablets) 1xpNPP- und 1x Tris-Tablette. Für die Färbung werden 100 µl Substrat pro Well hinzugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung wird im ELISA-Reader photometrisch bei 405 nm durchgeführt.

Ausgewählte Zellklone im ELISA werden zur weiteren Überprüfung in den Streifentest herangezogen (Siehe 3.3).

#### **2.2.4 Western-Blot für die Transferierung von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran**

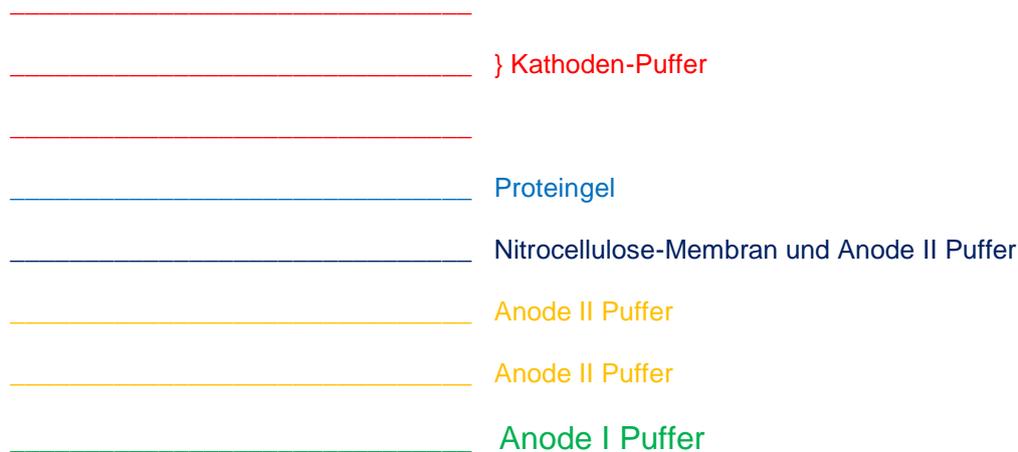
Mit dem Western-Blot werden Proteine aus einem Proteingel nach dem Semi-Dry-Transfer-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Für den Western-Blot werden zunächst Proteine in SDS-PA Gelen aufgetrennt. Dafür werden 100 µl Proteinhomogenat mit 100 µl Probenpuffer gemischt, 5 Minuten bei 95<sup>0</sup>C erhitzt und jeweils gleichmäßig in die Probentaschen gegeben. Zusätzlich werden 3 µl Proteinmarker mit 10 µl Probenpuffer verdünnt und eine äußere Tasche hineingegeben. Der Proteinmarker dient zur späteren Bestimmung der Proteingrößen auf der Nitrocellulosemembran.

Pro Western-Blot werden sechs Whatman-Filterpapiere, (Whatman No X) benötigt, die folgendermaßen aufbereitet werden. Es wird ein Filterpapier mit Anoden-I-Puffer und jeweils zwei mit Anoden-II-Puffer befeuchtet. Drei weitere werden mit Kathoden-Puffer benetzt. Eine Nitrocellulosemembran wird mit destilliertem Wasser angefeuchtet und in Anoden-II-Puffer gelegt. Für den Western-Blot Transfer werden die vorbereiteten Papiere mit dem Kathoden-Puffer auf das Proteingel gelegt. Auf die andere Seite des Proteingels wird die Nitrocellulosemembran gelegt und mit zwei weiteren Anode-II-Puffer und einem Anode-I-Puffer Filterpapier abgedeckt (siehe Abb. 8). Zur Transferierung wird das Proteingel mit den Filterpapieren und der Membran (Western-Blot-Sandwich) in die Semi-dry-Westernblot-Kammer gelegt. Für ein Gel erfolgt die Transferierung für ca. 40 Minuten bei einer Spannung von 10 Volt, für zwei Gele bei 15 Volt für ca. 1 Stunde. Nach dem Transfer wird die Nitrocellulosemembran aus dem Westernblot-Sandwich entnommen und anschließend mit Ponceau-S Färbelösung gefärbt, um den Transfer zu überprüfen. Nach Sichtbarwerden der Proteinbanden auf der Membran wird diese zur Entfärbung mit NCP-Puffer gewaschen. Die Membran wird mit 5%igem Milchpulver (in NCP-Puffer) für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4<sup>0</sup>C inkubiert. Dies dient dazu, alle Protein-freien Bereiche abzudecken,

damit sie nicht als unspezifische Bindungsstellen bei der späteren Antikörperperstung zur Verfügung stehen [Towbin et al. 1979].

#### Färbelösung:

2 g Ponceau S-Farbstoff gelöst in 100 ml 3%iger Trichloressigsäure



**Abbildung 8: Aufbau eines Westernblots**

### **2.2.5 Western-Blot aus Maus-Herzgewebelysat**

Aus zwei Herzen von Wildtyp-Mäusen wird ein Proteinlysate hergestellt. Zur Proteinextraktion wird das Gewebe zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren, anschließend wird es mit dem Mörser zerkleinert. Die zerkleinerten Gewebestandteile werden in einem Reagenzgefäß wieder in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Vergleichbar mit der Proteinexpression wird Lysispuffer (IP-Lysis-Puffer, Hepes-basiert) benötigt. Das zerkleinerte Gewebe wird mit dem Lysispuffer versetzt und anschließend bei 16.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird entnommen und 2x Probenpuffer hinzugefügt. Der Probenüberstand wird bei 95<sup>0</sup>C für fünf Minuten denaturiert. Die Proteine der Homogenate werden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western-Blot auf Nitrocellulosemembran übertragen. Die Nitrocellulosemembran enthält nach dem Western-

Blot das CAP2 Protein auf Höhe der 60 kDa Bande. Diese Nitrocellulosemembranen werden zur Antikörpertestung im Streifentest verwendet.

### **2.2.6 Polyklonale Antikörper von CAP1 und CAP2**

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper gegen CAP1 wurde CAP1 cDNA aus der mRNA von C3H10T1/2 Zellen vervielfältigt. Für CAP2 wurde mRNA, isoliert aus Mausherzgewebe, verwendet. CAP1 wurde unter Verwendung von pT7-7 als Vollängenprotein exprimiert und durch Kationenaustauschchromatographie gereinigt. Für CAP2 wurden N- und C-terminal GST-gekoppelte Polypeptide exprimiert. Für F-Aktin Interaktionsuntersuchungen wurde die C-terminale Domäne von Maus CAP2 (CAP2 2647) mit den Aminosäureresten 261-476 , entweder als GST-Fusionsprotein oder nach der Abspaltung von GST durch Thrombin , verwendet. Die ordnungsgemäße Faltung der Polypeptide wurde überprüft und durch NMR-Spektroskopie gezeigt. Für die Herstellung CAP1 spezifischer polyklonaler Antikörper wurde rekombinantes CAP1 als Vollängenprotein verwendet. Für spezifische polyklonale Antikörper gegen CAP2 wurde das N-terminale his-gekoppelte Polypeptid mit den Aminosäureresten 1-201 genutzt. Die Antikörper wurden in Kaninchen gebildet. Die Spezifität der Antikörper wurde mit CAP1 und CAP2 als GFP-Fusionsproteine in COS7 Zellen untersucht. Es ergaben sich keine Kreuzreaktionen mit überexprimiertem GFP-CAP1 bzw. GFP-CAP2. Die Antikörper konnten jeweils die korrespondierenden Proteine in humanem Gewebe und Mausgewebe binden [Peche et. al. , 2007].

## **2.3 Immunologische Methoden**

### **2.3.1 Immunisierung von Balb/C-Mäusen mit rekombinantem CAP2 Polypeptid**

Die Immunisierung wird insgesamt sechsmal durchgeführt. Dabei werden Balb/C-Weibchen, im Alter von 6 bis 10 Wochen, mit dem aminoterminalen Teilprotein von CAP2 immunisiert. Nach der Versuchsanleitung erfolgt die Immunisierung an den Tagen 17, 14, 10, 6, 4 und 1 vor der Fusion. Die Immunisierung wird mit einer Proteinkonzentration des Antigens von 0,5

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$  durchgeführt. 60  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung (in PBS) werden bei der ersten Immunisierung mit 50  $\mu\text{l}$  Freund's-Adjuvans-complete verdünnt. Freund's-Adjuvans-complete enthält Parafinöl, zur Gewährleistung der Depotwirkung, Hitze-inaktivierte Mikrobakterien zur Anregung des Immunsystems sowie einen Emulgator zur Stabilisierung der Wasser-in-Öl-Emulsion. Zur weiteren Immunisierung werden aus den Proteinlösungen Aliquots hergestellt, um Proteinfractionen für die Injektionen bereitzustellen. Für die zweite Immunisierung werden 60  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung mit 50  $\mu\text{l}$  Freund's-Adjuvans-incomplete gemischt. Die restlichen Immunisierungen erfolgen mit 100  $\mu\text{l}$  Aliquots. Dabei sind 50  $\mu\text{g}$  Protein in 50  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer gelöst und werden mit weiteren 50  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer verdünnt. Das Antigen wird subkutan in die beiden Hinterfüße der Mäuse zwischen die Ballen gespritzt.

### **2.3.2 Die Hybridomtechnik**

Die Hybridomtechnik zur Produktion monoklonaler Antikörper hat eine große Bedeutung in zahlreichen Bereichen der biologischen und medizinischen Forschung. Im Folgenden sollen die Prinzipien und grundlegenden Aspekte dieser Technik zur Produktion monoklonaler Antikörper dargestellt werden [Methode nach: Milstein und Köhler, 1975]. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper ist die Berücksichtigung einiger Faktoren wie die Immunisierung mit einem Antigen, die Auswahl geeigneter Myelom-Zelllinien und Methoden der Antikörpertestung erforderlich. Nach der Bildung von Hybridom-Zelllinien erfolgen die Überführung und die Isolation dieser in eine Zellkultur. Diese produzieren den monoklonalen Antikörper unter der Voraussetzung, dass eine Klonierung erfolgt, um die Akkumulation von Varianten zu verhindern [Clark, 1981]. Die Zellhybridisierung stellt eine der grundlegendsten Zytotechnologien dar. Das japanische Hämagglutinationsvirus, inaktiviertes Sendavirus, wurde zuerst zur Zellfusion genutzt. Das Virus zeigt die Fähigkeit, die Zellmembran aufzulockern und zu durchdringen, sodass eine Zellfusion stattfinden kann. Bei der

Hybridomtechnik wird zur Vereinfachung der Prozesse Polyethylenglycol (PEG) als PEG-Reaktion für die Zellfusion verwendet (siehe auch 2.4.2) [Shirata et al., 1998].

Bei der Bildung monoklonaler Antikörper produziert ein einzelner aktivierter B-Lymphozyt Antikörper mit einer bestimmten Spezifität. Bei Tumoren die aus B-Lymphozyten (Myelom, Plasmozytom) entstehen, können die produzierten Antikörper in ihrer Spezifität nicht vorher bestimmt werden. Da solche Tumoren aus einer einzigen entarteten Zelle entstehen, sind die von den Nachkommen dieser Zellen produzierten Antikörper einheitlich und können somit als monoklonale Antikörper angesehen werden [Peters et al., 1990].

Für die Herstellung bestimmter monoklonaler Antikörper werden Methoden verwendet, um permanent wachsende Zelllinien mit den antikörperproduzierenden B-Lymphozyten in der Zellkultur zusammenzuführen. Eine Antikörpergewinnung aus normalen B-Lymphozyten ist aufgrund ihrer begrenzten Überlebensfähigkeit in der Zellkultur nicht möglich. Bei der Hybridom-Technik werden die Eigenschaften der Immunzellen (B-Lymphozyten) und der Tumorzelllinien ausgenutzt. Dies ermöglicht die Produktion von Hybridomzellen, die monoklonale Antikörper gegen ein spezifisches Antigen bilden. Zur Bildung von Hybridomzellen werden B-Lymphozyten in einer Zellfusionsreaktion mit Myelom-Zellen (Tumorzelllinien) fusioniert [Tomita und Tsumoto, 2011]. Die Zellhybridisierung der Myelom-Zellen mit den B-Lymphozyten führt dazu, dass die Eigenschaften beider Zelllinien in den so entstandenen Hybridom-Zellen erhalten bleiben. Die Hybridom-Zellen besitzen sowohl die Fähigkeit der Antikörperproduktion der B-Lymphozyten als auch das permanente Wachstum der Myelomzellen. Wie von Köhler und Milstein beschrieben, erfolgt, für Milzzellen aus Mäusen dargestellt, die Fusion von Maus-Myeloma und Milzzellen immunisierter Mäuse. Es werden Balb/C Mäuse verwendet. Die Milzzellen sterben im Nährmedium ab. Sobald beide Zelllinien durch die PEG-Reaktion fusioniert werden,

entstehen aus der Verschmelzung Zellen, die ein Wachstum auf selektivem HAT-Medium zeigen.

Für die Purinsynthese in Zellen wird das Hypoxanthin aus dem Medium benötigt. Zur weiteren Umwandlung müssen die Zellen das Enzym HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) besitzen. Dieses fehlt den Myelom-Zellen, sodass sie alleine trotz ihrer Eigenschaft der Unsterblichkeit nicht im HAT-Selektionsmedium überlebensfähig sind. Bei Milzzellen ist diese Enzym vorhanden, jedoch ist ihre Überlebenszeit begrenzt. Die Hybridom-Zellen tragen in Folge der Fusion sowohl das HGPRT-Enzym als auch die Eigenschaft der Unsterblichkeit. Überlebende Zellklone können im Wachstum beobachtet werden und etablieren sich nach einigen Wochen. Zur Gewinnung von B-Lymphozyten für die Fusion können auch popliteale Lymphknoten von Balb/C Mäusen verwendet werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die Zellfusionstechniken ein sehr starkes Werkzeug für die Produktion eines spezifischen Antikörpers direkt gegen ein spezifisches Antigen darstellen. Zudem ist es möglich antikörperproduzierende Zellen verschiedenen Ursprungs zu hybridisieren. Solche Zellen können *in vitro* gezüchtet werden und spezifische Antikörper bilden. Köhler und Milstein zeigten mit der Hybridom-Technik, dass individuelle Zellklone von normalen antikörperproduzierenden Lymphozyten durch die Fusion mit Myelomazellen unsterblich gemacht werden können. Diese Methode der somatischen Zellhybridisierung eröffnete die Möglichkeit der *in vitro* Produktion von monoklonalen Antikörpern [Peters et al., 1990].

Die Methode der Produktion monoklonaler Antikörper umfasst folgende Aspekte. Die Immunisierung einer Maus mit einem prädefinierten Antigen, die Isolation antikörperproduzierender Lymphozyten aus der Milz oder aus Lymphknoten, sowie die Kultivierung geeigneter Myelomzellen. Es erfolgt die Fusion sensitivierter Lymphozyten mit den Myelomazellen zur Herstellung fortlaufend antikörperproduzierender Zellen, sowie die

Selektion und das Screening geeigneter Zelllinien, da nicht alle Hybridoma-Zellen die Eigenschaft der Antikörperproduktion besitzen (siehe 2.4.1).

Monoklonale Antikörper werden als strukturelle Proben für Proteine und Hormone verwendet, als hochspezifische Reagenzien für Histokompatibilitätstestung, für die Tumorlokalisation, Immuntherapie, Molekulpurifikation, zur Identifikation neuer Oberflächenantigene auf Lymphozyten und Tumorzellen, sowie für die Erkennung von mikrobiellen und parasitären Krankheiten und Ermittlung von Medikamenten-Spiegel [Nakamura, 1983].

### **2.3.3 Deparaffinierung und Immunfluoreszenzmarkierung von Gewebeschnitten mit Antikörpern**

Die Immunfluoreszenzmarkierung von Mausgewebeschnitten wird gegen die Zellproteine Emerin, Myomesin und F-Actin durchgeführt. Zur Vorbereitung müssen die Präparate auf den Objektträgern mit der Methode der rehydratisierenden Deparaffinierung behandelt werden. Es werden acht Lösungen in Glasbehältern vorbereitet (zweimal Xylen, zweimal Isopropanol, 100% Ethanol, 90% Ethanol, 70% Ethanol und PBS). Die Präparate werden sukzessive für jeweils 5 Minuten in das erste und das zweite Xylene-Gefäß eingetaucht, darauffolgend für jeweils 5 Minuten in die Isopropanollösungen getaucht, 2 Minuten in 100% Ethanol, 3 Minuten in 90% Ethanol, 2 Minuten in 70% Ethanol und für mindestens 5 Minuten in der PBS-Lösung inkubiert. In einem weiteren Schritt werden 20,5ml 0,1 M Natriumcitrat mit 4,5 ml 0,1 M Zitronensäure in einem Becherglas gemischt und auf 250 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird aufgekocht und anschließend in ein Objektträger-Gefäß gegeben. Die Lösung wird bei 92<sup>0</sup>C im Wasserbad aufgewärmt. Im Folgenden werden die Gewebepreparate mit der Lösung bei 92<sup>0</sup>C für 35 Minuten inkubiert. Anschließend wird der

Glasbehälter mit den Präparaten auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Präparate werden für 1 Stunde zugedeckt bei Raumtemperatur mit 1x PBG inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen auf dem Präparat zu blockieren. Der Blockierungstropfen wird mit Dakopen auf dem Objektträger fixiert. Die drei Gewebeschnitte auf den Objektträgern werden mit den Ersten Antikörpern für 1 Stunde lichtgeschützt inkubiert. Der Emerin Antikörper als Erstantikörper wird 1:40 verdünnt (5 µl auf 200 ml PBG). Der Myomesin-Antikörper wird unverdünnt auf das Präparat gegeben. F-Aktin kann mit TRITC-Phalloidin markiert werden, das sich in F-Aktinfilamente einlagert.

Vor der Gabe des zweiten Antikörpers werden die Präparate dreimal mit PBS für jeweils 5 Minuten inkubiert. Als Zweitantikörper wird für Emerin und Myomesin monoklonaler Ziegen-Anti-Maus-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Zusätzlich werden für die DNA-Färbung 0,5 µl DAPI hinzugefügt. Zur Herstellung des TRITC-Phalloidin-Markers werden 3 µl Phalloidin mit 1 ml PBG verdünnt und 0,5 µl DAPI hinzugesetzt. Nach Zugabe des Zweitantikörpers sowie von TRITC-Phalloidin erfolgt eine lichtgeschützte Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Darauf werden die Präparate in einem Abstand von 5 Minuten dreimal mit PBS gewaschen, und in der Zwischenzeit dunkel gelagert. Das Fixationsmedium wird bei 37<sup>0</sup>C aufgewärmt und auf die Präparate gegeben. Die Präparate werden mit Deckgläsern zugedeckt und für 1 Stunde bei 37<sup>0</sup>C gelagert. Danach erfolgt eine Lagerung bei Raumtemperatur über Nacht.

Für Präparate aus Mäusegehirn von Wildtyp und KO Maus wurde eine Hämatoxylinfärbung nach Weigert durchgeführt.

Die Gewebeschnitte wurden auf den Objektträgern mit Dakopen umrandet, der zugegebene Farbstoff wird dadurch innerhalb der Umrandung gehalten und für 5 Minuten mit Hämatoxylinfarbstoff bedeckt. Darauf wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gewaschen und für 5 Minuten in destilliertem Wasser inkubiert. Die Prozessierung in den

Lösungen wird im Vergleich zur oben beschriebenen Methode bei der Hämatoxylinfärbung in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt.

Als Fixationsmedium wird Gelvatol verwendet.

#### Gelvatol:

20 g Gelvatol, 20-30 (Polyvinylglykol, MW10.000)

in PBS für 16 Stunden rühren

40 ml Glycerin zugeben, 16 Stunden rühren

15 min bei 12.000x g zentrifugieren

25 ng/ml DABCO zum Überstand geben

Lagerung aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$

## **2.4 Zellbiologische Methoden**

### **2.4.1 Präparation monoklonaler Antikörper**

Die Herstellung monoklonaler Antikörper dauert mit Standardimmunisierungsverfahren einige Monate, da die Immunisierung im Durchschnitt 7 Wochen beansprucht. Bei Immunisierungen mit Proteinen, die unter zahlreichen verschiedenen Spezies hochkonserviert sind, kann oft keine ausreichende Immunantwort aufgrund der fehlenden Unterschiede erreicht werden. Dies kann für zytoskelettale Proteine zutreffen. Durch die Anwendung einer schnellen Immunisierungsmethode über 17 Tage und der Auslösung einer lokalen Immunantwort, können gute Ergebnisse bei der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen schwächere Antigene erreicht werden. Zur Immunisierung erhalten alle vier Balb/C Mäuse, die für die Herstellung von monoklonalen Antikörper verwendet werden, Antigeninjektion (siehe.2.3.1) [Niebuhr et al., 1998].

Am Tag der Zellfusion werden bei jeder Maus nach Tötung beidseits die poplitealen Lymphknoten entfernt [Brodsky, 1985, Kubagawa et al., 1982]. Für die Lymphknotenpräparation werden folgende Lösungen benötigt

**Lösungen:**

70% Ethanol

Steriles vorgewärmtes PBS

Vorgewärmtes DMEM mit 25 mM HEPES (No. 22 320-022, Lif

Technologies) ohne Zusatzstoffe

Die Mäuse werden durch Genickbruch getötet. Zur Einhaltung steriler Verhältnisse werden die Mäuse in 70% Ethanol eingetaucht und in der sterilen Werkbank auf einer Präparationsunterlage fixiert. Die poplitealen Lymphknoten sind in der Kniekehle lokalisiert. Durch die Adjuvanzzugabe bei der Immunisierung können die Lymphknoten stark vergrößert sein. Für die Präparation wird das Fell der Hinterbeine vom Oberschenkel bis zu den Pfoten hin abgezogen. Die Lymphknoten haben eine weißgelbliche Farbe und einen Durchmesser von ca. 2 bis 4 mm. Die Präparation erfolgt durch die Überstreckung der Kniegelenke. Die Lymphknoten werden vorsichtig ohne Gewebeverletzung in eine Petrischale mit DMEM-HEPES gelegt. Das restliche adhärente Gewebe wird mit einer sterilen Schere und Pinzette entfernt und die Lymphknoten in eine neue Petrischale mit Medium gelegt. Dann werden die Lymphknoten zerkleinert und zwischen zwei Objektträgern zerrieben, um die Lymphozyten im Medium zu suspendieren. Das Medium mit den suspendierten Zellen wird in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Die Lymphknotenreste werden in der Petrischale mit 10 ml Nährmedium gewaschen. Das Medium wird abgesaugt und in das 50 ml Röhrchen überführt. Die Lymphozyten im Röhrchen werden 5 Minuten bei 200G zentrifugiert, der Überstand verworfen.

Das erhaltene Pellet wird resuspendiert und auf vier Aliquots verteilt.

Für die Zellfusion werden folgende Lösungen benötigt [Niebuhr et al., 1998].

**Lösungen:**

1. DMEM mit 25 mM HEPES
2. OPTIMEM 1 Medium ( No. 31985-047, Life Technologies).  
Dem Medium sind zugesetzt 5% FCS (fetal calf serum), Glutamin, Antibiotikum, Hypoxanthin/Aminopterin (HA)
3. 50% PEG [ Für weitere Information siehe: Celis et al.,  
"Production of Monoclonal Antibodies", Volume 2]

Am Tag vor der Zellfusion werden aus 13 Mäusen Makrophagen isoliert. Die Mäuse werden mit Geknickbruch getötet und für die Makrophagenproduktion mit dem Bauch nach oben fixiert und mit 70% Ethanol abgesprüht. Die Felldecke wird vorsichtig freipräpariert, ohne das Peritoneum zu verletzen. Pro Maus werden drei Spritzen mit jeweils ca. 8 ml kaltem Nährmedium aufgezogen. Das Nährmedium wird vorsichtig durch das Peritoneum in die Bauchhöhle gespritzt, ohne innere Organe zu verletzen. Die Maus wird daraufhin geschüttelt, sodass die Makrophagen an der Bauchwand in Lösung gehen und anschließend mit dem Nährmedium abgesaugt werden können. Dieser Vorgang wird je Maus dreimal wiederholt. Das abgesaugte Nährmedium wird in 50 ml Röhrchen gesammelt und auf Eis gelagert. Daraufhin werden die Röhrchen bei 1000 U/min für 5 Minuten bei 5<sup>0</sup>C zentrifugiert. Dies erfolgt bei den Makrophagen ohne Bremse, da das Makrophagenpellet instabil ist und mit Bremse wieder in Lösung gehen könnte. Der Überstand wird anschließend verworfen und das Pellet mit je 25 ml Nährmedium zweimal gewaschen. Nach dem zweimaligen Waschvorgang wird das Pellet in 500 ml OPTIMEM-HA-Selektionsmedium verdünnt und in 24 Loch-Platten pipettiert (jeweils 500 µl pro well). Die ELISA-Platten werden für die Fusion an dem darauffolgenden Tag beschriftet und bis zum nächsten Tag im Brutschrank gelagert. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen das Zellwachstum nach der Fusion fördern [Bazin und Lemieux, 1989]. Die Makrophagen fördern das Zellwachstum nach der Fusion und verhindern Kontaminationen. Aufgrund des besseren Wachstums wird für Fusion die Maus-

Myeloma Zelllinie Ag8 anstatt der Pai-Zelllinie verwendet. Die Maus-Myelom-Zellen werden in DMEM-HEPES- Medium resuspendiert und in 50 ml Röhrcen auf vier Aliquots verteilt. Die Lymphozyten und Myelomzellen werden für 5 Minuten bei 200G zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets in HEPES-Medium resuspendiert. Die Zellen werden zusammengeführt, gemischt und für drei Minuten bei 200G zentrifugiert. Anschließend werden die Überstände verworfen.

Die restliche Flüssigkeit wird abgesaugt, das Pellet aufgelockert und auf 37<sup>0</sup>C erwärmt. Für die Zellfusion der Maus-Myeloma-Zellen mit den präparierten B-Lymphozyten wird die Fusion mit Polyethylenglycol (PEG-Reaktion) durchgeführt (siehe 2.4.2). Danach erfolgt die Selektion der Zellen in der Zellkultur.

#### **2.4.2 PEG-Reaktion zur Zellfusion:**

Zur Zellhybridisierung der Maus-Myeloma mit den B-Lymphozyten wird die Reaktion mit Polyethylenglycol durchgeführt. Zunächst werden 1 ml vorgewärmtes PEG (37<sup>0</sup>C) innerhalb 1 Minute unter Schütteln des Röhrcens langsam zugetropft. Das Röhrcen wird 1 Minute weiter im Wasserbad geschüttelt. Das PEG wird vorsichtig durch Zugabe von vorgewärmtem DMEM-HEPES-Medium verdünnt. Es werden 1 ml Medium innerhalb von 30 Sekunden, weitere 3 ml in den nächsten 30 Sekunden zugetropft und schließlich die restlichen 16 ml in der darauffolgenden Minute. Das Röhrcen wird für 5 Minuten im Wasserbad inkubiert. Darauf wird das Röhrcen 5 Minuten bei 200G zentrifugiert. Das Pellet wird pro Röhrcen jeweils in 125 ml Nährmedium-Bri resuspendiert. Es werden 500 µl pro Loch auf die mit Makrophagen vorbereiteten Platten gegeben. Im weiteren Verlauf erfolgt die Selektion in der Hybridomazellkultur sowie Mediumwechsel für die weitere Kultivierung (siehe 2.4.3).

### 2.4.3 Hybridomzellkultur und Selektion

Nach der Zellfusion befinden sich verschiedene Zelltypen in der hergestellten Zellkultur. Bei den Zelltypen handelt es sich um nichtfusionierte Myelomzellen und B-Lymphozyten sowie fusionierte Zellen. Die nichtfusionierten B-Lymphozyten haben eine begrenzte Lebensdauer und sterben in der Zellkultur nach einiger Zeit ab. Bei den nichtfusionierten Myelomzellen handelt es sich um eine unsterbliche Zelllinie, diese sterben aufgrund des Selektionsmediums. Bei den fusionierten Zellen, die als Hybridomzellen bezeichnet werden, kann man sowohl antikörperproduzierende als auch nichtantikörperproduzierende Zellen unterscheiden. Zur Selektion der hergestellten Hybridomzellen werden am Tag nach der Zellfusion 500 µl 3x HAT-Medium pro Loch hinzugefügt. Das Selektionsmedium besteht aus 500 ml Nährmedium mit 25 ml Bri, zur Wachstumsförderung, und 30 ml 3 x HAT-Medium. Nach 2 bis 4 Tagen erfolgt ein Mediumwechsel mit 1 ml 1x HAT- Medium pro Loch. Der Nährmediumwechsel wird während der Kultivierungszeit im Abstand von 3 bis 4 Tagen unter Vermeidung von Kontamination wiederholt. Die Testung erster Zellklone erfolgt 8 bis 10 Tagen nach der Zellfusion mit dem ELISA sowie Western Blot-Streifentest. Positive Zellklone aus ELISA und Western-Blot-Streifentest werden subkloniert. Durch die Subklonierung kann eine einzelne antikörperproduzierende Hybridomzelle isoliert werden. Dabei werden die Zellen in den 24-Loch Mikrotiterplatten mit einer Pasteurpipette aufgewirbelt und mit normalem Nährmedium verdünnt. Es wird mit Hilfe einer ausgezogenen Pasteurpipette jeweils ein Tropfen in jede Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte verteilt. Mikroskopisch werden die Löcher gesucht, welche eine einzelne Zelle enthalten. Diese werden auf der Mikrotiterplatte markiert und mit Makrophagensuspension, die in normalem Nährmedium verdünnt ist, aufgefüllt. Es erfolgt eine Inkubation für 7 bis 10 Tage im Brutschrank bei 37<sup>0</sup>C, 5% CO<sub>2</sub>-Konzentration sowie 90% rH. Danach werden die Überstände dieser Einzelklone im Streifentest auf die Antikörperproduktion getestet.

Die Zellklone mit positivem Testergebnis werden in Gewebekulturflaschen überführt und zur Sammlung der Hybridomzellüberstände kultiviert. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 Minuten bei 4°C abgetrennt. Die Überstände können bei 4°C oder -20°C gelagert werden.

Normalmedium:

500 ml RPMI 1640 mit Hepes und Glutamin  
55 ml fötales Kälberserum  
5,5 ml 200 mM L-Glutamin  
5,5 ml Kanamycinlösung (Gibco)  
5,5 ml einer frischen  $10^{-3}$  M  $\beta$ -Mercaptoethanolösung

1x HAT-Medium:

571,5 ml Normalmedium  
5,5 ml HAT-Stocklösung  
5,5 ml Aminopterinstocklösung

3x HAT-Medium:

571,5 ml Normalmedium  
16,5 ml HAT-Stocklösung  
16,5 ml Aminopterinstocklösung

HAT-Stocklösung:

$1,0 \times 10^{-2}$  M Hypoxanthin  
 $1,6 \times 10^{-3}$  M Thymidin

Aminopterin-Stocklösung:

$4 \times 10^{-5}$  M Aminopterin

## 2.5 Streifentest und Chemilumineszenz zum Nachweis monoklonaler Antikörper

Der Streifentest wird mit den vorbereiteten Nitrocellulosemembranen aus dem Western-Blot durchgeführt. Die Nitrocellulosemembranen werden mit dem Bereich der Proteinbande in schmale Streifen geschnitten. Die Streifen werden dreimal mit 1 x TBST für jeweils 5 Minuten auf dem Horizontalschüttler gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Als erster Antikörper wird zur Testkontrolle der polyklonale Anti-CAP2 aus Kaninchen verwendet. Die Zellüberstände der im ELISA ausgewählten Zellklone werden mit den Nitrocellulosemembranstreifen inkubiert. Die Inkubation wird über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dreimaliger Waschung mit NCP-Puffer wird in Abhängigkeit von der jeweiligen Substratreaktion der zweite Antikörper ausgewählt. Für die Wahl von NBT/BCIP als Substrat, wird als zweiter Antikörper Anti Mouse IgG AP (alkalische Phosphatase) mit einer Verdünnung von 1:10,000 (in NCP-Puffer) verwendet. Die NTB/BCIP Substratreaktion ergibt nach Antikörperbindung eine entsprechende Farbreaktion auf den Membranstreifen in dem gesuchten Proteinbereich von ~60 kDa. Als weitere Methode kann als Substrat Chemilumineszenz gewählt werden. Der zugehörige zweite Antikörper für diese Substratreaktion ist Anti Mouse IgG POD (Merrettichperoxidase) mit einer Verdünnung von 1:10.000 (in NCP-Puffer). Die Inkubation des zweiten Antikörpers erfolgt für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler. Vor der Substratgabe werden die Streifen dreimal mit NCP-Puffer sowie einmal fünf Minuten mit einem Lösungsgemisch aus 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gewaschen. Die Substratanfärbung mit NBT/BCIP dauert maximal 10 Minuten und wird anschließend bei Sichtbarwerden von Farbbanden mit destilliertem Wasser gestoppt. Bei der Chemilumineszenz wird durch die Peroxidase des zweiten Antikörpers das Substrat Luminol oxidiert. Diese Reaktion führt zu einer Schwärzung des Röntgenfilms. Die Inkubation mit dem Chemilumineszenz-Substrat wird für 1 bis 2 Minuten durchgeführt,

daraufhin werden die Streifen mit Expositionszeiten zwischen einer Minute und einer Stunde auf Röntgenfilmen dargestellt.

Luminol:

2 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,0

200 µl (0,25mol in DMSO) 3-Aminonaphthylhydrazid

8 µl (0,1M in DMSO) p-Cumarsäure

18 ml Wasser

6,1 µl 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung

NBT/BCIP:

66 µl NBT + 33 µl BCIP pro 10 ml 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>-Gemisch,  
pH 10,0

## **2.6 Herstellung von Paraffingewebeschnitten aus Mausgewebe**

Für die Präparation von Gewebeschnitten aus Maus werden die Gewebe zunächst als Gewebeblöcke in Paraffin eingebettet. Vor der Paraffineinbettung werden die Präparate chemisch prozessiert. Die Maschinenaufbereitung läuft nach folgendem Prozessierungsprogramm (siehe Abb. 9). Die letzten beiden Prozessierungsschritte werden in der Maschine unter Vakuum durchgeführt. Nach Beendigung der Prozessierung werden die Gewebepräparate in Paraffinblöcke eingebettet. Die Paraffineinbettung der Gewebe erfolgt in der Paraffineinbettungsmaschine. Es werden aus Wildtyp, KO-Maus sowie Embryonen Gewebeblöcke vom Gehirn hergestellt. Die Paraffineinbettung wird bei 60°C mit flüssigem Paraffin durchgeführt. Die gegossenen Paraffinblöcke werden eine Stunde bei -5°C gelagert und erreichen dadurch eine feste Konsistenz. Aus den Paraffinblöcken werden 9 µm dicke histologische Gewebeschnitte angefertigt.

<b>1.</b>	<b>70% Ethanol</b>	45 Min
<b>2.</b>	<b>80% Ethanol</b>	45 Min
<b>3.</b>	<b>90% Ethanol</b>	45 Min
<b>4.</b>	<b>96% Ethanol</b>	45 Min
<b>5.</b>	<b>100% Ethanol</b>	60 Min
<b>6.</b>	<b>100% Ethanol</b>	60 Min
<b>7.</b>	<b>100% Ethanol</b>	60 Min
<b>8.</b>	<b>Xylol</b>	45 Min
<b>9.</b>	<b>Xylol</b>	45 Min
<b>10.</b>	<b>Xylol</b>	45 Min
<b>11.</b>	<b>Paraffin</b>	3 Std
<b>12.</b>	<b>Paraffin</b>	6 Std

**Abbildung 9: Chemisches Prozessierungsprogramm der maschinellen Aufbereitung** .Die chemische Prozessierung der Gewebe erfolgt maschinell nach der tabellarisch dargestellten Reihenfolge mit den verschiedenen angegebenen Chemikalien.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Sequenzvergleich von CAP1 und CAP2 und Gewebsverteilung

CAP1 und CAP2 sind eng miteinander verwandt. Murines CAP2 weist 62% Identität und 76% Ähnlichkeit zu CAP1 auf. Die größte Ähnlichkeit findet sich in den C-terminalen Domänen von CAP1 und CAP2, während die N-terminalen Domänen und die zentrale Prolinreiche Region größere Unterschiede aufweisen.

Die Gewebeverteilung von CAP1 und CAP2 ist unterschiedlich. CAP1 ist im Vergleich zu CAP2 in der Gewebeverteilung weiter verbreitet. Northern Blot Versuche verdeutlichten, dass das CAP1 Gen in allen untersuchten Geweben transkribiert wird, besonders hoch sind die RNA Mengen in Testes, Lunge und Niere. Dort ist eine 2,5 kb mRNA anzutreffen. Die CAP2 mRNAs mit 3-3,5 kb sind im Skelettmuskel, Herz und Testes abundant, wohingegen in allen anderen Geweben wie z.B. in der Leber die Expression sehr gering ist. Weitere Untersuchungen des Vorkommens von CAP1 und CAP2 erfolgten mit polyklonalen Antikörpern gegen CAP1 und CAP2. Auf der Proteinebene war CAP1 in allen Geweben nachweisbar mit Ausnahme von Muskel. CAP2 konnte im Gehirn, in Haut, Herz, Testes und Skelettmuskulatur als ein ~56 kDa Protein nachgewiesen werden. In den untersuchten Zelllinien COS7, HEK293 und A431 war CAP1 im Gegensatz zu CAP2 ebenfalls vorhanden. Auch mit der RT-PCR Untersuchung, einem sehr sensitiveren Verfahren, gab es keinen Nachweis von CAP2 mRNA in diesen Zelllinien [Peche et al., 2007]. Nur PAM212 Maus-Keratinocytenzellen enthielten CAP2 [Yuspa et al., 1980].

### 3.2 Expression eines N-terminalen CAP2 Polypeptids für die Erzeugung von monoklonalen Antikörpern

Als Immunogen für die Herstellung von CAP2 spezifischen monoklonalen Antikörpern wurde der N-terminale Bereich des Proteins ausgewählt, da er eine geringe Homologie zu CAP1 aufweist. Dieser Bereich wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und umfasst die die Aminosäuren 1-310 des Proteins. Das Polypeptid wurde als NCAP2-WH2 bezeichnet und enthält den Prolin-reichen Bereich einschließlich der WH2 Domäne (Abbildung 10).

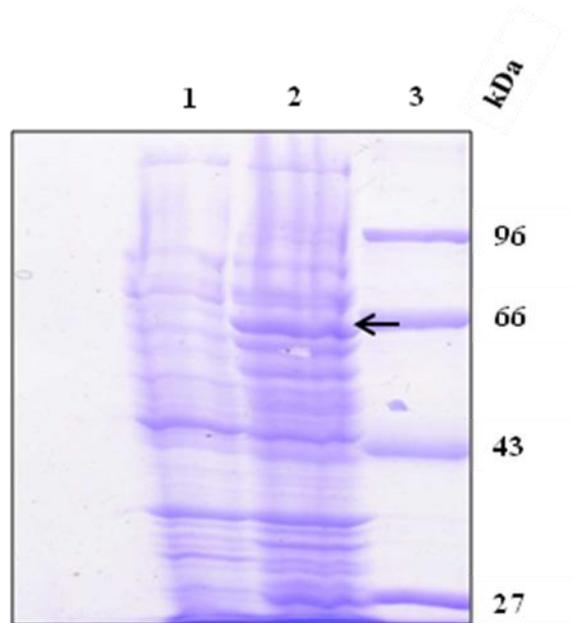
```

1 mtdmaglmer leravirleq lsagldgppr gcgevngvng gvapsveafd klinsmvaef
61 lknsrvlagd vethaemvhg afqaqrafl1 mvsqyqqpge nevavllkpi sekiqueiqtf
121 rergrgsnmf nhlsavsesi aalgwiavsp kpgpyvkemn daatfytnrv lkdykhsdlr
181 hvdwvrsyln iwselqayir ehhttglts ktgpvastas afsilssgpg lppppppppp
241 pggpppfene dkkeepspsr salfaqlnqg eaitkglrhv tddkktyknp slraqgqirs
301 ptkthtpspt

```

**Abb. 10: Aminosäuresequenz von NCAP2-WH2. Der Prolin-reiche Bereich ist in Blau angegeben, die WH2-Domäne in Orange.**

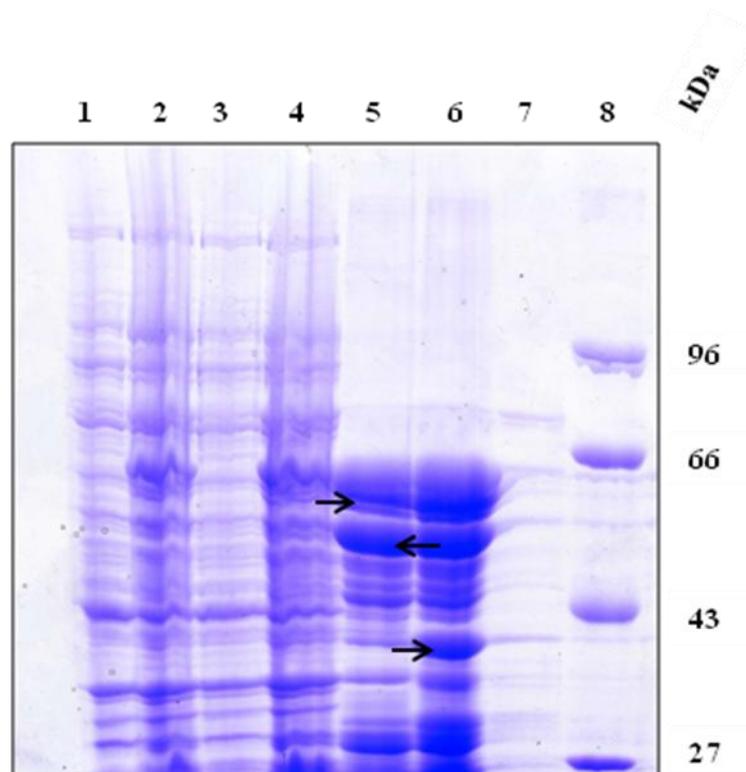
Die theoretische molekulare Masse des Polypeptids beträgt 34.090, der pI 7.15. Das GST-Fusionprotein wird in *E. coli* (ArcticExpress™ (DE3)RIL) nach Induktion mit IPTG (0.5 mM) in guten Mengen hergestellt und kann aus der löslichen Fraktion gereinigt werden. In einem Vorversuch wurde zunächst die Expression bestätigt, anschliessend wurde die benötigte Menge an Protein in zwei Ansätzen isoliert. In Abbildung 11 ist die erfolgreiche Induktion des GST-NCAP2-WH2 Fusionsproteins dargestellt. In Spur 1 ist ein Gesamtzelllysat des Bakterienstamms vor der Induktion der Proteinexpression mit IPTG aufgetragen, Spur 2 zeigt die Proteine des Zellhomogenats 24 Stunden nach IPTG-Induktion. Der Vergleich des Bandenmusters zeigt eine zusätzliche Proteinbande bei ~66 kDa (Pfeil in Abbildung 11, Spur 2), die das Fusionsprotein darstellt.



**Abb. 11: Überprüfung der Expression von NCAP2-WH2 in *E. coli* (Arctic Stamm).** In Spur 1 sind die Proteine eines Zellhomogenats vor der IPTG-Induktion (Zelldichte: OD600 ist 0.72) dargestellt. Spur 2 zeigt das Proteinbandenmuster nach der Induktion der Expression (24 Stunden nach Induktion mit 0.5 mM IPTG). Die Position des Fusionsproteins ist mit einem Pfeil angezeigt. Spur 3 zeigt die Positionen des Molekulargewichtsmarkers (in kDa). Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (10% Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie Blue angefärbt.

Anschliessend wurden die Bakterien in zweimal 3-Liter-Kulturen angezogen und nachdem eine Zelldichte erreicht war, die einer OD600 von 0.7 entsprach, die Expression des Fusionsproteins mit IPTG (0.5 mM) induziert. Die Kulturen wurden für weitere 24 Stunden bei 10°C unter Schütteln inkubiert, die Zellen durch Zentrifugation geerntet, lysiert und in Überstand und Pellet getrennt (siehe Material und Methoden 2.2.1). Aus dem Überstand konnte das GST-Fusionsprotein an GST-Sepharose-Beads gebunden werden. Nach der Bindung wurde Thrombin zugegeben (10 units), um den GST-Anteil vom CAP2-Anteil zu trennen. Die Spaltung wurde bei 4 Grad für 12 Stunden durchgeführt und in einer SDS-PA-Gelelektrophorese überprüft (Abbildung 12). Dafür wurde ein Aliquot der Bead-Suspension vor Thrombin-Spaltung (Abbildung. 12, Spur 5) sowie der Beads und des Überstands der

Beads aufgetragen (Abbildung. 12, Spuren 6 und 7). In Spur 5 wurde das an die Beads gebundene Fusionsprotein bei ~ 60 kDa detektiert und ein etwas kleineres Protein bei ~ 55 kDa, das möglicherweise ein Proteolyseprodukt darstellt.

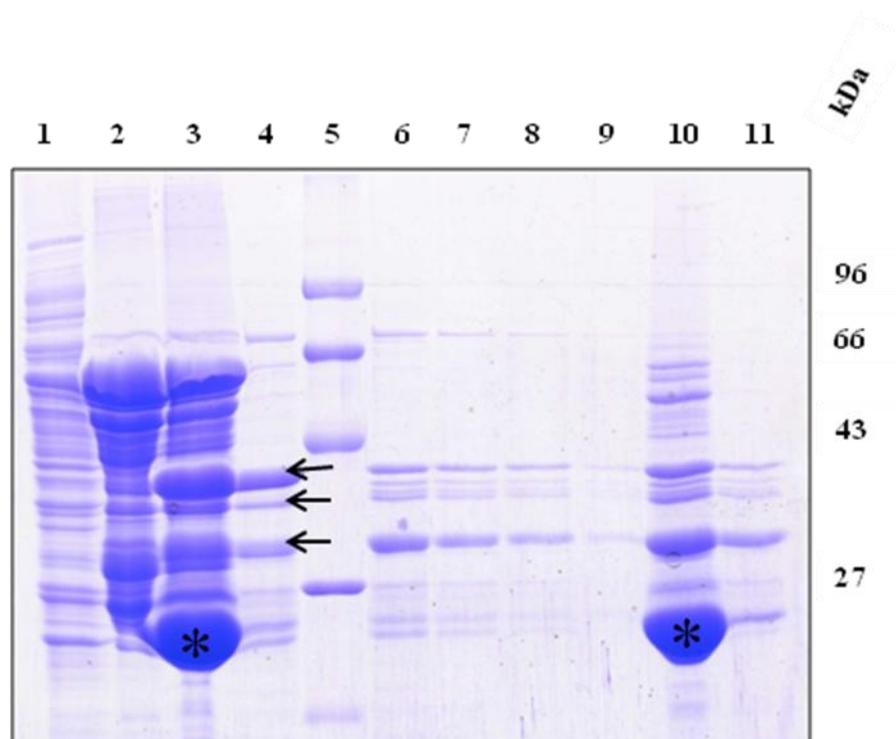


**Abb. 12: SDS-Gelelektrophorese (10 % Acrylamid) der Proteinexpression vor und nach Thrombinspaltung.** In (1) Blindwertprobe des 20 ml Ansatzes vor bzw. (2) nach IPTG-Induktion sowie (3) und (4) für den Hauptexpressionsansatz. Die zusätzlichen Banden bei ~60 kDa verdeutlichen die erfolgreiche Proteinexpression nach IPTG-Induktion. Die Spur (5) zeigt die an die GST-Sepharose Beads gebundenen Proteine vor der Thrombinspaltung. In Spur (6) sind die Proteine gezeigt, die nach Spaltung des Fusionsproteins mit Thrombin an den Beads vorhanden sind. Hier fällt eine zusätzliche Bande bei 35-40 kDa auf. Das Vorhandensein des 60 kDa Proteins zeigt, dass der Thrombinverdau nicht vollständig war. Die Spur (7) enthält den Überstand nach der Thrombinspaltung. Die schwarzen Pfeile auf das 66 kDa Fusionsprotein und ein ~55 kDa Abbauprodukt (Spur 5) sowie auf das NCAP-WH2 Polypeptid nach Thrombinspaltung (Spur 6).

Spur 6 zeigt die Proteine, die an die Gelmatrix nach Thrombinverdau gebunden sind. Das Bandenmuster ist sehr ähnlich dem in Spur 5 und deutet auf einen unvollständigen Thrombinverdau hin. Zusätzlich ist eine prominente Bande unterhalb des 43 kDa Markers zu sehen, die dem NCAP-WH2 Polypeptid entsprechen könnte. In Spur 7, dem Überstand nach Thrombinspaltung, war dagegen keine Anreicherung dieses Proteins zu sehen. Daraus haben

wir geschlossen, dass NCAP-WH2 an die Gelmatrix nach Thrombinspaltung gebunden bleibt.

Eine Möglichkeit, das Protein in den Überstand zu überführen, ist die Behandlung der GST-Sepharose Beads mit dem Detergenz Sarkosyl (0,25%, Inkubation der Beads über Nacht). Unter diesen Bedingungen wird NCAP-WH2 in den Überstand überführt (Abbildung 13, Spur 4). Da in einer Proteinlösung, die für eine Immunisierung verwendet werden soll, keine Detergenz vorhanden sein soll, wurde versucht, Sarkosyl durch Fällung mit Calciumchlorid zu entfernen, ohne dass das Protein ebenfalls präzipitiert. Diese Versuche waren erfolgreich, und NCAP2-WH2 blieb im Überstand (Abbildung 13, Spur 4), während Sarkosyl als Calciumsalz präzipitiert werden konnte. Die Identität des Proteins mit NCAP2-WH2 wurde durch eine massenspektrometrische Analyse bestätigt. Dazu wurden drei Banden (Abbildung 13, Spur 4, Pfeile) aus dem Gel ausgeschnitten und der massenspektrometrischen Analyse zugeführt.



**Abb. 13: SDS Gelelektrophorese (10% Acrylamid) des Hauptexpressionsansatzes.** Die Spuren 1 - 4 stellen die Proteinexpression des Expressionsansatzes vor und nach der Thrombinspaltung dar. Spur 3 verdeutlicht, dass nach der Thrombinspaltung das freie NCAP-WH2 wie GST (Stern) an die Beads gebunden bleibt. In Spur 4 ist

die Überstandfraktion nach Sarkosylbehandlung gezeigt. Die Pfeile weisen auf die Proteine, deren Identität in der Massenspektrometrie bestimmt worden ist. (5), LMW-Marker. (6 – 9), verschiedene Überstandsfractionen nach weiterer Thrombinspaltung. (10), Beadsuspension nach Thrombinspaltung. GST bei ~27 kDa (Stern) ist das prominenteste Protein. (11), Überstandsfraction nach PBS-Behandlung der Beads.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie haben gezeigt, dass diese drei Banden aus NCAP2-WH2 stammen und Peptide enthalten, die das gesamte Polypeptid abdecken (Abbildung 14a-d). Wir gehen davon aus, dass die beiden oberen Banden das gesamte rekombinant exprimierte Protein umfassen, das kleinste Polypeptid stellt eine proteolytisch verkürzte Form dar, da die Peptide, die in der Massenspektrometrie gefunden wurden, nicht aus dem gesamten Bereich stammen und nur Peptide bis zur Position 211 enthalten. Das unterschiedliche Laufverhalten der beiden grösseren Polypeptide könnte möglicherweise auf unterschiedliche Konformationen zurückzuführen sein (Abbildung 13). Das gesamte Protein aus der Thrombinspaltung wurde für die Immunisierung von Mäusen verwendet (Abbildung 15, 16). Es wurde auch zusammen mit *E. coli* Zellysaten bei der Analyse der Antikörperproduktion durch die Hybridomzellen eingesetzt.

(a)

```

1 mtdmaglmer leravirleq lsagldgppr gcgevngvng gvapsveafd klinsmvaef
61 lknsrvlagd vethaemvhg afqaqrafl1 mvsqyqqpqe nevavllkpi sekiqueiqtf
121 rernrsgnmf nhlsavsesi aalgwiavsp kpgpyvkemn daatfytnrv lkdykhsdlr
181 hvdwvrsyln iwselqayir ehhttgltw s ktgppvastafsilssggp lppppppppp
241 ppppppfene dkkeepspsr salfaqlnqg eaitkglrhv tddkkyknp slraqgqirs
301 ptkthtpspt

```

(b)

10	20	30	40	50	60	70	80	
MTDMAGLMER	LERAVIRLEQ	LSAGLDGPPR	GCGEVNGVNG	GVAPSVEAFD	KLINSMVAEF	LKNSRVLAGD	VETHAEMVHG	
90	100	110	120	130	140	150	160	
AFQAQRAFLL	MVSQYQQPQE	NEVAVLLKPI	SEKIQEIQTF	RERNRSGNMF	NHLSAVSESI	AALGWIAVSP	KPGPYVKEMN	
170	180	190	200	210	220	230	240	
DAATFYTNRV	LKDYKHSDLR	HVDWVRSYLN	IWSELQAYIR	EHHTTGLTWS	KTGPPVASTAS	AFSILSSGGP	LPPPPPPPPP	
250	260	270	280	290	300	310	320	
PGPPPPFENE	DKKEEPSPSR	SALFAQLNQG	EAITKGLRHV	TDDKKTYPNP	SLRAQQQIRS	PTKTHTPSPT	SPKSNPQKH	
330	340	350	360	370	380	390	400	
TPVLELEGKK	WRVEYQEDRN	DLVISETELK	QVAYIFKCDK	STLQIKGKVN	SITVDNCKKF	GLVFDHVVGI	VEVINSKDIQ	
410	420	430	440	450	460	470	480	
IQVMGRVPTI	SINKTEGCHL	YLSERALDCE	IVSAKSSEM	N	VLVPQDDDYR	EFPIPEQFKT	IWDGSKLVTE	PAEIMA

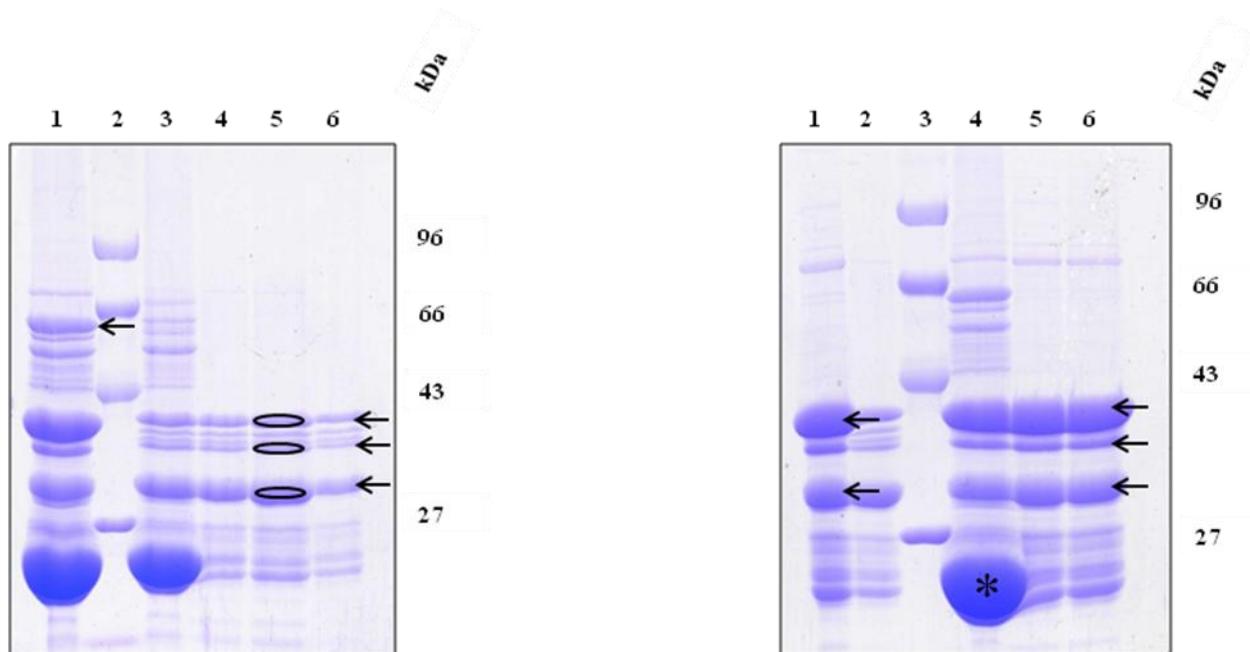
(c)

10	20	30	40	50	60	70	80
MTDMAGLMER	LERAVIRLEQ	LSAGLDGPPR	GCGEVNGVNG	GVAPSVEAFD	KLINSMVAEF	LKNSRVLAGD	VETHAEMVHG
90	100	110	120	130	140	150	160
AFQAQRAFL	MVSQYQQPQE	NEVAVLLKPI	SEKIQEIQTF	RERNRGSNMF	NHLSAVSESI	AALGWIAVSP	KPGPYVKEMN
170	180	190	200	210	220	230	240
DAATFYTNRV	LKDYKHSDLR	HVDWVRSYLN	IWSELQAYIR	EHHTTGLTWS	KTGPVASTAS	AFSILSSGPG	LPPPPPPPPP
250	260	270	280	290	300	310	320
PGPPPPFENE	DKKEEPSPSR	SALFAQLNQG	EAITKGLRHV	TDDKKTYKNE	SLRAQQQIRS	PTKTHTPSPT	SPKSNPQKH
330	340	350	360	370	380	390	400
TPVLELEGKK	WRVEYQEDRN	DLVISETELK	QVAYIFKCDK	STLQIKGKVN	SITVDNCKKF	GLVFDHVVGI	VEVINSKDIQ
410	420	430	440	450	460	470	480
IQVMGRVPTI	SINKTEGCHL	YLSERALDCE	IVSAKSSEM	VLVPQDDYR	EFPIPEQFKT	IWDGSKLVTE	PAEIMA

(d)

10	20	30	40	50	60	70	80
MTDMAGLMER	LERAVIRLEQ	LSAGLDGPPR	GCGEVNGVNG	GVAPSVEAFD	KLINSMVAEF	LKNSRVLAGD	VETHAEMVHG
90	100	110	120	130	140	150	160
AFQAQRAFL	MVSQYQQPQE	NEVAVLLKPI	SEKIQEIQTF	RERNRGSNMF	NHLSAVSESI	AALGWIAVSP	KPGPYVKEMN
170	180	190	200	210	220	230	240
DAATFYTNRV	LKDYKHSDLR	HVDWVRSYLN	IWSELQAYIR	EHHTTGLTWS	KTGPVASTAS	AFSILSSGPG	LPPPPPPPPP
250	260	270	280	290	300	310	320
PGPPPPFENE	DKKEEPSPSR	SALFAQLNQG	EAITKGLRHV	TDDKKTYKNE	SLRAQQQIRS	PTKTHTPSPT	SPKSNPQKH
330	340	350	360	370	380	390	400
TPVLELEGKK	WRVEYQEDRN	DLVISETELK	QVAYIFKCDK	STLQIKGKVN	SITVDNCKKF	GLVFDHVVGI	VEVINSKDIQ
410	420	430	440	450	460	470	480
IQVMGRVPTI	SINKTEGCHL	YLSERALDCE	IVSAKSSEM	VLVPQDDYR	EFPIPEQFKT	IWDGSKLVTE	PAEIMA

**Abb. 14: Identifizierung von NCAP2-WH2 Sequenzen im rekombinanten Protein.** (a), Sequenz des Polypeptids. Unterstrichen ist der Bereich, der in der Massenspektrometrie abgedeckt wurde. In rot ist die Position (211) angezeigt, bis zu der die Abdeckung im kleinsten Protein reicht. (b-c) Daten aus der massenspektrometrischen Analyse der Proteine. (d) zeigt die Abdeckung durch das kleinste Protein.



**Abb. 15 (links): SDS-Gelelektrophorese (12% Acrylamid) der Hauptexpressionansätze nach 48 Stunden Thrombinspaltung und Behandlung mit Natriumsarkosylat (0.25%) über Nacht.** In (1) ist das Protein an die Beads gekoppelt. (2), stellt den LMW-Marker dar. In (1) lässt sich eine Proteinbande bei 60 kDa erkennen (Pfeil). Ein Fehlen der 60 kDa-Bande zeigt eine Abspaltung des Proteins nach Thrombinverdau und den Übergang in die Überstandsfraktion an (3). In (4) ist die Überstandsfraktion nach Natriumsarkosylatwirkung (0.25%) sowie (5) nach Ausfällung des Sarkosyls als Calciumsalz (schwarze Ovale). Nach der Calciumausfällungsreaktion befinden sich nur geringe Mengen Protein in der Pelletfraktion (Pfeile) (6).

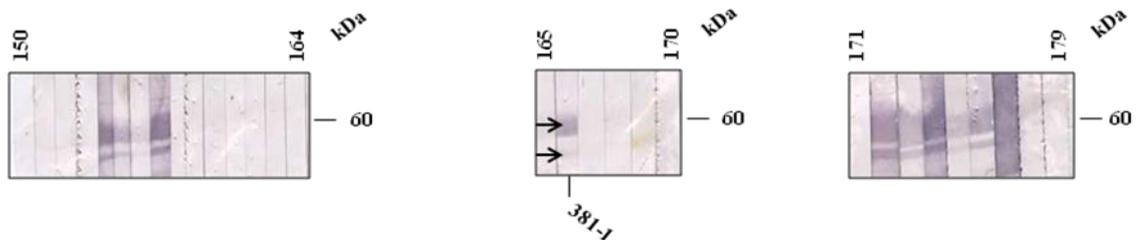
**Abb. 16 (rechts): SDS-Gelelektrophorese (12% Acrylamid).** (1) zeigt die NCAP-WH2 Polypeptide bei 35 kDa und im Bereich von 30 kDa (Pfeile) im Überstand nach Bead-Abtrennung. In (2) ist die Überstandsfraktion nach Natriumsarkosylatwirkung und anschließender Calciumausfällung gezeigt. (3) LMW-Marker. (4) Beadsuspension nach Thrombinspaltung. Der Stern in (4) zeigt das GST-Fusionsprotein. (5) Überstand nach Sarkosylbehandlung der Beads. Nach Calciumfällung (6) sind die Banden mit denen in der Überstandsfraktion in (5) nahezu identisch (Pfeile). Somit ist das Polypeptid nach Entfernen des Sarkosyls als Calciumsalz in Lösung geblieben.

### 3.3 Isolierung von Hybridomzellen, die Antikörper gegen NCAP2-WH2 produzieren

Nach der Fusion der Myelomzellen mit Antikörper produzierenden Zellen aus der Maus (siehe Material und Methoden) wurden zunächst mit Hilfe des ELISA Tests die Hybridomzellen identifiziert, die spezifische monoklonale Antikörper gegen NCAP2-WH2 produzieren. Die Zellüberstände dieser Hybridomzellen wurden für die weiteren Westernblot-Streifentests herangezogen. Dabei wurde getestet, ob die Antikörper das rekombinante NCAP2-WH2 erkennen, das auf den Nitrocellulosemembranstreifen aufgetrennt worden war.

In diesen Tests wurden zahlreiche positive Zellen ermittelt (Abbildung 17; Übersicht siehe Zusammenstellung der Streifentests in Tabelle 1). Anschliessend wurden die Hybridomzellen kloniert, um sicherzustellen, dass von reinen Klonen ausgegangen werden konnte (monoklonal), die je einen Antikörper produzierten. Die Subklone eines Ausgangsklons wurden ebenfalls mit Hilfe von Streifentests ermittelt (siehe Übersicht Tabelle 1). Dafür wurde Gesamtprotein aus *E. coli* Zellen verwendet, die das GST-NCAP2-WH2 Protein exprimierten. Die Proteinbanden wurden mit GST-Antikörpern bestätigt (Abbildung 18).

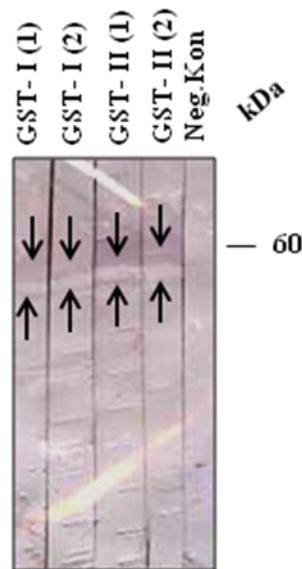
Streifennummer:



**Abb. 17: Streifentest von Sub- und Mutterklonen (Tab. 1) mit Westernblot Streifen.** In diesem Beispiel wurde Gesamtzelllysat von *E. coli* Zellen, die GST-NCAP2-WH2 exprimierten, im SDS-PA Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen überführt. Die positiven Subklone und Mutterklone zeigen ein Doppelbandenmuster im Bereich von 60 kDa, das auf proteolytischen Abbau zurückzuführen ist. Die Pfeile zeigen exemplarisch für den Subklon 381-1 dieses Bandenmuster. Die Identität des Proteins konnte im GST-Antikörpertest (Abb. 18) bestätigt werden. Streifen 166 zeigt den Subklon 381-1, welcher auch in den Gewebeamunblots positiv erfasst werden konnte. Streifen 170 und 171 zeigen die Negativkontrollen mit Nährmedium sowie NCP-Puffer. Als Substrat für die Farbreaktion durch die alkalische Phosphatase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, wurde BCIP/NBT verwendet.

<b>Streifen</b>	<b>Zell-/Subklon</b>	<b>Testergebnis</b>
150	NCP-Puffer	<b>Neg.Kontr.</b>
151	61-1	+
152	61-2	+
153	61-3	-
154	61-4	
155	61-5	+++
156	61-6	+++
157	61-7	++
158	61-8	+++
159	755-5	-
160	755-6	-
161	755-7	+
162	755-8	-
163	755-9	-
164	755-10	-
165	755-11	-
166	381-1	++
167	381-2	+++
168	381-3	+
169	381-4	+
170	Nährmedium	<b>Neg.Kontr.</b>
171	NCP-Puffer	<b>Neg.Kontr.</b>
172	Polykl. Ak.	<b>Pos. Kontr.</b>
173	56	+++
174	61	+++
175	62	+++
176	139	+++
177	141	+++
178	148	++
179	175	++

**Tab 1.: Übersicht der Ergebnisse aus Proteinstreifentest, Subklone und Mutterklone im Streifentest sowie dem Testergebnis (Abb. 17).** Zur Beurteilung der Qualität der Bandenmuster positiver Sub- und Mutterklone wurde eine Unterteilung der Testergebnisse in -, +, ++, +++ durchgeführt. Dabei steht - für test-negative Streifen, + für positive Streifen, ++ für gutes Bandenmuster, +++ für sehr gutes Bandenmuster. Als Positivkontrolle (**Pos. Kontr.**) wurden polyklonale CAP2 Antikörper aus Kaninchen verwendet. Nährmedium sowie NCP-Puffer waren die Negativkontrollen (**Neg.Kontr.**).



**Abb. 18: Reaktionen des GST-Antiserums im Streifentest zum Nachweis des GST-NCAP2-WH2 Proteins.**

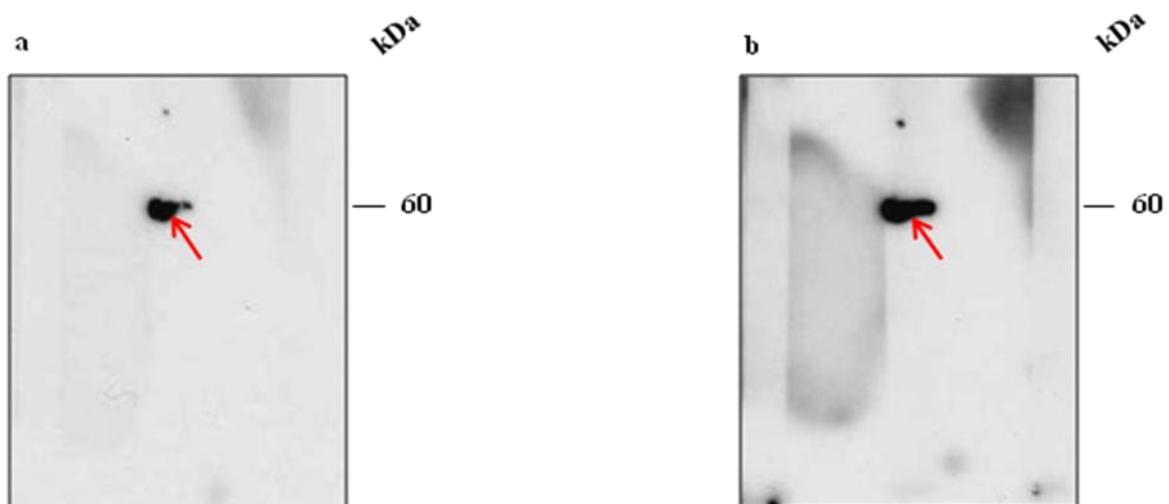
Es zeigten sich im 60 kDa Bereich eine prominente und darunter eine dünnere Bande. Dies ist ein Muster, das vergleichbar ist mit den Ergebnissen der Streifentests, die mit Hybridomüberständen durchgeführt wurden. Die Pfeile verweisen auf das GST-NCAP2-WH2 Protein, und Abbauprodukte, die mit den GST-Antikörpern erkannt werden. Die mit den GST-Antikörpern erhaltenen Banden zeigen das charakteristische Muster für GST-NCAP2-WH2 in den Streifentests mit den Hybridomüberständen.

Als GST-Antikörper wurden Anti GST-Antikörper aus Kaninchen verwendet. Zweiter zugehöriger Antikörper ist der polyklonale Anti Kaninchen IgG Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase. Die negative Testkontrolle (**Neg. Kon**) zeigte keine Signale. Der Nachweis von GST-NCAP2-WH2 mit dem spezifischen GST-Antikörper bestätigte die Richtigkeit und Spezifität der erhaltenen Doppelbanden in den Tests mit den Hybridomüberständen. Es wurden zwei verschiedene GST-Antikörper **I** und **II** jeweils zweimal (**1**), (**2**) verwendet.

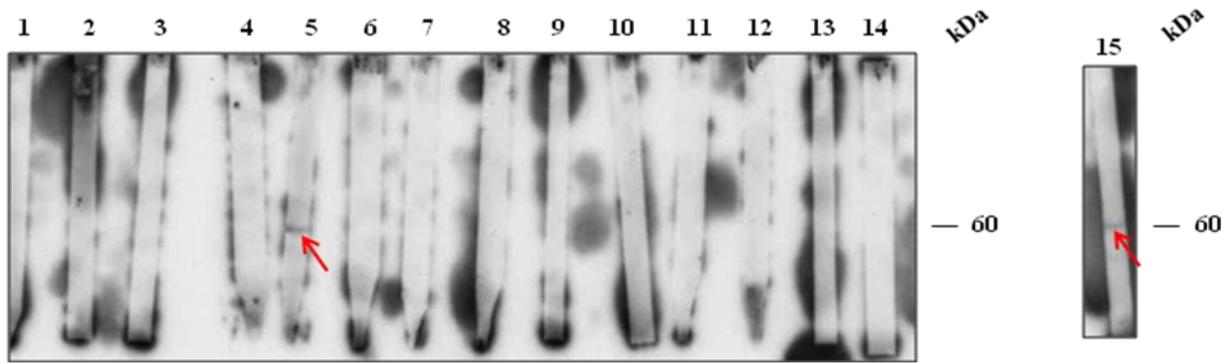
Zur Überprüfung der Spezifität und zur Bestätigung positiver Zellklone und Subklone wurden Westernblot-Streifentests mit Lysaten aus Mausherzgewebe hergestellt. Aus vorhergehenden Untersuchungen ist bekannt, dass CAP2 spezifisch im Herzmuskel vorhanden ist.

Der Nachweis der monoklonalen Antikörper und der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde mit der Chemilumineszenzmethode durchgeführt. Dabei wird durch eine chemische Reaktion, die durch den an eine Peroxidase gekoppelten Antikörper erzeugt wird, ein Röntgenfilm geschwärzt. Spezifische monoklonale Antikörper in den jeweiligen Hybridomzellüberständen, welche mit dem Antigen auf dem Streifen reagierten, erzeugten jeweils eine entsprechende Bande bei etwa 60 kDa (Abbildung 19). In Abhängigkeit von der Antikörpermenge und der Qualität der Reaktion zwischen Antigen und Antikörper konnten unterschiedlich starke

Banden auf den Röntgenfilmen erfasst werden. Es wurden mehrere Gewebeimmunblot-Streifentests mit verschiedenen positiven Zellklonen und Subklonen durchgeführt. Dabei konnten mit den meisten Zell- und Subklonen die positiven Ergebnisse aus den Streifentests mit rekombinatem Protein aus *E. coli* nicht wiederholt werden (siehe Übersicht Zusammenstellung der Zellklone). Unter den getesteten Überständen der Zell- und Subklone zeigten die beiden Subklone K82-381-1 und K82-743-13 wiederholt positive Testergebnisse und erkannten CAP2 sowohl im Gewebe aus dem Mausherzen als auch rekombinantes Protein aus *E. coli* im Westernblot (Abbildungen 19-21; Tabellen 2 und 3). mAk K82 381-1 wurde expandiert und für die Analysen von Mausgewebe verwendet.



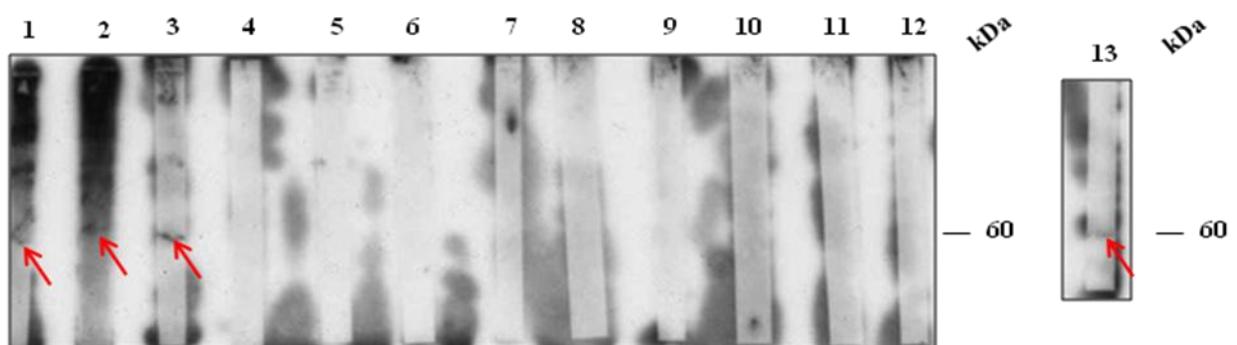
**Abb. 19 a, b: K82-381-1 (Tab. 2) erkennt CAP2 in Mausherzgewebe (Wildtyp) im Westernblot.** Der monoklonale Antikörper erkennt ein ~60 kDa Protein (Pfeile) im Gesamtgewebelysate aus Mausherz. In a und b sind unterschiedliche Expositionszeiten gezeigt.



**Abb. 20: Zusammenstellung der Streifen aus dem Test der Subklone (Tab. 2).** Westernblots wurden mit Gewebelysat von Mausherz hergestellt. Der Nachweis wurde mit einem an Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper gefolgt von einer Chemilumineszenzreaktion durchgeführt. Streifen 5 zeigt die Erkennung des Proteins durch den Subklon 381-1, Streifen 15 zeigt die Reaktion der polyklonalen CAP2 Antikörper (Pfeile). Die übrigen Subklone (Tab. 2) waren negativ in diesem Test.

**Tab.2: Übersicht der Subklone im Streifentest (Abb. 20)**

Streifen	Zell-/ Subklon	Testergebnis
1	61-2	-
2	61-5	-
3	61-6	-
4	61-9	-
<b>5</b>	<b>381-1</b>	<b>+++</b>
6	381-2	-
7	381-3	-
8	381-6	-
9	755-11	-
10	755-12	-
11	755-13	-
12	755-14	-
13	61-1	-
14	NCP-Puffer	-
15	Polykl. Ak.	-



**Abb. 21: Streifentest der Subklone (Tab. 3) mit Gewebewesternblot ( Röntgenfilmexposition ca. 5 Minuten).** Streifen 3, Reaktion von K82-381-1. Streifen 1 und 2, Reaktion der Subklone K82-61-4 und K82-61-7. Diese Klone konnten jedoch nicht erfolgreich vermehrt werden. Streifen 13, Positivkontrolle mit polyklonalen CAP2 Antikörpern (Pfeile).

**Tab.3: Übersicht der Subklone im Streifentest (Abb. 21)**

<b>Streifen</b>	<b>Zell-/ Subklon</b>	<b>Testergebnis</b>
1	61-4	+
2	61-7	++
<b>3</b>	<b>381-1</b>	<b>+++</b>
4	381-5	-
5	755-12	-
6	228-1	-
7	228-2	-
8	228-3	-
9	228-4	-
10	228-5	-
11	Nährmedium	-
12	Nährmedium	-
13	Polykl. Ak.	++

### **3.4 Embryonale Entwicklung des zerebralen Kortex von Säugern**

Die kortikale Gehirnentwicklung bei Säugern kann mit Hilfe des Boulder Komitee Modells (1970) beschrieben werden. Die embryonale Entwicklung des zentralen Nervensystems kann dabei in vier Zonen unterteilt werden. Von basal nach apikal kann die Ventrikular-, Subventrikular-, Intermediär- und Marginalzone unterschieden werden. Neuroepitheliale Zellen bilden durch Zellteilung eine Proliferationszone aus, in der sich basal die Ventrikularzone ausbildet. Mit weiterer Proliferation und der Bildung mitotischer Zellen, die in der basalen Ventrikularzone gebildet werden, kommt es zur Akkumulation intermediärer Progenitorzellen. Diese Zellen initiieren durch Migration die Subventrikularzone. Im Verlauf kommt es mit transienten Neuronen weiter apikal zur Formation einer Präplatte. Radiär migrierende Neurone bilden im Folgenden die kortikale Platte aus. Die kortikale Platte teilt die Präplatte in die apikale Marginalzone und ein weiteres Kompartiment, die heterogene Zellpopulationen enthält. In diesem Kompartiment zwischen der Subventrikularzone und der kortikalen Platte ist die Grenze zwischen der sogenannten Intermediärzone und der Subplatte nicht definiert. Dieses Kompartiment wird daher als Intermediär/Subplatten-Zone beschrieben. Im Rahmen der embryonalen Entwicklung formiert sich vor der Bildung der kortikalen Platte die Präplatte als transiente Schicht mit zahlreichen Neuronenpopulationen zwischen dem Neuroepithelium und der Oberfläche der Pia. Diese Präplatte bildet sich vor der kortikalen Platte aus. Die Subventrikularzone zeigt sich als proliferative Schicht vor der Entwicklung der kortikalen Platte. Die heterogene Intermediärzone zwischen den proliferativen Schichten und den weiter apikal liegenden post-migratorischen Zellen enthält tangential migrierende Zellen sowie eine Schicht extrinsischer Axone. Mit der Akkumulation post-migratorischer Zellen kommt es zur Entwicklung der kortikalen Platte, einem bedeutenden Entwicklungsschritt bei der Bildung des Neokortex. Weiter apikal kann die Marginalzone beschrieben werden, welche sich aus dem oberen Teil der Präplatte bildet und die erste Schicht des reifen Kortex ausmacht [Bystron et al., 2008].

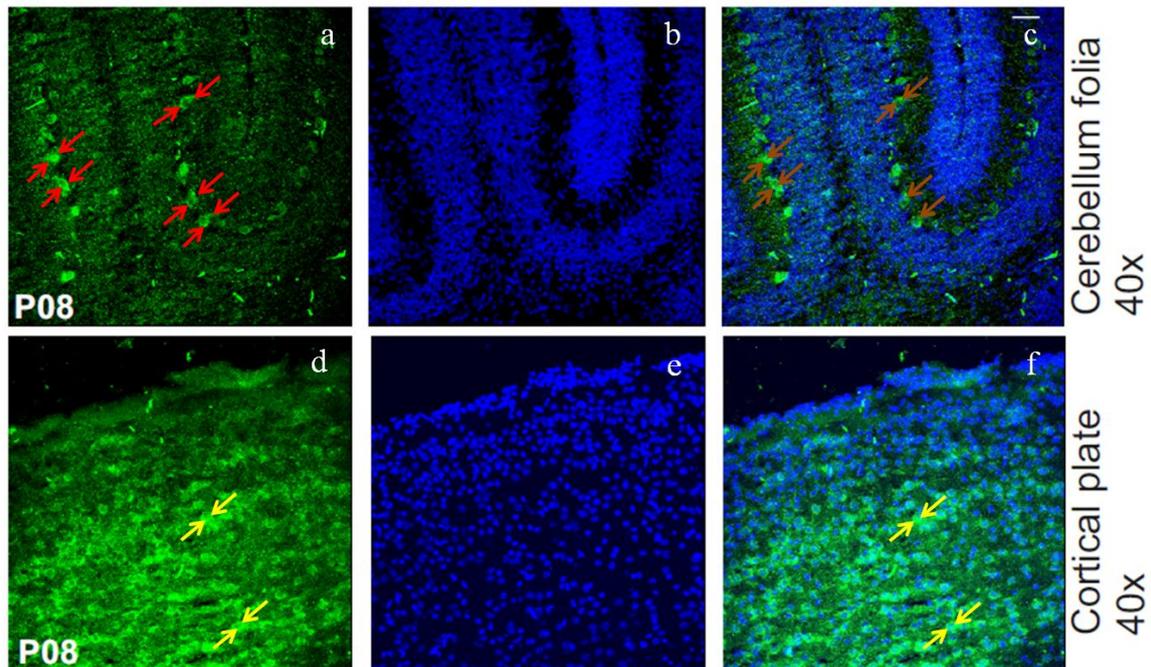
Im Rahmen der zerebralen Entwicklung konnte gezeigt werden, dass das ASPM-Gen für die mitotische Spindelapparatfunktion embryonaler Neuroblasten von Bedeutung ist. In *Drosophila melanogaster* ist ASPM sowohl an der Meiose als auch Mitose beteiligt. Es reguliert die Organisation von Mikrotubuli an den Spindelpolen sowie die Ausbildung zentraler mitotischer Spindel. Die neuronalen Progenitorzellen von Säugern zeigen in Untersuchungen ein spezifisches Muster mitotischer Aktivität. Diese Aktivität reguliert in der embryonalen Entwicklung die Gehirngröße. Mutationen in Spindelapparat-Genen wie ASPM führen zum Sistieren der Teilung von Neuroblasten in der Metaphase, welches zur Verringerung der Entwicklung des zentralen Nervensystems führt [Bond et al., 2002]. Einen weiteren Regulator des mitotischen Spindelapparates in neuroepithelialen Zellen stellt WDR-62 dar. Dieses Protein wird in mitotischen neuronalen Vorgängerzellen des embryonalen Neuroepitheliums von Säugern exprimiert [Nicholas et al., 2010]. Veränderungen in diesen Proteinen führen zu Störungen in der Zellteilung des Neuroepitheliums und damit der Gehirnentwicklung. Die strukturelle Unterteilung der kortikalen Gehirnentwicklung in die verschiedenen Zonen kann hinsichtlich der Lokalisation der untersuchten Proteine und deren mögliche Funktion bedeutend sein.

### **3.5 Lokalisationsstudien von CAP2 mit Hilfe der generierten monoklonalen Antikörper und Lokalisation von CAP 1 im Mäusegehirn und Embryo**

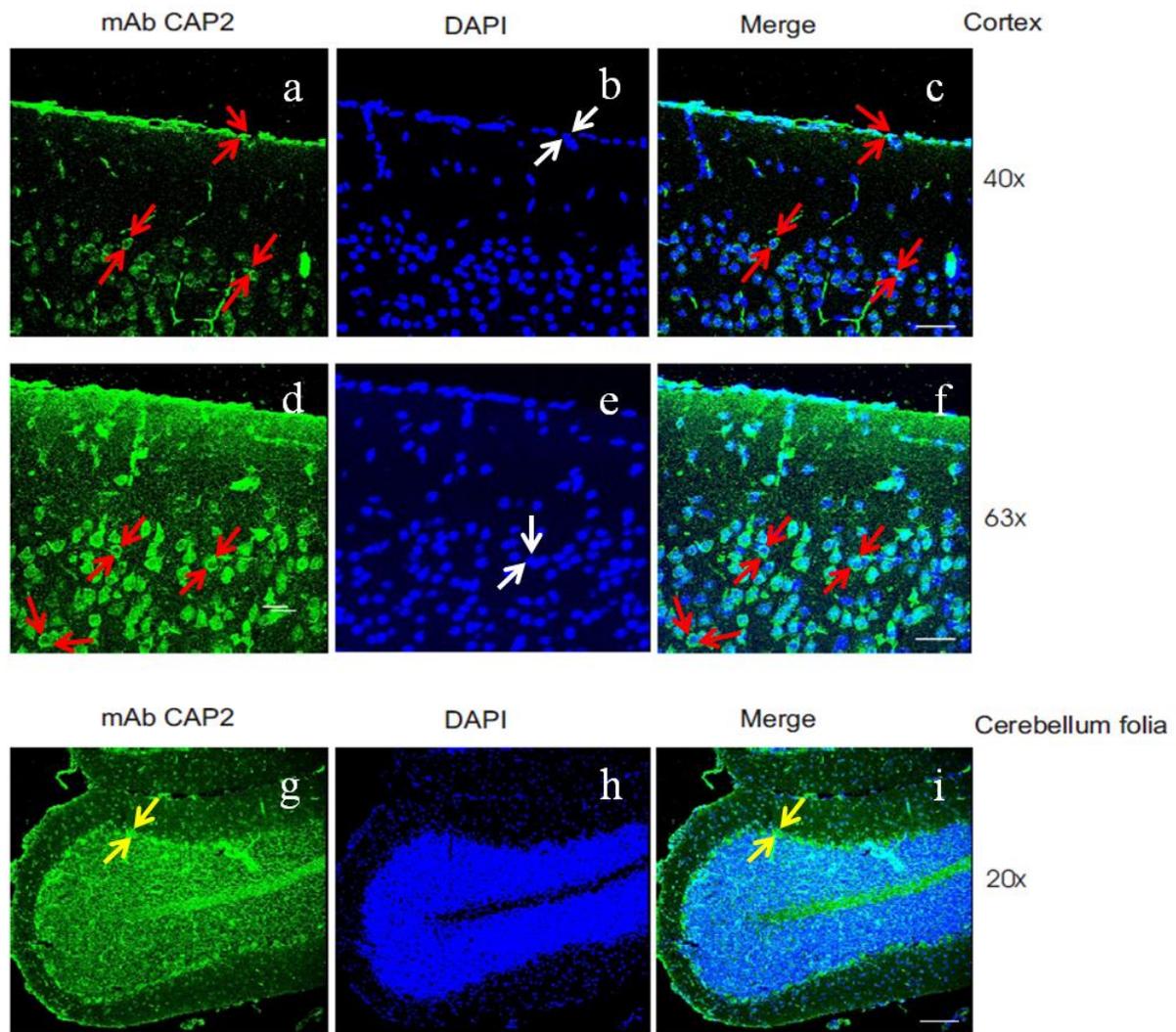
Die subzelluläre Lokalisation von CAP2 wurde bereits in früheren Arbeiten im humanen Skelettmuskel, im Herzmuskel der Maus und in der murinen Keratinozytenzelllinie PAM212 mit Hilfe der polyklonalen Antikörper bestimmt. In quergeschnittener humaner Skelettmuskulatur konnten wir sarkoplasmatische Strukturen erkennen und im längsgeschnittenen Skelettmuskulatur konnte man eine quergestreifte Immunfluoreszenzmarkierung erkennen. Für die Ermittlung der subzellulären Lokalisation von CAP2 in Muskelzellen wurden Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen mit

Antikörpern durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurden charakteristische Strukturproteine als Marker für die CAP2 Lokalisation genutzt, nämlich  $\alpha$ -Aktinin als Z-Scheibenmarker, Troponin I als A-Bandenmarker sowie Myomesin als M-Bandenmarker. Dabei zeigte sich, dass CAP2 mit Myomesin kolokalisiert. Somit konnte CAP2 als Komponente der M-Bande charakterisiert werden. Untersuchungen an embryonalen Kardiomyozyten ergaben eine zytoplasmatische Lokalisation von CAP2, welche durch eine Kontrollmarkierung mit Troponin I bestätigt werden konnte. CAP2 ist in HL-1 Zellen, einer kardialen Muskelzelllinie, auch im Kern vorhanden [Claycomb et al., 1998]. Dies deutet auf eine mögliche Lokalisationsänderung von CAP2 während der Myogenese hin. Die Untersuchungen an den PAM212 Zellen verdeutlichen das Vorhandensein von CAP2 im Zellkern und eine schwache CAP2 Markierung im Zytoplasma. Die nukleäre Lokalisation von CAP2 konnte anhand von Fraktionierungsexperimenten unterstrichen werden. Als Vergleichsprotein diente Emerin, ein Protein der Kernmembran. Die Versuche der Zellfraktionierung ergaben eine Anreicherung von CAP2 in der Kernfraktion (2000 rpm Pellet). Emerin als Kontrollprotein konnte auch in der nukleären Pelletfraktion dargestellt werden. Der Vergleich der subzellulären Lokalisation des CAP2 in Muskelzellen und Keratinozyten gibt Hinweise darauf, dass das Protein in beiden Zellkompartimenten vorkommt und somit als duales Kompartimentprotein angesehen werden kann [Peche et al., 2007].

In Kenntnis dieser Daten haben wir die nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt und im Rahmen dieser Arbeit die Expression von CAP2 im Gehirn untersucht. Dafür wurden die hier generierten monoklonalen Antikörper K82-381-1 erstmals verwendet. Die Analysen an Mäusegehirn ergaben, dass CAP2 im Gehirn exprimiert wurde (Abbildung 22, P 08 und Abbildung 23, P28).



**Abb. 22: Immunfluoreszenzmarkierung von Gehirnschnitten (Paraffinschnitte) der Maus (Kleinhirnwindungen und kortikale Platte) mit dem monoklonalen Antikörper K82-381-1 gegen CAP2 im Stadium P08.** Die Pfeile markieren Antikörpersignale des monoklonalen Antikörpers gegen CAP2, rote und braune Pfeile in **a** und **c** verweisen auf eine starke Expression von CAP2. Das Protein ist besonders im Bereich der Kleinhirnwindungen nachweisbar (**a**, **c**). Der monoklonale Antikörper markiert das Protein in weiten Bereichen der kortikalen Platte (gelbe Pfeile, **d**). Die DNA-Färbung mit DAPI (blau) markiert die Lokalisation von Zellkernen (**b**, **e**). In den mit Merge gekennzeichneten Bildern (**c**, **f**) sind DAPI Färbung und Antikörpermarkierung zusammengeführt. Sekundärer Antikörper ist ein Anti-Maus IgG Alexa 488 Konjugat.



**Abb. 23: Immunfluoreszenzmarkierung von Gehirnschnitten der adulten Maus (Kortex und Kleinhirnwindungen) mit dem monoklonalen Antikörper K82-381-1 im Stadium P28.** Markierung des Kortex (**a, d**) sowie der Kleinhirnwindungen (**g**). DAPI DNA- Färbung (blau) (**b, e, h**). Merge: Zusammenführung beider Markierungssignale (**c, f, i**) Als sekundärer Antikörper wurde Anti-Maus Alexa 488 Konjugat verwendet. Es wurden Paraffinschnitte verwendet. In **a** und **c** verweisen rote Pfeile auf CAP2 positive Zellen im Kortex sowohl apikal als auch in tieferen Schichten. In **d** ist in 63-facher Vergrößerung die CAP2-Verteilung in zellreichen Regionen weiter basal gezeigt (**d**, rote Pfeile), in **g-i** ist die CAP2-Verteilung im Bereich der Kleinhirnwindungen gezeigt (**g, i**, gelbe Pfeile). Die DAPI- Färbung stellt Zellkerne in blau dar (**b, e, h**, weiße Pfeile).

Die beiden untersuchten Stadien P8 und P28 stellen postnatale Entwicklungsstadien des Mäusegehirns am 8. sowie 28. postnatalen Tag dar. Die Gehirnschnitte der 8 Tage alten Maus (P8) zeigen Bereiche der Kleinhirnwindungen sowie der kortikalen Platte. Die Gehirnschnitte vom Tag P28 erfassen den Kortex und die Kleinhirnwindungen. Die markierten Bereiche und

Immunfluoreszenzsignale in den Gehirnschnitten weisen auf das Vorhandensein von CAP2 in den verschiedenen Gehirnarealen.

Die Lokalisationsanalysen von CAP2 im Stadium P8 im Bereich der Kleinhirnwindungen in vergrößerter Darstellung (63x) zeigen eine vermehrte Expression von CAP2 im Bereich der großen Zellkörper der Purkinjezellen im Kleinhirn (Abbildung 23 P8 a, rote Pfeile; c, braune Pfeile). Diese spezifischen Zellen des Kleinhirns besitzen Zellkörper, die in einer Reihe angeordnet sind. Sie befinden sich im Stratum ganglionare der Kleinhirnrinde. Diese Zellzone grenzt an die mit DAPI gefärbte weiter innen liegende Körnerzellschicht (blaue Signale) (Stratum granulosum) der Kleinhirnrinde (Abbildung 22 P8 b, c,).

Für eine Charakterisierung der Funktion und Rolle von CAP2 in diesen Zellen sind weitere Untersuchungen notwendig. Auch im Bereich der kortikalen Platte (Abbildung 22 P8 d, f, gelbe Pfeile) zeigen sich im frühen Entwicklungsstadium mit hellgrünen Antikörpersignalen weit verteilte CAP2 positive Areale und verweisen auf eine mögliche Bedeutung von CAP2 für die kortikale Gehirnentwicklung.

Im Bereich des Kortex zeigen die Untersuchungen (Abbildung 23 a-f) eine gute Expression von CAP2 im Stadium P28. Die roten Pfeile markieren exemplarisch CAP2-Antikörpersignale sowohl weit apikal im Bereich der äußersten Molekularschicht des Kortex als auch in den weiter basal liegenden Schichten. (Abbildung 23 a, rote Pfeile). Die markierten hellgrünen Signale verweisen auf die Lokalisation des CAP2 in den Kortexarealen. In den weiter basal liegenden Schichten des Kortex kann eine starke Expression von CAP2 beobachtet werden. Hier wird CAP2 besonders stark in den zellreichen Bereichen der Pyramiden- und Körnerzellschichten des Kortex exprimiert (Abbildung 23 d, rote Pfeile). Diese Verteilung von CAP2 korreliert auch mit den DAPI-Markierungssignalen, die auf eine hohe Zelldichte in diesen Arealen hinweisen (Abbildung 23 b, c, e, f). Die weißen Pfeile (Abbildung 23 b, e) zeigen Zellkerne in der DAPI-Färbung und erfassen somit die Lokalisation von Zellen. Der Vergleich der Lokalisation von CAP2 ohne sowie mit DAPI-Färbung in vergrößerter

Darstellung (Abbildung 23 d, f) ermöglicht eine genauere Lokalisation des Proteins in den Kortexarealen. Dabei erlaubt die Zusammenführung beider Markierungssignale (CAP2 und DAPI) die Aussage, dass CAP2 im Zytosol lokalisiert ist (Abbildung 23 f, rote Pfeile).

Bei der Färbung von Kleinhirnschnitten wurde CAP2 im Bereich der Kleinhirnwindungen nachgewiesen (Abbildung 23 g, i), wobei CAP2 besonders stark in den Körnerzellschichten (Stratum granulosum) exprimiert wurde. In den äußeren Kleinhirnschichten wurde CAP2 nicht detektiert. Die gelben Pfeile in Abbildung 23 g und i verdeutlichen exemplarisch eine CAP2 Färbung am Übergang zu den äußeren Zellschichten sowie in den innen liegenden Körnerzellschichten. Das Vorhandensein von CAP2 in diesen Kleinhirnschichten lässt eine Rolle von CAP2 im Rahmen der neuronalen Funktion des Kleinhirns vermuten. Auch hier bestätigen die starken DAPI-Signale die Lokalisation von CAP2 in besonders zellreichen Regionen (Abbildung 23 h, i).

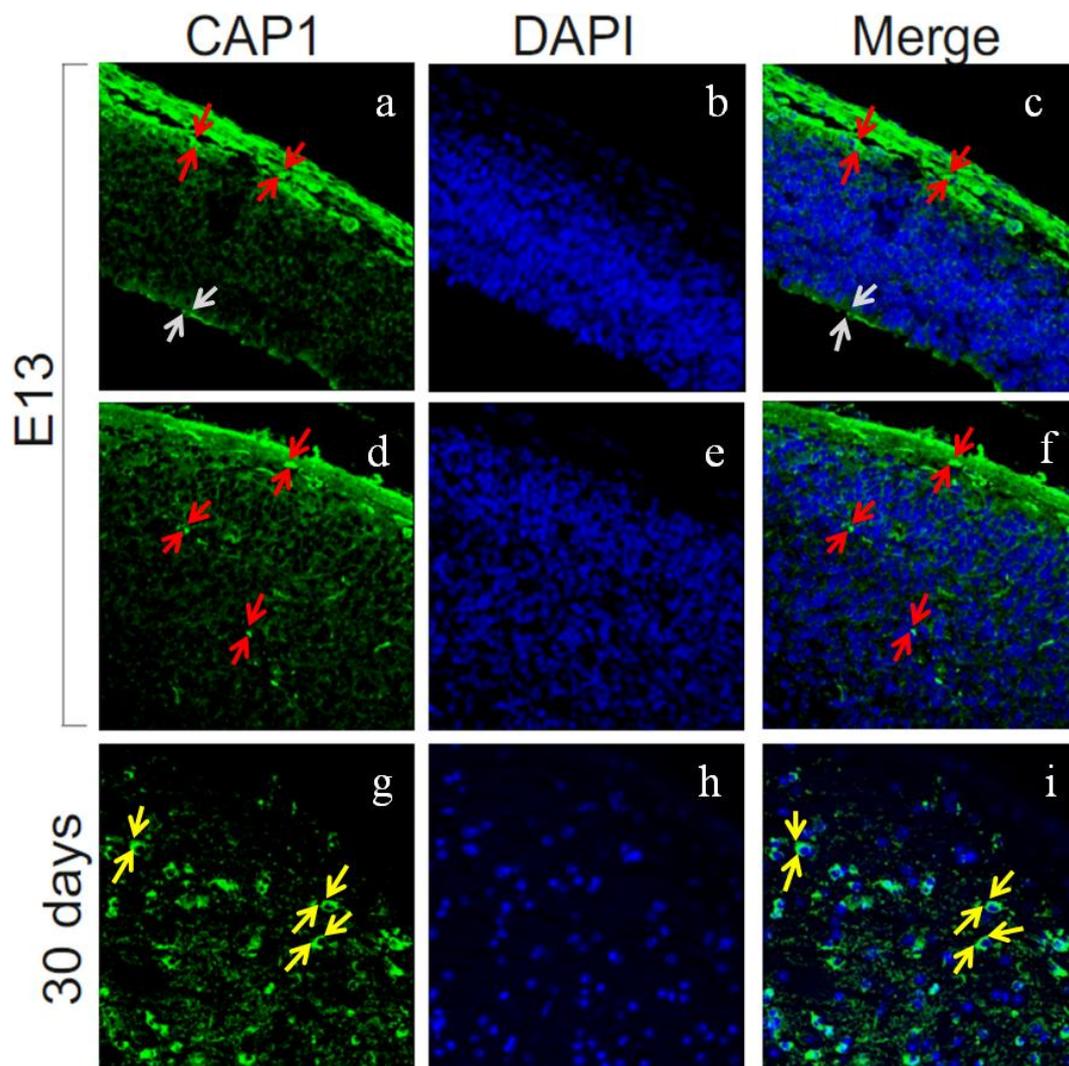
Zusammenfassend verdeutlichen diese Lokalisationsanalysen für CAP2 im Kortex und Kleinhirn das Vorkommen des Proteins im Bereich differenzierter zellreicher Gehirnareale. Dies zeigt sich im Vorhandensein von CAP2 im Kleinhirn im Bereich der Purkinjezellen, die spezifische differenzierte Zellen darstellen, sowie im Stratum granulosum mit den Körnerzellen des Kleinhirns (Abbildung 22 a-c und Abbildung 23 g-i). Die mögliche besondere Bedeutung von CAP2 für zellreiche, differenzierte Gehirnareale wird auch anhand der Expression des Proteins im Bereich der Pyramiden- und Körnerzellschichten des Kortex deutlich (Abbildung 23 d, f, rote Pfeile).

Im Folgenden sind Lokalisationsuntersuchungen von CAP1 im Mäusegehirn dargestellt. Die Lokalisationsstudien von CAP1 wurden mit Gehirnschnitten einer adulten Maus sowie eines 13 Tage alten Mausembryos (Embryonaltag 13) durchgeführt. Dafür wurden polyklonale Antikörper gegen CAP1 aus Kaninchen verwendet (Dr. V. Peche), die gegen rekombinantes CAP1 hergestellt wurden [Peche et al., 2007]. Dafür wurde CAP1 cDNA aus der mRNA von C3H10T1/2 Zellen gewonnen und in den Expressionsvektor pT7-7 kloniert und CAP1 als

Vollängenprotein exprimiert und anschließend durch Kationenaustauschchromatographie gereinigt (siehe 2.2.6).

Die Immunfluoreszenzmarkierung von CAP1 beim Mäuseembryo (E13) und im Gehirn der adulten Maus (Tag 30) mit den polyklonalen CAP1Antikörpern zeigt eine weite Verteilung des CAP1 im gesamten Kortex (Abbildung 24). Beim Embryo ist CAP1 sowohl in den basalen kortikalen Schichten als auch in den weiter apikal befindlichen Zonen nachweisbar (Abbildung 24 a, d). Die grauen Pfeile (Abbildung 24 a, c) verweisen auf CAP1 im basalen Kortexbereich des Embryos. Die roten Pfeile (Abbildung 24 a, c) zeigen auf CAP1 Expression im Bereich der Marginalzone. Hinsichtlich der zonalen Unterteilung des Kortex bei der Gehirnentwicklung verdeutlichen die Antikörpersignale, dass CAP1 in der basalen Ventrikularzone apikal im Bereich der kortikalen Platte sowie in der Marginalzone im Embryo exprimiert wird (Abbildung 24 a). In den apikalen Zonen sind im Laufe der Gehirnentwicklung postmigratorische höher differenzierte Zellen lokalisiert, die beim Embryo in der Immunfluoreszenzmarkierung eine CAP1 Anreicherung aufweisen.

Die ausgedehnte Verteilung des Proteins im Embryo ist besonders unterhalb der kortikalen Platte im Bereich der Intermediärzone auffällig. Die roten Pfeile weisen auf die CAP1 Färbung (hellgrüne Signale) (Abbildung 24 d, f). CAP1 ist im gesamten Bereich des Kortex über die verschiedenen Schichten von basal nach apikal verteilt (Abbildung 24 a, d, E13). Immunfluoreszenzsignale können in der basalen Ventrikularzone sowie in der apikalen Marginalzone beobachtet werden. In den Abbildungen mit geringerer Vergrößerung zeigen die roten und grauen Pfeile jeweils auf CAP1 positive Zellen in beiden Zonen (Abbildung 24 a, c). Die Antikörpermarkierung beim adulten Mäusegehirn zeigt eine vergleichbare weite Verteilung von CAP1 über den gesamten Kortex (Abbildung 24 g, i, gelbe Pfeile). Im Vergleich der DAPI- mit der Antikörperfärbung ergibt sich eine zytosolische Lokalisation für CAP1 (Abbildung 24 i, gelbe Pfeile).



**Abb. 24: Immunofluoreszenzmarkierung von Gehirnschnitten (Kortex) eines 13 Tage alten Mäusembryos (E13) sowie einer adulten Maus (30 Tage) mit polyklonalen Antikörpern gegen CAP1 und DAPI DNA-Färbung.** Kortex: Embryonaler Tag 13 (a-f). Adulte Maus (Tag 30), (g-i). Färbung mit polyklonalen Antikörpern gegen CAP1 (a, d, g), DAPI DNA-Färbung, der kortikalen Zellen (b, e, h). Merge: Zusammenführung der Antikörper- und DAPI-Markierung (c, f, i). Als sekundärer Antikörper wurde Anti-Kaninchen Alexa 568 verwendet. CAP1 zeigt sowohl beim Embryo (E13) als auch bei der adulten Maus (Tag 30) eine weite Verteilung über alle kortikalen Schichten (a, c, d, f, g, i Pfeile). Die Pfeile markieren hellgrüne Antikörpersignale und verweisen beim Embryo und der adulten Maus auf Bereiche, in denen die polyklonalen Antikörper gegen CAP1 das Protein erkennen und durch Bindung lokalisieren. Es wurden Paraffinschnitte verwendet.

Die dargestellten Ergebnisse für CAP1 verdeutlichen sowohl beim Embryo als auch bei der adulten Maus eine ubiquitäre Verteilung von CAP1 im Bereich aller kortikalen Schichten.

Dieses Verteilungsmuster zeigt die mögliche bedeutende Rolle von CAP1 in der embryonalen

Gehirnentwicklung sowie dessen Bedeutung für Struktur und Funktion der kortikalen Zellen im Gehirn.

## 4 Diskussion

CAP wurde erstmals in Hefe nachgewiesen und als ein Adenylatcyclase assoziiertes Protein beschrieben. Dabei zeigte es eine bedeutende Rolle für die Adenylatzyklase Signaltransduktion mit Ras Proteinen. Zudem konnte CAP als G-Aktin-bindendes Protein charakterisiert werden. CAP ist für die Aktindynamik verantwortlich und zeigt Funktionen im Aktinfilamentaufbau und -abbau, und ist somit an der Filamentorganisation von Zellen beteiligt. Dadurch ist es in viele Prozesse wie der Zellmotilität, Endozytose sowie Zellwachstum involviert. Höhere Eukaryoten besitzen zwei homologe Cyclase assoziierte Proteine, CAP1 und CAP2. CAP1 ist bei der Maus in allen untersuchten Organen mit Ausnahme des Skelettmuskels gefunden worden. Subzellulär konnte es in Regionen hoher Aktindynamik nachgewiesen werden. CAP2 hat dagegen ein begrenztes Expressionsmuster auf Organebene und weist auch subzellulär eine unterschiedliche Verteilung auf, wobei es als nukleäres und zytosolisches Protein identifiziert wurde. Im Muskel konnte es als M-Banden Protein charakterisiert werden [Peche et al., 2007, Bertling et al., 2004]. In dieser Arbeit wurden mit der Hybridomtechnik monoklonale Antikörper gegen CAP2 generiert und für Lokalisationsuntersuchungen im Mäusegehirn verwendet. Zudem wurde die Lokalisation von CAP1 im Mäusegehirn mit polyklonalen Antikörpern untersucht.

### 4.1 Wahl des NCAP2-WH2 für die Antikörpergenerierung

Für die Herstellung der spezifischen monoklonalen Antikörper gegen CAP2 im Rahmen der Hybridomtechnik wurde ein N-terminales CAP2 Polypeptid in *E.coli* exprimiert und als Antigen verwendet. Dieses Polypeptid enthält den N-terminalen Bereich des CAP2, den Prolin-reichen Bereich sowie die WH2 Domäne. Das ausgewählte Polypeptid wurde als NCAP2WH2 bezeichnet. Dieses Polypeptid umfasst die Aminosäuren 1-310 des Proteins und

wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert (siehe 3.2). Für die Wahl des N-terminalen Bereiches und der WH2 Domäne des Proteins für die Generierung spezifischer monoklonaler Antikörper waren die unterschiedliche Funktion und die evolutionäre Konservierung der verschiedenen CAP Domänenentscheidend. Im Unterschied zur N-terminalen Domäne von CAP ist nämlich der C-terminale Bereich des Proteins in allen CAPs hoch konserviert. und korreliert mit dem hohen Konservierungsgrad der Struktur sowie Funktion Aktins im Laufe der Evolution. Dies lässt Defekte in der C-terminalen Domäne resultierten in Störungen der Aktinorganisation sowie Zellmorphologie [Hubberstey und Motilo, 2002]. Allerdings wurde für CAP aus Säugern gezeigt, dass die WH2 Domäne die Aktininteraktion vermittelt. Eine Rolle des Carboxyterminus für die Aktininteraktion konnte dagegen nicht bestätigt werden (Peche et al., 2012).

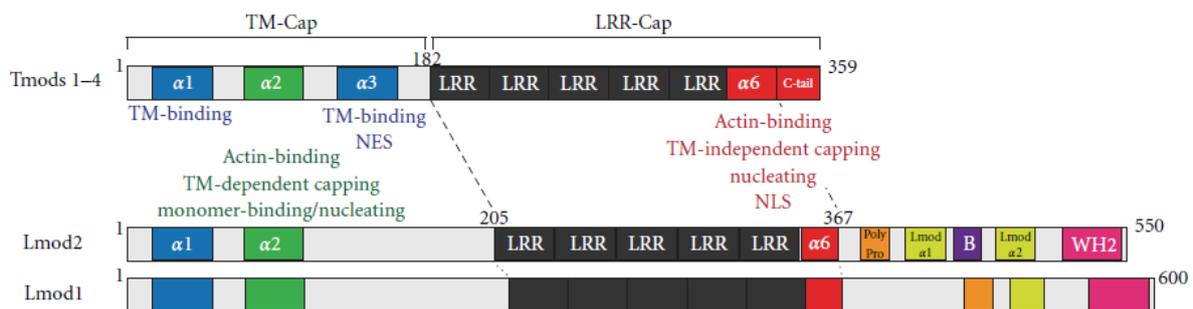
Für den N-terminalen Bereich des Proteins konnten in *S. cerevisiae* eine Interaktion mit der Adenylatcyclase sowie regulatorische Funktionen im Rahmen von Ras Protein Signaltransduktionen beschrieben werden [Fedor-Chaikin et al., 1990; Field et al., 1990; Toda et al., 1985]. Eine Konservierung dieser Rolle und Funktion für diesen Bereich konnte allerdings in Tier- und Pflanzenproteinen nicht gezeigt werden konnte. Zudem ist die Adenylatzyklase Struktur im Laufe der Evolution nicht konserviert [Hubberstey und Motilo, 2002]. Somit kann die geringe Konservierung der N-terminalen Domäne von CAP sowie der Adenylatzyklase als Interaktionspartner auf eine unterschiedliche Funktion und Bedeutung dieser Region und des CAP in höheren Eukaryoten hinweisen. NCAP2WH2 erschien deshalb für die Herstellung spezifischer monoklonaler Antikörper in Mäusen geeignet.

## **4.2 Funktion von CAP als Aktin-bindendes Protein im Muskel und der Einfluss auf Aktin**

Die Zellen der quergestreiften Skelettmuskulatur bestehen aus zahlreichen Myofibrillen, die aus einer Vielzahl von Sarkomeren als funktioneller Untereinheit zusammengesetzt sind. Die Funktion der Muskulatur erfordert innerhalb der Sarkomere eine genaue Interaktion zwischen den dünnen Aktinfilamenten und den dicken Myosinfilamenten. Im Hinblick auf die Kontraktion quergestreifter Skelettmuskulatur erfordert die kontraktile Funktion der Sarkomere eine präzise Zusammenstellung und Regulation der Aktinfilamentstrukturen des kontraktiven Apparates. Diese strukturelle Regulation der Aktinfilamente erfolgt durch die Funktion verschiedener Aktin-bindender Proteine [Gokhin und Fowler, 2011]. Zahlreiche Proteine interagieren dabei mit den schnellwachsenden (+) Enden der Aktinfilamente, induzieren den Filamentaufbau oder führen zur Abspaltung von Aktinmonomeren von den Filamenten. Auch CAP hemmt die Anlagerung von Aktinmonomeren an die (+) Enden der Filamente [Matilla et al., 2004]. Neben Proteinen, die an den (+) Enden der Filamente interagieren, gibt es Gruppen von Proteinen wie die Tropomoduline (Tmod) und Leiomodine (Lmod), welche als Kappungsproteine mit den langsamwachsenden (-) Enden der Filamente in Verbindung stehen [Weber et al., 1994]. Diese Proteine regulieren als Kappungsproteine den Aktinfilament-Zusammenbau an den (-) Enden und deren Länge und Stabilität [Gokhin und Fowler, 2011]. Dabei regulieren Tropomoduline die Aktinmonomer Assoziation und Dissoziation von den Aktinfilamenten an den (-) Enden [Fischer et al., 2003]. Über die Bindung von Tropomyosinen als Begleitproteine der Aktinfilamente regulieren Tropomoduline die Aktinfilamentlänge sowie die Stabilität [Kostyukova und Hitchcock-De Gregori, 2007].

Zudem konnte in quergestreifter Muskulatur Leiomodin 2 (Lmod2) nachgewiesen werden. Dieses Protein stellt eine größere Variante der Tropomoduline dar, welches über

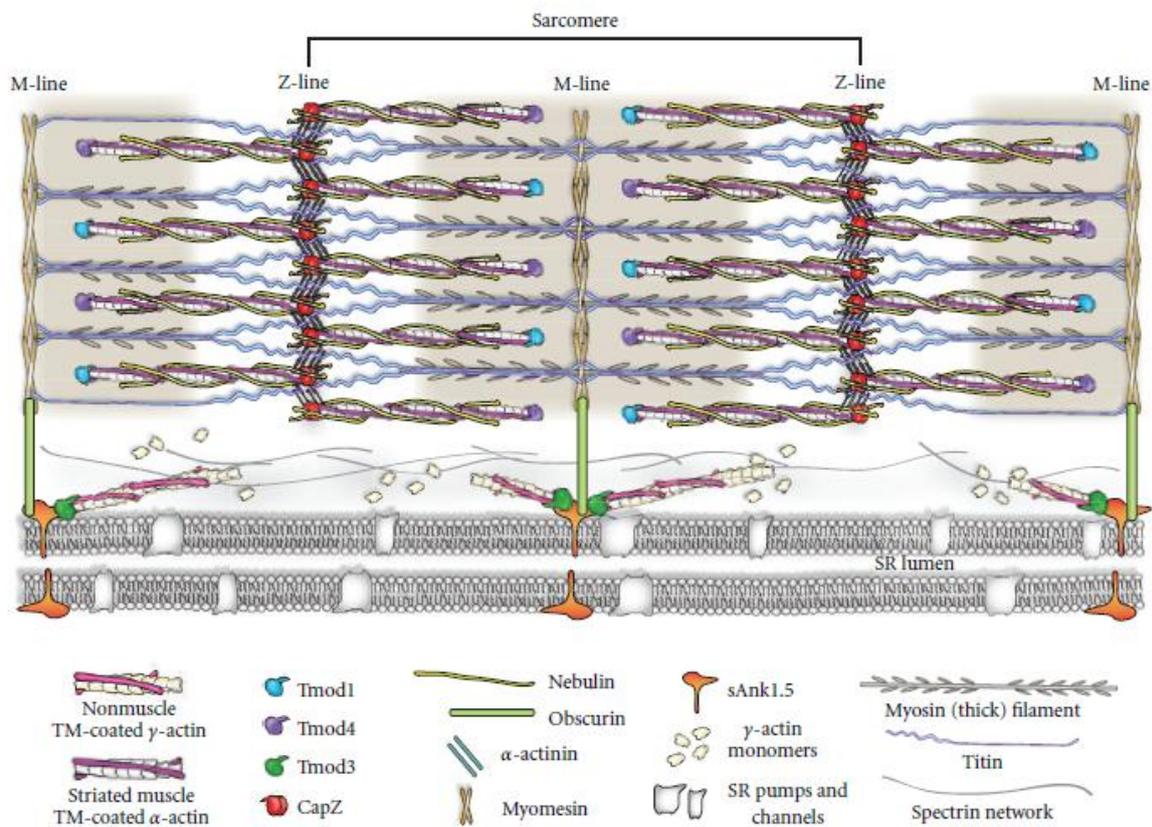
Tropomyosine (TM) reguliert werden kann und starke Aktin-Nukleations-Aktivität besitzt [Conley et al., 2001]. Leiomodin (~65 kDa) besitzt ein ähnliches Molekulargewicht wie CAP und CAP, Tropomoduline und Leiomodine weisen funktionelle Ähnlichkeiten in Bezug auf die Aktinbindung auf. Sowohl Tropomoduline als auch Leiomodine enthalten eine N-terminale TM-Cap Domäne und eine C-terminale LRR-Cap (leucine-rich repeats) Domäne (Abb. 25).



**Abb.25: Überblick über die Domänenstruktur von Tropomodulinen (Tmod) und Leiomodinen (Lmod) (aus Ghokin und Fowler, 2011).**

Diese Domänen bestehen aus  $\alpha$ -Helix-Strukturen (N-Terminale) bzw. Wiederholungen aus parallelen  $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Faltblattpaaren (C-terminale LRR-Cap), deren  $\alpha$ -Helices TM-Bindungs- und Aktinregulationsaktivitäten zeigen [Sung et al., 1992, Greenfiel et al., 2002, Kostyukova et al., 2000]. Leiomodine enthalten zusätzlich eine C-terminale Erweiterung mit einer Polyprolinregion, zwei  $\alpha$ -Helices, einer Basisregion und einer WH2 Domäne mit hoher Aktinnukleationsaktivität [Chereau et al., 2008]. Auch CAP2 besitzt eine WH2 Domäne, in der die Aktinbindung lokalisiert werden konnte [Peche et al. 2012]. Tropomoduline und Leiomodine besitzen eine besondere Rolle beim Zusammenbau der Myofibrillen, der Regulation der Aktinfilamentlänge, für die Entwicklung der quergestreiften Muskulatur sowie die kontraktile Funktion in der Herz- und Skelettmuskulatur [Skwarek-Maruszewska et al., 2010, Tsukada et al., 2010]. Bei der Organisation der Aktinfilamente in den Sarkomeren und Myofibrillen regulieren Tropomoduline die Filamentlänge durch Kontrolle der Elongation

und Kürzung an (-) Enden (Abb. 26) [Littlefield und Fowler, 2008; Ghokin und Fowler, 2011].



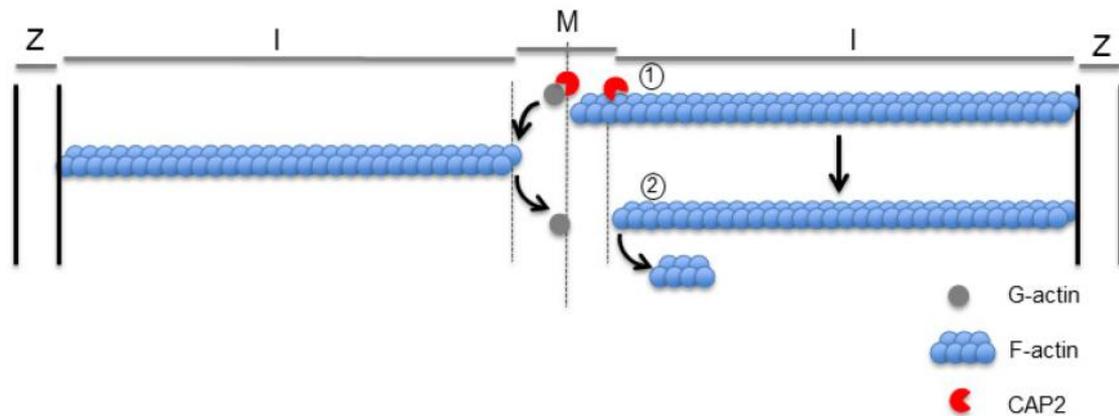
**Abb. 26: Modell für die Funktion von Tropomodulin im quergestreiften Muskel (aus Ghokin und Fowler, 2011).**

Für CAP werden vergleichbare Funktionen in Bezug auf den Einfluss auf Aktin angenommen. CAP2 konnte im Unterschied zum CAP1 in quergestreifter Skelettmuskulatur lokalisiert werden. Dabei zeigt sich CAP2 in Myoblasten als nukleäres Protein, wohingegen es im adulten Muskel ein M-Bandenprotein ist. Die M-Bande stellt mit verschiedenen Proteinen einen bedeutenden Bestandteil der Sarkomere dar. CAP aus niederen Eukaryoten und Säuger CAP1 üben einen hemmenden Effekt auf die Aktinpolymerisation aus [Hubberstey und Motillo, 2002, Bertling et al., 2004]. Auch für CAP2 konnten mit einer rekombinanten C-terminalen Domäne *in vitro* Interaktionen mit Aktin beschrieben werden. Dabei wurde der hemmende Einfluss auf die Aktinpolymerisation bestätigt [Peche et al., 2007]. In weiteren Arbeiten wurde gezeigt, dass CAP die Aktinfilamentdynamik durch eine

Interaktion mit dem Aktin-Depolymerisationsfaktor ADF/Cofilin und Aktinmonomeren reguliert und somit am Auf- und Abbau der Filamente beteiligt ist [Moriyama et Yahara, 2002, Balcer et al., 2003]. Für das Tropomodulin Homolog UNC94/TMD-1 in *C. elegans* wurde in Mutanten Defekte bei der Aktinfilamentorganisation und Myofibrillenstruktur beobachtet, die mit Defekten durch Mutationen in ADF/Cofilin vergleichbar waren. ADF/Cofilin steigert die Dissoziation von Aktinuntereinheiten an den (-) Enden und fördert die Aktin-Depolymerisation [Ono, 2007].

TMD-1 zeigte in *in vivo* Versuchen im Unterschied zu den *in vitro* Ergebnissen die gleiche Funktion synergistisch mit ADF/Cofilin hinsichtlich der Aktinorganisation der Sarkomere. Dabei waren in den Versuchen Doppelmutanten stärker von fehlerhaften Aktinstrukturen betroffen als Einzelmutanten. [Yamashiro et al., 2008]. Die zuvor beschriebene Interaktion von CAP mit ADF/Cofilin als Depolymerisationsfaktor und der hemmende Einfluss von CAP auf die Aktinpolymerisation lassen somit auf eine mögliche vergleichbare Funktion dieser Proteine für die Aktinorganisation in den Sarkomeren schließen. Zusammenfassend hemmen sowohl Tropomodulin, ADF/Cofilin als auch CAP durch möglicherweise unterschiedliche Mechanismen die Aktinpolymerisation und verhindern im Muskel die Elongation der Filamente. Hierbei wirken Tropomoduline als Kappungsproteine an den (-) Enden, ADF/Cofilin fördert den Aktinabbau an (-) Enden und CAP2 ist als M-Bandenprotein im Muskel im Bereich der Minusenden der Filamente lokalisiert, da die M-Bande mit den Minusenden der Filamente assoziiert ist. Die vergleichbare Ähnlichkeit der Domänenstruktur von CAP mit den Kappungsproteinen (Tmod, Lmod) und die Lokalisation von CAP2 an der M-Linie sind ein Hinweis darauf, dass CAP2 eine vergleichbare Funktion und Bedeutung in der Aktinorganisation trägt und in der strukturellen Organisation der Sarkomere im Muskel eine wichtige Rolle hat. Darüberhinaus ist für die WH2 Domäne eine Filament fragmentierende Aktivität gefunden worden, wie sie auch für die WH2 Domäne von Spire, einem multifunktionellen Regulator des Aktinzytoskeletts berichtet worden ist (Sitar et al.,

2011; Peche et al., 2012). Dies hat zu einem Modell für die Aktivität von CAP2 an der M-Linie geführt, in dem das Protein durch seine G-Aktinbindung und die Filamentfragmentierung an der Aufrechterhaltung der korrekten Länge der Aktinfilamente beteiligt ist (Abb. 27, von Dr. V. Peche zur Verfügung gestellt).



**Abb. 27: Modell für die Funktion von CAP2 im Muskel**

Die in dieser Arbeit hergestellten Antikörper sind bis bis jetzt vor allem für die Analyse des CAP2 im Gehirn verwendet worden. Dabei wurde eine weite Verteilung des Proteins beobachtet. Besonders auffällig war die Färbung im Kortex, im Kleinhirn und im Hippocampus (Atul Kumar, persönliche Mitteilung). Auf der subzellulären Ebene ist CAP2 im Zytosol vorhanden. Dort kann es die Aktindynamik beeinflussen und sowohl als sequestrierendes als auch fragmentierendes Protein tätig sein. In einer vergleichenden Untersuchung mit CAP1 hat sich eine ähnliche Verteilung für den Kortex ergeben. CAP1 ist ebenfalls zytosolisch lokalisiert. Inwieweit beide Proteine gleichzeitig in einer Zelle vorkommen und eine vergleichbare subzelluläre Lokalisation aufweisen, kann mit den hier erzeugten Reagenzien geklärt werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse bilden somit eine hervorragende Basis für weitergehende Untersuchungen.

## 5 Zusammenfassung

Das Cyclase-assoziierte Protein (CAP) ist ein G-Aktin-bindendes Protein, das erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert wurde. Dabei konnte CAP als ein Adenylatcyclase assoziiertes Protein charakterisiert werden. Es ist an der Aktinorganisation beteiligt und hat eine bedeutende Rolle für die Zellmorphologie sowie für verschiedene Zellfunktionen. CAP ist in allen untersuchten eukaryotischen Zelltypen vorhanden, höhere Eukaryoten besitzen zwei Homologe, CAP1 und CAP2. In dieser Arbeit wurden CAP1 und CAP2 aus Mausgewebe untersucht. Für CAP1 konnte in den untersuchten Geweben ein weites Verteilungsmuster erfasst werden. Es ist in nahezu allen Zellen und Organen der Maus nachweisbar, subzellulär lokalisiert es in Bereichen hoher Aktindynamik. CAP2 wird dagegen nur in einer begrenzten Anzahl von Geweben exprimiert. Zudem zeigt CAP2 eine unterschiedliche Verteilung auf subzellulärer Ebene. In adulten Muskelzellen ist CAP2 ein M-Banden Protein, wohingegen es in Myoblasten ein nukleäres Protein darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden CAP2 spezifische monoklonale Antikörper erzeugt und charakterisiert. Als Antigen wurde ein N-terminaler Bereich des Proteins verwendet. Mit dem generierten monoklonalen Antikörper K82-381-1 wurde die Verteilung von CAP2 im embryonalen und im adulten Mäusegehirn untersucht und mit der von CAP1 verglichen. CAP1 und CAP2 werden ubiquitär in allen Teilen des Gehirns exprimiert. CAP1 ist im Neuroepithel des Mausembryos nachweisbar und im Kortex des adulten Gehirns. CAP2 wird in Purkinjenzellen des Kleinhirns exprimiert und zeigt ebenfalls eine Anreicherung im Kortex. Die generierten Antikörper sind somit ein wertvolles Mittel, um weitere Kenntnisse über die Lokalisation und Funktion von CAP2 zu erlangen.

**Literaturverzeichnis**

1. Asakura S, Kasai M, Oosawa F (1960) The effect of temperature on the equilibrium state of actin solutions. *J Polymer Sci* 44: 35-49
2. Balcer HI, Goodman AL, Rodal AA, Smith E, Kugler J, Heuser JE, Goode BL. (2003) Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, cofilin, profilin, and Aip1. *Curr Biol.* 13:2159-2169
3. Bar-Sagi D, Rotin D, Batzer A, Mandiyan V, Schlessinger J. (1993) SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell.* 74:83-91
4. Bazin R, Lemieux R. (1989) Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor (IL-6). *J Immunol Methods.* 116:245-249
5. Bertling E, Hotulainen P, Mattila PK, Matilainen T, Salminen M, Lappalainen P. (2004) Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell.* 15:2324-2334
6. Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, Springell K, Mahadevan M, Crow YJ, Markham AF, Walsh CA, Woods CG. (2002) ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat Genet.* 32:316-320
7. Brodsky FM. (1985) Clathrin structure characterized with monoclonal antibodies. I. Analysis of multiple antigenic sites. *J. Cell Biol.* 101: 2047-2054
8. Broek D, Samiy N, Fasano O, Fujiyama A, Tamanoi F, Northup J, Wigler M. (1985) Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild-type and mutant RAS proteins. *Cell.* 41:763-769
9. Bystron I, Blakemore C, Rakic P. (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci.* 9:110-122.
10. Carlier MF (1990) Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Adv Biophys.* 26:51-73

11. Carlier MF, Jean C, Rieger KJ, Lenfant M, Pantaloni D. (1993) Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5034-5038
12. Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D. (1997) Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* 136:1307-1322
13. Carlier MF, Pantaloni D, Evans JA, Lambooy PK, Korn ED, Webb MR (1988) The hydrolysis of ATP that accompanies actin polymerization is essentially irreversible. *FEBS Lett.* 235:211-214.
14. Carlier MF, Pantaloni D, Korn ED (1987) The mechanisms of ATP hydrolysis accompanying the polymerization of Mg-actin and Ca-actin. *J Biol Chem.* 262:3052-3059.
15. Chereau D, Boczkowska M, Skwarek-Maruszewska A, Fujiwara I, Hayes DB, Rebowski G, Lappalainen P, Pollard TD, Dominguez R. (2008) Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science.* 320:239-243
16. Clark MR. (1981) Monoclonal antibodies derived from hybrid myelomas. *Ric Clin Lab.* 11: 195-203
17. Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. (1998) HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2979-2984
18. Cohen GB, Ren R, Baltimore D. (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell.* 80:237-248

19. Conley CA, Fritz-Six KL, Almenar-Queralt A, Fowler VM. (2001) Leiomodins: larger members of the tropomodulin (Tmod) gene family. *Genomics*. 73:127-139
20. Dodatko T, Fedorov AA, Grynberg M, Patskovsky Y, Rozwarski DA, Jaroszewski L, Aronoff-Spencer E, Kondraskina E, Irving T, Godzik A, Almo SC. (2004) Crystal structure of the actin binding domain of the cyclase-associated protein. *Biochemistry*. 43:10628-10641
21. Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova LV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ (2003) Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiol Rev* 83: 433-473
22. Drubin DG, Mulholland J, Zhu ZM, Botstein D. (1990) Homology of a yeast actin-binding protein to signal transduction proteins and myosin-I. *Nature*. 343:288-290
23. Fazekas de St. Groth, S, Scheidegger, D (1980) Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods* 35: 1-21
24. Fedor-Chaiken M, Deschenes RJ, Broach JR. (1990) SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast. *Cell*. 61:329-340
25. Field J, Vojtek A, Ballester R, Bolger G, Colicelli J, Ferguson K, Gerst J, Kataoka T, Michaeli T, Powers S, et al. (1990) Cloning and characterization of CAP, the *S. cerevisiae* gene encoding the 70 kd adenylyl cyclase-associated protein. *Cell*. 61:319-327
26. Fischer RS, Fritz-Six KL, Fowler VM. (2003) Pointed-end capping by tropomodulin3 negatively regulates endothelial cell motility. *J Cell Biol*. 161:371-380
27. Freeman NL, Chen Z, Horenstein J, Weber A, Field J. (1995) An actin monomer binding activity localizes to the carboxyl-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein. *J Biol Chem*. 270:5680-5685

28. Freeman NL, Lila T, Mintzer KA, Chen Z, Pahk AJ, Ren R, Drubin DG, Field J. (1996) A conserved proline-rich region of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein binds SH3 domains and modulates cytoskeletal localization. *Mol Cell Biol.* 16:548-556
29. Gerst JE, Ferguson K, Vojtek A, Wigler M, Field J. (1991) CAP is a bifunctional component of the *Saccharomyces cerevisiae* adenyl cyclase complex. *Mol Cell Biol.* 11:1248-1257
30. Gettemans J, Van Impe K, Delanote V, Hubert T, Vandekerckhove J, De Corte V (2005) Nuclear Actin-Binding Proteins as Modulators of Gene Transcription. *Traffic* 6: 847-857
31. Gieselmann R, Mann K. (1992) ASP-56, a new actin sequestering protein from pig platelets with homology to CAP, an adenylate cyclase-associated protein from yeast. *FEBS Lett.* 298:149-153
32. Gokhin DS, Fowler VM. (2011) Tropomodulin capping of actin filaments in striated muscle development and physiology. *J Biomed Biotechnol.* 2011: 103069
33. Gottwald U, Brokamp R, Karakesisoglou I, Schleicher M, Noegel AA. (1996) Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in *Dictyostelium discoideum* and characterization of its interaction with actin. *Mol Biol Cell.* 7:261-272
34. Grazi E, Trombetta G (1985) Effects of temperature on actin polymerized by  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biochem J* 232: 297-300
35. Greenfield NJ, Fowler VM. (2002) Tropomyosin requires an intact N-terminal coiled coil to interact with tropomodulin. *Biophys J.* 82:2580-2591
36. Grummt I (2006) Actin and myosin as transcription factors. *Curr Opin Genet Dev.* 16:191-196

37. Hegyi G, Szilágyi L, Belágyi J (1988) Influence of the bound nucleotide on the molecular dynamics of actin. *Eur J Biochem.* 175:271-274
38. Hertzog M, Yarmola EG, Didry D, Bubb MR, Carrier MF. (2002) Control of actin dynamics by proteins made of beta-thymosin repeats: the actobindin family. *J Biol Chem.* 277: 14786-14792
39. Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, Kysela K, Goodrich JA, Lessard JL, Hope TJ, Hozak P, de Lanerolle P (2004) Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 6: 1094-1101
40. Hubberstey AV, Mottillo EP. (2002) Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. *FASEB J.* 16:487-499
41. Kasai M, Nakano E, Oosawa F (1965) Polymerization of actin free from nucleotides and divalent cations. *Biochim Biophys Acta.* 94:494-503
42. Kataoka T, Powers S, McGill C, Fasano O, Strathern J, Broach J, Wigler M. (1984) Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell.* 1984 37:437-445
43. Köhler G, Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256:495-497
44. Kostyukova A, Maeda K, Yamauchi E, Krieger I, Maéda Y. (2000) Domain structure of tropomodulin: distinct properties of the N-terminal and C-terminal halves.. *Eur J Biochem.* 267:6470-6475
45. Kostyukova AS, Hitchcock-Degregori SE, Greenfield NJ. (2007) Molecular basis of tropomyosin binding to tropomodulin, an actin-capping protein. *J Mol Biol.* 372:608-618
46. Ksiazek D, Brandstetter H, Israel L, Bourenkov GP, Katchalova G, Janssen KP, Bartunik HD, Noegel AA, Schleicher M, Holak TA. (2003) Structure of the N-

- terminal domain of the adenylyl cyclase-associated protein (CAP) from *Dictyostelium discoideum*. *Structure*. 11:1171-1178
47. Kubagawa H, Mayumi M, Kearney JF, Cooper MD. (1982) Immunoglobulin VH determinants defined by monoclonal antibodies. *J Exp Med*. 156:1010-1024
48. Kukalev A, Nord Y, Palmberg C, Bergman T, Percipalle P (2005) Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol*. 12:238-244
49. Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685
50. Lee SH, Dominguez R (2010) Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells*. 29:311-325
51. Lila T, Drubin DG. (1997) Evidence for physical and functional interactions among two *Saccharomyces cerevisiae* SH3 domain proteins, an adenylyl cyclase-associated protein and the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 8:367-385
52. Littlefield RS, Fowler VM. (2008) Thin filament length regulation in striated muscle sarcomeres: pointed-end dynamics go beyond a nebulin ruler. *Semin Cell Dev Biol*. 19:511-519
53. Lüllmann-Rauch R (2006) Taschenlehrbuch Histologie. 2.Auflage, Stuttgart New York: Thieme: 19-20
54. Mattila PK, Quintero-Monzon O, Kugler J, Moseley JB, Almo SC, Lappalainen P, Goode BL. (2004) A high-affinity interaction with ADP-actin monomers underlies the mechanism and in vivo function of Srv2/cyclase-associated protein. *Mol Biol Cell*. 15:5158-5171

55. Moriyama K, Yahara I. (2002) Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover. *J Cell Sci.* 115:1591-1601
56. Nakamura RM. (1983) Monoclonal antibodies: methods and clinical laboratory applications. *Clin Physiol Biochem.* 1:160-172
57. Neidl C, Engel J (1979) Exchange of ADP, ATP and 1: N6-ethenoadenosine 5'-triphosphate at G-actin. Equilibrium and kinetics. *Eur J Biochem.* 101:163-169.
58. Nicholas AK, Khurshid M, Désir J, Carvalho OP, Cox JJ, Thornton G, Kausar R, Ansar M, Ahmad W, Verloes A, Passemard S, Misson JP, Lindsay S, Gergely F, Dobyns WB, Roberts E, Abramowicz M, Woods CG. (2010) WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly. *Nat Genet.* 42:1010-1014
59. Niebuhr K, Lingnau A, Frank R, Wehland J. (1998) Rapid Procedures for Preparing Monoclonal Antibodies and Identifying Their Epitopes. *Cell Biology: A laboratory handbook, Second Edition. Vol. 2.*
60. Noegel AA, Blau-Wasser R, Sultana H, Müller R, Israel L, Schleicher M, Patel H, Weijer CJ. (2004) The cyclase-associated protein CAP as regulator of cell polarity and cAMP signaling in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell.* 15:934-945
61. Noegel AA, Rivero F, Albrecht R, Janssen KP, Köhler J, Parent CA, Schleicher M. (1999) Assessing the role of the ASP56/CAP homologue of *Dictyostelium discoideum* and the requirements for subcellular localization. *J Cell Sci.* 112:3195-3203
62. Obrdlik A, Kukalev A, Louvet E, Farrants AK, Caputo L, Percipalle P (2008) The histone acetyltransferase PCAF associates with actin and hnRNP U for RNA polymerase II transcription. *Mol Cell Biol.* 28: 6342-6357
63. Ojala PJ, Paavilainen VO, Vartiainen MK, Tuma R, Weeds AG, Lappalainen P. (2002) The two ADF-H domains of twinfilin play functionally distinct roles in interactions with actin monomers. *Mol Biol Cell.* 13:3811-3821

64. Ono S (2010) Dynamic regulation of sarcomeric actin filaments in striated muscle. *Cytoskeleton* (Hoboken). 67:677-692
65. Ono S. (2007) Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int Rev Cytol.* 258:1-82
66. Oosawa F, Asakura S (1975) *Thermodynamics of the Polymerization of Protein.* New York: Academic
67. Paunola E, Mattila PK, Lappalainen P. (2002) WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett.* 513:92-97
68. Pawson T, Schlessingert J. (1993) SH2 and SH3 domains. *Curr Biol.* 3:434-442
69. Peche V, Shekar S, Leichter M, Korte H, Schröder R, Schleicher M, Holak TA, Clemen CS, Ramanath-Y B, Pfitzer G, Karakesisoglou I, Noegel AA. (2007) CAP2, cyclase-associated protein 2 is a dual compartment protein. *Cell Mol Life Sci.* 64:2702-2715
70. Peche, V S., Holak, T A, Burgute, B D, Kosmas, K, Kale, S P F, Wunderlich, T., Elhamine, F, Stehle, R, Pfitzer, G, Nohroudi, K, Addicks, K, Stöckigt, F, Schrickel, J W, Gallinger, J, Schleicher, M, Noegel, A A (2012) Ablation of Cyclase Associated Protein 2 (CAP2) leads to cardiomyopathy. *Cell Mol. Life Sci.* DOI 10.1007/s00018-012-1142-y
71. Percipalle P, Visa N (2006) Molecular functions of nuclear actin in transcription. *J Cell Biol.* 172:967-971
72. Peters J. H., Baumgarten H., (Hrsg.), (1990) *Monoklonale Antikörper. Herstellung und Charakterisierung*, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
73. Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. (1993) Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science.* 259:1157-1161

74. Rungger D, Rungger-Brandle E, Chaponnier C, Gabbiani G (1979) Intranuclear Injection of anti-actin antibodies into *Xenopus* oocytes blocks chromosome condensation. *Nature* 282: 320-321
75. Sass P, Field J, Nikawa J, Toda T, Wigler M. (1986) Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:9303-9307
76. Schleicher M, Jockusch BM (2008) Actin: its cumbersome pilgrimage through cellular compartments. *Histochem Cell Biol.* 129:695-704
77. Shen X, Ranallo R, Choi E, Wu C (2003) Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell.* 12:147-155.
78. Shirahata S, Katakura Y, Teruya K. (1998) Cell hybridization, hybridomas, and human hybridomas. *Methods Cell Biol.* 57:111-145
79. Sitar T, Gallinger J, Ducka AM, Ikonen TP, Wohlhoefer M, Schmoller KM, Bausch AR, Joel P, Trybus KM, Noegel AA, Schleicher M, Huber R, Holak TA. (2011) Molecular architecture of the Spire-actin nucleus and its implication for actin filament assembly. *Proc Natl Acad Sci.* 108:19575-19580
80. Skwarek-Maruszewska A, Boczkowska M, Zajac AL, Kremneva E, Svitkina T, Dominguez R, Lappalainen P. (2010) Different localizations and cellular behaviors of leiomodulin and tropomodulin in mature cardiomyocyte *Mol Biol Cell.* 21:3352-3361
81. A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R (1999) Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 98:159-169.
82. Sung LA, Fowler VM, Lambert K, Sussman MA, Karr D, Chien S. (1992) Molecular cloning and characterization of human fetal liver tropomodulin. A tropomyosin-binding protein. *J Biol Chem.* 267:2616-2621

83. Tatchell K, Robinson LC, Breitenbach M. (1985) RAS2 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for gluconeogenic growth and proper response to nutrient limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:3785-3789
84. Toda T, Uno I, Ishikawa T, Powers S, Kataoka T, Broek D, Cameron S, Broach J, Matsumoto K, Wigler M. (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell.* 40:27-36
85. Tomita M, Tsumoto K. (2011) Hybridoma technologies for antibody production. *Immunotherapy.* 3:371-380
86. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology.* 24:145-149
87. Tsukada T, Pappas CT, Moroz N, Antin PB, Kostyukova AS, Gregorio CC. (2010) Leiomodulin-2 is an antagonist of tropomodulin-1 at the pointed end of the thin filaments in cardiac muscle. *J Cell Sci.* 123:3136-3145
88. Vojtek A, Haarer B, Field J, Gerst J, Pollard TD, Brown S, Wigler M. (1991) Evidence for a functional link between profilin and CAP in the yeast *S. cerevisiae*. *Cell.* 66:497-505
89. Wang F, Sampogna RV, Ware B (1989) pH dependence of actin self-assembly. *Biophys J* 55: 293-298
90. Weber A, Pennise CR, Babcock GG, Fowler VM. (1994) Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments. *J Cell Biol.* 127:1627-1635
91. Wegner A (1976) Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol.* 108:139-150.
92. Wegner A, Isenberg G (1983) 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16:4922-4925

93. Yamashiro S, Cox EA, Baillie DL, Hardin JD, Ono S. (2008) Sarcomeric actin organization is synergistically promoted by tropomodulin, ADF/cofilin, AIP1 and profilin in *C. elegans*. *J Cell Sci.* 121:3867-3877
94. Yuspa SH, Hawley-Nelson P, Koehler B, Stanley JR. (1980) A survey of transformation markers in differentiating epidermal cell lines in culture. *Cancer Res.* 40:4694-4703
95. Zelicof A, Protopopov V, David D, Lin XY, Lustgarten V, Gerst JE. (1996) Two separate functions are encoded by the carboxyl-terminal domains of the yeast cyclase-associated protein and its mammalian homologs. Dimerization and actin binding. *J Biol Chem.* 271:18243-18252
96. Zheng B, Han M, Bernier M, Wen JK (2009) Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J.* 276:2669-268

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Eskandarnaz  
Vorname: Ali  
Geburtsdatum: 07. April 1983  
Geburtsort: Teheran (Iran)  
Wohnort: Moerserstr. 347  
47475 Kamp-Lintfort  
e-mail: ali1983@gmx.de  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulischer Werdegang

989-1993 Wilhelmschule-Städt. Gem.-Grundschule in Kamp Lintfort  
1993-2002 Unesco-Schule Kamp-Lintfort  
Juni 2002 Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

Januar- November 2003 Zivildienst

### Akademischer Bildungsgang

Oktober 2006- August 2007 University of Applied Sciences Düsseldorf, Fachbereich  
Elektrotechnik  
Oktober 2007 Beginn des Zahnmedizinstudiums an der Medizinischen  
Fakultät der Universität zu Köln  
  
April 2011- Oktober 2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen der  
zahnmedizinischen Promotionsarbeit am Institut Biochemie I  
der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln (Prof.  
Dr.Noegel).  
  
Juli 2012- bis jetzt Staatsexamen Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät der  
Universität zu Köln







