

*Molekularbiologische Charakterisierung des
M802-Antigens (Reggie) im retinotectalen
System des Goldfisches*

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie der
Universität Konstanz

vorgelegt von

Thomas Schulte

aus Bochum

1996

für meine Eltern

Danksagung

Frau Prof. Dr. Claudia Stürmer möchte ich für die Bereitstellung des Themas und ihre ständige Diskussionsbereitschaft ganz herzlich danken.

Außerdem bin ich für ihre Geduld, ihr Vertrauen und den Freiraum, den sie mir eingeräumt hat, sehr dankbar.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich (in alphabetischer Reihenfolge) Herrn Dr. Martin Bastmeyer für die Hilfe bei den Retinapräparaten und viele nützliche Tips, Frau Ulrike Binkle sowie Frau Brigitte Haag für ihre technische Unterstützung, Frau Dr. Ute Lässig für die Überlassung der cDNA Bibliothek, Frau Anette Yvonne Loos für die Etablierung der Goldfischzucht, und Frau Marianne Wiechers für ihre technische Unterstützung sowie ihre Geduld mit mir.

Mein ganz besonderer Dank aber, gilt der gesamten Arbeitsgruppe für Entwicklungsneurobiologie für das außerordentlich angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima und nicht zuletzt für ihre stete Bereitschaft zur Hilfe. Die nicht gerade beliebten Fischpräparationen sind nur ein Beispiel hierfür.

Herrn Dr. Friedrich Lottspeich vom Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried bin ich für die überaus prompte Sequenzierarbeit von Proteinen zu großem Dank verpflichtet. Ohne die von ihm stammenden Peptidsequenzen wäre die Klonierung der Reggie Proteine bedeutend schwieriger gewesen.

Bei den Mitarbeitern der Tierforschungsanlage, insbesondere Frau Gast (Immunisierungen) und Herrn Thimm (Fischzucht), möchte ich mich herzlich bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben.

Zusammenfassung	1
Abkürzungsverzeichnis	3
Einleitung.....	5
Das retinotectale System des Goldfisches (<i>Carassius auratus</i>).....	6
Der monoklonale Antikörper M802	10
1 Ergebnisse.....	14
1.1 Biochemische Charakterisierung des M802 Antigens (Reggie)	14
1.1.1 Das M802 Antigen (Reggie) hat ein Molekulargewicht von ca. 48 kD im <i>Western Blot</i>	14
1.1.2 Das immunoaffinitätsgereinigte M802 Antigen (Reggie) hat ein apparentes Molekulargewicht von 48 kD in der SDS PAGE	16
1.1.4 Immunoaffinitätsgereinigtes Reggie aus gesamten Goldfischlarven besteht aus einer Reihe von Isoformen mit verschiedenen isoelektrischen Punkten .	17
1.1.5 Die Mikrosequenzierung des 48 kD Reggie Proteins führte zur Bestimmung von 8 partiellen Aminosäuresequenzen	18
1.1.6 Drei neue Antiseren und drei neue monoklonale Antikörper gegen Reggie.....	20
1.1.7 Das M802 Antigen ist wasserlöslich, membranassoziiert und ein peripheres Membranprotein.....	22
1.2 Klonierung von 2 verschiedenen Reggie cDNA Partialklonen (Reggie-1 und Reggie-2).....	25
1.3 Isolierung zweier vollständiger Reggie cDNAs (Reggie-1 und Reggie-2)	28
1.4 Analyse der Reggie-1 und Reggie-2 Klone	35
1.4.1 Reggie-1 besitzt eine 80%ige Aminosäure-Identität zum menschlichen <i>epidermal surface antigen</i> (ESA)	35
1.4.2 Reggie-2 in anderen Spezies:.....	37
1.4.3 Sekundärstrukturvorhersagen für Reggie-1 und Reggie-2	38
1.4.4 in vitro translatiertes Reggie-1 hat ein apparentes Molekulargewicht von 48 kD.	45
1.4.5 Reggie-1 besitzt mehrere Genloci im tetraploiden Chromosomensatz des Goldfisches.	46
1.5 Analyse der Reggie Expression in adulten und embryonalen Goldfischen	47
1.5.1 Reggie-1 und Reggie-2 mRNAs haben eine Größe von ca. 3 und 3,2 kb in verschiedenen neuronalen Geweben.....	47
1.5.2 Reggie-1 und Reggie-2 werden in der Retina des adulten Goldfisches nach einer Durchtrennung des Sehnervs gleichermaßen induziert.	49

1.5.3 Im optischen Tectum sind Reggie-1 und Reggie-2 Transkripte in den retinorezipienten Schichten nicht nachzuweisen.	52
1.5.4 Reggie-1 und Reggie-2 Transkripte sind in der embryonalen und früh larvalen Retina nicht zu detektieren.....	53
2 Diskussion.....	57
2.1 Die Charakterisierung des M802 Antigens (Reggie)	58
2.2 Die neuen monoklonalen Reggie-Antikörper.....	59
2.3 Die Klonierung von zwei cDNAs zu Reggie.....	60
2.4 Die Charakterisierung von Reggie-1 und Reggie-2	62
2.5 Das Expressionsmuster von Reggie-1 und Reggie-2.....	66
2.6 Ausblicke	68
3.1 Tiere und Material	69
3.1.1 Tiere	69
3.1.2 Material.....	69
3.1.2.1 Geräte	69
3.1.2.2 Chemikalien	70
3.1.2.3 Vorgefertigte Systeme („Kits“).....	72
3.1.2.4 Enzyme und Längenstandards.....	72
3.1.2.5 Säulenmaterial	73
3.1.2.6 Nährmedien für Bakterien	73
3.1.2.7 Verbrauchsmaterial	74
3.1.2.8 sekundäre Antikörper.....	74
3.2 Methoden.....	75
3.2.1 Proteinbiochemie.....	75
3.2.1.1 Reinigung monoklonaler Antikörper der Klasse IgG aus Zellkultur-Überständen (<i>nach Ey et al., 1978, mit Modifikationen</i>).....	75
3.2.1.2 Proteinbestimmung nach der <i>BCA</i> Methode (Pierce)	75
3.2.1.3 Herstellung von Antikörper-Affinitätsäulen.....	75
3.2.1.4 Reinigung von Reggie aus ganzen Goldfischlarven (30 - 60 d) ..	76
3.2.1.5 Reinigung von Reggie aus Hirnen adulter Goldfische	77
3.2.1.6 Biotinmarkierung von Membranproteinen aus neuronalem Gewebe und Immunpräzipitation.....	77
3.2.1.7 SDS-PAGE (nach Lämmli)	78
3.2.1.8 SDS-PAGE (nach Schagger mit dem <i>Multiphor II</i> System, Pharmacia).....	79
3.2.1.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese (<i>nach O'Farrel</i>)	80
3.2.1.10 Silberfärbung von Gelen (<i>nach Heukeshoven und Dernick</i>).....	82
3.2.1.11 <i>Coomassie</i> -Färbung von Gelen	82
3.2.1.12 TCA-Fällung von Proteinen.....	83
3.2.1.13 Gelelektrophoretische Reinigung von Proteinen	83
3.2.1.14 Transfer von Proteinen auf Membranen (<i>Western Blot</i>)	83
3.2.1.15 Transfer von Proteinen auf Membranen (<i>Western Blot, semidry</i>)	84

3.2.1.16 Detektion immobilisierter Proteine (<i>Western Blot</i> Detektion)	84
3.2.2 Molekularbiologie	85
3.2.2.1 Bakterienstämme und Vektoren	85
3.2.2.2 Herstellung von <i>E. coli</i> über Nacht- und Dauer-Kulturen	85
3.2.2.3 Herstellung von <i>E. coli</i> Kulturen zur Infektion mit λ -Phagen	
3.2.2.4 Herstellung kompetenter Bakterien <i>nach Chung et al., 1989</i>	86
3.2.2.5 Transformation von Plasmid DNA in kompetente Bakterien (bei Selektion mit Ampicillin)	86
3.2.2.6 Amplifizierung von Plasmid DNA in Bakterien („Minipräp“).....	86
3.2.2.7 Verdauung von DNA durch Typ II Restriktionsendonukleasen	87
3.2.2.8 Gelelektrophorese von DNA	87
3.2.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	87
3.2.2.10 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	88
3.2.2.11 Subklonierung von PCR Produkten	88
3.2.2.12 Präparation von Klonierungsvektoren.....	88
3.2.2.13 Phenol/Chloroform Extraktion von Nukleinsäurelösungen.....	89
3.2.2.14 Phosphorylierung von DNA 5'-Enden	89
3.2.2.15 Ligation von DNA	89
3.2.2.16 Sequenzierung doppelsträngiger DNA	89
3.2.2.17 Herstellung von Deletionsklonen durch unidirektionalen <i>Exo</i> <i>III/DNAse I</i> Verdau.....	90
3.2.2.18 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	90
3.2.2.19 Anreicherung von poly A+ RNA aus Gesamt RNA durch oligo dT Cellulose Chromatographie	91
3.2.2.20 Anreicherung von poly A+ RNA aus Gesamt RNA durch oligo dT Dynabead Chromatographie	92
3.2.2.21 Gelelektrophorese von RNA	92
3.2.2.22 cDNA-Erststrangsynthese	93
3.2.2.23 <i>in vitro</i> Transkription	93
3.2.2.24 Kapillar-Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen	94
3.2.2.25 alkalischer <i>downward</i> Transfer von DNA aus Agarosegelen auf positiv geladene Nylonmembranen.....	95
3.2.2.26 Hybridisierung immobilisierter Nukleinsäuren mit DNA/RNA Sonden	95
3.2.2.27 Entfernung hybridisierter Sonde von Membranen (<i>stripping</i>).....	96
3.2.2.28 Herstellung radioaktiv markierter DNA Sonden durch <i>oligo</i> <i>labelling</i>	96
3.2.2.29 <i>Screening</i> einer λ -ZAP cDNA Bibliothek unter hochstringenten Bedingungen.....	97
3.2.3 Histologische Methoden	99

3.2.3.1	Anfertigung von Kryoschnitten	99
3.2.3.2	Immunhistologische Fluoreszenzmarkierung an Kryoschnitt Präparaten	99
3.2.3.3	In situ Hybridisierung an Gesamt-Präparaten (<i>whole mount</i>)....	100
3.2.3.4	In situ Hybridisierung an Kryo-Schnitt Präparaten.....	101
3.2.4	Produktion von Antikörpern	101
3.2.4.1	Produktion polyklonaler Antikörper	101
3.2.4.2	Produktion monoklonaler Antikörper	102
Literatur	103

ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von einem monoklonalen Antikörper M802, der wachsende und vor allem regenerierende retinale Ganglienzellaxone im Sehsystem des adulten Goldfisches erkennt (Paschke, 1990), erfolgte in dieser Arbeit die molekularbiologische Charakterisierung des M802 Antigens (Reggie).

Der monoklonale Antikörper M802 erkennt eine Gruppe peripherer Membranproteine, die ein apparentes Molekulargewicht von 48 kD in der SDS PAGE aufweisen. Die Mikrosequenzierung des aus Goldfischlarven (30-60 d alt) gereinigten Proteins durch Dr. F. Lottspeich (MPI für Biochemie, Martinsried) erbrachte eine N-terminale und 7 interne Peptidsequenzen. Mithilfe dieser Peptidsequenzen gelang die Klonierung zweier partieller Reggie cDNA Sequenzen durch Einsatz der *Polymerase chain reaction* (PCR) aus Retinae adulter Goldfische 14 Tage nach einer Durchtrennung des optischen Nervs (ONS). Zu diesen beiden partiellen cDNAs wurden vollständige cDNA Klone aus einer cDNA Bibliothek fünf Tage alter Goldfischlarven isoliert. Dadurch wurde der Nachweis erbracht, daß durch M802 immunoaffinitätsgereinigtes Protein aus mindestens 2 verschiedenen Polypeptiden besteht – Reggie-1 und Reggie-2, die Mitglieder einer neuen Proteinfamilie im ZNS der Vertebraten bilden. Diese beiden Proteine sind zu 45% identisch, haben errechnete Molekulargewichte von 46,9 (Reggie-1) sowie 47,2 kD (Reggie-2) und sind das Produkt mindestens zweier Gene im Goldfisch. Reggie-1 und Reggie-2 kodieren für überwiegend hydrophile Proteine, denen ein klassisches Signalpeptid fehlt. Eine Datenbankrecherche zeigte, daß das *Epidermal Surface Antigen* (ESA), ein in der menschlichen Haut produziertes 35 kD Protein, ein mögliches humanes Homologes zu Reggie-1 darstellt, da es zu 80% mit diesem identisch ist.

In situ Hybridisierungen zeigten, daß Transkripte von Reggie-1 und Reggie-2 nach einer Läsion des optischen Nervs transient von RGZs exprimiert werden. Dabei sind die Expressionsmuster beider mRNAs nicht unterscheidbar. Im Gegensatz zu dieser Situation, kommt es im Embryo und in der frühen Larve zu keiner Reggie-1 oder Reggie-2 mRNA Expression in RGZs, und dieser Befund stimmt mit der Abwesenheit der M802 Immunoreaktivität von RGZs und RGZ Axonen in Embryo und Larve überein. Zellen des olfaktorischen Epithels und des Trigemini im Embryo produzieren beide Transkripte. Auf der Ebene der RGZs stimmt das zeitlich räumliche Expressionsmuster der mRNAs von Reggie-1

und Reggie-2 mit dem des M802 Antigens überein. Dieses Expressionsmuster ergab sich auch mit neu produzierten monoklonalen Antikörpern gegen immunoaffinitätsgereinigtes Reggie Protein.

Reggie Proteine stellen eine neue Familie von Zelloberflächenproteinen im ZNS der Vertebraten dar. Die Expression von Reggie-1 und Reggie-2 verdeutlicht, daß die Regeneration verletzter Nervenfasern keine Rekapitulation der Ontogenese, sondern ein ähnlicher Vorgang ist.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy DNA
d	Tag
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
<i>ECL</i>	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
h	Stunde
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
Lsg.	Lösung
MAK	monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
min	Minute
<i>NP-40</i>	<i>Nonidet P-40</i>
OAc	Acetat
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
OGP	n- β -Octylglucopyranosid
ONS	Durchtrennung des <i>Nervus opticus</i>
P	Leistung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pf	post Fertilisation
pfu	Plaques bildende Einheiten
PNS	peripheres Nervensystem
RGZ	retinale Ganglienzelle
RITC	Rhodamin-isothiocyanat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.h.	siehe

SAC	<i>Stratum album centrale</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFGS	<i>Stratum fibrosum et griseum superficiale</i>
SM	<i>Stratum marginale</i>
SO	<i>Stratum opticum</i>
SPV	<i>Stratum periventriculare</i>
ss	einzelsträngig
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TX-100	<i>Triton X-100</i>
U	Spannung
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
W	Watt
ZNS	Zentralnervensystem

EINLEITUNG

Kalt- und warmblütige Vertebraten unterscheiden sich deutlich in ihrer Antwort auf Verletzungen von Fasertrakten im Zentralnervensystem (ZNS; Skene, 1989). ZNS Neurone in Fischen, wie dem Goldfisch (*Carassius auratus*), sind in der Lage, verletzte Axone unter Wiedererlangung der vollen Funktion zu regenerieren. Neurone des Säugers können das nicht. Hierfür sind vor allem zwei Umstände verantwortlich, die Gliazell Umgebung entlang des Nervs und speziell an der Stelle der Läsion (Schwab et al., 1993; Johnson, 1993; Bähr und Bonhoeffer, 1994; Wanner et al., 1995) und die intrinsische Wachstumspotenz der Neurone selbst (Fawcett, 1992; Stuermer et al., 1992). Im Gegensatz zum ZNS sind Neurone des peripheren Nervensystems (PNS) auch in Säugern zur Regeneration fähig.

Nach einer Verletzung des optischen Nervs im Goldfisch, überleben fast sämtliche retinalen Ganglienzellen (RGZs) (Meyer et al., 1985), und erlangen die Fähigkeit (Kompetenz), ihre Axone zu regenerieren. Bei Säugern kommt es nach einer solchen Läsion zu massivem Zelltod und nur wenige der RGZs überleben (Aguayo et al., 1991). An der Läsionsstelle selbst verhindern vor allem Oligodendrozyten und ihr Produkt das Myelin des ZNS, eine Regeneration der RGZ Axone (Schwab et al., 1993), denn sie sind inhibitorisch für Axonwachstum. Eine identifizierte Komponente hierfür stellen die von Säuger-Oligodendrozyten produzierten *neurite growth inhibitors* (NI-220 und NI-35) dar (Caroni und Schwab, 1988a). Durch Applikation des Antikörpers IN-1 – er neutralisiert die Funktion von NI-220 und NI-35 – ließen sich sowohl in vitro (Caroni und Schwab, 1988b) als auch in vivo im Falle des Rückenmarks der Ratte (Bregman et al., 1995) die Auswachseigenschaften von ZNS Axonen trotz der Gegenwart von Säuger Oligodendrozyten und Myelin deutlich erhöhen. Bei Fischen produzieren Gliazellen des optischen Nervs – sie sind nicht inhibitorisch für Axon Wachstum – nach einer Verletzung sogar wachstumsförderliche Moleküle, wie das E587-Antigen (Bastmeyer et al., 1993) und die *axogenesis factors* AF-1 und AF-2 (Schwalb et al., 1995; Schwalb et al., 1996).

Nach einer Läsion des optischen Nervs im Goldfisch kommt es zu einer massiven Hochregulation der RNA- und Proteinsynthese-Maschinerie in den retinalen Ganglienzellen (RGZs) (Grafstein und McQuarrie, 1978; Grafstein, 1991). Im Laufe dieses Prozesses werden

wachstumsassoziierte Proteine in RGZs produziert, diese erscheinen dann kurze Zeit später in oder auf den regenerierenden Axonen (Benowitz et al., 1981; Benowitz and Lewis, 1983; Burmeister et al., 1985; Perry et al., 1985; Stuermer et al., 1992).

Retinale Ganglienzellen (RGZs) im Säuger sind nach einer Verletzung des Sehnervs nur zur Ausbildung kurzer *sprouts*, aber nicht zur Elongation (Regeneration) ihrer Axone fähig (Ramon y Cajal, 1968). Nach Gabe eines peripheren Transplantats anstatt des optischen Nervs sind immerhin knapp 5% der retinalen Ganglienzellen in der Lage ihre Axone zu regenerieren (Vidal-Sanz et al., 1987). Der Großteil der RGZs stirbt allerdings nach der Axotomie ab (Thanos et al., 1989; Villegas-Perez et al., 1993). Das bedeutet, daß nicht nur die inhibitorischen Eigenschaften der Umgebung retinaler Ganglienzellaxone für die Unfähigkeit zur Regeneration in Säugern verantwortlich sind, sondern auch die intrinsischen Wachstums- und Überlebenseigenschaften der Zellen eine Rolle spielen (Übersicht in Fawcett, 1992).

Zur Zeit ist nur eine kleine Zahl von Proteinen bekannt, deren gesteigerte Expression Ausweis dieser Kompetenz des Neurons zur Regeneration sind. Hierzu gehört in Fischen und in Säugern das wachstumsassoziierte Protein Gap-43 (Benowitz und Lewis, 1983; LaBate und Skene, 1989). In Fischen zählen hierzu ferner die Zelladhäsionsmoleküle der Immunoglobulin (Ig) Superfamilie N-CAM (Bastmeyer et al., 1990), E587-Antigen (ein L1 ähnliches Molekül, Vielmetter et al., 1991) und Neurolin – ein DM-Grasp/BEN/SC1 Homologes – (Paschke et al., 1992; Lässig et al., 1994). Die Expression dieser Proteine korreliert zeitlich und räumlich mit Wachstum sowie Regeneration der RGZ Axone, und sie sind auf den regenerierenden Axonen und deren Wachstumskegeln vorhanden. Deshalb geht man davon aus, daß sie eine Rolle beim Auswachsen der RGZ Axone spielen (Skene, 1989; Stuermer et al., 1992; Bastmeyer et al., 1995). Im Fall des E587-Antigen konnte in in vitro Studien gezeigt werden, daß sowohl die Auswachsgeschwindigkeit um 30% und die Faszikulationsfähigkeit von RGZ Axonen des Goldfisches fast vollständig durch Anwesenheit eines funktions-neutralisierenden Antikörpers verringert war (Bastmeyer et al., 1995). Bei Säugern werden die entsprechenden Homologen dieser Proteine, wie beim Fisch, während der Embryonalentwicklung exprimiert (Jessel, 1988).

Man könnte nun annehmen, daß die Regeneration lediglich die Rekapitulation der in der Ontogenese ablaufenden Prozesse darstellt. Das ist aber nur im Prinzip richtig. Natürlich sind ähnliche Aufgaben zu bewältigen, wie etwa die Wegfindung von Axonen und der Aufbau einer funktionellen Verschaltung durch korrekte Synapsenbildung, doch mindestens zwei Dinge haben sich verändert. Zum einen ist das Neuron weiter differenziert, zum anderen hat

sich seine Umgebung verändert. Dies zeigt sich auch weiter unten in der Beschreibung des retinotectalen Systems des Goldfisches. Ein gutes Beispiel für den Unterschied zwischen den beiden Prozessen ist das M802 Antigen Reggie, dessen biochemische und molekularbiologische Charakterisierung das Thema der folgenden Arbeit war.

Der Goldfisch stellt somit ein gutes Modell dar, um funktionierende neuronale Regeneration im ZNS zu studieren, ihre Mechanismen und die Unterschiede zur Ontogenese zu verstehen.

Das retinotectale System des Goldfisches (*Carassius auratus*)

Das retinotectale System des Goldfisches weist gegenüber dem Sehsystem des Säugers – sieht man einmal von den anatomischen Unterschieden ab – zwei wichtige Unterschiede auf. Es ist in der Lage, nach einer Durchtrennung des Sehnervs innerhalb weniger Monate seine vollständige Funktion wiederzuerlangen. Nach ca. 20 Tagen lassen sich erste Aktionspotentiale in den retinorezipienten Schichten – hier terminieren die retinalen Ganglienzell (RGZ) Axone und machen erste Verschaltungen (Schmidt, 1985) – des Tectums ableiten. Diese sind zuerst nur grob retinotop (siehe unten) und werden dann innerhalb von ca. 80 Tagen verfeinert (Northmore 1989a, b). Dieser Zeitverlauf korreliert mit dem Eintreffen und der Reorganisation der regenerierenden RGZ Axone (Stuermer 1988a, b).

Außerdem wächst der Goldfisch und damit auch die Retina ein Leben lang, so daß sich selbst im adulten Tier Neurogenese und Wegfindungsprozesse studieren lassen.

Das retinotectale System des adulten Goldfisches besteht aus drei Teilen: der Retina, dem optischen Nerv und -Trakt sowie dem optischen Tectum (siehe zum Beispiel Schwassmann und Kruger, 1965; Sharma, 1972). Die im Auge befindliche Retina ist ein dünnes halbkugelförmiges Gewebe auf welches das visuelle Bild projiziert wird. Die Photorezeptoren – sie liegen zuunterst und machen den Großteil der Zellen in der Retina aus – geben ihre Signale an über ihnen liegende sekundäre Neurone (bipolare Zellen) und lateral projizierende Elemente (horizontale- und amakrine Zellen) weiter. Die Endstation dieser Verarbeitung sind die zuoberst liegenden retinalen Ganglienzellen (RGZs), welche Axone über den optischen Nerv, das optische Chiasma und den optischen Trakt in das kontralaterale optische Tectum aussenden (s.h. Abbildung a). Der optische Nerv besteht aus einzelnen Faszikeln von Axonen, wobei jedes Faszikel einem Ring von RGZs entspricht (Scholes, 1979; Easter, 1981; s.h. Abbildung b). Im Chiasma kreuzen die beiden optischen Nerven nahezu vollständig – im Gegensatz zu Säugern, bei denen nur die Hälfte der RGZ Axone im Chiasma kreuzen. Ziel dieser Axonfaszikel ist das

optische Tectum, welches eine geschichtete laminare Struktur darstellt (s.h. Abbildung c). Die einwachsenden RGZ Axone fächern beim Eintritt in das Tectum auf und ihre Axonendbäume terminieren in den retinorezipienten Schichten dem *Stratum opticum* (SO) und dem *Stratum fibrosum et griseum superficiale* (SFGS, s.h. Abbildung c).

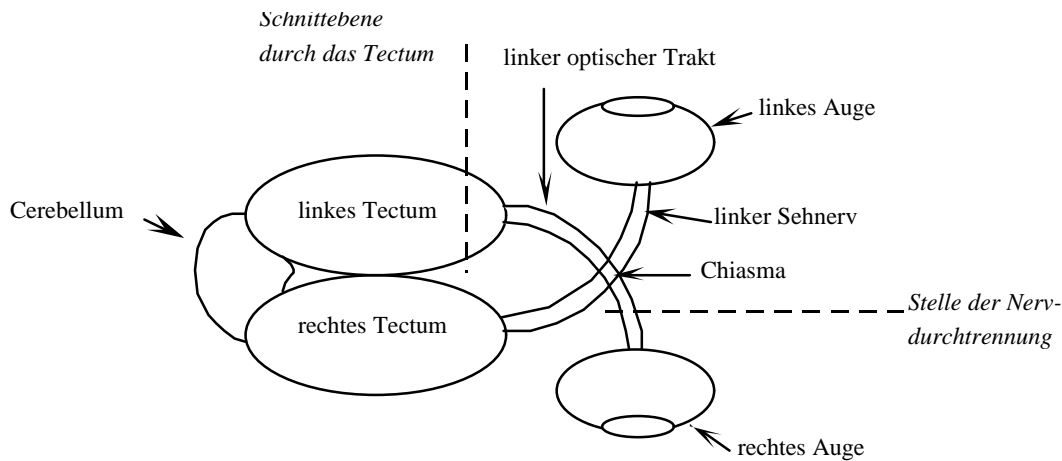


Abbildung a Schematische Aufsicht auf ein Goldfischgehirn. Rostral ist rechts. Die olfaktorischen Bulben und die Telencephali sind nicht dargestellt. Die gestrichelte Linie durch den optischen Nerv markiert die Stelle einer Nervendurchtrennung sowie den in Abbildung b dargestellten Querschnitt durch den optischen Nerv. Die gestrichelte Linie durch das Tectum markiert die Schnittebene durch das Tectum in Abbildung c.

Die Art der Projektion von der Retina zum optischen Tectum ist retinotop. Das heißt jeder Punkt auf der Retina – genauer gesagt auf der Ebene der RGZs – ist unter Erhalt der Nachbarschaftsbeziehung einem Punkt im Tectum zugeordnet. Diese Zuordnung folgt dabei einer einfachen Regelmäßigkeit. Die Projektion einer retinalen Ganglienzelle in das kontralaterale Tectum folgt nämlich dem Schema: dorsal → medial, ventral → lateral, rostral → anterior und temporal → posterior (s.h. Abbildung d).

Wie der gesamte Fisch, so wächst auch die Retina ein Leben lang. Neue Zellen – und auch RGZs – werden hierbei am Rand addiert (Johns, 1977). Diese neuen RGZs verhalten sich ähnlich wie embryonale Zellen, das heißt sie senden Axone in Richtung des kontralateralen Tectums über den Sehnerv aus. Auch hier existiert ein einfaches Ordnungsprinzip. Der Ring der neuen RGZs entspricht einem Bündel (Faszikel) an Axonen im optischen Nerv (Easter et al., 1981; s.h. Abbildung b). Dieses bildet sich an der Austrittsstelle des optischen Nervs in der Retina. Der optische Nerv wächst durch Addition dieser Faszikel entlang seiner Oberfläche. Demgegenüber, erweitert sich das optische Tectum entlang seiner Längsachse

(anterior/posterior) durch die Addition neuer Zellen am posterioren Ende. Um nun die retinotopie Karte aufrechtzuerhalten, müssen die Axonendbäume und deren Synapsen ständig verschoben werden. Dieser Vorgang wird als *shifting* bezeichnet (Easter und Stuermer, 1984).

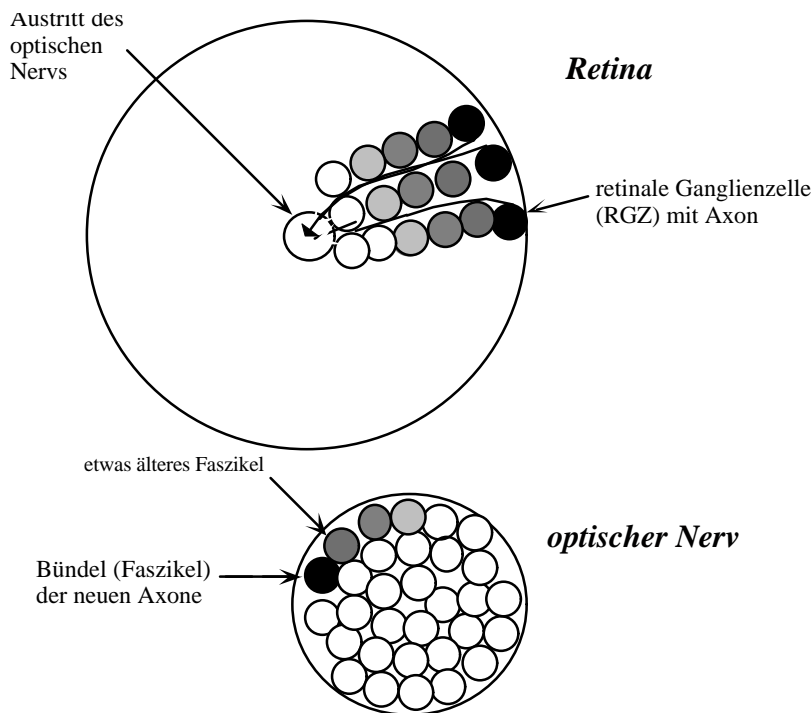


Abbildung b Schema einer Retina mit einigen wenigen eingezeichneten retinalen Ganglienzellen (RGZs) und deren Axonen. Je dunkler die RGZs dargestellt sind, desto jünger sind sie. Alle RGZs eines Alters liegen dabei auf konzentrischen Kreisen. Diese Altersordnung spiegelt sich auch im optischen Nerv wieder – hier Schema eines Querschnitts.

Nach einer Durchtrennung des optischen Nerven muß die retinotopie Ordnung wieder hergestellt werden. Dabei geschieht das Wiedereinwachsen der RGZ Axone in das kontralaterale optische Tectum relativ ungeordnet – jedenfalls im Vergleich mit dem Einwachsen embryonaler RGZ Axone in das tectale Neuropil (Stuermer und Easter, 1984). Die durch die Verletzung des optischen Nerven aufgebaute Ordnung ist das Ergebnis eines sukzessiven Wachstumsprozesses gewesen. Nach der Etablierung der retinotectalen Projektion im Embryo wachsen larvale und adulte RGZ Axone entlang älterer RGZ Axone (Stuermer und Raymond, 1989). Die so sukzessiv aufgebaute Ordnung wird auch als Altersordnung bezeichnet.

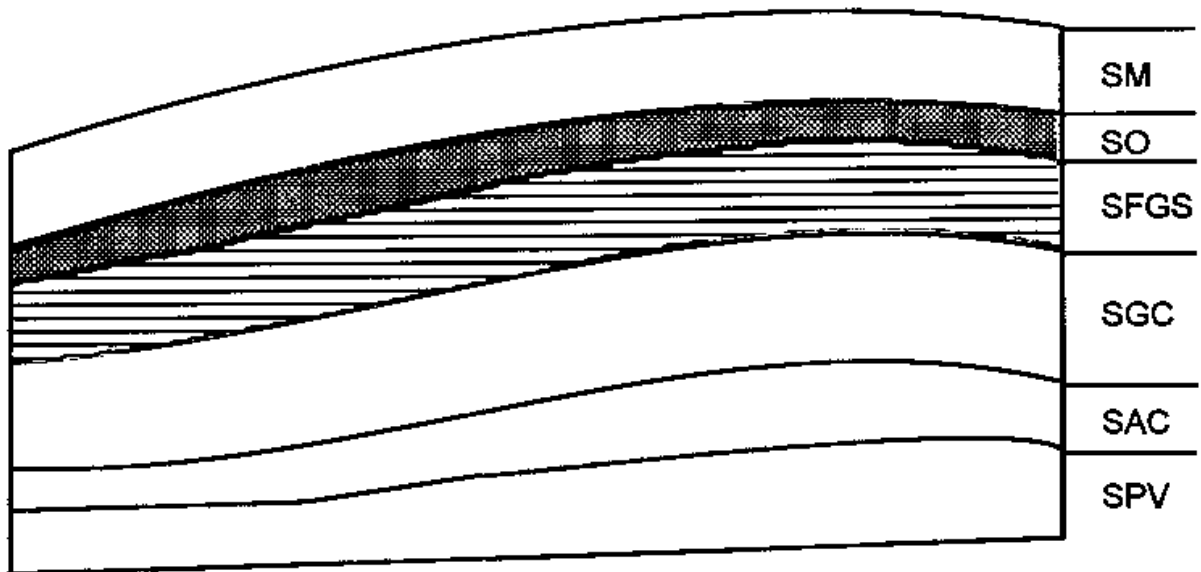


Abbildung c Querschnitt durch das optische Tectum eines adulten Goldfisches mit seinen 6 Schichten, SM: *Stratum marginale*, SO: *Stratum opticum*, SFGS: *Stratum fibrosum et griseum superficiale*, SGC: *Stratum griseum centrale*, SAC: *Stratum album centrale*, SPV: *Stratum periventriculare*. Die markierten Schichten (SO und SFGS) sind die retinorezipienten Schichten des optischen Tectums. Die meisten RGZ Axone gelangen über das SO (punktiert) in das optische Tectum und machen ihre synaptischen Kontakte im SFGS (schraffiert). Nach Meek, 1983.

Frühe Stadien (ca. 20 Tage nach Nervdurchtrennung) der axonalen Regeneration sind nicht retinotop (Stuermer und Easter, 1984, Northmore, 1989a). Innerhalb weniger Monate wird die volle Sehfähigkeit des Goldfisches wiederhergestellt. Durch einen anfangs von neuronaler Aktivität unabhängigen Mechanismus wird eine geordnete retinotop Karte wiederhergestellt, wobei es eines Prozesses neuronaler Aktivität bedarf, um die synaptischen Verschaltungen zu präzisieren (Stuermer, 1988a; Schmidt 1985, Northmore 1989b). Während dieser Zeit werden in den retinorezipienten Schichten des Tectums Axonendbäume aufgebaut und deren Position durch Astaufbau und Astabbau verschoben. Während dieser Regenerationsprozesse werden bestimmte Gene transient exprimiert, diese sind z.B. Oberflächenrezeptoren der Immunoglobulinsuperfamilie (Stuermer et al., 1992).

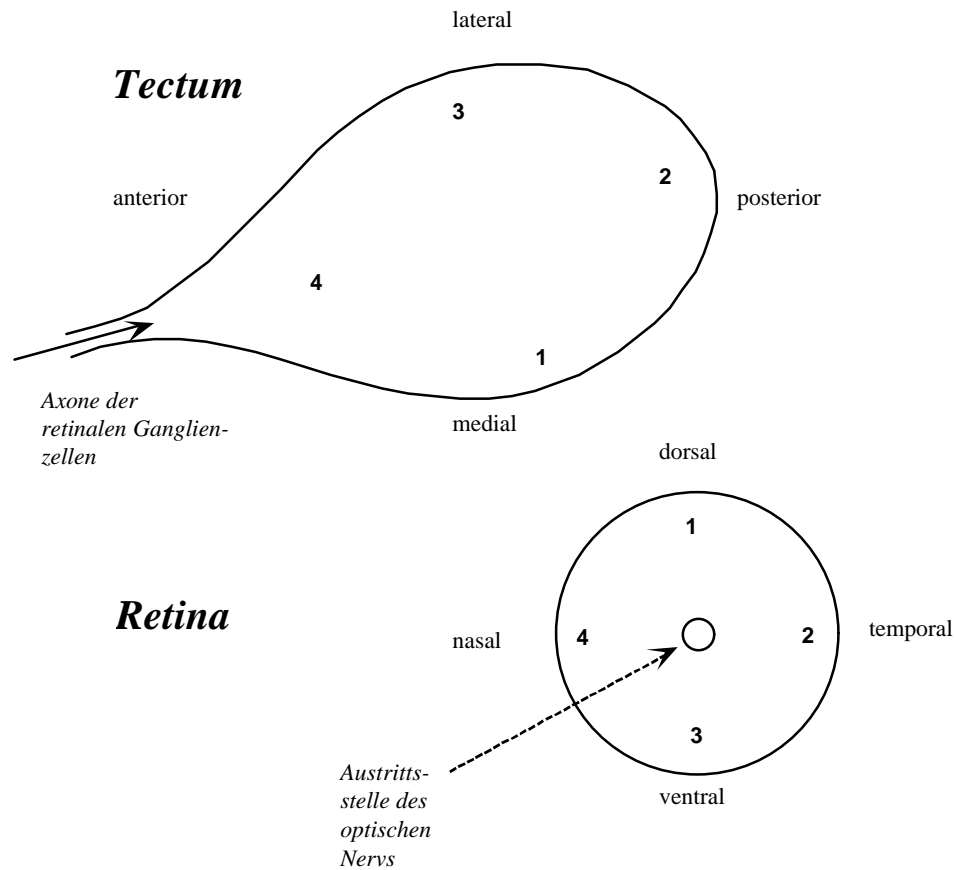


Abbildung d Retinotopie Ordnung zwischen der Retina und dem kontralateralen optischen Tectum. Zahlen in Retina und Tectum geben elektrophysiologisch verknüpfte Areale an (nach Schwassmann und Kruger, 1965). Das Tectum ist in der Aufsicht dargestellt, d.h. ventral geht in die Bildebene hinein.

Der monoklonale Antikörper M802

Eine in Vertebraten gangbare Strategie, Proteine zu identifizieren, die am axonalen Wachstum sowie der Regeneration beteiligt sind, ist die Produktion monoklonaler Antikörper gegen differentiell exprimierte Genprodukte. Dabei werden zuerst gegen sämtliche immunogenen Komponenten aus entsprechenden Gewebsfraktionen (hier optische Nerven nach einer ONS) Antikörper erzeugt. Die Differenzierung erfolgt dann durch ein geeignetes Auswahlverfahren. Im Fall des Goldfisches ist hierfür das *screening* auf Kryoschnitten des optischen Tectums oder des Chiasmas von Tieren nach einseitiger ONS sehr gut geeignet. Da nur ein Nerv regeneriert, dient die normale Seite des Präparats als Kontrolle. Tritt im regenerierenden Nerv oder dem Tectum kontralateral zur Läsion ein Signal auf, das in der Kontrollseite nicht zu sehen ist, dann ist das ein Kandidat für ein solches differentiell exprimiertes Gen. Durch die Wahl entsprechender Fraktionen, wie z.B. Zellmembranen, kann die Suche auf bestimmte Kompartimente der Zelle, hier der Zellmembran, beschränkt werden.

Dahinter verbirgt sich die Idee, daß ein Neuron nach einer Axotomie einen spezifischen Satz an Oberflächenrezeptoren benötigt, um Aufgaben wie Auswachsen von Axonen und deren Zielfindung zu lösen. Dieser Satz an Oberflächenrezeptoren wird nur transient exprimiert und nach erfolgreicher Regeneration wieder von der Oberfläche der Neurone und deren Zellkörpern entfernt.

Katja Paschke hat im Rahmen ihrer Doktorarbeit einen monoklonalen Antikörper generiert, der ein sehr interessantes zeitliches und räumliches Färbemuster aufweist. Es ist dies der MAK M802. Sein Antigen tritt nach einer Durchtrennung des optischen Nervs in den RGZs und ihren Axonen auf.

Obwohl das M802 Antigen an Regenerationsprozessen des optischen Nervs beteiligt ist – es wird jedenfalls hoch exprimiert – wird es anscheinend nicht während der Entwicklung des retinotectalen Systems exprimiert. Ein weiterer interessanter Punkt ist der zeitliche Verlauf seiner Expression. Zu einem Zeitpunkt, da andere wachstumsassoziierte Proteine, wie Neuroilin, nicht mehr detektierbar sind, werden erst maximale Proteinmengen des M802 Antigens in der gesamten retinotectalen Projektion sichtbar. Es scheint damit vor allem auch in sekundäre oder weitergehende Regenerationsprozesse involviert zu sein. Das Expressionsmuster des M802 Antigens im optischen Tectum ist auch in der Abbildung 1.4 ersichtlich.

	<i>Retina</i>	<i>optischer Nerv</i>	<i>optisches Tectum</i>
<i>sich entwickelndes retinotectales System</i>	innere Plexiform Schicht	nicht detektierbar	nicht detektierbar
<i>transiente Expression im adulten Goldfisch (ohne Läsion)</i>	neue RGZ- Zellkörper und -Axone	Bündel der neuen Axone und deren Zellkörper	nicht detektierbar
<i>transiente Expression im adulten Goldfisch nach ONS</i>	RGZ- Zellkörper und deren regenerierende Axone (nach ca. 5-6d, mindestens bis 129 d post ONS)	regenerierende Axone (erstes Signal nach ca. 18 d, Maximum nach ca. 129 d, nach 370 d nicht mehr nachweisbar), Mikroglia (3 d)?	SO und SFGS (nach ca. 21 d, Maximum ca. 129 d, nicht mehr nachweisbar nach ca. 8 Monaten)
<i>konstitutive Expression im ZNS des adulten Goldfisches</i>	innere Plexiform Schicht und Blutgefäß-Endothelien	Blutgefäß-Endothelien	Blutgefäß-Endothelien

Tab. a Zusammenfassung der Immunhistochemischen Daten des M802 Antikörpers (größtenteils aus Paschke, 1990 entnommen).

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- Die biochemische Charakterisierung des M802 Antigens und seine Isolierung
- Die Klonierung der entsprechenden cDNA(s)
- Die Generierung neuer Antikörper gegen Reggie
- Die Untersuchung der Genexpression des M802 Antigens

KAPITEL 1

ERGEBNISSE

1.1 Biochemische Charakterisierung des M802 Antigens (Reggie)

Das M802 Antigen (Reggie) ist auf der Oberfläche von retinalen Ganglienzell-Axonon lokalisiert (Paschke, 1990). Im Western Blot wurde es als 47 kD Protein unter reduzierenden Bedingungen beschrieben. Immunoaffinitätsgereinigtes M802 Antigen wurde als Triplet von 47, 118 und 175 kD unter nicht reduzierenden Bedingungen beschrieben (Paschke, 1990). Allerdings weisen diese Western Blots nur schwache Signale auf. Hinzu kommt, daß der zur Detektion benutzte Antikörper Ziege anti Maus H+L, HRP konjugiert (von Dianova), in *Western Blots* von Goldfisch Hirn Membranfraktionen allein schon zwei Banden bei 50 und 120 kD erkennt, wenn auch mit geringer Intensität. Deshalb wurde versucht mit der nachweisstärkeren Methode des *Enhanced Chemoluminescence* (ECL, Amersham) sowie alternativ durch Immunpräzipitation mit dem M802 Antikörper diese Befunde zu verifizieren.

1.1.1 Das M802 Antigen (Reggie) hat ein Molekulargewicht von ca. 48 kD im Western Blot

Zur Western Blot Analyse wurden Membranmikrosomenpräparationen (s.h. 3.2.1.6) aus adulten Goldfischhirnen mit jeweils einem der unten aufgeführten Puffer extrahiert und die lösliche Fraktion (jeweils 50µg Protein) mittels SDS PAGE und Western Blot mit dem M802 Antikörper analysiert. Als Kontrolle diente der Antikörper E587 (Vielmetter et al., 1989). Dieser erkennt ein integrales Membran-protein von 200 kD apparentem Molekulargewicht.

- *OGP Puffer*: 3% OGP; 20 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl
- *TX-100 Puffer*: 1% Triton X-100 ;20 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl
- *Harnstoff Puffer*: 8M Harnstoff in 20 mM Tris-HCl pH 7,4
- *Hochsalz Puffer*: 500 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl pH 7,4

Bei einem 25 fachen Überschuß an M802 Antikörper (50 µg/ml) zum Detektionsantikörper Ziege anti Maus HRP konjugiert (2 µg/ml), wurde bei allen 4 Extrakten eine Bande von ca. 48 kD apparentem Molekulargewicht detektiert (Abbildung 2.1). Bei der Hochsalz Extraktion zeigten sich neben der Bande bei ca. 48 kD noch jeweils eine Bande bei ca. 50 kD und eine bei ca. 100 kD, wenn auch letztere mit geringerer Intensität (Abbildung 2.1). Die SDS PAGE verlief in allen Fällen unter nicht reduzierenden Bedingungen. Unter reduzierenden Bedingungen (10 mM DTT oder 5% 2-Mercaptoethanol) kommt es zu keiner Bindung des M802 Antikörpers mehr. In der Kontrolle mit dem E587 Antikörper erschien nur ein Signal bei 200 kD apparentem Molekulargewicht. Demnach sind die Signale bei 48, 50 und 100 kD auf die Bindung des M802 Antikörpers zurückzuführen. Es zeigte sich, daß *Triton X-100* als Detergens gut geeignet ist, das M802 Antigen aus Membranfraktionen in Lösung zu bringen. Es ist zudem relativ billig und außerdem, im Gegensatz zu Harnstoff, kompatibel mit der Immunoaffinitätschromatographie.



Abbildung 2.1 Western Blot Analyse von Extrakten aus Gesamtmembran-Präparationen von Goldfischgehirnen. Linke Seite: 1-3: 8 M Harnstoff (1. M802; 2. Kontrolle, nur sekundärer Antikörper; 3. E587). 4-6: 1% TX-100 (gleiche Reihenfolge wie bei Harnstoff). Rechte Seite: 1+3: Hochsalz Puffer; 2+4: OGP Puffer; SDS PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen. Konzentration an Primärantikörper: 50 µg/ml; Konzentration an Sekundärantikörper: 2µg/ml. Der Nachweis erfolgte mit ECL.

1.1.2 Das immunoaffinitätsgereinigte M802 Antigen (Reggie) hat ein apparentes Molekulargewicht von 48 kD in der SDS PAGE

Zur Identifizierung des Antigens mußten größere Mengen (50-100 µg) des Proteins mit ausreichender Reinheit gewonnen werden. Aus gesamten Hirnen adulter nicht nervdurchtrennter Goldfische war die Ausbeute an Reggie gering, außerdem ist der Aufwand der Gewebepreparation groß. Als eine sehr viel günstigere Quelle für Reggie erwiesen sich 30 bis 60 Tage alte Goldfischlarven. Diese exprimieren, auch außerhalb des Nervensystems, Reggie (nachgewiesen durch M802 Immunhistochemie an Kryoschnitten). Neben der Haut weisen auch innere Organe, wie der Darm und vor allem die Milz ein starkes Signal in der Immunfluoreszenz auf. Ausgehend von einem existierenden Protokoll zur Affinitätsreinigung des integralen Membranproteins ICAM-1 aus humanem Tumorgewebe (Staunton et al., 1988) wurden ganze Goldfischlarven (30-60 d, 80 g) in TNCE Puffer (s.h. Abbildung 2.2 und 3.1.2.4) mit Hilfe eines Polytrons homogenisiert. Nach einer Anreicherung der Membranzymosomen und einer *Triton X-100* Extraktion wurde diese Fraktion über eine M802-Affinitätssäule (50 mg M802 an 6 ml *Mini-Leak*, Vorsäule 3 ml CNBr Sepharose mit E587 Antikörper) gepumpt. Nach dem Waschen der Säule mit Aufgabe-, Hochsalz- und Niedrigsalzpuffer (s.h. Abbildung 1.1 und Tabelle 1.1) wurden die Elutionsbedingungen unter Kontrolle der UV-Absorption bei 280 nm getestet. Außerdem wurden die Fraktionen aufgefangen und Aliquots davon mittels SDS PAGE analysiert. Das Ergebnis ist in folgender Tabelle aufgeführt. Das unter pH 12,0 eluierte 48 kD Protein ist in der Abb. 1.3b zu sehen. Das von der Immunoaffinitätssäule eluierte Protein erscheint in der SDS PAGE (nach Schägger) als Protein mit apparentem Molekulargewicht von ca. 300 kD, wenn sich nicht genügend SDS im Probenpuffer befindet. Bei einer Steigerung der SDS Konzentration von 1% auf 3% im Probenpuffer, war statt dessen nur noch eine Bande bei 48 kD sichtbar.

<i>Puffer</i>	<i>UV Absorption bei 280 nm/Bande im SDS PAGE</i>
50 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5% N-Octylglucopyranosid (OGP)	niedermolekulare Banden, beim Kontrollantikörper E587 erscheinen aber die gleichen Banden, möglicherweise C-Typ Lektine
100 mM Glycin-HCl pH 2,5; 0,5% OGP	keine
100 mM Triethylamin-NaOH pH 12,0; 0,5% OGP	starke Absorption, 48 kD Bande

Tabelle 1.1 getestete Elutionsbedingungen für die Immunoaffinitätsreinigung von Reggie mittels M802.

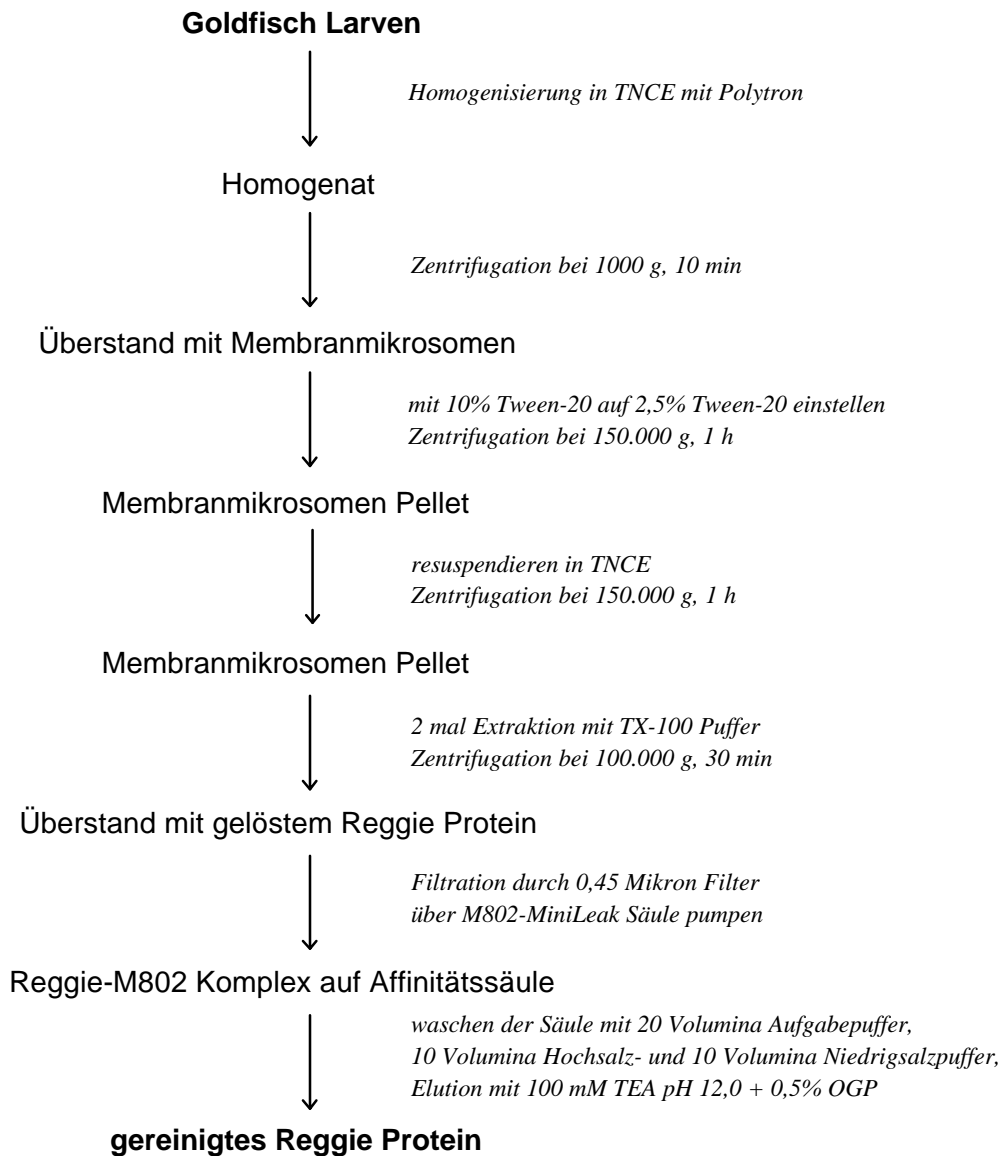


Abbildung. 1.2 Schema der Immunoaffinitätsreinigung des 48 kD Reggie: TNCE: 140 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 2 mM CaCl₂; 1 mM EDTA. TX-100 bzw. Aufgabepuffer: 2% Triton X-100; 150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM CaCl₂; 1 mM EDTA Hochsalz-Puffer: 500 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1% Nonidet P40; Niedrigsalzpuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5% Octylglucopyranosid (OGP); Elutionspuffer: 100 mM Triethylamin-NaOH (TEA) pH 12,0; 0,5% OGP

1.1.4 Immunoaffinitätsgereinigtes Reggie aus gesamten Goldfischlarven besteht aus einer Reihe von Isoformen mit verschiedenen isoelektrischen Punkten .

Mit ca. 5µg des immunoaffinitätsgereinigten Proteins wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt, um die Homogenität (bzw. Heterogenität) des Materials zu untersuchen. Nach Fällung aus 2 ml Eluat mittels Trichloressigsäure (Endkonzentration 10%, s.h. 3.2.1.12) erfolgte eine isoelektrische Fokussierung (pH Gradient 4-7; s.h. 3.2.1.9) mit anschließender SDS PAGE (s.h. 3.2.1.7). Das Ergebnis ist in Abbildung 1.2a dargestellt. Es

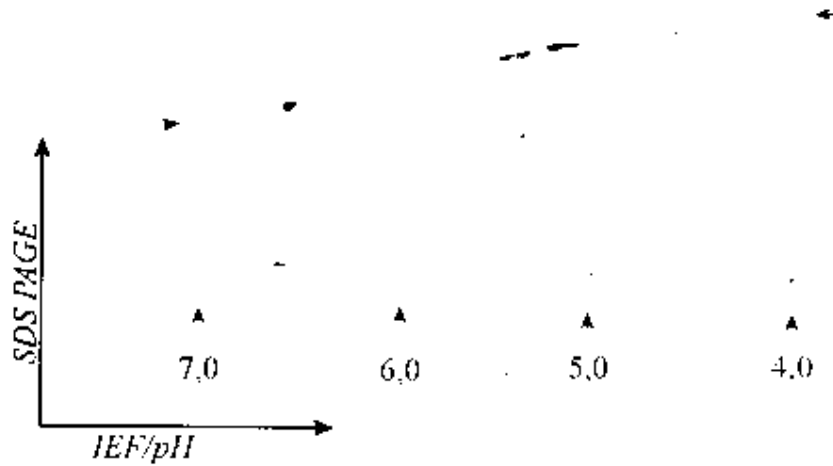
zeigen sich als Hauptbestandteile 6 Banden bei ca. 48 kD Molekulargewicht mit folgenden isoelektrischen Punkten 6,6; 5,4; 5,3; 5,1; 5,0 und 4,7.

1.1.5 Die Mikrosequenzierung des 48 kD Reggie Proteins führte zur Bestimmung von 8 partiellen Aminosäuresequenzen

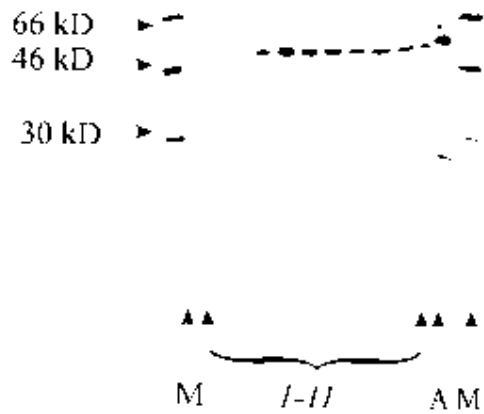
Sämtliche Protein Mikrosequenzierungen wurden von Dr. Friedrich Lottspeich am Max Planck Institut für Biochemie (Abteilung für Proteinanalytik) durchgeführt.

Aus 250 g Goldfischlarven (30-60 d) wurden mit Hilfe der in Abbildung 1 beschriebenen Reinigungsmethode ca. 50-100 µg Reggie Protein isoliert. Diese Abschätzung erfolgte in einem silbergefärbten Polyacrylamidgel mit einer BSA Standardreihe. Da das gereinigte Protein eine hohe Reinheit aufwies (s.h. Abbildung 1.3b), wurde es direkt in eine Spaltung mit der Endoproteinase RLysC eingesetzt (Dr. F. Lottspeich), diese spaltet nach Lysinresten. Nach einer Reversphasen HPLC wurden die so erhaltenen Peptidfraktionen mittels Edman Abbau N-terminal sequenziert. (Applied Biosystems 474 A Sequenzierautomat mit einem Applied Biosystems 120A PTH Analysator). Aus der Sequenzierung gingen insgesamt 7 partielle Peptidsequenzen hervor (RLysC1-RLysC7), diese sind in Abbildung. 1.3c dargestellt. Eine kleinere Menge des gereinigten Proteins (ca. 5µg) wurde nach SDS PAGE Trennung und Transfer auf eine *Glassybond* Membran N-terminal ansequenziert (Dr. F. Lottspeich). Daraus resultierte die Sequenz N-term in Abbildung 1.3c.

a.



b.



c.

N-term.: MEYDCGPN~~E~~AMVVS~~G~~
RLysC1: AEAYQQYGEAAK
RLysC2: AAFNQE~~V~~N~~T~~IK
RLysC3: GRAKAEQMAK
RLysC4: IGEAEAGSIEAVGK
RLysC5: KRDAV
RLysC6: TGEA
RLysC7: AQVQRDA

Abbildung 1.3 a) 2-D Gel Analyse ca. 5 µg immunaffinitätsgereinigten Reggie Proteins. 1. Dimension IEF pH 4-7; 2. Dimension SDS PAGE (Lämmli); Zu erkennen sind 6 Proteine bei ca. 48 kD (Pfeile) mit pIs von 6,6; 5,4; 5,3; 5,1; 5,0 und 4,7. b) Elutionsprofil einer M802-Mini-Leak Agarose Säule nach Elution mit 100 mM Triethylamin pH 12,0. M: Molekulargewichtstandards, A: monoklonakler Antikörper M802 (100 ng), 1-11 Elutionsfraktionen. Zu erkennen ist die hohe Reinheit des Proteins. Eine leichte Kontamination mit Antikörper ist lediglich in Fraktion 4 zu erkennen. Gelsystem Tris/Tricin, alkalisch; Silberfärbung; c) partielle Aminosäuresequenzen, die aus dem in b gezeigten Protein nach direkter Sequenzierung (N-terminal und nach RLysC-Spaltung) erhalten wurden.

1.1.6 Drei neue Antiseren und drei neue monoklonale Antikörper gegen Reggie

Ausgehend von immunoaffinitätsgereinigtem Reggie Protein wurden 2 verschiedene Strategien zur Produktion neuer Antikörper verfolgt. a) Ein polyklonaler Antikörper sollte durch Immunisierung mit SDS PAGE gereinigtem Protein (48 kD) erzeugt werden. b) Neue monoklonale Antikörper sollten produziert werden. Für die Immunisierung der *balb/c* Maus fand immunoaffinitätsgereinigtes Reggie (ohne weitere Aufreinigung) Verwendung.

a) Das Material einer Immunoaffinitätsreinigung (ca. 15µg) wurde nach TCA Fällung über ein 8%iges SDS PAGE Gel gereinigt und nach Elektroelution (s.h. 3.2.1.13) auf drei Aliquots verteilt und damit ein Kaninchen immunisiert (Nr. 446). Der Titer des 446-Serums stieg kontinuierlich von der ersten zur dritten Immunisierung an (s.h. Abbildung 0-3 a + b). Eine vierte Immunisierung mit der ungefähr gleichen Menge an Antigen erbrachte keine weitere Steigerung des Titers mehr. So brauchbar das 446 Serum in *Western Blots* auch ist, so unbrauchbar ist es für die Detektion des M802 Antigens in Kryoschnitten von Hirnen adulter Goldfische. Über dem starken Hintergrund, einer wahrscheinlich auf Filamente und Cytokeratine zurückzuführenden Färbung, lassen sich keine M802 spezifischen Strukturen anfärben. Diese filamentöse Färbung tritt schon bei Verwendung der Kaninchen 0-Seren auf.

b) Es wurden 2 *balb/c* Mäuse (Maus 0 und 1) mit dem Eluat einer M802-Immunoaffinitätssäule immunisiert. Die Immunisierung geschah nach folgendem Schema:

1. Immunisierung: 3µg Reggie in 100 µl (ankonzentriert durch Ultrafiltration mit 30 kD Filtron Einheiten aus ca. 1 ml) mit der gleichen Menge komplettem Freund's Adjuvans, subkutan.

2-4. Immunisierung nach jeweils 2 Wochen mit gleichen Mengen an Reggie in inkomplettem Freund's Adjuvans, subkutan.

5. Immunisierung 3 Tage vor der Entnahme der Milz und der Fusion mit Myeloma Zellen mit der gleichen Menge an Reggie, intravenös, ohne Adjuvans.

In Abbildung 1.5b ist das Ergebnis der Immunisierung dargestellt, 10 d nach der 4. Immunisierung wurden die 0-Seren der beiden Mäuse im Western Blot auf immunoaffinitätsgereinigtem Protein (je 100 ng pro Spur) analysiert. Das Serum der Maus 0 erkennt deutlich eine Bande von 48 kD unterhalb der Bande der schweren M802 Kette (Kontamination durch „Bluten“ der M802 Säule). Außerdem erkennt das Serum im Western Blot noch weitere Banden, unter anderem bei 20 kD (leichte Kette des M802). Das Serum der Maus 1 liefert bei 48 kD ein deutlich schwächeres Signal, erkennt aber sonst die gleichen Banden wie das Serum

der Maus 0. Zusätzlich liefert das Maus 1 Serum ein Signal bei ca. 25 kD. Dieses Protein wird vom Serum der Maus 0 nicht erkannt. Neben der Western Blot Analyse wurden die Seren auch auf Kryoschnitten getestet. Abbildung 1.4 zeigt das Ergebnis. Aus der Fusion der Maus 0 traten insgesamt 2 Antikörper hervor, die ein dem M802 identisches „Färbemuster“ aufwiesen (M72, M343). Alle drei Antikörper erkennen die gleichen Strukturen wie der M802 Antikörper: 1. die konstitutive Blutgefäßendothelfärbung und 2. die transiente (im Bereich von 21 d bis ca. 200 d nach Nervdurchtrennung) diffuse Färbung in den retinorezipienten Schichten (SO und SFGS) des optischen Tectums (Paschke, 1990).

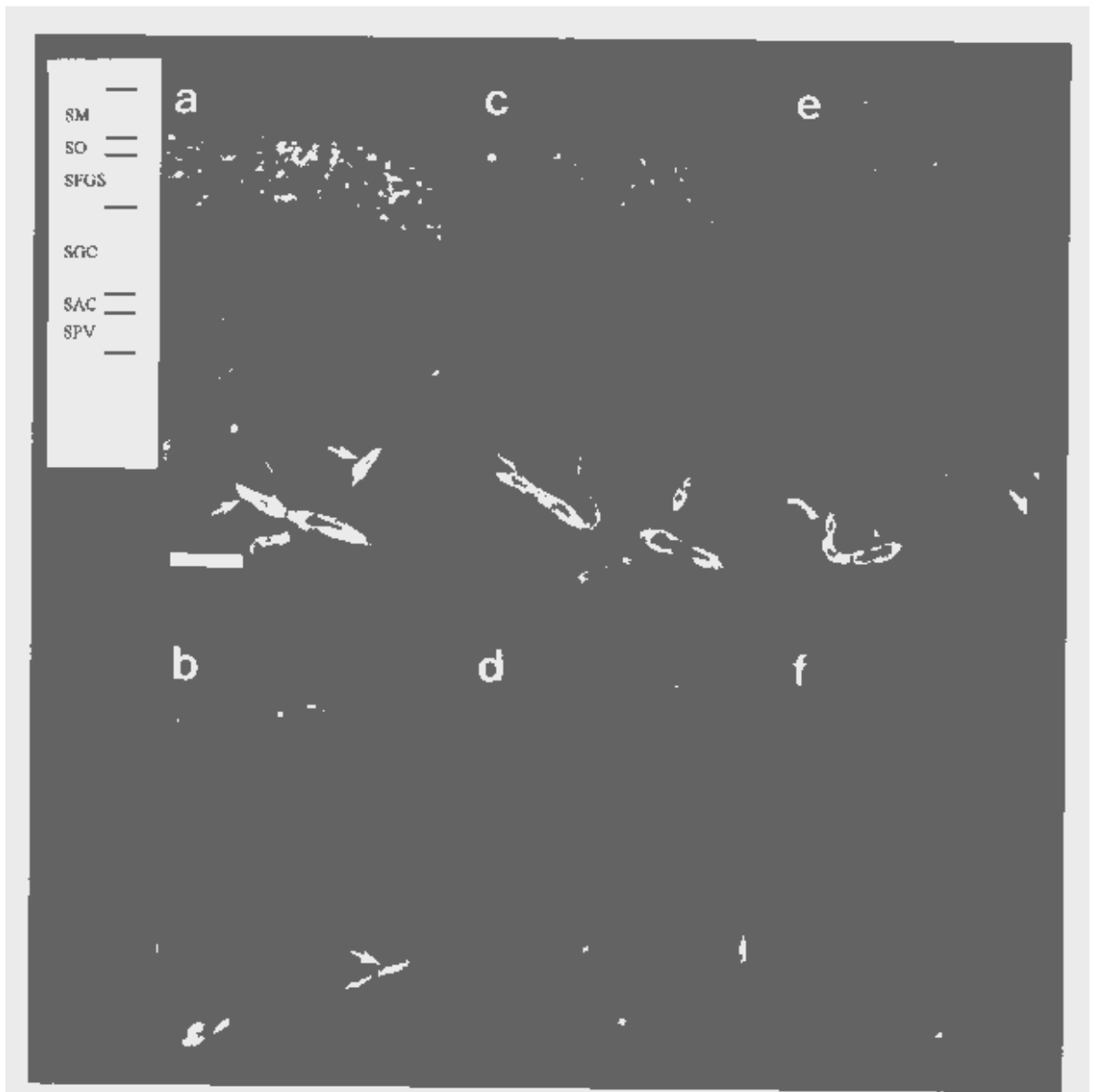


Abbildung 1.4 Neue Antikörper gegen Reggie: Immunofluoreszenz an Querschnitten von Goldfischgehirnen auf der Ebene des optischen Tectums an Tieren 61 d nach einer einseitigen Nervdurchtrennung (ONS). a: M802 / kontralateral zur ONS; b: M802 / ipsilateral zur ONS (Kontrollseite); c: M72 / kontralateral zur ONS; d) M72 / ipsilateral zur ONS (Kontrollseite); e) M343 / kontralateral zur ONS; f: M343 / ipsilateral zur ONS (Kontrollseite).

1.1.7 Das M802 Antigen ist wasserlöslich, membranassoziiert und ein peripheres Membranprotein

Das M802 Antigen (Reggie) präsentiert sich in der Immunhistochemie als Zelloberflächenmolekül (Paschke, 1990) und findet sich in der Membranfraktion von Zellen. Sind Reggie Proteine integrale Membranproteine, sind sie kovalent über einen Membrananker mit der Zellmembran verbunden oder sind sie nicht kovalent assoziiert mit der Membran oder einem Membranprotein? Um diese Frage zu klären, wurden Goldfischlarven (100 g), nach Homogenisierung in H-Puffer, durch einen einstufigen Saccharosegradienten fraktioniert (50% w/v Saccharose; s.h. 3.2.1.6). Zur Markierung der Proteine in der löslichen Fraktion und der Membranfraktion wurde diese mittels N-Hydroxysuccinimido-d-Biotin biotinyliert (s.h. 3.2.1.6). Darauf folgte eine sukzessive Extraktion der Hälfte der Membranfraktion mit 500 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl pH 7,4 (Hochsalzfraktion), 100 mM Triethylamin-NaOH pH 11,0 (Alkalifraktion) und *Triton X-100* Lysispuffer (Triton-Fraktion). Die andere Hälfte der Membranfraktion wurde direkt einer Extraktion mit *Triton X-100* Lysispuffer unterzogen. Nach einer Immunoaffinitätsreinigung der entsprechenden Überstände mittels M802-Mini-Leak Agarose (s.h. 3.2.1.3) wurden sie einer SDS PAGE (s.h. 3.2.1.7) unterzogen, die Proteine auf eine Cellulosenitrat Membran transferiert (s.h. 3.2.1.14) und die biotinmarkierten Proteine über Streptavidin-HRP *ECL* Detektion nachgewiesen. In Abb. 1.5c ist das Ergebnis dargestellt. In der löslichen Fraktion konnte kein markiertes Protein nachgewiesen werden. In der Hochsalzfraktion und der Alkalifraktion fanden sich jeweils gleich starke Signale bei ca. 50 kD. In der Triton-Fraktion nach Hochsalz- und Alkaliextraktion konnte nur noch ein sehr schwaches Signal bei ca. 50 kD detektiert werden. In der Kontrolle mit direkter Triton-Extraktion fand sich ein starkes Signal bei ca. 50 kD und ein schwächeres bei ca. 45 kD. Reggie läßt sich demnach praktisch quantitativ durch Hochsalz und pH 11 in Lösung bringen. Das M802 Antigen (Reggie) ist also ein wasserlösliches Protein, das wahrscheinlich durch ionische Interaktionen mit der Zellmembran assoziiert ist. Eine weitere Möglichkeit ist eine alkalilabile Bindung an einen Membrananker (Thioester, s.h. Diskussion, 2.3).

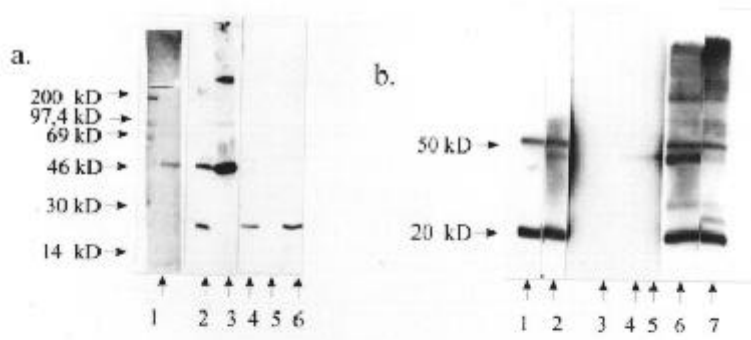
Mit Hilfe des 446 Antiserums (s.h. 1.1.6) gegen gelgereinigtes 48 kD Reggie-Protein wurde dieser Versuch mit optischem Tecta von Goldfischen (4 Wochen nach Nervdurchtrennung) wiederholt. Da dieses Serum Reggie im Western Blot zu detektieren vermag, konnte auf eine Markierung der Proteine mit Biotin verzichtet werden. Des weiteren wurde eine Extraktion mit 100 mM DTT in 100 mM Tris pH 7,4 durchgeführt. Als Detergens fand anstatt *Triton X-100* Octylglucopyranosid (OGP) Verwendung, da dieses kompatibel mit der SDS

PAGE ist. In Abb. 1.5d ist das Ergebnis dargestellt. Eine 48 kD Bande ist in der löslichen Fraktion nicht nachweisbar, allerdings eine Doppelbande bei 70 kD. Die direkte OGP Extraktion der Membranfraktion setzt die gleiche 70 kD Doppelbande frei, aber auch ein Protein von ca. 50 kD. Dagegen wird bei der Behandlung mit Hochsalz-Puffer (500 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,4) und alkalischem Puffer (100 mM Triethylamin-NaOH pH 11,0) ein 48 kD Protein freigesetzt. Die nachfolgende OGP Extraktion setzt dann das 50 kD Protein und die 70 kD Doppelbande frei. Die DTT Behandlung der Membranen setzt alle 4 Proteine frei, allerdings mit geringerer Effizienz.

Das Antiserum 446 erkennt in Membranen des optischen Tectums des Goldfisches (4 Wochen nach Nervdurchtrennung) 4 verschiedene Proteine. Diese unterscheiden sich in ihrem Löslichkeitsverhalten gegenüber dem Detergens OGP und Hochsalz bzw. pH 11,0.

Abbildung 1.5 (nächste Seite)

- a) Immunoblot mit HRP-*ECL* Entwicklung von affinitätsgereinigtem Reggie mit verschiedenen Reggie Antikörpern, 1: mit Aurodye angefärbter Blotstreifen, um gesamtes Protein zu visualisieren 2: Serum Maus-0.3(1/5000) 3: Serum 446.3 (1/5000) 4: M802 (Hybridoma Überstand) 5: nur sekundärer Antikörper anti Kaninchen HRP (1/2000) 6: nur sekundärer Antikörper anti Maus HRP (1/10000)
- b) wie a, aber 1: sekundärer Antikörper anti Maus HRP; 2: M802 (Hybridoma Überstand) 3-6: Serum 446.0-3; 7: Serum Maus-0.3; 8: Serum Maus-1.3 (alle Antikörper, außer M802 in 1/5000 Verdünnung);
- c) Extraktion von Membranen optischer Tecta von Goldfischen (4 Wochen nach Nervdurchtrennung) mit 3% Octylglucopyranosid (OGP) in 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM Triethylamin-NaOH pH 11,0; 0,5 M NaCl in 10 mM Tris-HCl pH 7,4 sowie 100 mM DTT in 100 mM Tris pH 7,4; lösliche Fraktion: wasserlösliche Fraktion. Nachweis nach SDS PAGE und Transfer auf PVDF Membran mit 446.3 Serum (1/5000), anti Kaninchen-HRP (1/1000) und *ECL*;
- d) Extraktion von Goldfisch Larven Gesamtmembranen nach Biotinmarkierung mit: 2: 500 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 3: 100 mM Triethylamin-NaOH pH 11,0; 4: *Triton X-100* Extraktion nach 2 und 3; 5: direkte *Triton X-100* Extraktion der Membranen; 1: lösliche Fraktion M: biotinylierte Molekulargewichtstandards; Nachweis nach SDS PAGE und Transfer auf Cellulosenitrat mit Streptavidin-HRP (1/1000 in 10 mM Tris pH 8,0) mit *ECL*.



1.2 Klonierung von 2 verschiedenen Reggie cDNA Partialklonen (Reggie-1 und Reggie-2)

Die von Friedrich Lottspeich (MPI für Biochemie, Martinsried) durch Mikrosequenzierung bestimmten Peptidsequenzen (s.h. Abbildung 1.3c und Tabelle 1.2), ließen sich anfangs noch keinem bereits bekannten Protein mit ausreichender Sicherheit zuordnen. Lediglich die RLysC1-Sequenz enthält ein Konsensusmotiv für γ -Tubuline (YQQY, Datenbankrecherche mit Hilfe des *Blast server*, NCBI, USA). Zur Klonierung kompletter cDNAs, mußten zuerst cDNA Partialsequenzen mittels PCR (*Polymerase chain reaction*) kloniert werden. Die so erhaltenen Klone, sollten dann über ein λ -cDNA-Bibliothek *screening* zur Isolierung von vollständigen cDNA Klonen führen. Sinnvoll für die Ableitung degenerierter Oligonukleotidprimer (*guessmers*) erschienen die N-terminale Peptidsequenz und die internen Peptidsequenzen RLys1,2,3 und 5. Es sind eindeutige Sequenzen, und sie besitzen eine ausreichende Länge für die Ableitung von *guessmers*. Des weiteren sind Aminosäuren wie Methionin und Tryptophan sowie Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin und Lysin für die Ableitung von Oligonukleotiden günstig, da sie von nur einem bzw. zwei Codons kodiert werden. Außerdem sollten die randständigen Aminosäurereste der Peptidsequenzen nicht für den Entwurf der Oligonukleotide benutzt werden, um spätere PCR-Produkte als „echt“ identifizieren zu können. Als Ausgangsmaterial diente mittels oligo-dT-Cellulose angereicherte polyA⁺ RNA (5 μ g) aus Retina von Goldfischen 14 d nach Durchtrennung des optischen Nervs (ONS) (s.h. 3.2.2.17). Die Synthese der Erststrang cDNA Matrize erfolgte unter Verwendung eines dT₁₂₋₁₈ *Primer*. Diese Matrize wurde daraufhin in insgesamt 16 verschiedene PCRs eingesetzt (s.h. 3.2.2.10). Die 16 Reaktionen beinhalteten alle möglichen Kombinationen, der aus den Peptidsequenzen N-term und RLysC1-3 und RLysC5 abgeleiteten *Primer* (s.h. Tabelle 1.2) und hatten folgende Produkte zur Folge (*annealing* Temperatur: 50°C; Zyklen 35; weitere Parameter s.h. 3.2.2.10):

RNT1/R6: 0,3 kb und 1 kb und weitere Produkte (s.h. Tabelle 1.3 und Abbildung 1.6)

R3/R2: 389 bp (s.h. Tabelle 1.3 und Abbildung 1.6)

Da die Kombination aus RNT1/R6 kein sauberes Produkt ergab, wurde es einer Reamplifikation mit dem Primer RNT2 unterzogen, welcher ebenfalls aus der N-terminalen Sequenz abgeleitet worden war, aber 14 Basen weiter in Richtung des 3'-Endes liegt. Ergebnis dieser Reaktion (nach 1/100 Verdünnung der ersten PCR und 20 Zyklen) war ein einzelnes

Produkt von 1 kb Größe. Dieses Produkt ergab sich auch bei der direkten Reaktion mit der cDNA Erststrang Matrize und der Kombination RNT2/R6 (s.h. Tabelle 1.3; *annealing* Temperatur: 50°C; Zyklen 35; weitere Parameter s.h. 3.2.2.10).

<i>Peptid</i>	<i>abgeleitete Oligonukleotide</i> ¹
<i>N-Term.</i> :MFYTCGPNEAMVVSG	<i>RNterm1</i> : 5'-TGTTYTAYAGITGYGGICC-3' (<i>sense</i> , Met 1 bis Pro 7) <i>RNterm2</i> : 5'-GGICCIAAYGARGCIATG-3' (<i>sense</i> , Cys 5 bis Met 11)
<i>RLysC1</i> : AEAYQQYGEEAAK	<i>R1</i> : 5'-GARGCITAYCARCARTAYGG-3' (<i>sense</i>) <i>R2</i> : 5'-GCYTCICCRTAYTGYTGRTA-3' (<i>antisense</i>)
<i>RLysC2</i> : AAFNQEVNTK	<i>R3</i> : 5'-CITYAAYCARGARGTIAAYAC-3' (<i>sense</i>) <i>R4</i> : 5'-TRTTIACYTCYTGRTRAAIGC-3' (<i>antisense</i>)
<i>RLysC3</i> : KDRAEAEQMAK	<i>R5</i> : 5'-GCIGARGCIGCITGGATGGC-3' (<i>sense</i>) <i>R6</i> : 5'-GCCATCCAIGCIGCYTCIGC-3' (<i>antisense</i>)
<i>RLysC5</i> :KRIGEAEAGSIEA VGK	<i>R7</i> : 5'-GARGCIGARGCIGGITCIATHGA-3' (<i>sense</i>) <i>R8</i> : 5'-TCDATIGAICCGCYTCIGCYTC-3' (<i>antisense</i>)

Tabelle 1.2 Zur PCR Klonierung von Reggie kodierenden cDNA Partialklonen benutzte Peptidsequenzen und die daraus abgeleiteten Oligonukleotidprimer (in IUPAC Nomenklatur).

Nach der Subklonierung (s.h. 3.2.2.11) und anschließender Sequenzierung (mit *M13*- oder *reverse-Primer*, s.h. 3.2.2.15) stellten sich beide Produkte als Reggie kodierende cDNAs heraus (Kriterium s.o.). Die erhaltenen DNA Sequenzen beider Klone zeigen keinerlei Überlappung und sind zu 50% identisch. Die aus den cDNA Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen weisen eine Identität von 45% auf. Zusätzlich enthält der cDNA Klon zum R3/R2 noch eine Peptidsequenz, die der *RLysC5* Sequenz stark ähnelt, genauer gesagt stimmen 12 von 15 Aminosäureresten überein (s.h. Abbildung 1.7). Das Protein stammte aus gesamten Goldfischlarven, die RNA für Erststrang cDNA Matrize aber aus *Retinae adulter*

¹ R=A/G; Y=C/T; H=A/C/T; D=A/G/T; I=Inosin

Goldfische nach Nervdurchtrennung. Ein Grund für diese Variation in der Peptidsequenz RLysC5 könnte die Existenz mehrerer gewebsspezifischer oder durch die Regeneration induzierte Isoformen sein. Zur Klärung dieses Problems wurde die PCR mit R3/R2 unter Verwendung von cDNA Erststrangmatrizen aus gesamten Goldfischlarven (30-60 d) und optischen Tecta adulter Goldfische sowie einer λ -cDNA Bibliothek von 5d Goldfischembryonen (Lässig, 1994) wiederholt. Sämtliche Reaktionen hatten ca. 400 bp große Produkte zum Ergebnis, die sich alle nach ihrer Sequenzierung als identisch zum o.g. 389 bp Fragment herausstellten

<i>sense Primer</i>	<i>antisense Primer</i>	<i>Produkt</i>
RNT1	R2	-
RNT1	R4	-
RNT1	R6	0,3 kb und 1 kb + weitere
RNT1	R8	-
RNT2	R6	1 kb
R1	R4	-
R1	R6	-
R1	R8	-
R3	R2	389 bp
R3	R6	-
R3	R8	-
R5	R2	-
R5	R4	-
R5	R8	-
R7	R2	-
R7	R4	-
R7	R6	-

Tabelle 1.3 *Primer-Kombinationen in der PCR zur Klonierung von Reggie kodierenden cDNA Partialklonen und erzielte Reaktionsprodukte*

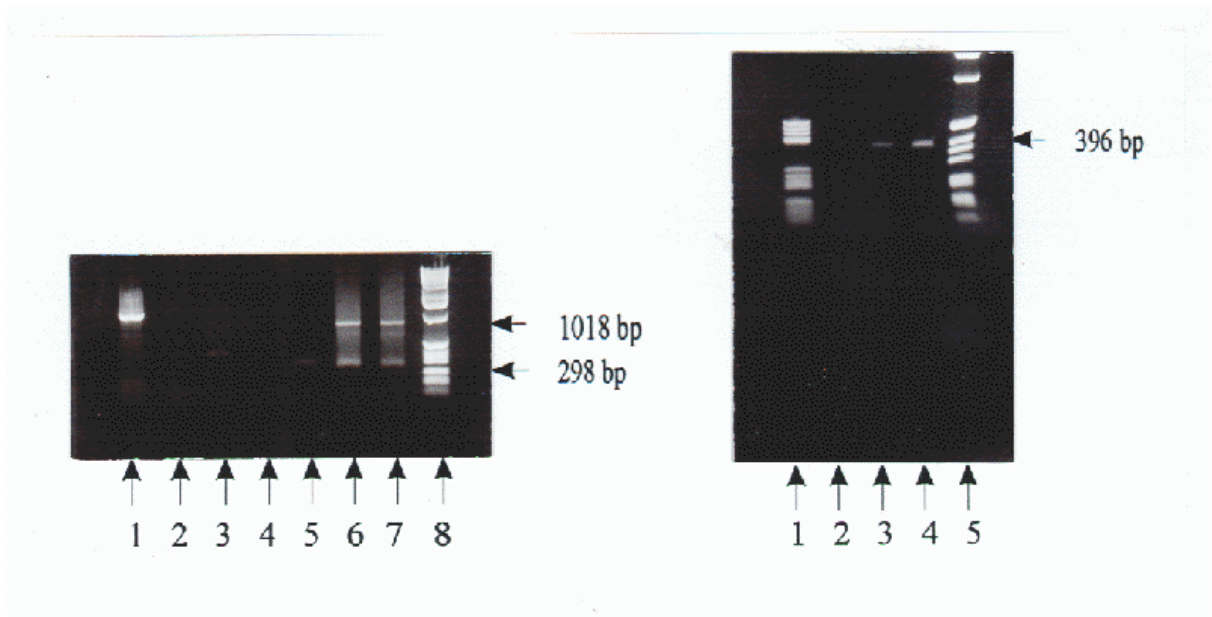


Abbildung. 1.6 PCR Klonierung von zwei Reggie Partialklonen. rechte Abbildung: Reggie-1 389 bp mit der *Primer*-Kombination R2/R3 bei 1: 65°C; 2: 60°C und 3: 55°C *annealing*-Temperatur. Linke Abbildung: Reggie-2 1 kb Fragment mit folgenden *Primer*-Kombinationen 1: RNT2/R8, 2: RNT2/R4, 3: RNT2/R2, 4: RNT2 allein, 5: R6 allein (1-6: Matrize Goldfisch Larven cDNA Erststrang mit dT₁₂₋₁₈) 6: RNT2/R6 (Matrize: Retina 2 Wochen nach ONS Erststrang, dT₁₂₋₁₈), 7: wie 6, aber mit Matrize aus Tectum, 7: Molekulargewichtsstandard.

1.3 Isolierung zweier vollständiger Reggie cDNAs (Reggie-1 und Reggie-2)

Um zu beiden cDNA Partialklonen (389 bp und 1 kb) vollständige cDNAs zu isolieren, fanden beide Klone als Sonden für zwei unabhängige *screens* einer λ -cDNA Bibliothek von 5d alten Goldfischembryonen Verwendung. Diese cDNA Bibliothek wurde deshalb gewählt, da sich beide Fragmente (389 bp und 1 kb) mit den entsprechenden Oligodesoxynukleotiden mittels PCR aus ihnen amplifizieren ließen. Beide *screens* (s.h. 3.2.2.27) mit 4×10^6 Phagen resultierten in der Isolierung von 10 positiven λ -Phagen-Plaques. Nach zwei weiteren *screening* Runden und einer anschließenden *in vivo* Excision, gelang es, insgesamt 6 cDNA Klone zum 389 bp Fragment und einen Klon zum 1 kb Fragment zu isolieren (s.h. Tabelle 1.4). Die Klone R9a, R8a, R181a wurden vollständig mit Hilfe unidirektionaler Deletionsklone (s.h. 3.2.2.16) und spezifischen Oligonukleotiden in beiden Richtungen sequenziert. Die Klone R3a, R4a, R7b und R10a wurden teilweise sequenziert. Alle isolierten Reggie cDNA-Klone sind in Abbildung 3.2.1.5 aufgeführt.

<i>PCR Fragment</i>	<i>Klon</i>	<i>Länge</i>	<i>Kommentare</i>
389 bp Fragment (Reggie1)	R9a	4 kb	enthält einen 3 kb langen vollständigen Reggie-1 Klon und in entgegengesetzter Orientierung einen 1 kb Porin Partialklon (s.h. Text), außerdem Stop Codon bei Codon 297, vollständig sequenziert im Bezug auf Reggie-1 kodierenden Klon.
	R8a	3,1 kb	vollständig sequenziert (Reggie-1)
	R3a	3,1 kb	soweit sequenziert, identisch mit R8a
	R7b	3,1 kb	soweit sequenziert, identisch mit R8a
	R10a	2,4 kb	fast vollständig sequenziert, kodiert für eine zu R8a ähnliche Polypeptidkette, aber deutliche Unterschiede in der DNA Sequenz (s.h. Text)
	R4b	2,0 kb	soweit sequenziert, identisch mit R8a
1 kb Fragment (Reggie-2)	R181a	3,3 kb	vollständig sequenziert, Reggie-2, enthält im Gegensatz zu 1 kb Partialklon noch eine 73 bp Insertion nach Position 970, die wahrscheinlich ein nicht herausgeschnittenes Intron darstellt (s.h. Text)

Tabelle 1.4 Bislang isolierte cDNA Klone zu Reggie (Reggie-1 und Reggie-2)

Die cDNA-Sequenzen sowie die daraus abgeleiteten Proteinsequenzen der Klone R8a (Reggie-1) und R181a (Reggie-2, ohne 73 bp Insertion) sind in den Abbildungen 1.7 und 1.8 dargestellt. Der Klon R181a enthält, im Gegensatz zum 1 kb PCR-Klon, zusätzlich eine 73 bp Insertion an der Stelle 970 der cDNA Sequenz. Diese Insertion enthält Stop-Codons in allen drei Leserahmen. Des weiteren entsprechen die flankierenden Basen vor und hinter der Insertion der sogenannten GT/AG Regel für Introns (Breathnach und Chambon, 1981). Außerdem findet man weitere Konsensus-Sequenzen, welche üblicherweise in Introns enthalten sind (s.h. Abbildung 1.9; Mount, 1982). Demnach stellt diese Insertion sehr wahrscheinlich ein nicht prozessiertes Intron dar. Bei der Synthese der verwendeten cDNA Bibliothek ist der gesamte RNA *pool* der Zellen (nukleärer, cytoplasmatischer und mitochondrialer) benutzt worden (Lässig, 1994). Da 3' nicht translatierte Regionen von mRNAs A-reiche Sequenzen besitzen, können auch sie an oligo dT sowohl bei der Affinitätschromatographie als auch bei der Synthese der cDNA binden.

1	aattggacaacaattattctctcactagggccgagatttgttcattttacggggtcaaaa	60
61	atctgctaaataaacgctttgttttaatagataggaatagacacgaaaggattattgtttg	120
121	ggtttaaacgcaagatgsggttgcctgactggtggaccaaacgaagcgctcgtttgtg	180
	M G C C L T V G P N E A L V V	15
181	tcaggtgcctggttgggtcagatgcaaagacgtatgtggtgggaggctgggctgggca	240
16	S G A C C G S D A K T Y V V G G W A W A	35
241	tggtggccttatatcagacacacagagaattacactagagattatgacactacagcctaag	300
36	W W L I S D T Q R I T L E I M T L Q P K	55
301	tgtgaagacgtggagacagcggaggagtcgctattaccgtgacaggagtcgctcaagtc	360
56	C E D V E T A E G V A I T V T G V A Q V	75
361	aaggttatgactgaccaagacttgctggcggttgctgtgagcagtttctggggaagtct	420
76	K V M T D Q D L L A V A C E Q F L G K S	95
421	gtcatggaaatcaaggctgtggttctgcaaactctagaaggacattttgcgttctatctta	480
96	V M E I K A V V L Q T L E G H L R S I L	115
481	ggtactttgacgggtggagcagatctatcaggacagagatgagtttgctcggctggtgagg	540
116	G T L T V E Q I Y Q D R D E F A R L V R	135
541	gaggtggcagctcctgatgtgggcccggatgggcatgagatcctcagcttactataaaa	600
136	E V A A P D V G R M G I E I L S F T I K	155
601	gatgtctatgataaactggactacctgagctctcttggaaaaactcagacagcggctgta	660
156	D V Y D K L D Y L S S L G K T Q T A A V	175
661	caaagggacgcggacatcggagtgccgaggcagagagggatgctgggattagagaagct	720
176	Q R D A D I G V A E A E R D A G I R E A	195
721	gagtgcaagaaagaaatgatggatgtgaagttcttggcggacactagaatggccgactcc	780
196	E C K K E M M D V K F L A D T R M A D S	215
781	aaacgagagctggagctgcagaaagcttcaatcaggaagtcaacactaagaagacc	840
216	K R E L E L Q K <u>A A F N Q E V N T K K A</u>	235
841	gagtctcagcttgctatgaactagaggcagcaaaagagcagcagaagatcagattggag	900
236	E S Q L A Y E L E A A K E Q Q K I R L E	255
901	gagattgaaatcgagggttgtgcagaggaaaaaacagatctccatcgaggagaaagagatt	960
256	E I E I E V V Q R K K Q I S I E E K E I	275
961	gagaggacagagaaggagctgattgagcggctcaagcgtcctgctgaagcagaggcttac	1020
276	E R T E K E L I A T V K R P A E A E A Y	295
1021	aagatgcagcaactggctgaaggacaaaagttgaagaaagtgctgatcgctcaggccgag	1080
296	K M Q Q L A E G Q K L K K V L I A Q A E	315
1081	tcagagaagatcaggaagatcggagagcagaggccatctctatctcatctgtgagggaag	1140
316	S E K I R K <u>I G E A E A I S I S S V G K K</u>	335
1141	gccgaggccgagagatgaggctgaaggcagagggcctaccagcagtagcggagggccgccc	1200
336	A E A E S M R L K <u>A E A Y Q Q Y G E A A</u>	355
1201	aagactgcgctcgtcctagaagcactgcccgaagattgctggaaaggtagcggctcctctg	1260
356	<u>K</u> T A L V L E A L P K I A G K V A A P L	375
1261	gccaggaccaatgagattgttattctgagtggggatggaagccgctgtgtccggagaggtg	1320
376	A R T N E I V I L S G D G S R V S G E V	395
1321	aaccgcctcctcgccgagctgcccgtgtctattaatgcactcacgggtgtggacctgtcc	1380
396	N R L L A E L P V S I N A L T G V D L S	415
1381	aagatgcctctgttgcagaagatgacgggtgctcaagcatgaagtcaatcagttgctct	1440
416	K M P L L Q K M T G A Q A	435
1441	ccttcatgatgtgtctgtatgcactcacagaaactgcctttagaagattttaattaa	1500
1501	aaataaacaacaaagtagattttgatcctctggtgcctttaatgtttcataggacca	1560
1561	gaatttctgcatgcactgctgctcccacgttctgcagctccacttcatttttaaatcatcg	1620
1621	tgcatcgcatacatcagagaccatcaggacaaccactaatgattgttgttttgtttt	1680
1681	atatagtttttagtgtcgtcatacaaaactcagcctatcacactttattcttaactatt	1740
1741	ttttacactttattttcatctctacactactcggacactttaacactcaatgatcctacc	1800
1801	atgatttaacactcaatgatcctaccatgatttctaacatccaggaagtctgccactgat	1860
1861	gtagagttgtgagtagcagtcagtataactaagctcatgggcaaacatagcttacgggt	1920
1921	aaaaatcagtgctcatcttcggtagaatcataccaagtgctcctcttctgtttaaatggtg	1980
1981	ctgacacataaacaacatggctttcagacaccgatccatcttctgaatgaccgtgcaag	2040
2041	tcacctaactcaacaatagttcagatcattttttgcccggtagattttgattgtaaggt	2100
2101	gtgctttgtttgtttatgttatttggagatatattcattggctgttagcgaactcatgctc	2160
2161	ggatatccaaccaatccgatgctttttagatatagtttcatgacaacagagttgagccattt	2220
2221	ttaaaacagttttgtatagttgtattttgacatctatttctaacaaaatctttctacacat	2280
2281	taacacgtgttacatgagatgaatttaaaaatcaccctttatggacattaacattctgct	2340
2341	ctgtagtggttaactcttgattgtgtattcttttgtcactgtgaaagttatattacctcgt	2400
2401	tttctcattcggttcatagcagtagagtttgacatggtttgtacattttattctgcaggg	2460
2461	tcagtagtgctgtgaaggggcaagtcactttccctttttttttttgcatgctaataa	2520

```

2521 caccaaagccaagagatcgcactcatctttgtgatgtaaagatttcattaatagttttta 2580
2581 ctgatttattgtttattttcattcaagtatgagtaaaatgccctgacacttctgtttgct 2640
2641 catagactgtttatattcaatcaaaaagtaatttttagtattttgttttattattttat 2700
2701 ttattttttaactctataatttttatgtttgattaattcagaactattaaagccatgtca 2760
2761 tgacaagtttagagcatcatagactagttatgtgctttgtatgcaatgtactatactgtg 2820
2821 tattgacaacattataggaactctagaattgtatggcaggataaaagctcagatggcggct 2880
2881 tttcttttagtgggacaaaagatacacaaattaaccccaaatatgccattgacgatgtggg 2940
2941 gattatttggtagttttatacataactctttacacagaattatctgagcatgtttatggtg 3000
3001 catgtattttccaaatgtaataaaatgtaatgtgatcctgtttctctcgatgttctttcatt 3060
3061 ccattaaagtgtcatataaaaaaa 3085

```

Abbildung 1.7 cDNA Sequenz und daraus abgeleitete Proteinsequenz von Reggie-1. Unterstrichen sind durch Mikrosequenzierung erhaltene Peptidsequenzen, mit übereinstimmenden Aminosäureresten im Fettdruck. Der Polyadenylierungskonsensus ist doppelt unterstrichen. Die zur Peptidsequenz RLysC5 ähnliche Sequenz ist kursiv dargestellt. Die Zugangsnummer in *Genbank* ist: L36867.

```

1  tgtttctccacagaggaaaatgttttacacttgccgacccaatgaagcaatggtggtgtc 60
      M F Y T C G P N E A M V V S 14
61  tggtttttgtcgctctccacccgcatgatctctgggtggaagtgtggtttgttttccatg 120
15  G F C R S P P V M I S G G S V F V F P C 34
121  cgttcagcagatacaaaaggatctctctgaacacactgacgctgaatgtaaagagtataa 180
35  V Q Q I Q R I S L N T L T L N V K S D K 54
181  agtctacacacgctcatggagtgccgctctctgtcactggaattgcacagatgaagattca 240
55  V Y T R H G V P V S V T G I A Q M K I Q 74
241  agggcagaataagcagatggtggcggccaagtgtcagatgtttctgggaaagtccagagag 300
75  G Q N K Q M L A A K C Q M F L G K S E S 94
301  tgatattgccacattgccttggaacactggagggtcaccagagggccatcattgtctca 360
95  D I A H I A L E T L E G H Q R A I I A H 114
361  cctgactgtggaggagatctacaaagaccgcaagaagttctccgagcaggtgttcaaggt 420
115  L T V E E I Y K D R K K F S E Q V F K V 134
421  ggcttcatctgaccttttcaacatgggcatcagcgtgggtcagctacacactcaaagacgt 480
135  A S S D L F N M G I S V V S Y T L K D V 154
481  acatgatgaccaggattacctgcactctttgggaaaagcccgtacggcacaagtgcagaa 540
155  H D D Q D Y L H S L L G K A R T A Q V Q K 174
541  ggacgcacggattggagaagccaagaacaaaagagatgcagtgatcagggaggccaatgc 600
175  D A R I G E A K N K R D A V I R E A N A 194
601  tatacaggagaaggtatctgctcagtacatgaatgagatcgagatggctaaggctcagag 660
195  I Q E K V S A Q Y M N E I E M A K A Q R 214
661  agactacgagctgaagaaggctgtctatgatattgaggtctgcacaaaaaagcagagtc 720
215  D Y E L K K A V Y D I E V C T K K A E S 234
721  tgaaatggcctatcagctccaggtggcgaagacaaagcagcagatcgaggaggagaagat 780
235  E M A Y Q L Q V A K T K Q Q I E E E K M 254
781  gcaggtgatgggtgggagcgtcgcagcaaatcatgcttcaagaacaggagatcgcacg 840
255  Q V M V V E R S Q Q I M L Q E Q E I A R 274
841  caaggagaagagctggaggccaagtcatgaaaccagccgatgcagaacgataaccggct 900
275  K E K E L E A Q V M K P A D A E R Y R L 294
901  ggagaaactggcagaagctgaacgccttcagctaatacatggaggcagaagctgaagctga 960
295  E K L A E A E R L Q L I M E A E A E A E 314
961  atctatcaaaatgagaggagaggccgaagcatacgctgtggaggcgagaggtcgtgccga 1020
315  S I K M R G E A E A Y A V E A R G R A E 334
1021  agccgagcagatggcgaagaaggccgagggccttccagacctacaaggaaggagcagtggt 1080
335  A E Q M A K K A E A F Q T Y K E G A M V 354
1081  ggacatgctgatggagaaactgccgctgattgcagaggagatcagtaagcccctgtcagc 1140
355  D M L M E K L P L I A E E I S K P L S A 374
1141  taccaataagggtcacaatggtttccagtgagggttcagagattgggtgcagccaaactaac 1200
375  T N K V T M V S S G G S E I G A A K L T 394
1201  ggggtgaagtgttgactatgaccaaactgcccgaaccattgagaaactgaaactgggt 1260
395  G E V L D I M T K L P E T I E K L T G V 414
1261  cagcatttcccaggtggcccgaactgggtgaagacactctctctcctccatctgtgacaa 1320
415  S I S Q V A R T G 434

```

1321	ttcattttcttttcccttctgtcttccacactgcatctcttttgttttccctttcccatctt	1380
1381	tctctctcgacgtacacttccctgtctgccttgctgccaaaaacccaaagtgggaac	1440
1441	actttagaataggtaacacctatttagtttcttattttgcatgcatataactagaatatttg	1500
1501	ccatgtattagtgtctaattaagaacatattaatgccttattctacttgacctgttcatc	1560
1561	atccctaactcttacccaatacctaagaactaacgaccttactaactattaataagaagcaa	1620
1621	attaagaatttattgagaaaaatgctgtagttaatagttaacacggttacctattctaa	1680
1681	agtgttacccccacaaagtgcatttttaactctaaaactccaggggaagaatgctgtactttata	1740
1741	tttttaatgcaatcataagaagacactgaagtccaaggatctcttgaattctgttacaca	1800
1801	ccgacacttttagacattttgaaatattacacctttattttttctttagtagtacttttta	1860
1861	atgctgggtggagcactatgagcattttcgatataatttgagctttctatttagtaaccttttg	1920
1921	gaaaccaaagtaacatgaagggaaacacggtgataaagactgatgcagacatggtgaata	1980
1981	ggataaacattcactttacctcaatagtgatattttactatattacttagacataactgt	2040
2041	gtaggaattatagtaactatctgcttcaaatggtagtctgctctgaaatctgaagatact	2100
2101	gccataaatgtcagatcatctttatctgggttaaatctttactcaagtgaacagtcaga	2160
2161	tgtcttcatgtgttatgcagaattatagggcagtaattattctgtcagtaacttatttat	2220
2221	tttacaatatcatttgaagggtttttgttgttgttgttgtatagtttgtgtgcata	2280
2281	tatatatatctgtactgtttgttgtaaaatgatcaaacctatgtctaggacttgacattac	2340
2341	agggaaacgtatgtgttacatcttttagaccgttctattcattaaatgagacaggagctga	2400
2401	atgctaaaatttcaaagggtgtgtcataaaaaacccccattttaaggagtctaaaaatgt	2460
2461	tttgttctgacttatacagtggttaaatatttagttatactgcattgttcttgcattgcatt	2520
2521	acaacattttcttttcaaatgtttaaagtcaatacaatatgtttactttttgtcatta	2580
2581	gatacataagcatgtataattcataagcactaatgacatgatttcccactcacattttat	2640
2641	cattactagcatgactaatgatatgttgacagaaacaatgttatatggtagtctttatagatg	2700
2701	ttgtgtgcaatgtaaactgaaactaagtacatatttatgtcactgttttttaaatctttcc	2760
2761	tatttaattgggttatgacatgcatatgcatgtgaagtgggatgcatctatataggctaaa	2820
2821	tatgaagggcagtttttattattgttattattatttagtgagcagatgttagttaagccta	2880
2881	ttcagtgatgtttggatagatttaggagggtcagggcattagatagaccatctcttatgct	2940
2941	gtgtaggccagggctgctatgctagtgctgctgaaagaaaagctgtgtttgtccatagatg	3000
3001	ctttttctactctatacaaaagtatctacaatcatgtaaaccgatcacgtcttatctgtta	3060
3061	cagttttatctgtttcagcatgcatgcaaagactagcaaaccacactgtattgtcta	3120
3121	tctgtacttatgatgccttaagtaacctccctactaaaa	3159

Abbildung 1.8 cDNA Sequenz und daraus abgeleitete Proteinsequenz von Reggie-2. Der Klon enthält kein Polyadenylierungssignal. Unterstrichen sind durch Mikrosequenzierung erhaltene Peptidsequenzen, mit übereinstimmenden Aminosäureresten im Fettdruck. Die im Reggie-2 auftretende LRE-Sequenz ist doppelt unterstrichen (s.h. Diskussion). Die Zugangsnummer in *Genbank* ist: U33556.

↓

AAAgtaagtgatcagccatgttctaggctatattaaaaactaaatagattgtgtttatacaca
ctgtgtctctgcagATG

↑

Abbildung 1.9 cDNA Sequenz der im Klon R181a an Stelle 970 gefundenen Insertion (kleine Buchstaben), die im 1 kb PCR Klon (RNT2/R6) nicht vorkommt. Die großen Buchstaben markieren den Randbereich (putative Exon-Grenzen). Im Fettdruck erscheinen die Basen, die der GT/AG Regel für Introns (Breathnach und Chambon, 1981) entsprechen. Weitere Konsensussequenzen für Introns sind kursiv dargestellt (nach Mount, 1982), bzw. erscheinen unterstrichen (Pyrimidin-reiche Region am 3'-Ende des putativen Introns). Die Pfeile deuten auf die Exon/Intron bzw Intron/Exon Grenzen hin. Die Sequenz weist Stop Codons in allen drei Leserastern auf.

Die weiteren Reggie-1 cDNAs weisen folgende Besonderheiten auf: *Klon R9a*: Dieser Klon besitzt eine Länge von ca. 4 kb. Er ist damit deutlich länger als die anderen Klone, die maximal 3,1 kb lang sind. Nach der Sequenzierung stellte sich heraus, daß R9a ein Hybrid aus zwei verschiedenen cDNAs darstellt. Zum einen enthält er einen 3,1 kb langen Reggie-1 Klon, zum anderen beinhaltet er aber einen 1 kb langen Partialklon, der wahrscheinlich das Goldfischho-

mologe des plasmalemalen Porins (Anionenkanal) der Säuger darstellt (s.h. Abbildung 1.10a). Die Orientierung beider cDNAs ist antiparallel, des weiteren liegt zwischen ihnen eine *Eco RI* und eine *Not I* Schnittstelle. Diese Sequenz entspricht genau dem in der Konstruktion der cDNA Bibliothek verwendeten Adapter. Es handelt sich also sehr wahrscheinlich um ein Artefakt aus der Konstruktion der cDNA Bibliothek. Die Sequenz des Klon R9a ist identisch zum Klon R8a, mit einer Ausnahme, an Aminosäure 297 enthält R9a einen Austausch einer Base von C→G (TAC nach TAG), dadurch entsteht ein Stop Codon an dieser Stelle. Damit verkürzt sich der offene Leserahmen dieses Klons um 137 Aminosäuren.

a)

Genbank Zugangsnr.	Klonbezeichnung	P(N)
X75068	B.taurus mRNA for plasmalemal porin	1,5×10 ⁻³⁷
L06132	Human voltage-dependent anion channel...	3,2×10 ⁻³⁵
L08666	Homo sapiens porin (porin) mRNA,...	1,4×10 ⁻³³
L06328	Human voltage-dependent anion channel...	1,2×10 ⁻³²

b)

Reggie-1 <--

```
TTCGTTTGGTCCAACAGTCAGGCCGCAACCCATACTTGC GTTTAAACCCAAACAATAATCCT
TTCGTGTCTATTCCTATCTATTAACAAAGCGTTTATTTAGCAGATTTTTGACCCGTAAAAT
GAACAAATCTCGGCCCTAGTGAGAGAATAATTGTTTGTCCAAGCGGCCGCGAATTCCTGCAG
CCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTGG
```

Porin -->

Abbildung 1.10 a) Ausgabe der Datenbankrecherche zur abgeleiteten Aminosäuresequenz von R9a (Partialsequenz) durch das Programm *Blastp*. Es wurden 4 spannungsabhängige Anionenkanal cDNAs gefunden, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen eine hohe Identität von bis zu 77% auf einer Länge von 70 Aminosäuren zu R9a aufweisen. P(N) bezeichnet die Poisson Wahrscheinlichkeit, daß die Sequenzen nicht zufällig ähnlich sind. b) Sequenzanalyse des R9a Partialklons R9adelrev4a. Diese zeigt am 5' Ende den Anfang von Reggie-1 (in umgekehrter Orientierung), gefolgt von einem *Bluescript SK Polylinker*. Daran schließt sich die homologe Sequenz zum spannungsabhängigen Anionenkanal (*antisense*) an.

a)

```

1 .....TCTCAGCTG 9
      |||||
801 aagctgctttcaatcaggaagtcaacactaagaaagccgagctctcagctt 850
      .
10 GCCTATGAACTACAGGCAGCTAAAGAGCAGCAGAAGATCAGATTGGaGGA 59
      |||||
851 gcctatgaactagaggcagcaaaagagcagcagaagatcagattggagga 900
      .
60 GATCGAAATCGAGGTTGTGCAGAGGAAAAAGCAGATCTCCATTGAGGAGA 109
      |||
901 gattgaaatcgaggttgtgcagaggaacacagatctccatcgaggaga 950
      .
110 AAGAAATTGAGAGGACAGAGAAGGAGCTGATTTCAACAGTCAAGCGTCCT 159
      |||||
951 aagagattgagaggacagagaaggagctgattgcgacgggtcaagcgtcct 1000
      .
160 GCTGAAGCAGAGGCTTACAAGATGCAGCAGCTGGCAGAAGGACAGAAGAT 209
      |||||
1001 gctgaagcagaggcttacaagatgcagcaactggctgaaggacaaaagtt 1050
      .
210 GAAGAAAGTGCTGACTGCTCAGGCTGAGGCAGAGAAGATCAGGAAGATC. 258
      |||||
1051 gaagaaagtgctgatcgctcaggccgagtcagagaagatcaggaagatcg 1100
      .
259 GAGAGGCAGAGGCCATCTCTATCGATCC.GTGGG.AAGGCCGAGGCAGAG 306
      |||||
1101 gagaggcagaggccatctctatctcatctgtggggaaggccgaggccgag 1150
      .
307 ATTA..... 310
      ||
1151 agtatgaggctgaaggcagaggcctaccagcagtacggagaggccgcaa 1200

```

b)

```

1 .....SQLAYELQAAKEQQ 14
      |||||:|||||
201 MMDVKFLADTRMADSKRELELQKAQAFNQEVNTKKAESQLAYELEAAKEQQ 250
      .
15 KIRLEEIEIEVQQRKKQISIEEKEIERTEKELISTVKRPAEAEAYKMQQL 64
      |||||
251 KIRLEEIEIEVQQRKKQISIEEKEIERTEKELIATVKRPAEAEAYKMQQL 300
      .
65 AEGQKMKKVLTAQAQAEAEKIRKIGEAEAISESV..... 97
      |||||:|||||.||||.|||||
301 AEGQKLKVLIAQAQAESEKIRKIGEAEAISISSVGKAEAESMRLKAEAYQQ 350

```

Abbildung. 1.11 a) teilweiser Vergleich der DNA Sequenzen der Klone R10a (obere Reihe und in Großbuchstaben) und R8a (untere Reihe). Die Sequenzen weisen deutliche Unterschiede auf. Auffällig ist vor allem die Insertion von drei Basenpaaren in der R10a Partialsequenz gegenüber der entsprechenden R8a Sequenz (Sequenzvergleich mit dem *Gap* Programm aus dem GCG 8.0) b) Auch die abgeleiteten Aminosäuresequenzen weisen noch deutliche, aber weniger, Unterschiede zueinander auf. Auffällig ist hier die bessere, aber immer noch nicht vollständige Übereinstimmung der unterstrichenen Sequenzen mit der partiellen Peptidsequenz RLysC5 (E statt S, fett gedruckt).

Bei der Betrachtung der 3' nichttranslatierten Bereiche des Klons R10a ist festzustellen, daß dieser nur eine DNA Identität von 65% zu R8a aufweist. Die weiteren Reggie-1 Klone (vollständige cDNAs: R3a, R7b; unvollständige cDNA: R4b) sind, soweit sequenziert, identisch zu R8a.

1.4 Analyse der Reggie-1 und Reggie-2 Klone

1.4.1 Reggie-1 besitzt eine 80%ige Aminosäure-Identität zum menschlichen epidermal surface antigen (ESA); Reggie-1 und Reggie-2 sind Mitglieder einer neuen Proteinfamilie.

Reggie-1 (berechnetes Molekulargewicht: 46,9 kD) und Reggie-2 (berechnetes Molekulargewicht: 47,2 kD) besitzen eine Aminosäure-Identität von 45% (s.h. Abbildung 1.12). Kurz nach der Klonierung des 389 bp Reggie-1 Partialklons fand sich in *Genbank* eine cDNA Sequenz, die eine sehr hohe Ähnlichkeit zu Reggie-1 aufweist. Es ist das sogenannte *epidermal surface antigen* (ESA, Schroeder et al., 1994), ein 35 kD Protein aus menschlichen Keratozyten, welches eine Aminosäure-Identität von 80% zu Reggie-1 und von 45% zu Reggie-2 aufweist (s.h. Abbildung 1.12). Im Vergleich zu ESA ist Reggie-1 um 49 Aminosäuren im N-terminalen Bereich länger. Viele der Aminosäureaustausche zwischen Reggie-1 und ESA entstehen durch Einfügung ähnlicher Aminosäuren, demnach ist die Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene noch deutlich höher als 80%.

Abbildung 2.12 (nächste Seite) Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von Reggie-1, Reggie-2 und humanem ESA (ESA) sowie Maus-ESA (mESA). Die Sequenzen wurden mit dem Programm *Clustalw 1.5* (Thompson et al., 1994) aligniert. Identische Aminosäuren zwischen zwei oder mehr Sequenzen sind durch einen gemeinsamen Kasten eingerahmt.

1.4.2 Reggie-2 in anderen Spezies:

Drosophila: Ein genomisches DNA Fragment, welches ein putatives Reggie-2 Homologes darstellt, ist der folgende STS (*Sequence tagged sites*) Klon aus einer *Drosophila melanogaster* P1 (Bakteriophage P1) Bibliothek. Dieses DNA Fragment hat, übersetzt in Aminosäuresequenz, eine Identität von 76% zur Reggie-2 Aminosäuresequenz. Das Fragment ist mittels in situ Hybridisierung auf dem Polyten Chromosom lokalisiert worden. Allerdings bricht die Homologie nach etwa der Hälfte der übersetzten DNA Sequenz von G00829 ab. Grund hierfür ist allerdings keine Verschiebung des Leserasters, da die Translation in den anderen beiden Leserastern keine Weiterführung der Homologie ergibt. Möglicherweise stellt dieser Teil ein Intron dar. In den folgenden Sequenzvergleichen sind ähnliche Aminosäuren zwischen den beiden verglichenen Sequenzen mit einem + gekennzeichnet.

gb/G00829/G00829 fruit fly STS Dm0794 clone DS08014 SP6

Reggie-2: 96

IAHIALETLEGHQRAIIAHLTVVEEIIYKDRKKFSEQVFKVASSDLFNMGISVVSYYTLKDVHDD
Q 158

I+HIAL TLEGHQRAI+ +TVVEEIIYKDRKKFS+QVF+VASSDL
NMGI+VVSYY+KD+ D++

G00829: 1

ISHIALVTLEGHQRAIMGSMTVVEEIIYKDRKKFSKQVFEVASSDLANMGITVVSYYTIKDLRDE
E 63

Mensch: Es finden sich eine Vielzahl von EST Klonen in *Genbank*, welche wahrscheinlich humane Homologe von Reggie-2 darstellen. Dargestellt ist hier nur der Aminosäure-Sequenzvergleich mittels *tblastn* mit dem Klon H41004, dieser hat eine Identität von 84% zu Reggie-2 (Reg-2) im betrachteten Bereich. Er stammt aus der cDNA Bibliothek *Soares* von adultem Gehirn.

H41004 yo08c08.s1 Homo sapiens cDNA clone 177326

Reg-2: 90 GKSESDIAHIALETLEGHQRAIIAHLTVVEEIIYKDRKKFSEQVFKVASSDLFNMGISVVSYY 149
G+ HIALETLEGHQRAI+A +TVVEEIIYKDR+KFSQVFKVASSDL NMGISVVSYY

H41004: 20 GRRRLXXXHIALETLEGHQRAIMAXMTVVEEIIYKDRQKFSQVFKVASSDLVNMGISVVSYY 199

Reg-2: 150 TLKDVHDDQDYHLHSLGKARTAQVQKDARIGEAKNKRDAVIREANAIQEKVSAQYMNEIEM 209
TLKD+HDDQDYHLHSLGKARTAQVQKDARIGE+ KRDA IREA A QEKVSAQY++EIEEM

H41004:200 TLKDIHDDQDYHLHSLGKARTAQVQKDARIGEAEAKRDAGIREAKAKQEKVSAQYLSIEIEM 379

Reg-2: 210 AKAQRDYELKKAAY 223

AKAQRDYELKKA Y

H41004:380 AKAQRDYELKKAAY 421

Ratte: Eine homologe Partial cDNA zu Reggie-2 ist mittlerweile kloniert worden (S. Lommel, persönliche Mitteilung).

1.4.3 Sekundärstrukturvorhersagen für Reggie-1 und Reggie-2

Reggie-1 ist ein hydrophiles Protein (s.h. Abbildung 1.13) mit überwiegend α -helikaler Sekundärstrukturvorhersage (s.h. Abbildung 1.14). Reggie-2 ist überwiegend hydrophil (s.h. Abbildung 1.15), besitzt allerdings eine hydrophobe Region im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 21-39). Diese hydrophobe Region wird gleichzeitig als helikal vorhergesagt (*PHDhtm server*, EMBL, Heidelberg) und könnte eine Transmembrandomäne darstellen (s.h. Abbildung 1.15). Aus den Kyte/Doolittle *plots* (Abbildung 1.15) ist auch ersichtlich, daß die Verteilung hydrophiler und hydrophober Aminosäuren in Reggie-1 und Reggie-2 sehr ähnlich ist.

Auffällig bei der Analyse beider Reggie Proteine ist der hydrophile Charakter der Polypeptidsequenz, obwohl es sich um Membranproteine handelt. Dies stimmt für Reggie-1 mit den biochemischen Eigenschaften des Proteins (Löslichkeit in neutralen Puffern hoher Ionenstärke) überein (s.h. Abbildung 1.5c), nach denen Reggie vor allem durch ionische Wechselwirkungen mit der Zellmembran assoziiert ist. Reggie-2 weist im N-terminalen Bereich allerdings einen hydrophoben Sequenzabschnitt auf. Sowohl die Hydropathieanalyse nach Kyte-Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) als auch nach Goldman-Engelman-Steitz (Engelman et al., 1986) hat eine Transmembranregion im Bereich Aminosäure 27-47 zum Ergebnis, wenn auch mit vergleichsweise kleinen Indizes (Kyte und Doolittle, 1982). Der *PHDhtm server* (EMBL, Heidelberg) gibt den Bereich Aminosäure 21-39 als Transmembranhelix an. Die errechnete Genauigkeit dieser Vorhersage wurde mit mindestens 90% angegeben. Es besteht demnach die Möglichkeit, daß es sich bei Reggie-2 um ein Transmembranprotein handelt.

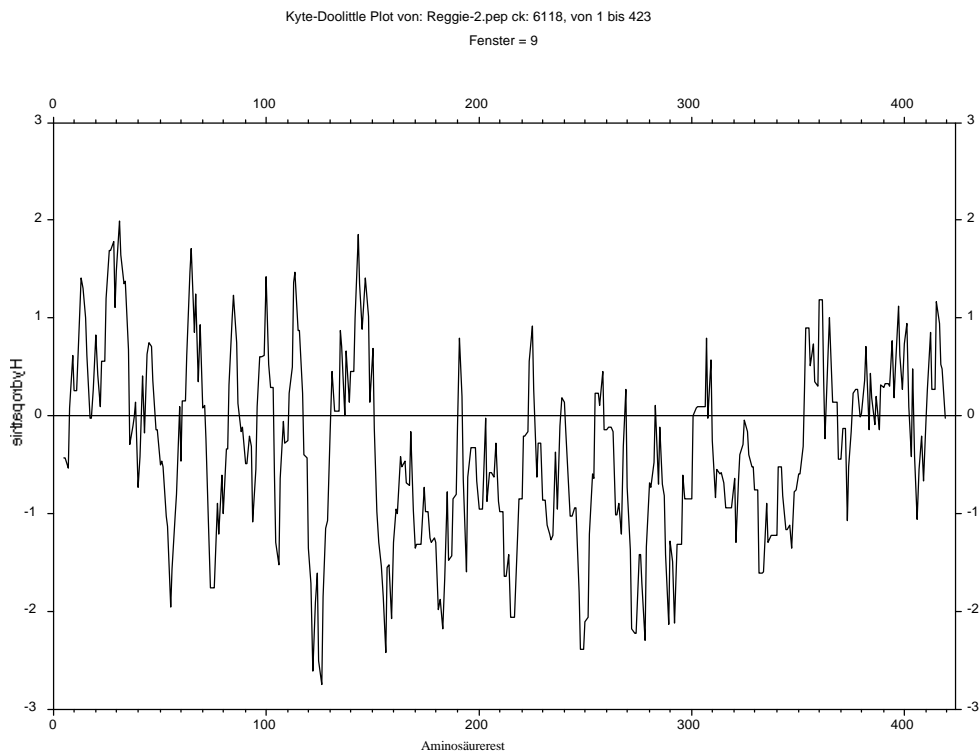
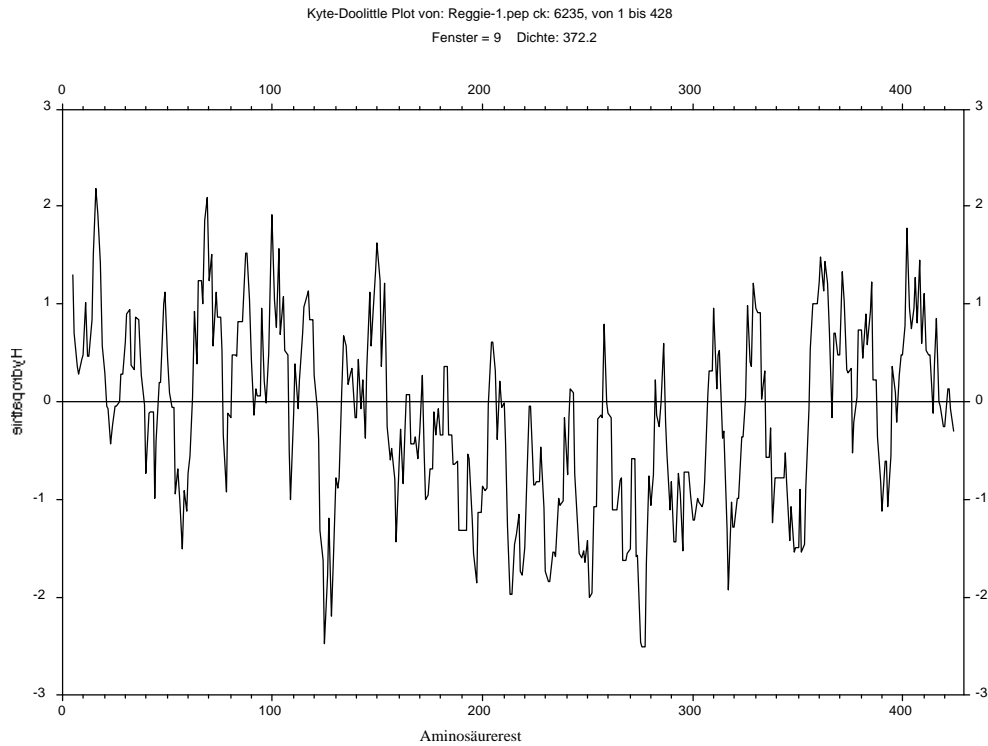


Abbildung 1.13 Kyte und Doolittle Plots von A) Reggie-1 und b) Reggie-2: Für Reggie-1 Es findet sich kein Abschnitt, der eine Transmembran-Helix ausbilden könnte. Für Reggie-2 findet sich ein Bereich von Aminosäure 27-47. (Kriterium >19 Aminosäuren mit einer Hydrophobizität $> 1,3$; Kyte und Doolittle, 1982)


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sequenz | MFYTCGPNEAMVVSQFCRSPVVMISGGSVFVFPVQVQIQRIQLNLTLLNVKSDKVYTRHG
Pred SS | HHH      HHHEEE  E   EEEEEHHH      HEH HHHHHHHHHHHH  H EEH
Clean SS |           EEE      EEEE      HHHHHHHHHHHHHH
                    TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sequenz | VPVSVTGIAQMKIQGQNKQMLAAKQMFGLGKSESDIAHIALETLEGHQRAIIAHLTVEEI
Pred SS | HHHHHHHHHHHH  E HHHH  HHHEH      HEHHHHH  HHHHHHH  H
Clean SS | HHHHHHHHHHHH      HHHHH      HHHHHHHHHHHHHHHH

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sequenz | YKDRKKFSEQVFKVASSDLFNMGISVVSYTLKDVHDDQDYLSLHGKARTAVQVKDARIGE
Pred SS |   EE      HH HHHHHHHHHHHHHHHHHH      HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
Clean SS |           HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH      HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sequenz | AKNKRDAVIREANAIQEKVSAQYMNEIEMAKAQRDYELKKAVYDIEVCTKKAESEMAYQL
Pred SS | HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
Clean SS | HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sequenz | QVAKTKQQIEEEKMQVMVVERSQQIMLQEQEIARKEKELEAQVMKPADAERYRLEKLAEA
Pred SS | HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
Clean SS | HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sequenz | ERLQLIMEAEAEAEESIKMRGEAEAYAVEARGRAEAEQMAKKAFAFQTYKEGAMVDMLMEK
Pred SS | HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH  HH  HHH
Clean SS | HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH  HH  HHH

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sequenz | LPLIAEEISKPLSATNKVTMVSSGGSEIGA AKLTGEVLDIMTKLPETIEKLTGVSISQVA
Pred SS | HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH  HH  HHHHHHHHH      HHHHHH  HHHHHHH
Clean SS | HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH  HHHHHHHHHHHHH      HHHHHH  HHHHHHH

.....
Sequenz | RTG
Pred SS | HHH
Clean SS | HHH

```

Abbildung 1.15 Vorhersage der Sekundärstruktur von Reggie-2 mit Hilfe des *Predictprotein server* (EMBL, Heidelberg). Ein „H“ unter einer Aminosäure deutet an, daß für diesen Bereich eine Helix vorhergesagt wird, ein E steht für die Vorhersage eine Strangs. Die angegebene Wahrscheinlichkeit für das Eintreffen der Vorhersage liegt bei mindestens 90%. Der, als Transmembranhelix mit einer Wahrscheinlichkeit $\geq 90\%$ angegebene Bereich (AS 21-39), ist mit T gekennzeichnet (*PHDhtm*, EMBL, Heidelberg).

Ein weiteres augenfälliges Merkmal ist die Häufigkeit eines Asparaginsäure-Alanin Motivs. Bei genauerer Analyse befinden sich im mittleren Bereich der Polypeptidkette – die Vorhersage der Sekundärstruktur nach Chou-Fassmann/Garnier/*Predictprotein* (EMBL, Heidelberg) ist hier fast durchgehend α -helikal – quasi heptadische Wiederholungen, genauer un-

dekadische Wiederholungen bestimmter Aminosäuren, die in den Tabellen 1.7 und 1.8 dargestellt sind. Auch im ESA wurden solche Quasi Undekaden gefunden (Schroeder et al., 1994). In der Regel besitzen Proteine mit α -helikalen *coiled coil* Domänen heptadische oder quasi heptadische Wiederholungen des Motivs abcdefg, wobei a und d in der Regel apolar sind (Cohen und Parry, 1986; Cohen und Parry, 1990). Treten solche heptadischen Wiederholungen innerhalb einer α -Helix auf – in einer α -Helix liegen jeweils die 1. und 7. Aminosäure übereinander – dann bildet sich entlang dieser Helix ein apolares Band in Form einer linksgängigen Helix. Diese Sekundärstruktur ist in einer wäßrigen Lösung nicht stabil, da die apolaren Reste dem Lösungsmittel Wasser ausgesetzt sind. Die einfachste und in der Natur oft vorgefundene Möglichkeit diese Reste gegen das Wasser abzuschirmen, ist die Ausbildung eines helikalen *coiled coil* von 2 oder 3 (in stäbchenförmigen Domänen) oder 4 (in globulären Domänen) Helices (Übersicht in Cohen und Parry, 1990). Das Vorliegen undekadischer Wiederholungen steht im Einklang mit dieser Struktur, da auch weitere Vielfache (3) einer Helixdrehung von ca. 3,6 Aminosäuren pro Drehung zu solch einer Struktur führen (quasi Heptaden). Die Vorhersage des *Pepcoil* Programmes von A. Lupas, welches quasi heptadische Wiederholungen in Peptidsequenzen sucht, bestätigt diese Vermutung. Es sagt bei Reggie-1 im Bereich der Aminosäuren 231-283 eine *coiled coil* Domäne mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,0 und bei Reggie-2 im Bereich der Aminosäuren 179-208 sowie 243-270 zwei *coiled coil* Domänen mit Wahrscheinlichkeiten von jew. 0,7 voraus (s.h. Abb. 1.16). Diese Vermutungen müssen natürlich durch strukturanalytische Verfahren (z.B. Kristallstrukturaufklärung oder CD-Spektroskopie) evaluiert werden.

Die Reggie-1 und Reggie-2 Aminosäuresequenzen wurden von Dr. Andrei Lupas (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) mit Hilfe weitergehender Analyseverfahren (Fourier Transformation zur Ermittlung der Periodizität der hydrophoben Reste) auf eine mögliche *coiled coil* Struktur untersucht. Er ist der Ansicht, daß die vom *Pepcoil* Programm vorhergesagten *coiled coil* Bereiche, wahrscheinlich keine *coiled coil* Struktur ausbilden, sondern nur eine verstärkte Neigung zur Ausbildung α -helikaler Strukturen besitzen.

<i>Position</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>
182	G	V	A	E	A	E	R	D	A	G	I
289	A	E	A	E	A	Y	K	M	Q	Q	L
301	A	E	G	Q	K	L	K	K	V	L	I
313	A	Q	A	E	S	E	K	I	R	K	I
325	G	E	A	E	A	I	S	I	S	S	V
337	G	K	A	E	A	E	S	M	R	L	K
349	A	E	A	Y	Q	Q	Y	G	E	A	A
<i>Konsensus</i>	A/G	E	A	E	A	E	K	X	X	ap.	ap.

Tabelle 1.7 Undekadische Wiederholungsmotive in der C-terminalen Hälfte von Reggie-1. X ist irgend eine und ap. eine apolare Aminosäure.

<i>Position</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>
179	G	E	A	K	N	K	R	D	A	V	I
287	A	D	A	E	R	Y	R	L	E	K	L
299	A	E	A	E	R	L	Q	L	I	M	E
311	A	E	A	E	A	E	S	I	K	M	R
323	G	E	A	E	A	Y	A	V	E	A	R
335	G	R	A	E	A	E	Q	M	A	K	K
347	A	E	A								
<i>Konsensus</i>	A/G	E	A	E	A	E	X	ap.	X	X	X

Tabelle 1.8 Undekadische Wiederholungsmotive in der C-terminalen Hälfte von Reggie-2. X ist irgend eine und ap. eine apolare Aminosäure.

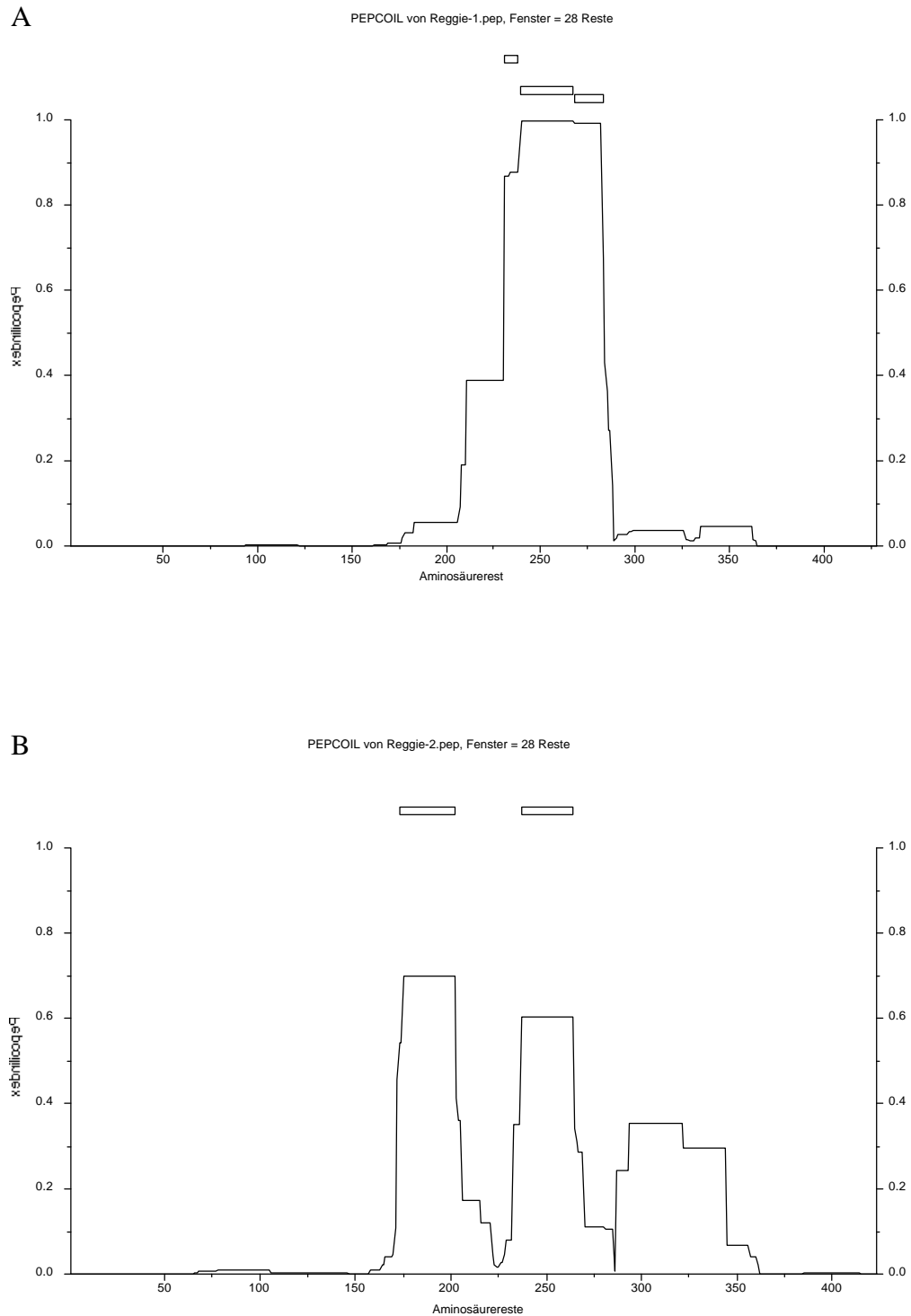


Abbildung 1.16 Ausgabe des *Pepcoil* Programms (HUSAR, DKFZ-Heidelberg) von A) Reggie-1 und B) Reggie-2. Das Programm sucht nach heptadischen oder quasi heptadischen Wiederholungen des Grundmotivs abcdefg (a und d apolar). Es findet bei Reggie-1 eine durchgehende und bei Reggie-2 zwei durch ein kurzes Stück getrennte mögliche *coiled coil* Domänen.

1.4.4 *in vitro* translatiertes Reggie-1 hat ein apparentes Molekulargewicht von 48 kD.

Zur Bestimmung der Vollständigkeit der Reggie-1 cDNA wurde eine *in vitro* Translation mit dem *ECL in vitro translation kit* durchgeführt. *In vitro* transkribierte *sense* und *antisense* (als Negativkontrolle) R8a RNA (mit einer CAP ähnlichen Struktur versehen, s.h. 3.2.2.22) wurden in *in vitro* Translationsreaktionen eingesetzt, die Produkte mittels SDS PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine Cellulosenitrat Membran mittels Streptavidin-HRP *ECL* detektiert. Das Ergebnis ist in Abb. 1.17 dargestellt. In den 2 verschiedenen Ansätzen mit *sense* R8a RNA tritt als einziges Produkt ein Polypeptid von 48 kD apparentem Molekulargewicht auf (Kalibrierung mit *in vitro* Translation von BMV RNA s.h. Abb. 1.17). Die Negativkontrolle mit *antisense* R8a RNA zeigte kein Signal.

Ein zweiter Ansatz mit ^{35}S markiertem Methionin erlaubte den Test auf immunologische Kreuzreaktion des Reaktionsproduktes mit dem M802 Antikörper und dem 446 Reggie Antiserum. Abb. 1.17b zeigt das Ergebnis einer *in vitro* Translation mit nachfolgender Mikrodialyse auf Millipore Mikrodialyse Membranen und Affinitätsreinigung über eine Protein-A/G-Matrix und den entsprechenden Antikörpern. Allerdings fand keine spezifische Bindung der beiden Antikörper statt. Der Kontrollansatz mit Protein A/G ohne Antikörper wies die gleichen Produkte auf, wie die Ansätze mit M802 oder 446 Antiserum.

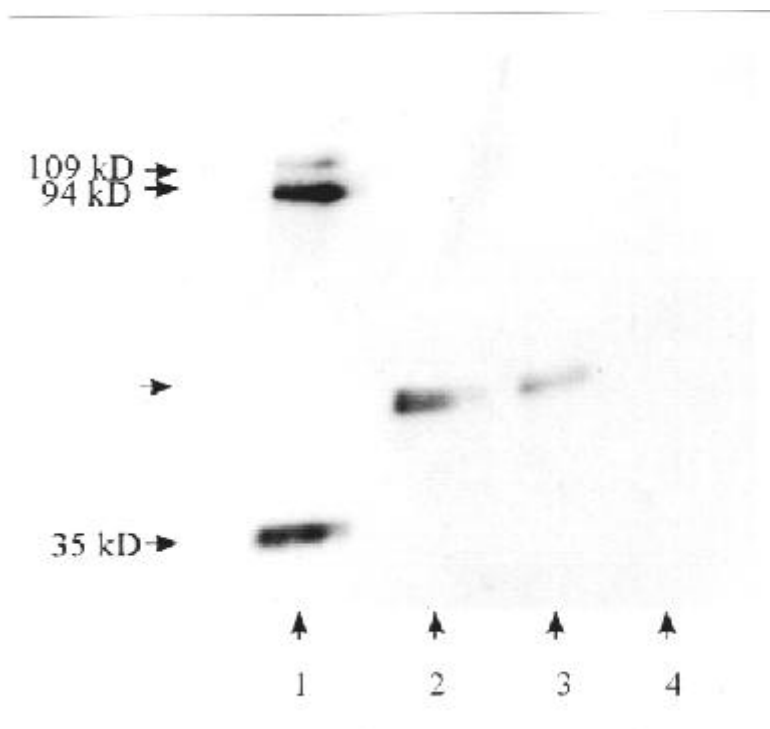


Abbildung 1.17 a) in vitro Translation von Reggie-1 Klon R8a mit dem *ECL in vitro translation kit* (Amersham). 1: *Brome mosaic virus* (BMV) RNA, 2: R8a sense cRNA, R8a sense cRNA(+5 mM KCl), 4: R8a antisense cRNA. Der Pfeil ohne Beschriftung markiert ein apparentes Molekulargewicht von 48 kD.

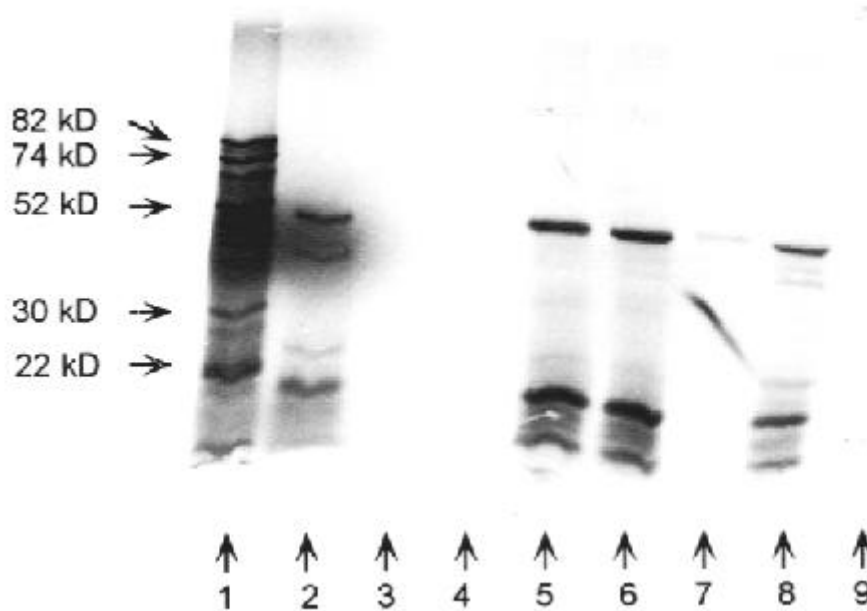


Abbildung 1.17 b) Immunpräzipitation (Antikörper + Protein A/G *Affinica* Matrix, *Schleicher & Schüll*) von ^{35}S -Methionin markiertem R8a in vitro Translationsprodukt (Kaninchen Retikulozyten System von *Amersham*). 1: Kontroll RNA, 3: unmarkierter Molekulargewichtsstandard, 2 und 4-9: R8a sense cRNA mit folgender Aufreinigung: 2: Translationsprodukt ohne Aufreinigung, 4: Überstand 446 Antiserum, 5: Protein A/G (Kontrolle), 6: M802-Protein A/G, 7: M802-Protein A/G Überstand, 8: 446-Protein A/G, 9: Protein A/G Überstand.

1.4.5 Reggie-1 besitzt mehrere Genloci im tetraploiden Chromosomensatz des Goldfisches.

Eine Southern Blot Analyse genomischer DNA eines Goldfisches mit einer Reggie-1 Probe spricht für die Existenz mehrerer Genloci von Reggie-1. Jeweils 10 µg genomische DNA wurden mit einem von 6 verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung und dem Transfer auf eine Nylonmembran, erfolgte eine Hybridisierung mit einer ^{32}P markierten Probe (389 bp PCR Fragment; Abbildung. 1.18). Die Anwesenheit mehrerer Banden in fast allen Reaktionen läßt auf die Existenz mehrerer Genloci für Reggie-1 schließen, da die Probe (389bp) klein gegenüber der zu erwartenden Mindestgröße des Reggie-1 Genlocus (mindestens 3,1 kb) ist. Allerdings besitzt der Goldfisch einen tetraploiden Chromosomensatz, diese Tatsache steht dieser einfachen Interpretation im Wege.

Zusätzlich konnten zu Reggie-1, -2 partielle cDNAs (R10a und R4b) kloniert werden, die in den putativen 3' nicht translatierten Bereichen deutliche Unterschiede zu den Reggie-1 Klonen R8a, R9a, R3 und R7b aufweisen. Identisch mit den o.g. Klonen sind sie aber in den putativen translatierten Bereichen (s.h. Tabelle 1.4)

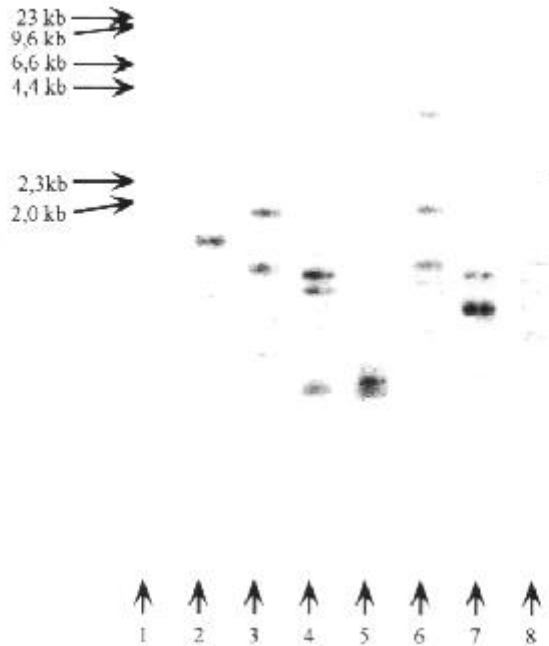


Abbildung 1.18 Genomische *Southern Blot* Analyse von Reggie-1 im Goldfisch. 1: Molekulargewichtsstandard, λ /*Hind III*, an ihn hybridisiert keine Probe. In den weiteren Spuren sind je 10 μ g genomischer Goldfisch DNA mit den folgenden Restriktionsenzymen verdaut worden: 2: *Hind III*; 3: *Eco RI*; 4: *Eco RV*; 5: *Nco I*; 6: *Pst I*; 7: *Xba I*; 8: *Bam HI*. Die Hybridisierung erfolgte mit einem 32 P markierten 389 bp großen PCR Fragment von Reggie-1 als Probe.

1.5 Analyse der Reggie Expression in adulten und embryonalen Goldfischen

1.5.1 Reggie-1 und Reggie-2 mRNAs haben eine Größe von ca. 3 und 3,2 kb in verschiedenen neuronalen Geweben.

Um die Größe der Reggie-1 und Reggie-2 Transkripte sowie deren gewebsspezifische Expression zu untersuchen, wurden von verschiedenen neuronalen Geweben und der Haut adulter Goldfische Gesamt RNA isoliert und per *Northern Blot* analysiert. Jeweils 10 μ g Gesamt RNA optischer Tecta, Retinae (normal und 14 d nach Nervdurchtrennung) sowie Haut wurden auf einem Formaldehyd-Agarose Gel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylon-

membran mit ^{32}P markierten Proben gegen Reggie-1 (389 bp PCR Fragment) und Reggie-2 (1 kb PCR Fragment) hybridisiert (s.h. Abbildung 1.19).

Die mRNA von Reggie-1 ist ca. 3 kb groß und in allen getesteten Geweben nachweisbar (s.h. Abb. 1.19a). Das stärkste Signal tritt in der Retina von Tieren 14 d nach Nervdurchtrennung auf. Es ist deutlich intensiver als das Signal in Retinae von Kontrollfischen. Im optischen Tectum tritt noch ein zweites Transkript von ca. 2,9 kb auf. In der Haut sind ebenfalls zwei Transkripte von 3,0 und 2,9 kb zu identifizieren, ihre Intensität ist allerdings im Vergleich zu denen in neuronalen Geweben deutlich geringer.

Die Reggie-2 mRNA in neuronalen Geweben hat eine Größe von ca. 3,2 kb. In der Haut tritt zwar ein Transkript solcher Größe auf, die Hauptbande dort hat aber eine Größe von ca. 2,3 kb (s.h. 1.19b).

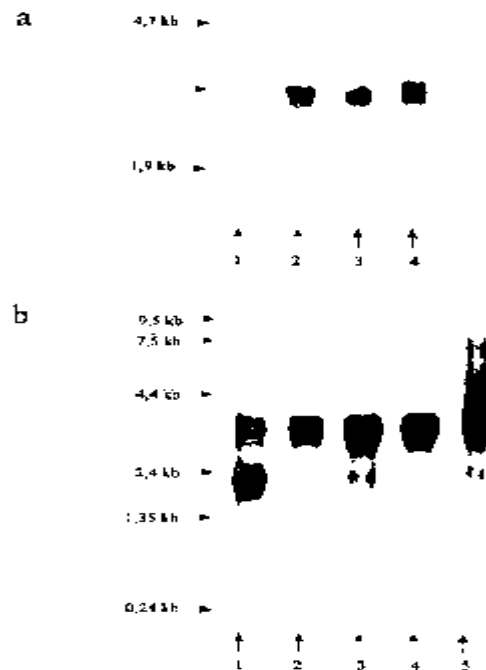


Abbildung 1.19 Northern Bot Analyse von Reggie-1 und Reggie-2. a) Jeweils 10 μg Gesamt RNA von 1: Haut, 2: optisches Tectum (ohne Durchtrennung des optischen Nervs (ONS)), 3: Retina (ohne ONS), 4: Retina (GF 2 Wochen nach ONS) wurden wie in 3.2.2.20 beschrieben aufgetrennt und analysiert. b) Jeweils 10 μg Gesamt RNA von 1: Haut, 2: optischem Tectum (GF ohne ONS), 3: optischem Tectum (2 Wochen nach ONS), 4: Retina (ohne ONS), 5: Retina (2 Wochen nach ONS) wurden wie in 3.2.2.20 beschrieben aufgetrennt und analysiert.

1.5.2 Reggie-1 und Reggie-2 werden in der Retina des adulten Goldfisches nach einer Durchtrennung des Sehnervs gleichermaßen induziert.

Der monoklonale Antikörper M802 detektiert Reggie in der Retina des adulten Goldfisches nur auf jungen wachsenden Axonen und deren Ursprungszellen (Paschke, 1990). Demnach sollten die entsprechenden mRNAs von Reggie-1 und Reggie-2 gleichermaßen reguliert werden. Reggie-1 und oder Reggie-2 Transkripte sollten in der Retina des adulten Goldfisches in „neugeborenen“ RGZs am äußersten Rand der Retina und in allen RGZs nach einer Nervdurchtrennung zu finden sein, aber nicht in normalen adulten RGZs. M802 detektiert ferner alle RGZs und deren Axone nach ONS (Paschke, 1990). Folglich sollten Reggie mRNA Mengen in der Retina nach einer ONS in allen RGZs ansteigen. Diese Transkripte sollten außerdem zeitlich ähnlich reguliert werden wie das M802 Antigen. Diese Fragestellungen wurde mit Hilfe von in situ Hybridisierungen an ganzen Retina Präparationen und Kryoschnitten von Retinae adulter Goldfische angegangen.

Erste Hybridisierungen wurden an ganzen Retina Präparationen durchgeführt. Als Sonden dienten jeweils vollständige in vitro Transkripte (mit Digoxigenin-UTP) in *antisense* Orientierung (s.h. 3.2.2.23) von Reggie-1 und Reggie-2, die durch limitierende Hydrolyse auf eine mittlere Größe von 250 nt gebracht worden waren. Als Negativkontrolle dienten Sonden gleicher Art, aber in *sense* Orientierung.

Nach Hybridisierung und Nachweisreaktion (s.h. 3.2.3.3) ergab sich folgendes Bild: Beide Proben, Reggie-1 und Reggie-2, zeigten das gleiche Expressionsmuster. Bei Retinae von Fischen 1, 2, 3 und 4 Wochen nach Nervdurchtrennung war ein starkes Hybridisierungssignal (lilafarbenes Präzipitat) in den Ganglienzellen detektierbar (s.h. 1.20a). Bei stärkerer Vergrößerung (s.h. 1.20c) ist deutlich die cytoplasmatische Lokalisierung des Präzipitats zu erkennen. Der Zellkern blieb ausgespart. In den retinalen Ganglienzellen von Kontrollfischen ohne Nervdurchtrennung trat kein Signal auf (s.h. 1.20b). Bei einer intakten Aderhaut – sie liegt über der Retina, wurde aber normalerweise entfernt – ergab sich ein spezifisches Signal in den Endothelzellen der Blutgefäße. In solchen Fällen, aber war das Signal in den retinalen Ganglienzellen deutlich schwächer. Die Aderhaut scheint demnach eine Penetrationsbarriere für die cRNA-Proben und die alkalische Phosphatase konjugierten anti *DIG* F_{ab} Fragmente darzustellen. Ohne Signal blieben die Hybridisierungen mit den *sense* Proben unter jeweils identischen Bedingungen.

Da auch auswachsende Axone des normalen adulten Goldfisches M802 positiv sind, sollten auch die am äußeren Rand der Retina liegenden Ganglienzellen positiv für Reggie-1 und Reggie-2 Transkripte sein. In einigen Fällen waren diese Zellkörper auch gefärbt, allerdings war ihre Zahl deutlich geringer als die Zahl der M802 positiven in den Gesamt Retina Immunfärbungen (s.h. Diskussion).

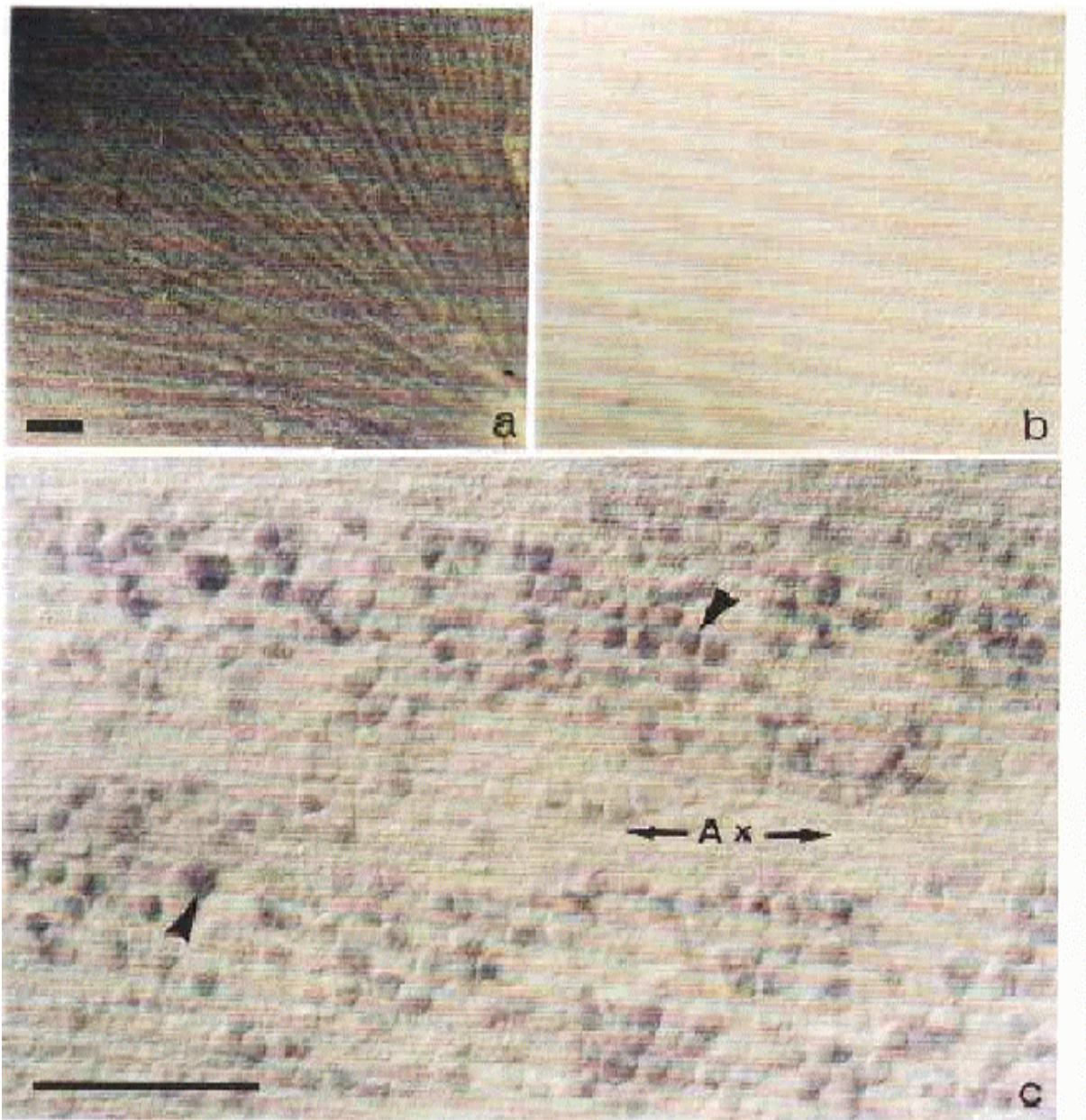


Abbildung 1.20 In situ Hybridisierung an Gesamtpräparaten von Goldfisch Retinae, vor und nach einer optischen Nervdurchtrennung (ONS). a: Kontroll-Retina mit Reggie-1; b: Retina 2 Wochen nach ONS mit Reggie-1; c: Kontroll-Retina mit Reggie-2; d: Retina 2 Wochen nach ONS mit Reggie-2. Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Es wurde anfangs versucht in situ Hybridisierungen an Kryoschnitten anhand eines existierenden Protokolls durchzuführen (Nachweis von Opsin Transkripten in der Retina des adulten Goldfisches mit Hilfe des *DIG* Systems, Galuska et al. 1994). Diese Vorschrift galt es in verschiedener Hinsicht zu optimieren, da mit ihm praktisch keine Signale über dem Hintergrund mit Reggie-1 Proben zu erzielen waren. Als optimal stellte sich eine Schnittdicke von 16 μm heraus, dünnere Schnitte geben ein schwächeres Signal und dickere lösen sich bei der Hybridisierung ab. Optimal als Beschichtungsmaterial für die Objektträger war *Vectabond* (Vector). Als ausreichende Vorbehandlung stellte sich eine 10 minütige Fixierung mit 4%igem Formaldehyd in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) dar, gefolgt von einer schrittweisen Dehydratisierung und Delipidierung in einer Methanolreihe (70%, 80%, 95% und 100%) mit einer abschließenden 1 minütigen Chloroformbehandlung. Alle Hybridisierungs- und Waschschrte wurden bei 55°C durchgeführt. Höhere Temperaturen führen zu schwächeren Signalen bzw. zur teilweisen oder vollständigen Ablösung der Schnitte (besonders bei Hirngewebe). Das Ergebnis einer Hybridisierung eines Retinaschnittes (4 Wochen nach Nervdurchtrennung) mit einer Reggie-1 Probe ist in Abb. 1.21a dargestellt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Hybridisierungen an gesamten Retinapräparaten fand sich in Kryoschnitten der Retinae von Goldfischen 4 Wochen nach Nervdurchtrennung ein deutliches Signal in den Ganglienzellen. Bei Retinae nicht nervdurchtrennter Goldfische trat kein Signal auf. *Sense* Proben führten in allen Experimenten zu keinem Signal in der Retina. Allerdings trat in Querschnitten des optischen Nervs eine Färbung sternförmiger Zellen auf. Diese war bei *sense*- und bei *antisense*-Proben gleich und stellt wahrscheinlich eine endogene alkalische Phosphatase Aktivität in diesen Zellen dar, weil Reaktionen ohne vorherige Hybridisierung das gleiche Färbemuster ergaben. In 1.21b ist ein Ausschnitt aus dem Stammhirn zu sehen. Dort sind große Zellkörper (wahrscheinlich lang projizierende Neurone) gefärbt. Es stellt die einzige spezifische Färbung an Schnitten des Gehirns dar.

Endothelzellen von Blutgefäßen im Nervensystem sind ebenfalls M802 positiv. Auch diese Endothelzellen sollten demnach Reggie-1 und oder Reggie-2 Transkripte produzieren. Dies ist auch der Fall (s.h. 1.21), allerdings waren diese in den in situ Hybridisierungen von Kryoschnitten praktisch nicht nachweisbar. Schon die Signale der Endothelzellen (vor allem in der Aderhaut) in den Gesamt Retinapräparaten waren schwach, deshalb ist es nicht verwunderlich, daß die dünneren Kryoschnitte kein Signal mehr aufwiesen.

1.5.3 Im optischen Tectum sind Reggie-1 und Reggie-2 Transkripte in den retinorezipienten Schichten nicht nachzuweisen.

In den retinorezipienten Schichten des Tectums (SO und SFGS) waren weder Reggie-1 noch Reggie-2 Signale detektierbar. Auch in den Endothelzellen der Blutgefäße des Hirns ließen sich – in den Kryoschnitten – weder Reggie-1 noch Reggie-2 Transkripte nachweisen. Ein sehr starkes Signal für beide Transkripte lieferten dafür Zellen im Stammhirn, die wahrscheinlich, aufgrund ihrer Größe, langprojizierende Neurone darstellen.

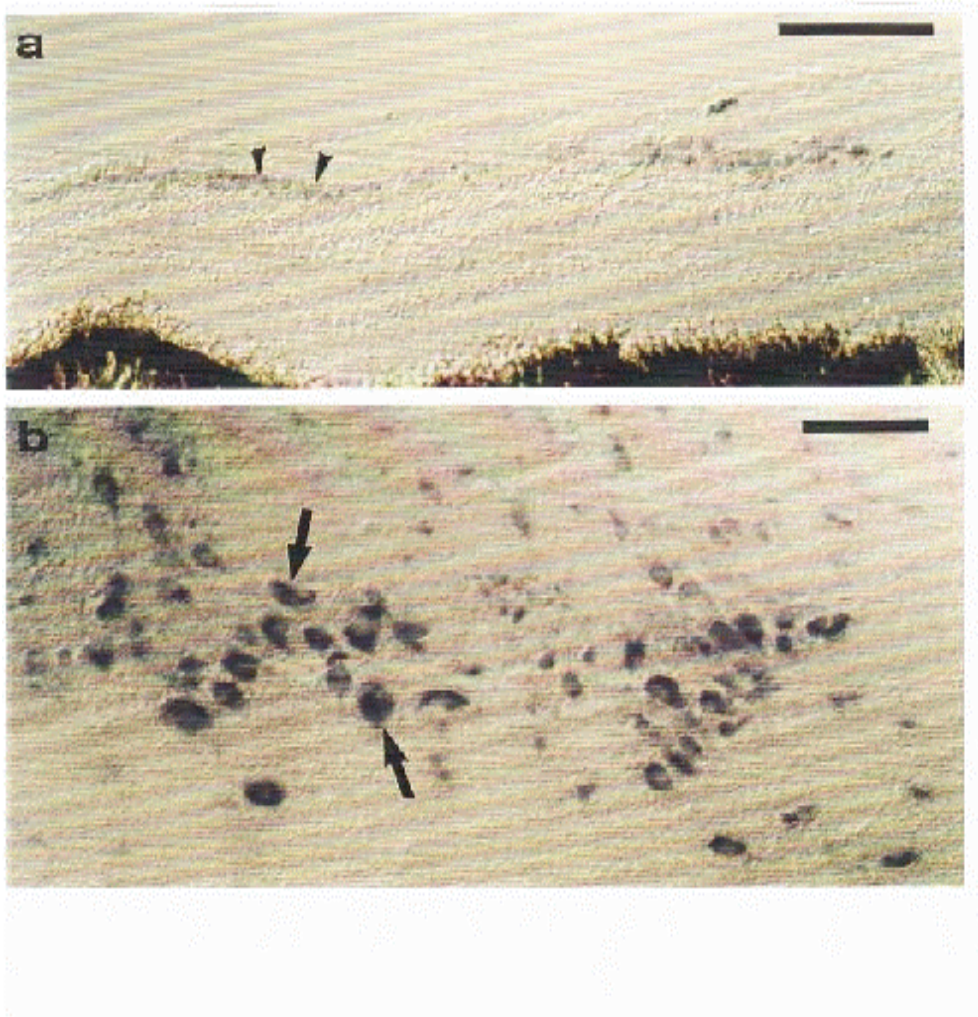


Abbildung 1.21 In situ Hybridisierung mit Reggie-1 und Reggie-2 Proben an 16 µm dicken Kryoschnitten des Auges (Querschnitt) und des Hirns (Querschnitt auf Höhe des optischen Tectums) eines adulten Goldfisches 4 Wochen nach einer einseitigen Nervdurchtrennung. Maßstabsbalken: a = 50 µm, b= 20 µm.

1.5.4 Reggie-1 und Reggie-2 Transkripte sind in der embryonalen und früh larvalen Retina nicht zu detektieren.

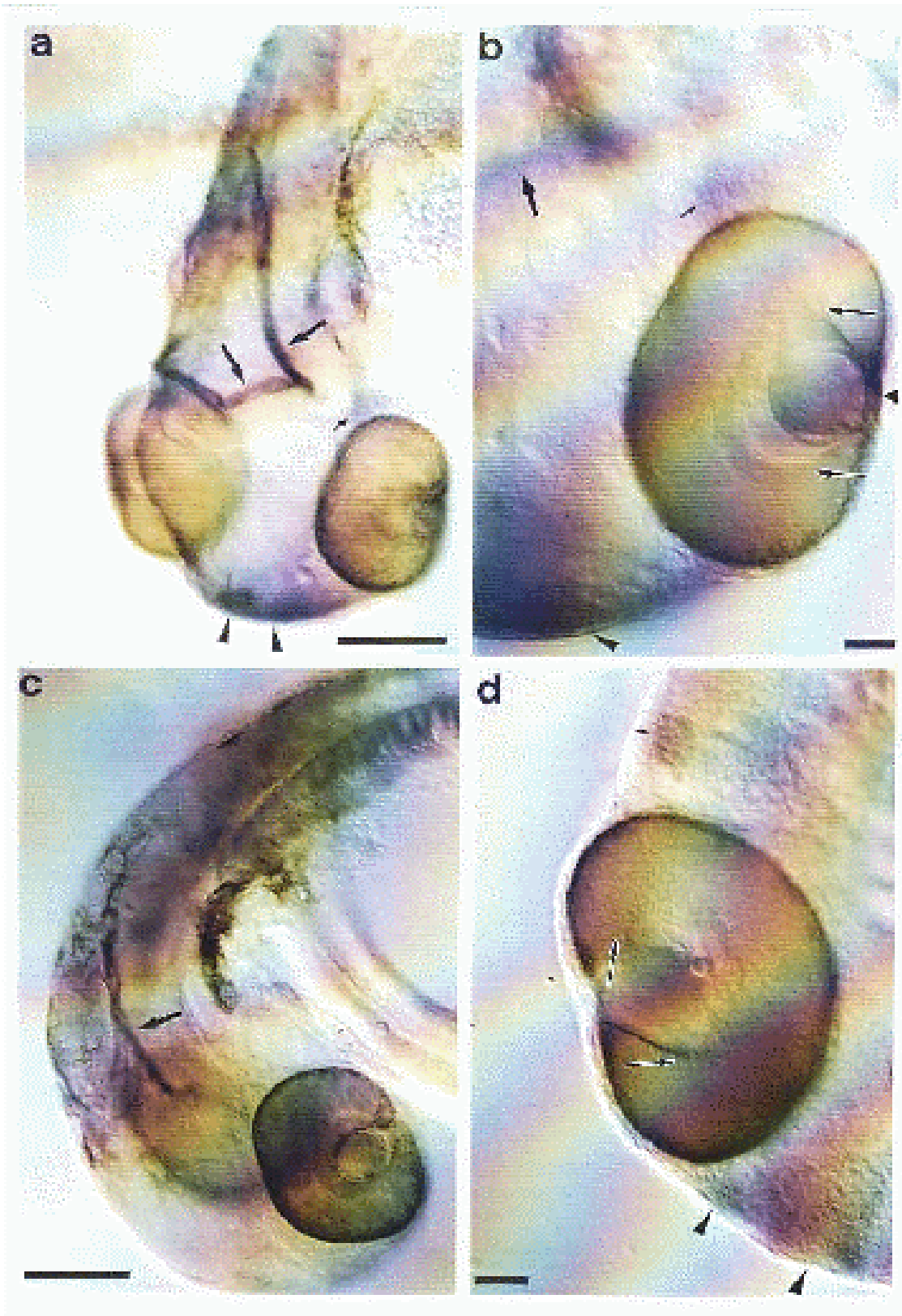
Die Zellkörper und Axone der retinalen Ganglienzellen des Goldfischembryos sind M802 negativ. In situ Hybridisierungen an ganzen Goldfischembryonen (48h post Fertilisation(pf)) und (72 h pf)) zeigten ebenfalls keine Signale für Reggie-1 und Reggie-2 in den Ganglienzellen der Retina (s.h. Abb. 1.23a und 1.23c).

Allerdings deckte die Analyse weiterer Strukturen in den Präparaten Unterschiede in der Expression von Reggie-1 und Reggie-2 auf. Beide mRNAs werden in Zellen des olfaktorischen Epithels und in Zellen des Trigeminus exprimiert. Darüber hinaus fanden sich in den Rohon Beard Neuronen, Epithelien des Hirnventrikels und in sekundären Linsenfasern Signale, die Reggie-2 spezifisch waren (s.h. Tabelle 1.9 und Abbildungen 1.22, 1.23).

	<i>Auge</i>	<i>rostral</i>	<i>Mes-und Telencephalo n</i>	<i>caudal</i>
48h <i>Reggie-1</i>	-	•olfaktorisches Epithel (schwach)	• Trigeminus (schwach)	-
<i>Reggie-2</i>	-	•olfaktorisches Epithel (schwach)	• Trigeminus (schwach) • Hirnventrikel (schwach)	-
72h <i>Reggie-1</i>	-	•olfaktorisches Epithel	• Trigeminus	-
<i>Reggie-2</i>	• Retina: kein Signal • Linse: laterale Zellen in Kontakt mit Blutgefäß an ventraler Fissur, sekundäre Linsenfasern	•olfaktorisches Epithel	• Trigeminus • Hirnventrikel	• Rohon Beard Neurone

Tabelle 1.9 Reggie-1 und Reggie-2 positive Strukturen im Goldfischembryo (48 h und 72 h pf) in in situ Hybridisierungen.

Abbildung 1.22 (nächste Seite) In situ Hybridisierungen an ganzen Goldfischembryonen (48 h und 72 pf) mit Reggie-2 *antisense* cRNA. a: 72 h Embryo, Pfeilköpfe markieren das olfaktorische Epithel, große Pfeile kennzeichnen den Ventrikel des sich entwickelnden Gehirns, kleiner Pfeil markiert den Kern des *Nervus trigeminus*. b: Ausschnittvergrößerung von a, zusätzlich ist die Schicht der retinalen Ganglienzellen mit weiß umrandeten Pfeilen und der laterale Teil der Linse mit einem kleinen Pfeilkopf markiert. c und d: 48 h Embryo, gleiche Pfeil-Nomenklatur wie bei a und b. Maßstabsbalken: a und c: 400 µm, b und d: 100 µm



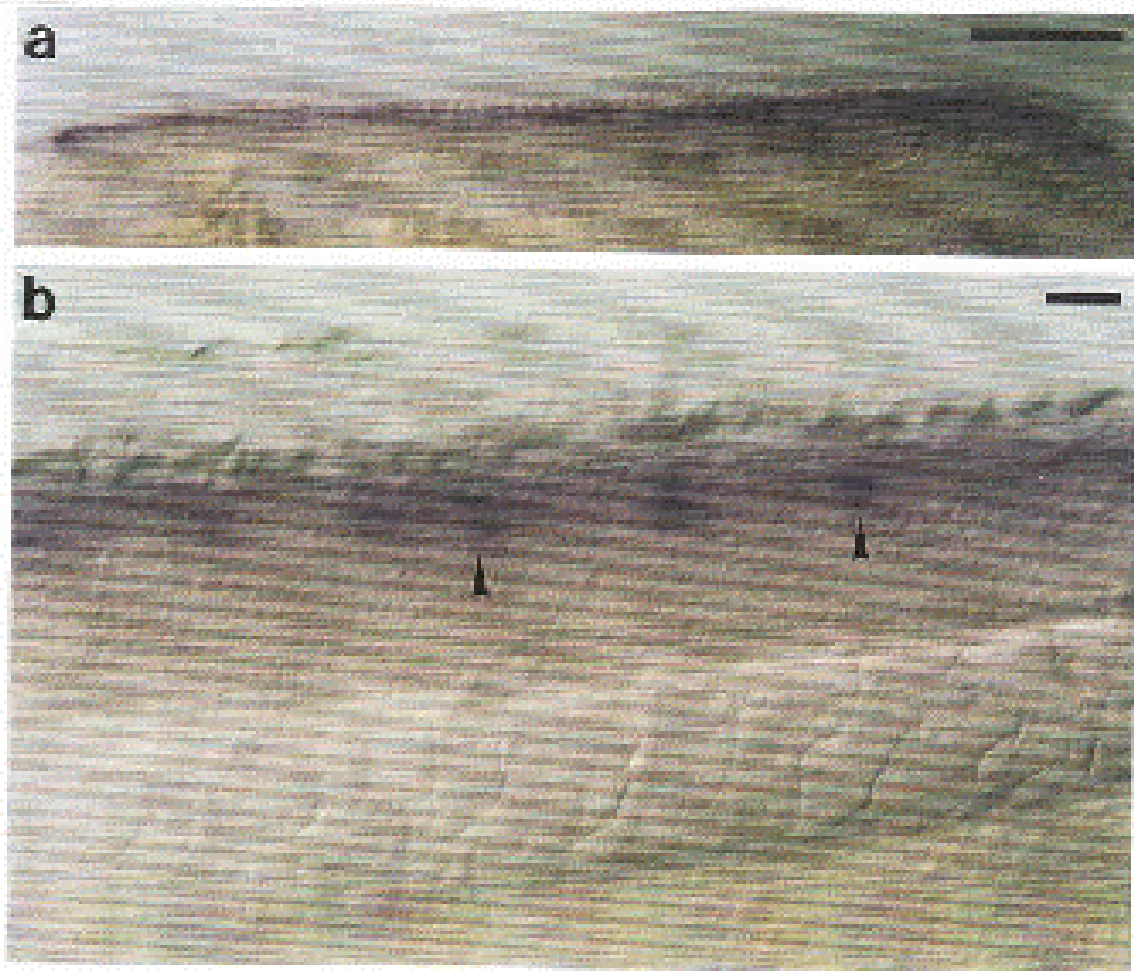
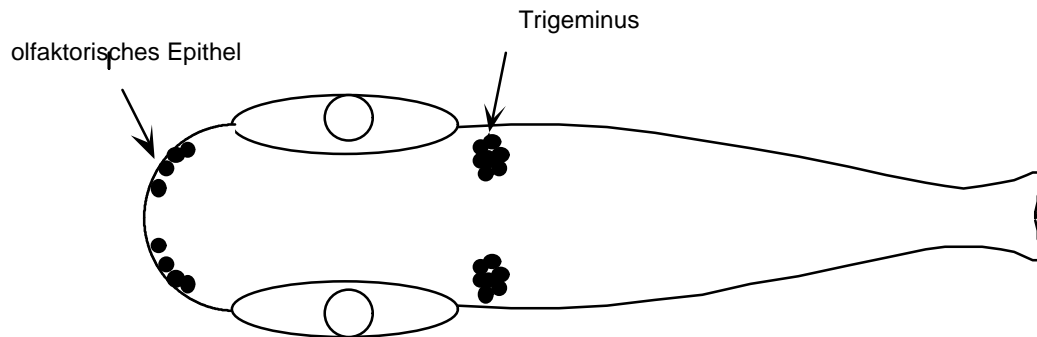


Abbildung 1.23 In situ Hybridisierung an 72 h Goldfischembryonen mit Reggie-2 *antisense* cRNA. a und b Darstellung des Schwanzbereiches mit markierten Rohon Beard Neuronen (Pfeilköpfe). Maßstabsbalken: a; 400 μm , b: 100 μm .

Reggie-1 Expression im 72 h Goldfischembryo:



Reggie-2 Expression im 72 h Goldfischembryo:

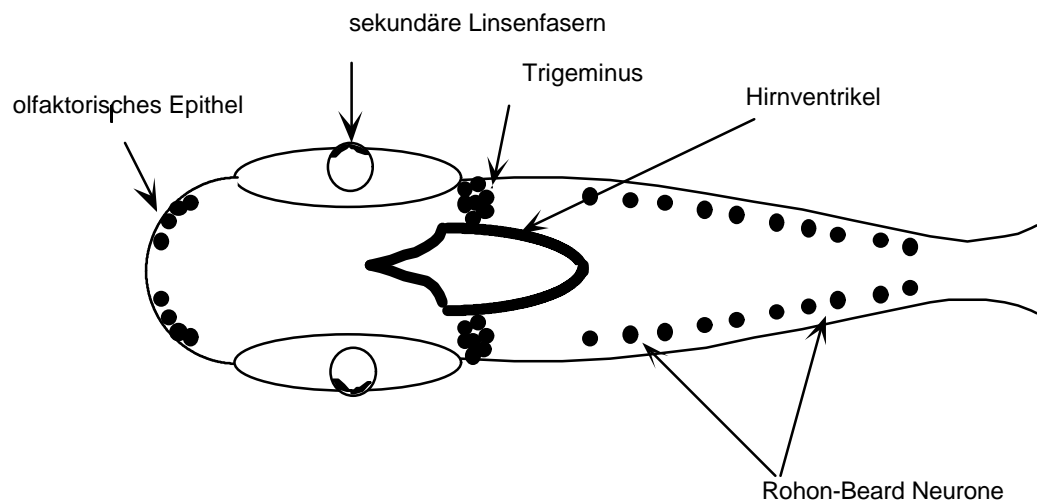


Abbildung 1.24 Verteilung der Reggie-1 und Reggie-2 mRNA Expression im 72 stündigen Goldfischembryo (Aufsicht). Schwarz gefüllte Kreise/Streifen markieren Zellen mit in situ Hybridisierungssignal.

KAPITEL 2

DISKUSSION

Ausgehend von einem monoklonalen Antikörper M802, der wachsende und vor allem regenerierende retinale Ganglienzellaxone im Sehsystem des Goldfisches erkennt (Paschke, 1990), erfolgte in dieser Arbeit die molekularbiologische Charakterisierung des M802 Antigens (Reggie).

1. Das M802 Antigen (Reggie) konnte als ein peripheres Membranprotein mit einem apparentem Molekulargewicht von 48 kD identifiziert werden. Die Mikrosequenzierung des aus Larven (30-60 d) gereinigten Proteins (Dr. F. Lottspeich) erbrachte eine N-terminale und 7 interne Peptidsequenzen.

2. Zu Reggie aus Larven existieren zwei unterschiedliche mRNAs: Reggie-1 und Reggie-2; deren Translationsprodukte sind zu 45% identisch. Sie sind das Produkt mindestens zweier Gene im Goldfisch.

3. Die Genprodukte von Reggie-1 und Reggie-2 sind überwiegend hydrophile Proteine mit einer vorwiegend α -helikalen Sekundärstrukturvorhersage. Das humane *epidermal surface antigen* (ESA) ist wahrscheinlich das Homologe zu Reggie-1, da es zu 80% mit diesem aminosäureidentisch ist. Reggie-1 und Reggie-2 bilden eine neue Familie hochkonservierter Zelloberflächenproteine im Nervensystem, denn sowohl zu Reggie-1 (ESA) als auch zu Reggie-2 existieren putative Homologe im Nervensystem der Säuger mit Aminosäure-Identitäten von ca. 85%.

4. Reggie-1 und Reggie-2 Transkripte werden im Nervensystems des Goldfisches exprimiert. Die durch Northern Blot Analyse bestimmten mRNA Größen stimmen mit der Größe der isolierten cDNAs überein. Reggie-1 und Reggie-2 werden gleichermaßen nach einer Nervdurchtrennung in den retinalen Ganglienzellen exprimiert. Die Transkripte konnten im

retinotectalen System des Goldfischembryos und der Larve (bis 30 d) nicht nachgewiesen werden. Dies stimmt mit dem Befund überein, daß M802 weder retinale Ganglienzellen noch deren Axone in diesen Stadien erkennt.

5. Zwei neue monoklonale und ein polyklonaler Antikörper (446), gegen immunoaffinitätsgereinigtes Reggie gerichtet, wurden gewonnen. Sie erkennen das gleiche Antigen wie der M802 Antikörper.

2.1 Die Charakterisierung des M802 Antigens (Reggie)

Unter ausreichend denaturierenden Bedingungen zeigte sich das immunoaffinitätsgereinigte M802 Antigen (Reggie) als Protein mit einem apparentem Molekulargewicht von 48 kD. Dieses 48 kD Protein war auch im *Western Blot* unter nicht reduzierenden Bedingungen sichtbar. Die Anwesenheit von Reduktionsmitteln, wie DTT oder 2-Mercaptoethanol, hatte keinen Einfluß auf das Laufverhalten in der SDS PAGE. Allerdings schien eine nicht ausreichende Denaturierung vor der SDS PAGE zur Bildung teilweise SDS resistenter, stöchiometrischer Komplexe von Reggie zu führen (ca. 300 kD). Die Erhöhung des SDS Anteils im Probenpuffer auf 3% ließ diese 300 kD Bande verschwinden.

Das Protein ist in der Membranfraktion angereichert. Es läßt sich mit denaturierenden Agenzien (8 M Harnstoff), mit Detergenzien (3% OGP, 1% TX-100), aber auch mit Hochsalm (500 mM NaCl; pH 7,4) und alkalischem Puffer (100 mM TEA; pH 11) aus Membranmikrosomen herauslösen. Da schon eine Extraktion mit 500 mM NaCl (bei neutralem pH) Reggie von der Membran entfernt, stellt Reggie ein peripheres Membranprotein dar. Die Molekulargewichte der biotinmarkierten M802 immunopräzipitierten Proteine (1.1.7) entsprechen zwar nicht genau 48 kD, sondern erscheinen etwas größer, doch ist dies mit der Biotinmodifikation erklärbar, die das Laufverhalten von Proteinen zu höheren apparenten Molekulargewichten verändert. Eine genaue Kalibrierung ist auch mit biotinmarkierten Molekulargewichtstandards nicht möglich, da diese unterschiedlich stark mit Biotin derivatisiert sind.

Die nur halbvollständige Extraktion von Reggie durch Hochsalzextraktion aus den Membranmikrosomen liegt wahrscheinlich darin begründet, daß die Mikrosomen durch die Extraktionsbedingungen (500 mM NaCl; pH 7,4) intakt bleiben, das heißt nur Protein auf ihrer Oberfläche kann in Lösung gehen. Erst unter Einfluß des 100 mM Triethylamins pH 11,0 werden die Mikrosomen labil (Fujiki et al., 1982) und können nun eingeschlossenes Protein freigeben. Eine weitere Möglichkeit für dieses Verhalten wäre die Existenz eines Bindeproteins in

der Membran, welches Reggie über nicht ionische Wechselwirkungen bindet, aber bei pH 11,0 denaturiert wird.

Ein interessanter Befund ist weiterhin, daß zwei Proteine (48 kD und 50 kD) selektiv durch 3% OGP unter pH 7,4 und Niedrigsalzbedingungen (50 kD) oder durch 500 mM NaCl unter pH 7,4 (48 kD) aus der Membran herausgelöst werden und vom 446 Antikörper erkannt werden. Die nachfolgende Extraktion der Hochsalz extrahierten Membranmikrosomen durch 100 mM TEA (pH 11,0) setzt noch einmal weiteres 48 kD Protein, aber wenig 50 kD Protein frei, so daß sich die Frage erhebt, ob der Antikörper M802 die gleichen Proteine erkennt wie der Antikörper 446. Wäre dem so, dann gäbe es zwei verschiedene Formen, die sich durch ihre physikalischen Eigenschaften (Löslichkeit in polaren oder amphiphilen Lösungsmitteln) voneinander unterscheiden. Entweder weist dies auf die Existenz eines Membranankers hin – die Octylglucopyranosid lösliche Form hat ja ein größeres apparentes Molekulargewicht – oder auf ein integrales Membranprotein, welches auch das M802 Epitop trägt. Die Existenz verschiedener Proteine ließe sich unter Umständen auch aus der Immunfluoreszenz mit dem M802 Antikörper herleiten. Dort existiert ja ein diffuses- (retinorezipiente Schichten nach Nervdurchtrennung) und ein distinktes (Blutgefäßendothelien) Färbemuster (Paschke, 1990). Inwieweit das vom 446 Antikörper erkannte Bandendoublet bei 70 kD eine spezifische Bindung darstellt, ist nicht klar. Mit dem M802 Antikörper kam es weder im Western Blot noch in der Immunopräzipitation zu einer Erkennung dieser Banden.

2.2 Die neuen monoklonalen Reggie-Antikörper

Die neu produzierten monoklonalen Antikörper (M72 und M343) zeigen das gleiche Muster in Immunfärbungen (optisches Tectum eines Goldfisches, 4 Wochen nach einseitiger Nervdurchtrennung) wie M802. Darüberhinaus führt M802 in Immunfärbungen von Gliazellkulturen des optischen Nervs des Goldfisches zur selektiven Anfärbung kleiner Zellen, die möglicherweise Mikroglia darstellen. Auch die Antikörper M72 und M343 erkennen in diesen Färbungen selektiv solche Zellen (M. Bastmeyer, pers. Mitteilung). Die Immunisierung der Maus, aus der die Antikörper hervorgingen, erfolgte mit immunoaffinitätsgereinigtem Reggie Protein aus gesamten Goldfischlarven. Betrachtet man nun noch das Expressionsmuster der Reggie-1 und Reggie-2 Transkripte, dann ist es zumindest wahrscheinlich, daß das vom M802 in Kryoschnitten erkannte und das immunoaffinitätsgereinigte Reggie Protein aus gesamten Goldfischlarven identisch sind. Dies wird durch den Befund gestützt, daß Reggie-1 und Reg-

gie-2 Transkripte in einem zeitlich und räumlichen Muster exprimiert werden, welches mit der Verteilung des Proteins bzw. M802 Immunoreaktivität übereinstimmt.

2.3 Die Klonierung von zwei cDNAs zu Reggie

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wies das M802 Antigen als heterogen aus. Eine Ansequenzierung der Proteine nach einer zweidimensionalen Gelelektrophorese wurde zwar von Dr. Lottspeich versucht, scheiterte aber an den zu geringen Mengen nach der Auftrennung. Erst die molekularbiologische Charakterisierung zeigte, daß das M802 Antigen aus mindestens 2 verschiedenen Polypeptiden besteht, die nur zu 45% identisch sind (Reggie-1 und Reggie-2). Der Tatbestand, daß sich die partielle Aminosäuresequenz RLysyC5 nicht vollständig in den Reggie-1 cDNAs wiederfinden ließ, weist auf eine noch höhere Heterogenität auf mRNA und entsprechend auf Proteinebene hin. Ein Teil der 6 deutlich unterscheidbaren *spots* in der zweidimensionalen Gelelektrophorese könnte durch unterschiedliche Modifizierungen einer kleineren Zahl von Polypeptiden zustande kommen. Deren Existenz ist allerdings gar nicht notwendigerweise zu fordern, da Reggie-1 Isoformen, wie R10a (Reggie-1') isoliert worden sind, die einige Aminosäureaustausche gegenüber dem Reggie-1 Klon R8a besitzen und sich damit unterschiedlich in der isoelektrischen Fokussierung verhalten sollten. Es ist nicht verwunderlich, daß die *Southern Blot* Analyse Reggie-1 als multi Kopie Gen im Genom des Goldfisches identifiziert, denn die partielle cDNA Sequenz zu Reggie-1' weist vor allem im 3' nichttranslatierten Bereich eine nur noch 65%ige Identität zu Reggie-1 (R8a) auf. Allerdings ist eine genomische *Southern Blot* Analyse bei Goldfischen kritisch, da diese Fische tetraploid sind und zudem einer Gendrift unterliegen. Im Falle von Gap-43 (im Goldfisch Gap-48) ergab diese ein Einzelkopie-Gen (LaBate und Skene, 1989), doch es ist bekannt, daß andere Gene, die in Mensch, Maus und Drosophila als Einzelkopie Gen vorliegen, weisen im Goldfisch mehrere Kopien auf, welche nicht identisch sind (Polymorphismen, Risinger und Larhammar, 1993). Bei anderen tetraploiden Organismen, wie dem afrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), sind ähnliche Fälle bekannt (z.B. Synaptophysin, Wang und Poo, 1995). Das bedeutet, daß Reggie-1 im Goldfisch in mehreren polymorphen Genkopien vorliegt, doch ist dies wahrscheinlich auf den tetraploiden Chromosomensatz des Tieres zurückzuführen.

Das *epidermal surface antigen* (ESA) – es ist 80% aminosäureidentisch zu Reggie-1 und ist wahrscheinlich das Säugerhomologe zu Reggie-1 – besitzt nur eine Kopie im Genom des Menschen und der Maus. Dieses ESA weist eine erstaunliche Ähnlichkeit zu Reggie-1 auf, wiewohl sein apparentes Molekulargewicht aus *Western Blot* mit dem Antikörper ECS-1 mit

35 kD kleiner ist als das von Reggie-1 (Schroeder et al., 1994). Allerdings weist die momentan veröffentlichte cDNA Sequenz zu ESA in *Genbank* einen offenen Leserahmen von rechnerisch 41,7 kD aus. Damit ist ESA deutlich kleiner als Reggie-1, welches um 50 Aminosäuren am N-Terminus länger ist und dessen errechnetes Molekulargewicht von 46,9 kD sehr gut mit seinem apparentem Molekulargewicht in der SDS PAGE übereinstimmt. Ob mehrere ESA mRNAs mit alternativen Translationsstartpunkten existieren, ist offen. Diese müßten allerdings durch alternatives *splicing* entstehen, da es sich bei ESA um ein Einzelkopie-Gen handelt (Schroeder et al., 1994).

Auch zu Reggie-2 finden sich mittlerweile putative Säugerhomologe in *Genbank*, genauer in der Datenbank der *expressed sequence tags* (EST). Die in dieser Datenbank abgespeicherten Sequenzen entsprechen kleinen cDNA Fragmenten von zufällig klonierten und ansequenzierten cDNA Klonen eines Gewebes. Es finden sich hier mehrere Einträge, die eine Identität von ca. 90% zu Reggie-2 aufweisen. Auch in der Datenbank des *Drosophila Genome Project* findet sich ein Eintrag mit hoher Identität zu Reggie-2 (90%). Die Reggie Proteinfamilie scheint demnach in der Evolution hoch konserviert zu sein. Eine Aufteilung in distinkte Domänen bestimmter Funktion – wie beispielsweise bei den Zelladhäsionsmolekülen der Immunoglobulinsuperfamilie (Übersicht in Brümmendorf und Rathjen, 1994) – ist anhand der Homologievergleiche nicht möglich. Demnach ist bei diesen Proteinen wahrscheinlich die Gesamtstruktur entscheidend für die Funktion.

Der Klon R9a enthält neben dem putativen Homologen des spannungsabhängigen Anionenkanals der Säuger ein Stop Codon an der Aminosäureposition 297 (entstanden durch einen einzelnen Basenaustausch) von Reggie-1. Es wäre möglich, daß R9a ein weiteres Transkript darstellt. Allerdings ist an der fraglichen Stelle Proteininformation durch das RLysC1 Peptid vorhanden. Außerdem ist in keiner der fünf weiteren cDNA Klone zu Reggie-1 ein solches Stop Codon vorhanden. Ich halte es demnach für wahrscheinlicher, daß es sich bei diesem Basenaustausch um eine Mutation während der reversen Transkription oder der nachfolgenden Amplifikation handelt.

Es stellt sich die Frage, warum der monoklonale Antikörper M802 in Zellmembranextrakten zwei Proteine erkennt, deren Sequenzen zu nur 45% identisch sind. Es ist nicht geklärt, ob der M802 ein kontinuierliches oder ein diskontinuierliches Epitop erkennt. Eine Möglichkeit für ein kontinuierliches Epitop wären die N-terminalen Sequenzen von Reggie-1 (...GPNEALVVSG...) und Reggie-2 (...GPNEAMVVSG...). Eine weitere Möglichkeit ist

die eines gemeinsamen Strukturepitops. Es ist bislang kein Unterschied im Expressionsmuster der mRNAs von Reggie-1 und Reggie-2 während der axonalen Regeneration nach Durchtrennung des optischen Nervs festgestellt worden. Dabei werden anscheinend beide Transkripte in ähnlichen Mengen von einer Zelle produziert. Deshalb besteht die Möglichkeit, daß M802 ein Heterodimeres aus Reggie-1 und Reggie-2 erkennt. Ob dies zutrifft, ließe sich in Zukunft mit rekombinantem Protein oder mit zwischen Reggie-1 und Reggie-2 differenzierenden Antikörpern klären.

Die meisten eukaryotischen mRNAs sind am 3'-Ende polyadenyliert. Auslöser für diese Polyadenylierung ist ein nahe dem 3'-Ende der prä-mRNA gelegenes poly A Signal. Die Sequenz des Reggie-2 Klons R181a enthält kein solches poly A Signal. Es gibt zwar in der Literatur Hinweise für unübliche Polyadenylierungssignale (Wahle und Keller, 1986), doch sind diese sehr selten. Die Sequenz enthält nur 4 Adenine am 3'-Ende. Es ist demnach möglich, daß das 3'-Ende des Klons R181a, in dem das poly A Signal liegt, fehlt.

2.4 Die Charakterisierung von Reggie-1 und Reggie-2

Reggie-1 und ESA weisen keine putativen transmembranären α -helikalen Transmembransegmente auf (Kyte und Doolittle, 1982). Bei der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Reggie-2 detektieren sowohl der Algorithmus von Kyte und Doolittle als auch die GES-Methode (Goldman, Engelman, Steitz; Engelman et al., 1986) im Bereich Aminosäure 27-47 einen putativen transmembranösen Bereich. Allerdings ist dieser Abschnitt des Proteins wahrscheinlich nicht α -helikal (*Predictprotein*, EMBL Heidelberg). Auch für eine Verankerung mittels Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI) finden sich keine Hinweise weder experimentell noch über die Analyse der abgeleiteten Proteinsequenzen. Für diese Struktur müßte sich in der abgeleiteten Proteinsequenz sowohl ein N-terminales Signalpeptid für den Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER) als auch eine C-terminale Transmembranregion für den Einbau in die ER-Membran und anschließenden Transfer des Proteins an den GPI-Anker finden (Englund, 1993).

Reggie Proteine sind überwiegend hydrophile Zelloberflächenproteine, und das M802 Epitop ist von außen zugänglich. Dadurch stellen sich zwei prinzipielle Fragen: 1. Wie sind die Proteine mit der Membran verbunden? – und 2. Wie gelangen sie überhaupt dahin?

Prinzipiell wären für die Membranassoziation von Reggie-1 und Reggie-2 vier Möglichkeiten denkbar (Abb. 3.1). Die naheliegendste wäre eine ionische Interaktion mit der Zellmembran (Abb. 3.1 a.). Diese könnte entweder direkt mit den zumeist negativ geladenen Kopfgruppen der Membranphospholipide oder aber mit anderen geladenen Bestandteilen der Membranoberfläche erfolgen. Die entsprechenden Gegenionen auf der Seite des Proteins wären dann Lysin oder Argininseitenketten (aber auch Aspartat und Glutamat). Diese sind in großer Zahl in den Reggie-1 und Reggie-2 sowie ESA vorhanden. Man kann davon ausgehen, daß zumindest ein Teil der Reggie Proteine über diese Interaktion mit der Membran assoziiert ist, da sich M802 immunopräzipitierbares Protein in 500 mM NaCl bei neutralem pH von Membranmikrosomen ablösen läßt. Diese Art der Membranassoziation wurde auch bei Proteinen wie *Collapsin* (Luo et al., 1993), einem Mitglied der Semaphorin Familie (Kolodkin et al., 1993) als auch für die Extrazellulärmatrixproteine Cytotactin/J1/Tenascin (Grumet et al., 1985; Kruse et al., 1985) und Cat 301 (Zaremba et al., 1989) beobachtet. Allerdings besitzen diese Proteine, im Gegensatz zu Reggie-1, Reggie-2 und ESA, ein klassisches Signalpeptid. Wie kommen sie dann aber an die Oberfläche der Zelle? In der Literatur gibt es mittlerweile genügend Beispiele für einen nichtklassischen Proteinexport, wie im Falle der Interleukine 1- α und - β (Beuscher und Colten, 1988; Rubartelli et al., 1990) und den *acidic-* sowie *basic-fibroblast growth factors* (FGF-1 und FGF-2; Tarantini et al., 1995 und Florkiewicz et al., 1995) gezeigt worden ist. Dieser müßte im Falle von Reggie Proteinen auch gefordert werden.

Weitere Erklärungsmöglichkeiten für die Freisetzung von M802 immunopräzipitierbarem Protein durch 100 mM TEA pH 11,0 nach einer 500 mM NaCl Extraktion aus Membranmikrosomen wären eine nichtionische Assoziation mit einem integralen Membranprotein (Abb. 3.1 b.) oder die Verknüpfung an eine Fettsäure über einen Thioester (Abb. 3.1. c.). Letztere würde ein Cystein des Proteins mit einer Fettsäure wie Palmitinsäure verbinden, und wäre alkalilabil (Jocelyn, 1972). Allerdings sind bislang nur cytoplasmatische oder myelinasoziierte Proteinen (z.B. das Proteolipidprotein PLP, Schultz et al., 1992) mit einer solchen Modifikation bekannt, aber keine Oberflächenproteine.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Reggie-2 gibt Anlaß zu einem vierten Modell der Membranassoziation. Es ist dies die Existenz einer integralen Transmembrandomäne innerhalb des Proteins (Abbildung 2.1d). Die Hydrophathieanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Reggie-2 macht nämlich eine putative Transmembrandomäne im Bereich der Aminosäuren 27-47 (Kyte-Doolittle, Goldman-Engelman-Steitz) möglich. Allerdings ist es

fraglich, ob der Aminosäurebereich 27-47 tatsächlich eine Transmembranregion ausbildet, da sich zum einen in seiner Mitte ein Arginin befindet und zum anderen die Sekundärstrukturvorhersage keine eindeutige Struktur vorhersagt (*Predictprotein*) – die oben erwähnten Programme gehen aber von der Ausbildung einer α -Helix aus. Das Hauptproblem stellt allerdings die geladene Seitenkette des Arginins dar. Es ist thermodynamisch nicht favorisiert, eine Ladung in eine Lipid-Doppelschicht zu überführen. Deshalb kommen geladene Aminosäuren auch normalerweise nicht in solchen einfachen Transmembrandomänen vor (Auflistung in: von Heijne und Gavel, 1988). Der als relativ zuverlässig geltende *PHDhtm server* (EMBL, Heidelberg) – er beruht auf einem neuronalem Netz, welches mit *alignments* aus einer Datenbankrecherche gestartet wird – gibt den Bereich von Aminosäure 21-39 als Transmembranhelix an. Hierin befindet sich keine Ladung mehr, diese sitzt nun am Rand direkt neben der vorhergesagten Transmembranhelix. Allerdings wird dieser Bereich des Proteins vom verwandten *PHDhtm* (EMBL, Heidelberg) nur teilweise als Helix vorhergesagt (s.h. Abb. 2.14). Da der durch Mikrosequenzierung bestimmte N-Terminus von Reggie-2 mit dem aus der cDNA abgeleiteten übereinstimmt, besitzt Reggie-2 kein klassisches Signalpeptid, welches nach der Translokation des Präproteins in das ER entfernt wird. Daraus ergäbe sich das Modell eines integralen Membranproteins vom Typ II (von Heijne und Gavel, 1988). Bei diesen Proteinen dient eine N-terminale nicht prozessierte Signalsequenz zugleich als Transmembrandomäne für das translozierte Protein. Die Topologie solcher Proteine entspricht der in Abbildung 2.1d dargestellten, daß heißt der N-Terminus befindet sich im Zellinneren (von Heijne und Gavel, 1988). Attraktiv wäre dieses Modell vor allem deshalb, da es sowohl die Membranassoziation als auch die Translokation des Proteins an die Oberfläche beschreibt.

Eine eindeutige Aussage im Bezug auf die Modelle b-d kann bis dato nicht getroffen werden. Weitere Versuche sind notwendig, um hier Klarheit zu schaffen. Es ist vor allem wichtig entweder über Transfektion von Reggie-Konstrukten in Zelllinien oder durch geeignete spezifische Antikörper eine Form der Proteine rein zu erhalten. Das Modell, welches mit den experimentellen Daten momentan am besten übereinstimmt, ist das des peripheren Membranproteins, welches über ionische Wechselwirkungen mit der Membran assoziiert ist (Abbildung 2.1a).

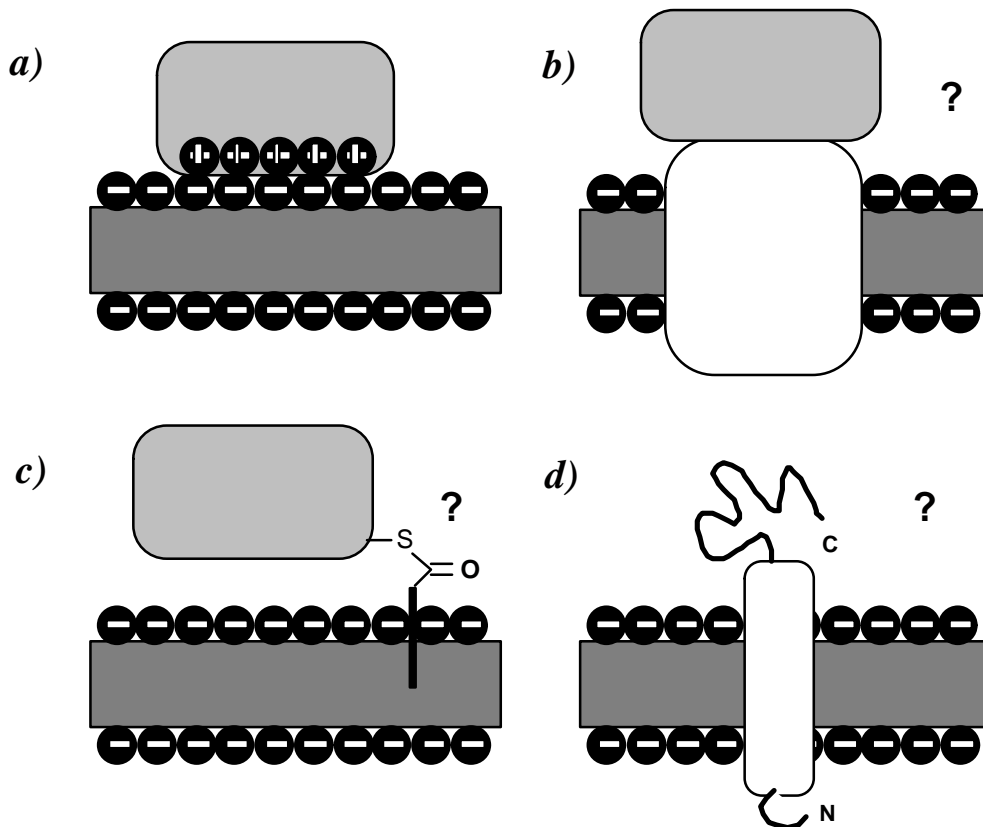


Abbildung 2.1 Mögliche Membranassoziationen von Reggie und ESA, die Außenseite der Membran ist oben: a) Modell der ionischen Interaktion, gestützt durch Ablösung des Proteins in Puffern hoher Ionenstärke. b) Modell der nichtionischen Assoziation an ein Membranprotein, bislang nicht auszuschließen, da pH 11 Puffer auch nach einer Hochsalzextraktion noch Protein von Membranmikrosomen ablösen. c) Modell einer Fettsäureverankerung des Proteins mit der Membran, konform mit einer Alkalilabilität des Ankers wäre eine Thioester-Verknüpfung mit der Fettsäure. d) Mögliches Modell für Reggie-2: Der Bereich Aminosäure 27-47 ist transmembranär und dient sowohl als Signalsequenz, die nicht entfernt wird als auch als Membranverankerung des Proteins. Es ergäbe sich ein transmembranäres Protein der Klasse II (von Heijne und Gavel, 1988).

Die aus Reggie-2 abgeleitete Aminosäuresequenz weist das Tripeptid LRE auf (Position 300). Dieses findet sich auch im S-Laminin, einem Extrazellulärmatrixprotein, welches von Muskelzellen sekretiert wird. Dort hat die LRE Sequenz die Funktion eines synaptischen Stoppsignals für Motoraxone (Hunter et al., 1991). Es stellt sich natürlich die Frage, ob auch die im Reggie-2 befindliche LRE Sequenz, eine solche Funktion besitzt. Viele *coiled coil* Proteine (auch S-Laminin ist eines, und das LRE liegt genau in dieser Domäne des Proteins) weisen dieses Tripeptid auf. Dazu gehören auch die Intermediärfilamente (Porter et al., 1995) diese sind einem nahendem Motoraxon aber nicht zugänglich, da sie intrazellulär lokalisiert sind. Allerdings ist die Häufigkeit des LRE Tripeptids geringer, als man es aufgrund der Wahrscheinlichkeit für ein zufälliges Auftreten annehmen würde (Porter et al., 1995). Eine *coiled*

coil Struktur führt aus sterischen Gründen zu einer drastischen Einschränkung der in ihr vorkommenden Aminosäuren. Es liegt also nahe, daß die Funktion des LRE als Stop Signal evolutiv jünger ist, als die des Bestandteils von *coiled coils*, beziehungsweise hochgradig α -helikaler Strukturen (Porter et al., 1995).

2.5 Das Expressionsmuster von Reggie-1 und Reggie-2

Reggie-1 und Reggie-2 werden im ZNS des Goldfisches exprimiert und unterliegen einer entwicklungs- und verletzungsabhängigen Regulation. Das durch den M802 erkannte Protein tritt nach einer Verletzung des optischen Nervs (ONS) in den Ganglienzellen der Retina (RGZs) auf. Verglichen mit den Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) des Goldfisches, E587-Antigen, Neurolin und N-CAM erfolgt die Expression von Reggie (detektiert durch M802) verspätet. Die Expression von E587, Neurolin und N-CAM korreliert eng mit dem Wachstumsstatus der RGZ Axone. Sobald Axone nach einer Verletzung vom distalen Stumpf des Nervs wieder auswachsen (5-9 Tage nach ONS, Lanners und Grafstein, 1980), treten E587-Antigen, Neurolin und N-CAM im distalen und proximalen Teil einzelner regenerierender Axone auf (Hirsch et al., 1995, Vielmetter et al., 1991; Paschke et al., 1992; Bastmeyer et al., 1990). Auch während der Reinnervation des optischen Tectums (10-40 d nach ONS, Stuermer und Easter, 1984b), werden diese CAMs auf den Oberflächen der RGZ-Axone exprimiert. Interessanterweise tritt die Reggie Expression (durch M802 detektiert) erst nach ca. 18 Tagen im Nerv und nach ca. 40 Tagen in den retinorezipienten Schichten des optischen Tectums auf und steigt dort weiter an bis ca. 130 Tage nach ONS (Paschke 1990). Zu dieser Zeit ist das wachstumsassoziierte CAM Neurolin nicht mehr (Paschke et al., 1992) und die wachstumsassoziierten CAMs E587-Antigen (Vielmetter et al., 1991) und N-CAM (Bastmeyer et al., 1990) kaum noch nachweisbar (eine Übersicht in Stuermer et al., 1992). Ein weiterer und drastischerer Unterschied zu den erwähnten wachstumsabhängigen CAMs zeigt sich in der Embryonal- und frühen Larvalentwicklung des retinotectalen Systems. Während das E587-Antigen und Neurolin im Embryo bereits auf den ersten RGZs und Axonen vorkommt, ist Reggie im Embryo durch M802 noch nicht nachweisbar. M802 Immunoreaktivität in der Retina findet sich erst in ca. 30 Tage alten Tieren (C. Leppert, M. Wiechers, pers. Mitteilung). Bereits nach fünf Tagen haben Axone der frühen RGZs das Tectum opticum erreicht (Stuermer und Raymond, 1989), und etwa zu diesem Zeitpunkt wächst die Retina des Goldfisches in Ringen. Diese in Ringen addierten neuen RGZs exprimieren Reggie in > 30 d alten Larven und adulten Fischen, nicht jedoch im Embryo.

Im Zielgebiet der RGZ Axone (SO und SFGS im optischen Tectum) konnten keine Reggie-1 und Reggie-2 Transkripte nachgewiesen werden (4 Wochen nach ONS), wiewohl das M802 Signal in diesen Schichten 4 Wochen nach einer Verletzung des Sehnervs deutlich ausgeprägt ist. Dies ist erklärlich da Reggie Proteine auf Axonen lokalisiert sind. Die Färbung ist, im Gegensatz zu den Blutgefäßendothelien oder den Zellkörpern der RGZs, diffus. Da zumindest Reggie-1 ein peripheres Membranprotein ist, wäre es denkbar, daß Reggie-1 von den Axonen sekretiert wird.

Es fällt auf, daß auswachsende RGZs im Embryo kein Reggie exprimieren, neue RGZs in der larvalen und adulten wachsenden Retina, es jedoch aufweisen. Andere Zellpopulationen, wie Zellen des olfaktorischen Epithels exprimieren Reggie-1 und Reggie-2, und Rohon Beard Neurone exprimieren Reggie-2. Welches Ereignis der Auslöser für die Expression von Reggie in RGZs des sich entwickelnden Goldfisches ist, wird zu klären sein. Es könnte die Umgebung sein, die dem Neuron signalisiert Reggie zu produzieren oder es verlangt, daß ein auswachsendes Axon Reggie auf seiner Oberfläche trägt. Ein Auslöser für die Reggie Expression in RGZs könnte zum Beispiel die beginnende Myelinisierung sein. Andere Neuronenpopulationen (Rohon Beard Neurone) jedoch, exprimieren Reggie schon zu Zeitpunkten, die weit vor einer beginnenden Myelinisierung liegen.

Zumindest im retinotectalen System des Goldfisches ist anzunehmen, die Expression von Reggie sei notwendig für ein axonales Wachstum in einer nicht mehr embryonalen (oder früh larvalen), sondern weiter differenzierten (subadulten) Umgebung. Ein Beispiel für Proteine, die erst in späteren Phasen der neuronalen Entwicklung exprimiert werden, ist das CAT 301, welches durch neuronale Aktivität induziert wird (Zaremba et al., 1989).

In situ Hybridisierungen mit Reggie-1 und Reggie-2 cRNA Proben zeigen eine zeitlich räumliche Expression der entsprechenden mRNAs, wie man es anhand der M802 Immunfärbungen erwarten würde. Weder Reggie-1 noch Reggie-2 mRNAs sind in den RGZs des Embryos nachweisbar. In nicht nervdurchtrennten adulten Goldfischen zeigt sich ein M802 positiver Randbereich in der Retina, der mit neuen RGZs korreliert (Paschke, 1990). In den in situ Hybridisierungen ist nur eine kleine Zahl solcher Zellen Reggie-1 und Reggie-2 positiv. Es ist allerdings möglich, daß ein Großteil der marginalen RGZs bei der langwierigen in situ Hybridisierungsprozedur zerstört wird. In Retinae nach Nervdurchtrennung exprimieren offenbar alle RGZs Reggie-1 und Reggie-2 mRNAs. Diese sind auch M802 positiv (Paschke, 1990).

2.6 Ausblicke

Reggie Proteine stellen eine neue Proteinfamilie dar, die in der Evolution hoch konserviert ist. Ihre Expression zeigt, daß die Regeneration keine Rekapitulation der Ontogenese darstellt, sondern lediglich ein ähnlicher Vorgang ist. Es wäre möglich, daß ihre weitere Analyse helfen wird, die bislang noch wenig erforschten späten Regenerationsereignisse besser zu verstehen. Ihr Vorkommen auf Blutgefäßendothelien sowie auf Mikroglia, beinhaltet die Möglichkeit, daß Reggie Proteine auf der Oberfläche dieser Zellen für die Regeneration der verletzten Fasertrakte von Bedeutung sind, doch könnte diese Koinzidenz auch nur zufällig sein. Die Analyse der Funktion der Reggie Proteine wird der nächste Schritt sein, um die Bedeutung dieser neuen Proteinfamilie zu begreifen.

KAPITEL 3

MATERIAL & METHODEN

3.1 Tiere und Material

3.1.1 Tiere

Alle Tiere wurden in der Tierforschungsanlage (TFA) der Universität Konstanz gehalten. Adulte Goldfische (*carassius auratus*) mit einer Körperlänge von 5-8 cm stammten anfangs von der Aquarienfarm "Ryba", ab 1993 aber aus der eigenen Zucht der TFA. Embryonale und larvale Goldfische sowie Mäuse (*balb/c*) stammten ebenfalls aus der TFA eigenen Zucht. Kaninchen für Immunisierungen wurden von der Firma Thomae (Bieberach) bezogen.

3.1.2 Material

3.1.2.1 Geräte

Brutschränke	Heräus
Chromatographie-Leersäulen	Bio-Rad
Elektrophorese System Mighty Small	Hoefer
Elektrophorese System Multiphor II	Pharmacia
Fraktionensammler	Gilson
gekühlter Arbeitsschrank	LKB
Gelelektrophoresekammern	Bio-Rad, Pharmacia, Eigenbau Uni Konstanz
Geltrockner	Hözel
Hybridisierungsschränke	Bachofer

Inkubatoren	Eppendorf, Scientific Instruments
Kryostat Frigocut 2800	Reichert Jung
Magnetrührer	Ikamag
Mikroskope (Axiophot, Axioskop, Axiovert)	Zeiss
PCR Triothermoblock	Biometra
Peristaltik-Pumpen (P1)	Pharmacia
Photometer	Beckmann, Zeiss
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Polaroid Kamera	Polaroid MP4
Röntgenfilm Entwicklermaschine	Sakura QX 130
Semidry Blot Apparatur	Hölzel
Sequenzierapparatur Sequi-Gen	Bio-Rad
Spannungsgeräte	Consort, Hoefer, Pharmacia
Speed Vac Concentrator	Bachofer
Strahlenmeßgerät	Berthold, Mini-Instruments
Tankblot-Apparatur 2051 <i>Midget Multiblot Electrophoretic Transfer Unit</i>	Pharmacia
Transilluminator (254 nm)	Bachofer
Trockenschrank	Memmert
Ultrazentrifuge inklusive Rotoren	Beckmann, Kontron
UV Detektor <i>Uvicord II</i>	Pharmacia
<i>UV-Stratalinker 1800</i>	Stratagene
<i>Vortex</i>	IkaVibrofix
Wasserbäder	Julabo, GFL
Zentrifugen	Eppendorf, Heräus, Sorvall

3.1.2.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Roth
Acrylamid (s), Bisacrylamid (s)	Serva
Acrylamid-Lsg. (30%) + 0,08% Bisacrylamid	Roth
Agar, Hefeextrakt und Trypton für Bakterienkulturen	Difco

Agarose	BRL
Agarose Schmelzpunkt 29°C	Bio-Rad
Ammoniumperoxodisulfat	Serva
Antibiotika	Boehringer Mannheim
BCIP = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphat	Sigma
BSA = Bovines Rinderserum Albumin	Sigma
DEPC = Diethylpyrocarbonat	Sigma
Dichlordimethylsilan (Repell-Silan)	Pharmacia, Sigma
Diguanosintriphosphat (gelöst, neutralisiert)	Pharmacia
DMSO = Dimethylsulfoxid	Sigma
EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Formamid	Sigma
Harnstoff	Sigma
HEPES = N-(Hydroxyethyl) Piperazin-N'-(2'-Ethansulfonsäure)	Sigma
IPTG = Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid	Sigma
Magermilchpulver	Rapilait (Migros)
Mineralöl für PCR	Sigma
MOPS = 3(N-Morpholino) Propansulfonsäure	Sigma
<i>Moviol 4-88</i>	Hoechst
MS222 = 3-Aminobenzoessäureethylester	Sigma
n-Octyl- β -D-Glycopyranosid	Sigma
NBT = NitroBlauTetrazolium	Sigma
<i>Nonidet P40</i> (für die Membranforschung)	Boehringer Mannheim
Nukleosidtriphosphate (gelöst, neutralisiert)	Pharmacia
Phenol äquilibriert mit TE-Puffer	Roth
Radiochemikalien	Amersham
Ribonukleosidtriphosphate (gelöst und neutralisiert)	Pharmacia
SDS = Natrium-Dodecylsulfat	Serva
TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylendiamin	Serva

<i>Tissue-Tek</i>	Miles
Triethylamin	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	BRL, Roth
<i>Triton X-100</i> (für die Membranforschung)	Boehringer Mannheim
X-Gal = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galactopyranosid	Sigma

Weitere Chemikalien wurden von den Firmen Sigma, Merck, Serva, Roth, Fluka und Riedel de Häen bezogen.

3.1.2.3 Vorgefertigte Systeme („Kits“)

<i>DIG DNA Labeling and Detection Kit</i>	Boehringer
<i>DNA Extraktion Kit</i>	Stratagene
<i>double stranded nested Deletion Kit</i>	Pharmacia
<i>Dynabeads mRNA Purification Kit</i>	Boehringer
<i>ECL Detection Kit</i>	Amersham
<i>ECL in vitro Translation Kit</i>	Amersham
<i>FlexiPrep Kit</i>	Pharmacia
<i>GeneClean-Kit (Bio 101)</i>	Dianova
<i>in vitro Translation Kit</i>	Amersham
<i>pCRScript Cloning System</i>	Stratagene
<i>RNAzolB RNA-Isolation System</i>	WAK Chemie
<i>Sequenase Sequencing Kit</i>	USB
<i>T7 Sequencing Kit</i>	Pharmacia
<i>TA-Cloning System</i>	Invitrogen
<i>Vectastain ABC Kit</i>	Vector Laboratories

3.1.2.4 Enzyme und Längenstandards

DNA 1kb-Ladder	BRL
DNA modifizierende Enzyme	Boehringer, Pharmacia, USB

<i>DNAse</i> I (<i>RNAse</i> frei)	Boehringer
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, New England Biolabs, Pharmacia
RNA Ladder 0,4-9,5	BRL
<i>RNAse A/T₁</i>	Boehringer
SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker	Amersham, BRL, Sigma
<i>Taq</i> DNA Polymerase	BRL, Pharmacia
<i>Vent</i> DNA Polymerase	New England Biolabs

3.1.2.5 Säulenmaterial

CNBr Sepharose	Pharmacia
Hydrazid Agarose	KenEmTec
<i>Mini-Leak</i> Agarose	KenEmTec
Protein A Sepharose	Pharmacia
Sephadex, Sephacryl	Pharmacia

3.1.2.6 Nährmedien für Bakterien

Nachstehende Mengenangaben beziehen sich auf 1 l Medium. Alle Lösungen werden feucht autoklaviert (25 min, 120 °C).

AXI-Platten	1 l LB-Agar wird nach dem Autoklavieren mit 100 mg Ampicillin, 25 mg X-Gal (gelöst in 1 ml DMF) und 25 mg IPTG (gelöst in 1 ml Wasser) versetzt.
LB Medium	10 g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar
LB-Amp-Platten	LB-Agar wird nach dem Autoklavieren mit 0,1 mg/ml Ampicillin versetzt
Phagen-LB	LB-Medium mit 0,2% Maltose und 10mM MgSO ₄
SOC-Medium	20 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose
Top-Agarose	LB-Medium mit 0,7% Agarose

3.1.2.7 Verbrauchsmaterial

Filmmaterial	Fuji, Kodak, Polaroid
Filterpapier	Schleicher & Schüll
Membranen	Amersham, Millipore, Schleicher & Schüll
Plasikmaterial	Falcon, Greiner, Sarstedt
Plastikfolie	Melitta
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Sarstedt
Sterilfilter	Millipore, Nalgene, Schleicher & Schüll

3.1.2.8 sekundäre Antikörper

- FITC-konjugierte AffiniPure Fab₂-Fragmente von "Goat-Anti-Mouse"- bzw. "Goat-Anti-Rabbit"-Immunoglobulinen (Dianova; Endverdünnung: 1:200)
- RITC-konjugierte AffiniPure Fab₂-Fragmente von "Goat-Anti-Mouse"- bzw. "Goat-Anti-Rabbit"-Immunoglobulinen (Dianova; Endverdünnung: 1:200)
- Cy-3-konjugierte AffiniPure Fab₂-Fragmente von "Donkey-Anti-Mouse"- bzw. "Donkey-Anti-Rabbit"-Immunoglobulinen (Dianova; Endverdünnung: 1:1000)
- Cy-2-konjugierte AffiniPure Fab₂-Fragmente von "Donkey-Anti-Mouse"- bzw. "Donkey-Anti-Rabbit"-Immunoglobulinen (Dianova; Endverdünnung: 1:1000)
- Alkalische-Phosphatase-konjugierte "Goat-Anti-Mouse" und "Goat anti Rabbit"-Immunoglobuline (Promega, Serva; Endverdünnung: 1:1000-1:10000)
- Meerrettich-Peroxidase-konjugierte "Goat-Anti-Mouse" und "Goat anti Rabbit"-Immunoglobuline (Promega, Serva; Endverdünnung: 1:1000-1:10000)

3.2 Methoden

3.2.1 Proteinbiochemie

Alle Schritte werden, wenn nicht explizit angegeben, bei 4°C durchgeführt. Der pH-Wert der Lösungen wird bei Raumtemperatur eingestellt.

3.2.1.1 Reinigung monoklonaler Antikörper der Klasse IgG aus Zellkultur-Überständen (nach Ey et al., 1978, mit Modifikationen)

Der Hybridoma Überstand wird zentrifugiert (1000 g; 10 min; RT), um größere Partikel, wie Zellen und Zelltrümmer, zu entfernen. Dann wird 1/10 des Volumens an 1 M NaBorat (pH 8,9) zugegeben und der pH-Wert, wenn notwendig, mit 10 M NaOH auf 8,9 adjustiert. Unter Rühren wird nun langsam und portionsweise festes NaCl (pro Liter 87,6 g) zugegeben. Die so erhaltene Lösung wird nach einer 0,45 µm-Filtration (Vakuumfiltrationseinheit) mit Hilfe einer Schlauchpumpe über eine Protein-A Säule (10 ml) gepumpt (Flußrate 0,5 ml/min, Vorsäule mit 5 ml inaktivierter CNBr-Sepharose). Anschließend wird die Säule mit 10 Volumina WA gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgt dann mit EA-Puffer (1 ml/min, Detektion mit UV Meßzelle bei 280 nm). Das Eluat wird mit Hilfe eines Fraktionensammlers in Fraktionen à 1 ml gesammelt (Vorlage von 150 µl 1M HEPES pH 7,0). Protein enthaltende Fraktionen (UV Absorption bei 280 nm) werden vereinigt und mit Hilfe der SDS-PAGE (Lämmli) auf ihre Reinheit überprüft.

WA: 10 mM Na Borat pH 8,9; 1,5 M NaCl

EA: 50 mM NaCitrat pH 3,5

3.2.1.2 Proteinbestimmung nach der BCA Methode (Pierce)

Die Proteinbestimmungen wurden mit Hilfe des *BCA* oder des *µBCA* Proteinbestimmungskit von Pierce durchgeführt.

3.2.1.3 Herstellung von Antikörper-Affinitätssäulen

Die Kopplung von Antikörper erfolgt an *Mini-Leak* Agarose (Divinylsulfon aktiviert) und wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Antikörperlösung wird mit Hilfe

von *NAP-10* oder *NAP-25* Säulen auf 100 mM NaHCO₃ (pH 8,6), 500 mM NaCl ungepuffert. Daran schließt sich die Kopplung des Antikörpers an die Matrix an (nach Einstellung der Suspension auf 6% PEG-6000 mit 30% PEG-6000 in o.g. Puffer, Kopplung über Nacht bei 4°C). Das Inaktivieren der verbleibenden funktionellen Gruppen erfolgt durch Zugabe von 1/5 Volumina an 1 M Ethanolamin (pH 9,0) für 2 h bei 4°C. Danach wird eine Säule mit der Affinitätsmatrix gepackt und diese zuerst mit PBS und anschließend alternierend (je 3 mal) mit 100 mM NaAcetat (pH 4,5) und 100 mM NaBoarat (pH 8,9) gewaschen. Zum Schluß wird die Säule einmal unter den nachfolgenden Elutionsbedingungen (2 Säulenvolumina; bei M802 : 100 mM TEA pH 12,0; 0,5% OGP) gewaschen. Die Lagerung der Säulen erfolgt unter PBS mit 0,02% Natriumazid bei 4°C.

3.2.1.4 Reinigung von Reggie aus ganzen Goldfischlarven (30 - 60 d)

100 g Goldfischlarven (eingefroren in flüssigem Stickstoff, gelagert bei -70°C) werden in 300 ml TNCE homogenisiert (Polytron, 2 min in Intervallen von je 20 sec). Das Homogenat wird zentrifugiert (1000 g, 10 min) und das Pellet erneut in 100 ml TNCE homogenisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (1000 g, 10 min) wird das Pellet verworfen und die beiden Überstände vereinigt. Diese werden dann mit 10%igem *Tween-20* in TNCE auf eine Endkonzentration von 2,5% *Tween-20* gebracht und homogenisiert (*Dounce* Homognisator 30 ml, L-Stößel). Die so erhaltene Suspension wird erneut zentrifugiert (150.000 g, 1 h), um die Membran-Mikrosomen zu pelletieren. Der Überstand der Zentrifugation wird verworfen, die Pellets in insgesamt 100 ml TNCE resuspendiert (*Dounce* Homognisator 30 ml, S-Stößel) und die Suspension erneut zentrifugiert (150.000 g, 1 h). Der Überstand wird wieder verworfen und die Membranbestandteile in 300 ml TX-Puffer extrahiert (*Dounce* Homognisator 30 ml, S-Stößel). Die Suspension wird nun zentrifugiert (100.000 g, 30 min) und das Pellet erneut in 100 ml TX-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (100.000 g, 30 min) werden die Überstände vereinigt, mit Hilfe einer Vakuumfiltrations-apparatur (0,45 µm Durapor Filter) filtriert und über Nacht über eine 10 ml M802-Säule gepumpt (Schlauchpumpe, 0,5 ml/min). Die Säule wird dann mit 10 Volumina W1 und 5 Volumina W2 gewaschen (1 ml/min). Die Elution des Proteins erfolgt dann mit E-Puffer unter Kontrolle der UV-Absorption bei 280 nm. Es werden Fraktionen à 1 ml gesammelt (50 µl 2 M Tris pH 6,5 vorlegen) und Aliquots à 50 µl einer jeden zweiten Fraktion mit TCA gefällt und mittels SDS-PAGE (Schägger) und anschließender Silberfärbung des Gels analysiert. Die Elutionsfraktionen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

TNCE:	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 140 mM NaCl; 2 mM CaCl ₂ ; 1 mM EDTA; Proteinase-Inhibitoren
Proteinase-Inhibitoren:	1 mM PMSF oder <i>Pefabloc</i> ; 1 µM Leupeptin; 1 µM Pepstatin A; 0,02 µM Aprotinin
TX-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM CaCl ₂ ; 1 mM EDTA; 2% <i>Triton X-100</i> (v/v); Proteinase-Inhibitoren
W1:	20 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,02% <i>Nonidet P40</i> (v/v)
W2:	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 0,5% n-Octylglucopyranosid (w/v)
E-Puffer:	100 mM Triethylamin-NaOH pH 12,0; 0,5% n-Octylglucopyranosid (w/v)

3.2.1.5 Reinigung von Reggie aus Hirnen adulter Goldfische

Hirne adulter Goldfische werden kurz in PBS gewaschen und anschließend in H-Puffer homogenisiert (*Dounce* Homogenisator L- und S-Stößel), dabei richtet sich die Menge an H-Puffer nach der Viskosität des Homogenats. Dieses wird daraufhin zentrifugiert (1000 g, 10 min). Alle weiteren Schritte entsprechen dann der Reinigung von Reggie aus Larven.

H-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 2 mM CaCl₂; 1 mM EDTA; 1 mM Spermidin; Proteinase-Inhibitoren (s.h. 2.1.4)

3.2.1.6 Biotinmarkierung von Membranproteinen aus neuronalem Gewebe und Immunpräzipitation

Neuronales Gewebe wird kurz in PBS gewaschen und anschließend in H-Puffer homogenisiert (*Dounce* Homogenisator L- und S-Stößel, s.h. 2.1.5). Dieses Homogenat (2 ml) wird in ein 4 ml Polypropylen-Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt und mit je 1 ml an 20%iger Saccharose in HM-Puffer und 50%iger Saccharose in HM-Puffer (1 ml Spritze mit großer Kanüle) unterschichtet. Nach einer Zentrifugation (50.000 g; 15 min; Ausschwingrotor) wird der lösliche Überstand und die erste Interphase (Myelin-angereicherte Fraktion) mit einer Pipette entfernt. Man überschichtet mit HM-Puffer und entfernt die zweite Interphase (Membran-Mikrosomen Fraktion) mit einer Pasteurpipette. Diese Membran-Mikrosomen-Fraktion wird nun mit 4 ml an HM-Puffer gewaschen (*Dounce*-Homogenisator S-Stößel) und erneut pelletiert (50.000 g, 10 min). Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt. Das Membranpellet wird in 2 ml HM-Puffer homogenisiert (*Dounce* S), 20 µl N-Hydroxy-succinimido-Biotin (10 mg/ml in

wasserfreiem DMSO) zugegeben, auf dem *Vortex* suspendiert und 1h bei 4°C inkubiert. Gestoppt wird die Reaktion durch Zugabe von 250 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0 und 250 µl 10%igem *NP-40* (Detergensextraktion).

Die Suspension wird homogenisiert (*Dounce S*) und 1h auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (100.000 g, 30 min) wird der Überstand mit 100 µl Protein-A Sepharose (1:1 aufgeschlämmt in Lysis-Puffer), 1h präinkubiert (Taumler), zentrifugiert (1000 g; 1 min) und der Überstand in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 µg Antikörper (hier M802) versetzt (Taumler). Nach 1h werden die Antigen-Antikörper Komplexe mit 10µl Protein-A Sepharose „eingefangen“ (2 h, Taumler), der Überstand nach Zentrifugation (1000g, 1 min) verworfen und die Sepharose 3 mal mit Lysis-Puffer und 2 mal mit Waschpuffer gewaschen. Der Überstand nach dem letzten Waschschrift wird möglichst vollständig entfernt und 50 µl Probenpuffer ohne Reduktionsmittel (s.h. 2.1.7, 2.1.8) zu der Sepharose gegeben (10 min 85°C). Nach einer Zentrifugation (13.000g; 10 min) wird der Überstand vorsichtig abgenommen und auf einer SDS-PAGE (s.h. 2.1.7, 2.1.8) mit anschließendem Transfer auf Cellulosenitrat (*Hybond C*, s.h. 2.1.14, 2.1.15) unterzogen. Der Nachweis der biotin-markierten Proteine erfolgt dann durch Streptavidin-HRP und *ECL*-Detektion (s.h. 2.1.16).

H-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 2 mM CaCl₂; 1 mM EDTA; 1 mM Spermidin; Proteinase-Inhibitoren (s.h. 2.1.4)

HM-Puffer: 10 mM Na-HEPES pH 7,0; 140 mM NaCl

Lysis-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 140 mM NaCl; 1% *NP-40*; 2mM CaCl₂; 1 mM EDTA; 0,1 mM PMSF

Wasch-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,02%*NP-40*

3.2.1.7 SDS-PAGE (nach Lämmli)

Die Elektrophorese erfolgt in einer vertikalen Mini-Gel-Apparatur (*Hoefler, Mighty Small*), mit Geldicken zwischen 0,75-1,5 mm. Nach dem Zusammenbau der Gelplatten und *spacer* (1 Glasplatte, 1 Aluminaplatte, 2 *spacer*) in der Apparatur, wird das Gel unten und an den Seiten mit heißer 3%iger Agarose (*molecular biology grade*, in Wasser) abgedichtet. Zunächst wird das Trenngel (1×*lower* Tris; entsprechendes Volumen an Acrylamid/Bisacrylamid 30/0,08%; 10µl TEMED; 100 µl 10% APS) gegossen, welches mit Isopropanol überschichtet wird. Nach der Polymerisation der Trennmatrix wird der Isopropanol entfernt, das Sammelgel (1×*upper* Tris; bei 3 ml Gelmix 0,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30/0,08%; 3 µl TEMED; 30 µl

10% APS) gegossen und der Kamm eingesetzt. Die Apparatur wird nun mit Lämmli-Gelpuffer gefüllt, und die in $1 \times$ Probenpuffer gelösten Proben (reduzierend: + 5% 2-Mercaptoethanol und 3 min 95°C; nichtreduzierend: 30 min RT) werden in die Starttaschen des Gels gefüllt. Die Elektrophorese läuft dann unter folgenden Parametern:

Einsinken der Proben in das Sammelgel: $U = 50 \text{ V}$

Proben im Gel: bei 1mm starken Gelen $P_{\max} = 2,5 \text{ W}$; $U_{\max} = 150 \text{ V}$

10 × lower Tris:	50 mM Tris-HCl pH 6,8; 1% SDS
10 × upper Tris:	150 mM Tris-HCl pH 8,8; 1% SDS
3 × Probenpuffer:	50 mM Tris-HCl pH 6,8; 9% SDS; 30% Glycerin; 3 mM EDTA
10×Lämmli-Gelpuffer:	250 mM Tris-Base; 1,92 M Glycin; 1% SDS

3.2.1.8 SDS-PAGE (nach Schagger mit dem Multiphor II System, Pharmacia)

Gießen der Gele: Das Gel wird auf eine Trägerfolie (*Gelbond PAG*) polymerisiert. Dazu benutzt man zwei unterschiedliche Glasplatten, eine plane, auf der man die Trägerfolie befestigt (mit etwas Wasser) und eine mit Silikonrahmendichtung (0,5/1,0 mm). Nach dem Zusammenlegen der Glasplatten, werden diese durch vier Klammern fixiert. Das Gießen des Gels erfolgt nun in „umgekehrter“ Reihenfolge, das heißt zuerst wird das Sammelgel eingefüllt und anschließend sofort das Trenngel. Beim Gießen eines kontinuierlichen Gradienten ist auch hier auf eine umgekehrte Reihenfolge der Gellösungen zu achten (schwere Gellösung in der vorderen Kammer des Gradientenmischers). Nach erfolgter Polymerisation baut man die Gelkassette auseinander und entfernt das fertige Gel. Durch die Verwendung eines sauren Puffersystems ist das polymerisierte Gel unter Luftabschluß mehrere Monate bei RT haltbar.

Elektrophorese: Die Elektrophorese erfolgt auf einer Flachbettapparatur (*Pharmacia Multiphor II*), bei der ein foliengestütztes Gel mit der Folienseite nach unten auf einen Kupfer-Kühlblock (Wassertemperierung durch Kühlwasserbad, hier 10°C) gelegt wird. Zwischen Block und Folie befindet sich Silikonöl (luftblasenfrei), um einen möglichst guten Wärmeübergang zu erreichen. Das elektrische Feld wird über die Fokussierungselektroden der *Multiphor II* angelegt, wobei sich zwischen Elektrode und Gel jeweils ein in Elektrodenpuffer getränkter Papierstreifen (Schleicher und Schüll 2,5 mm) befindet. Die Aufgabe der Proben erfolgt mit Hilfe eines Probenaufgabebandes aus Silikon (20 oder 40 µl Aufgabenmenge). Es ist darauf zu

achten, daß sämtliche Aufgabekammern mit Puffer (Probenpuffer) gefüllt sind, um ein möglichst homogenes elektrisches Feld zu erhalten. Das Eindringen der Proben erfolgt unter einer Feldstärke von 5 V/cm (hier 70 V, siehe unten). Danach wird eine maximale Spannung von 400 V bei maximaler Stromstärke am Stromversorger eingestellt und die Spannung über eine konstante Leistung geregelt (bei $24,5 \times 11$ cm Gelen max. 22 W). Nach erfolgter Elektrophorese wird das Gel vom Kühlblock entfernt und die Rückseite mit Aceton von überschüssigem Silikonöl befreit. Das Gel kann nun entweder gefärbt (s.h. 2.1.10, 2.1.11) oder nach Entfernen der Trägerfolie (Pharmacia *Gelremover*) einer *Blot* Prozedur zugeführt werden.

In 3 Falcon Röhrchen pipettieren	Sammelgel T=5%; C=3%	schwere Gellösung T=8%; C=3%	leichte Gellösung T=20%; C=3%
<i>Glycerin (98%)</i>	17,1 ml	11,4 ml	-
<i>Acrylamid (30:0,08)</i>	7,5 ml	12 ml	30 ml
<i>Gelpuffer (10^x)</i>	4,5 ml	4,5 ml	4,5 ml
<i>Bromphenolblau (1%)</i>	-	-	300 µl
<i>Orange G (1%)</i>	300 µl	-	-
<i>TEMED</i>	30 µl	30 µl	30 µl
<i>APS (40%)</i>	5 µl auf 3,5 ml Lsg.	6,2 µl auf 7 ml Lsg.	4,0 µl auf 7 ml Lsg.
mit aqua bidest ad	45 ml	45 ml	45 ml

Gelpuffer (10^x): 1,2 M Tris-Acetat pH 6,4; 1% SDS

Anodenpuffer: 0,3 M Tris-Acetat pH 6,4; 0,4% SDS

Kathodenpuffer: 0,08 M Tris; 0,8 M Tricin pH 7,1; 0,4% SDS

Probenpuffer: 0,05 M Tris-Acetat pH 7,5; 3% SDS; 0,01% Bromphenolblau; bei reduzierender Probenbehandlung 5 mM DTT und 1 mM EDTA

2.1.9 Zweidimensionale Gelelektrophorese (nach O'Farrel)

Die Methode besteht aus einer isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension) gefolgt von einer SDS PAGE (2. Dimension).

1. Dimension: Die isoelektrische Fokussierung wird in Glasröhrchen von 7 cm Länge und 1,5 mm Innendurchmesser in einer Vertikalelektrophoreseeinheit für Stäbchengele durchgeführt. Zum Gießen stellt man die Röhrchen in einen möglichst engen Standzylinder und füllt diesen bis zur gewünschten Höhe mit IEF Gel Mix, überschichtet mit 9,2 M Harnstoff in Wasser. Nach der Polymerisation über Nacht werden die Röhrchen mit Wasser kurz ausgespült und in die Gelapparatur eingesetzt (Anolyt: 10 mM H_3PO_4 ; Katholyt: 20 mM NaOH). Die Gele werden nun mit IEF Probenpuffer überschichtet und der Vorlauf gestartet (200 V: 15 min; 300 V: 30 min; 400 V: 30 min). Nach Abschluß des Vorlaufs werden die Proben (ca. 20 μ l in IEF Probenpuffer) aufgegeben und die Fokussierung gestartet (12 h bei 400 V dann 1 h bei 800 V). Nach Beendigung der IEF wird nun das Glasrohr durch einen passenden Schlauch mit einer mit Wasser gefüllten 2 ml Spritze verbunden und das Gel durch gelinden Wasserdruck aus dem Glasrohr entfernt (eine Seite des Gels mit feinem Draht markieren). Zur Vorbereitung auf die nachfolgende SDS PAGE äquilibriert man das Gel für 30 min in Äquilibriumspuffer. Überschüssiger Puffer wird nun vorsichtig mit Hilfe eines *Kim- Wipe* Tuches entfernt und das Gel auf ein SDS PAGE Gel gelegt (ohne Aufgabetaschen gegossen, s.h. 3.2.1.7). Befestigt wird das Gel der ersten Dimension mittels 1%iger flüssiger Agarose in Lämmli Puffer. Daraufhin wird der Lauf der 2.Dimension gestartet (s.h. 3.2.1.7).

IEF Gel Mix:	5,5 g Harnstoff (hochrein)
	1,33 ml einer 28,38% Acrylamid; 1,62% Bisacrylamid Lösung
	2 ml 10%iges <i>Nonidet P40</i>
	0,4 ml 40% <i>Ampholine</i> (pH 5-7)
	0,1 ml 40% <i>Ampholine</i> (pH 3,5-10)
	1,95 ml Wasser
	5 μ l TEMED
	10 μ l 10%iges Ammoniumperoxodisulfat
IEF Probepuffer:	9,5 M Harnstoff (hochrein)
	2% <i>Nonidet P40</i>
	1,6% <i>Ampholine</i> (pH 5-7)
	0,4% <i>Amoholine</i> (pH 3,5-10)
Äquilibriumspuffer:	2,5% SDS
	125 mM Tris-HCl pH 6,8
	5 mM DTT

10% Glycerin
0,05% Bromphenolblau

3.2.1.10 Silberfärbung von Gelen (nach Heukeshoven und Dernick)

nachstehende Mengen beziehen sich auf ein 24,5 × 11 cm Flachbettgel:

Schritt	Lösung	V(ml)	Zeit
<i>Fixierung</i>	300 ml EtOH 100 ml HOAc	250 mit aqua dest ad 1l	>30 min
<i>Reduktion/ Quervernetzung</i>	75 ml EtOH 17,00 g NaAcetat 1,25 ml Glutardialdehyd (25% w/v) 0,50 g Natriumthiosulfat-pentahydrat mit Aqua dest ad 250 ml	250	30 min o. über Nacht
<i>Waschen</i>	aqua dest	3× 250	5 min
<i>Versilberung</i>	0,5 g Silbernitrat 30 µl Formaldehyd (37% w/v) mit aqua dest ad 250 ml	250	20 min
<i>Entwicklung</i>	7,5 g Na ₂ CO ₃ 30 µl Formaldehyd (37% w/v) mit aqua dest ad 300 ml	1× 100 1× 200	1 min variabel
<i>Stoppen</i>	1%iges Glycin in aqua dest	250	10 min
<i>Waschen</i>	aqua dest	3× 250	10 min

Anschließend legt man das Gel mit der Folienseite nach unten (bei foliengestützten Gelen) auf feuchtes *Whatman* Papier und trocknet dieses *sandwich* in einem Geltrockner (40°C, 2h).

3.2.1.11 Coomassie-Färbung von Gelen

Lösung	Zeit
<i>Coomassie-Färbung</i>	1 h
<i>Entfärbung</i>	bis zur gewünschten Entfärbung

3.2.1.12 TCA-Fällung von Proteinen

Die Proteinlösung wird mit 50%iger Trichloressigsäure (TCA) auf eine Endkonzentration von 10% TCA gebracht und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Pelletierung des Niederschlags erfolgt dann durch eine 10 minütige Zentrifugation (13.000 g, 4°C). Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen, das Pellet wird dann mit 1-10 ml (je nach gewählter Röhrchengröße) -20°C kaltem Aceton gewaschen, erneut pelletiert (13.000 g, 3 min) und getrocknet (*Speedvac*).

3.2.1.13 Gelelektrophoretische Reinigung von Proteinen

Die hier beschriebene Methode eignet sich für Proteinmengen >2-3 µg. Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch ein Lämmli Gelsystem (s.h. 2.1.6), allerdings wird hier ein modifizierter Kathodenpuffer verwendet (*Blue SDS PAGE*). Dabei werden schon während des Gellaufs die Proteinbanden sichtbar. Ist die gewünschte Trennung erreicht, wird die Elektrophorese abgebrochen und das Gelstück mit der Bande ausgeschnitten (scharfes Skalpell). Dieses Gelstück plaziert man nun in die Elutionskammer eines Elektroelutions-Gerätes (Schleicher und Schüll *Biotrap* in einer *submarine* Elektrophoresekammer) und eluiert über Nacht bei einer Feldstärke von ca. 0,5-0,7 V/cm. Als Puffer wird 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat verwendet (auf pI des Proteins aber gegebenenfalls abstimmen). Die Zugabe von 0,1% OGP in den Elutions- und Fallenpuffer ist bei kleinen Proteinmengen sinnvoll, um hohe Wiederfindungsraten zu erzielen.

Blue SDS PAGE-Kathodenpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,05% SDS; 0,05% *Coomassie Blue-G-250*

3.2.1.14 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Nach erfolgter Elektrophorese wird das Gel kurz mit Transferpuffer (TP) gewaschen. Zwei Schwämme, vier *Whatman*-Filterpapierstücke (Gelgröße) und eine Transfermembran (*Hybond C*; *Immobilon P*, auf Gelgröße) werden in TP getränkt und ein Stapel aus: **Kathode** || Schwamm | 2×Filterpapier | Gel | Transfermembran | 2×Filterpapier | Schwamm || **Anode** zusammgebaut. Mit einer Glaspipette walzt man den Stapel vorsichtig luftblasenfrei und plaziert ihn in das Haltegitter. Dieses wird in die Transferkammer eingesetzt (mit TP gefüllt) und der Transfer gestartet. (4°C, Magnetprüher, bei LKB-Kammer: I=150 mA; V≤70 V; Dauer ≈ 4 h)

Transferpuffer: 48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% MeOH

3.2.1.15 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot, semidry)

Der Transfer wird mit Hilfe zweier Graphitelektroden (vorher 1 h in Wasser quellen lassen) durchgeführt, zwischen denen sich ein Stapel aus Filterkarton (2,5 mm mit Puffer getränkt), Gel und Transfermembran (*Hybond C*; *Immobilon P*) befindet. Kartons und Membran haben dabei die gleiche Größe wie das Gel (vorher 5 min in Anodenpuffer II äquilibrieren). Der Stapel wird wie folgt auf der Anodenplatte zusammgebaut: **Anode** || 1×Filterkarton (Anodenpuffer I) | 1×Filterkarton (Anodenpuffer II) | Transfermembran | Gel | 2×Filterkarton (Kathodenpuffer) || **Kathode**. Der Stapel wird mit einer Glaspipette vorsichtig von Luftblasen befreit und überschüssiger Puffer mit einem Papiertuch entfernt. Anschließend plaziert man die Kathodenplatte auf dem Stapel und beschwert den Aufbau mit einem 1 kg Gewicht. Mehrere Gele können in übereinanderliegenden Stapeln transferiert werden. Der Transfer läuft dann bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² bei 4°C eine Stunde lang.

Anodenpuffer I: 0,3 M Tris; 20% MeOH

Anodenpuffer II: 25 mM Tris; 20% MeOH

Kathodenpuffer: 40 mM 6-Aminohexansäure; 0,01% SDS; 20% MeOH

3.2.1.16 Detektion immobilisierter Proteine (Western Blot Detektion)

Nach dem Transfer auf eine Membran (s.h. 2.1.14, 2.1.15) wird diese zuerst kurz in Waschpuffer gewaschen. Cellulosenitrat-Membranen (*Hybond C*) werden dann getrocknet (1-2 h). Zum Blocken inkubiert man die Membran 1 h bei 37°C in Blockpuffer. Im Falle von Antikörpernachweisen erfolgt nun die Inkubation mit dem primären Antikörper (1h; RT; 1/1000-1/10000 in Inkubationspuffer). Nach jedem Inkubationsschritt wäscht man 3×10 min in Waschpuffer. Der Nachweis des primären Antikörpers erfolgt dann mit Hilfe eines HRP-konjugierten Antikörpers (anti Maus oder entsprechendes, 1/1000 in Inkubationspuffer) und des *ECL*-Systems (Amersham).

Der Nachweis biotinmarkierter Proteine erfolgt nach Blockierung in Biotin-Blockpuffer und einer Inkubation mit Streptavidin-HRP (30 min; 1/1000 in Biotin-Inkubationspuffer) und Waschen (3×10 min) in Biotin-Waschpuffer mit Hilfe des *ECL*-Systems (Amersham). Durch die Verwendung von PVP-10 und *Tween-20* als Blocksubstanzen, können die Proteine nach der Detektion noch mit kolloidalem Gold (*Aurodye*, BioTrend) sichtbar gemacht werden.

Waschpuffer:	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,05% <i>Tween-20</i>
Blockpuffer:	Waschpuffer + 5% Magermilchpulver
Inkubationspuffer:	Waschpuffer + 1% Magermilchpulver
Biotin-Waschpuffer:	20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,05% <i>Tween-20</i>
Biotin-Blockpuffer:	Biotin-Waschpuffer + 3% Polyvinylpyrolidon-10 (PVP-10)
Biotin-Inkubationspuffer:	Biotin-Waschpuffer + 0,3% PVP-10

3.2.2 Molekularbiologie

Standardtechniken zur Manipulation von Nukleinsäuren wurden, wenn nicht gesondert vermerkt, den Methodenmanualen Sambrook et al. 1991 oder Ausubel et al. 1991 entnommen.

3.2.2.1 Bakterienstämme und Vektoren

<i>Vektor</i>	<i>Bakterienstamm</i>
<i>pBluescript</i> (Stratagene)	<i>XII-Blue</i> (Stratagene)
<i>I-ZAPII</i> (Stratagene)	<i>XIIBlue</i> (Stratagene)
<i>pCRScript KS⁺</i>	<i>XLI-Blue</i> (Stratagene)
<i>pCRII</i> (Invitrogen)	<i>INVaF'</i> (Invitrogen)

3.2.2.2 Herstellung von *E. coli* über Nacht- und Dauer-Kulturen

Eine entsprechende Menge LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) werden mit einer einzelnen Bakterienkolonie des plasmidtragenden *E. coli* Stammes angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Für Dauer-Kulturen werden die Bakterien zentrifugiert (5 min bei 3000 g) und das resultierende Bakterienpellet in 500 µl LB-Medium resuspendiert. Nach der Zugabe eines gleichen Volumens Glycerin werden die Kulturen bei -70°C gelagert.

3.2.2.3 Herstellung von *E.coli* Kulturen zur Infektion mit I-Phagen

Bakterien des Stammes *XII-Blue* aus einem Glycerin- oder Agar-Stock werden auf einer LB-Agar Platte (mit 50µg/ml Tetracyclin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inku-

biert. Von einer einzelnen Kolonie wird eine 50 ml Kultur mit LB-Medium angeimpft. Das LB-Medium wird zusätzlich mit 0,02% Maltose (zur Expression des Maltoserezeptors), 10 mM MgSO₄ und 50µg/ml Tetracyclin supplementiert. Diese wird entweder 8 h bei 37°C oder über Nacht bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Wichtig ist hierbei, daß eine OD₆₀₀ von 0,5 nicht überschritten wird. Die Bakterien werden pelletiert (3000 g, 4°C, 10 min) und im entsprechendem Volumen an 10 mM MgSO₄ resuspendiert, so daß sie eine OD₆₀₀ von 0,5 (zum Ausplattieren) oder von 1,0 (zur in vivo Excision) besitzen.

3.2.2.4 Herstellung kompetenter Bakterien nach Chung et al., 1989

Mit einer frisch hergestellten Übernachtskultur des entsprechenden *E.coli* Stammes wird eine 100 ml Kultur angeimpft (1/100 verdünnen in LB Medium) und diese bei 37°C inkubiert (mind. 500 ml Kolben; Bakterien-schüttler) bis sie eine OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 erreicht hat. Die Bakterien werden abzentrifugiert (1000 g; 10 min; 4°C) und in 1/10 des Originalvolumens 1×TSS vorsichtig resuspendiert (auf Eis). Aliquots von je 100 µl werden in ein eiskaltes Eppendorfhütchen gefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

1×TSS: 10% PEG 6000 autoklaviert zugeben zu
50 mM MgCl₂; 5% DMSO in LB Medium pH adjustieren auf 6,5
und steril filtrieren

3.2.2.5 Transformation von Plasmid DNA in kompetente Bakterien (bei Selektion mit Ampicillin)

Zur Transformation werden 100 µl der Bakterien-suspension mit 1 bis 5 µl DNA (0,1 bis 100 ng) vermischt und 5 bis 60 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschock Behandlung (45 sec bei 42°C) plattiert man den Ansätze auf LB Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum. Bei Verwendung von Antibiotika, die die Proteinbiosynthese hemmen, ist nach der Hitzeschock Behandlung eine Zugabe von 900 µl SOC Medium (s.h 1.2.6) und eine einstündige Inkubation bei 37°C erforderlich, um die Resistenz zu entwickeln.

3.2.2.6 Amplifizierung von Plasmid DNA in Bakterien („Minipräp“)

Eine über Nacht Kultur des entsprechenden Bakterienstammes wird mit einer einzelnen Kolonie einer LB Platte angeimpft. Am nächsten Tag werden aus 1,5 ml dieser Lösung die Bakterien abzentrifugiert (13.000 g, 2 min) und in 200 µl Lösung I resuspendiert. Daraufhin werden 200 µl Lösung II hinzu gegeben, vorsichtig das Röhrchen invertiert und 10 min bei RT

inkubiert. Anschließend werden 200 µl Lösung III hinzugefügt, das Röhrchen vorsichtig invertiert, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und mittels *Wizard Miniprep Kit* (Promega) aufgereinigt.

Lösung I: 10 mM Tris pH 7,4

Lösung II: 0,2 M NaOH
0,1 % SDS

Lösung III: 3 M KOAc pH 4,8

3.2.2.7 Verdauung von DNA durch Typ II Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsverdauung von DNA erfolgt in 1× Restriktionspuffer (A, B, L, M oder H, Boehringer Mannheim Puffersystem) mit der berechneten Menge der jeweiligen Restriktionsendonuklease bei 37°C (oder höher bei Enzymen thermo-stabiler Bakterien) für 30 bis 120 min. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 0,25 Volumina an 5×Probenpuffer terminiert.

3.2.2.8 Gelelektrophorese von DNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt in 0,8-3,0%igen Agarosegelen. Als Puffer findet 1×TBE (oder TAE, höhere Auflösung im oberen Bereich, aber langsamer) mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid Verwendung. Die zur Auftrennung benutzten Feldstärken liegen bei 5 bis 10 V/cm. Dabei wird, je nach Trennproblem, die Dauer der Elektrophorese variiert, wobei die Wanderung der DNA durch 2 Farbstoffe (s.h. Probenpuffer) visualisiert wird.

3.2.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen geschieht unter Verwendung des *Gene-Clean Kit* (Bio 101). Generell können auch andere Adsorptionsmatrices auf Glasbasis benutzt werden. Die DNA-Fragmente sollten größer 200 bp, aber kleiner als 5 kb sein. Das benötigte Fragment wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten, das erhaltene Gelstück mit dem 4,5 fachen Volumen an 4,5 M NaI, dem 0,5 fachen Volumen an *TEB-Modifier* ersetzt und 5 min bei 56°C aufgeschmolzen. Anschließend werden 5µl Glasmilch (vorher sorgfältig resuspendieren) hinzugegeben, 5 min auf Eis inkubiert und 15 s in einer Tischzentrifuge (14.000 rpm) sedimentiert.

Das erhaltene Sediment wird dann dreimal mit jeweils 200µl eiskaltem 80%igem Ethanol gewaschen und zweimal mit jeweils 7µl TE eluiert (5 min bei 56°C). Die vereinigten TE-Eluate werden anschließend eine Minute lang zentrifugiert, um noch in der Lösung verbliebene Glasmilch abzutrennen.

3.2.2.10 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Reaktionsansätze für Routineanwendungen sehen wie folgt aus:

0,5-5µl	DNA Matrize (ca. 1ng ds/ss)
5µl	10 ^x Reaktionspuffer der jew. Polymerase
5µl	Primer I (10µM in 0,5 ^x TE)
5µl	Primer II (10 µM in 0,5 ^x TE)
1,25µl	dNTP-Mix (je 10mM, bei Vent und Pfu 2µl)
0,5µl	DNA Polymerase (<i>Taq</i> , <i>Vent</i> , <i>Pfu</i>)

ad 50 µl mit aqua bidest und überschichten mit 20µl Mineralöl

PCR Parameter			
primäre Denaturierung		1 min	95°C
Zyklen (20-40)	<i>Denaturierung</i>	45 sec	95°C
	<i>Primer-Bindung</i>	45 sec	4 ^x (G+C)+2 ^x (A+T))-5°C als Richtwert
	<i>Primerverlängerung</i>	30-120 sec	72°C
abschließende Primerverlängerung		10 min	72°C

3.2.2.11 Subklonierung von PCR Produkten

PCR Fragmente können entweder mit Hilfe des *TA Cloning kit* (Invitrogen) oder des *Srf I Cloning Systems (pCRScript Kit, Stratagene)* subkloniert werden.

3.2.2.12 Präparation von Klonierungsvektoren

Zur Präparation des entsprechenden Vektors *Bluescript KS⁻* und *-SK⁻* werden 10 µg Plasmid-DNA einer Verdauung mit der jeweiligen Restriktionsendonuklease unterworfen (s.h. 3.2.2.7). Anschließend inkubiert man die Lösung für 10 min bei 65°C, bringt sie auf 50 mM Tris-HCl (pH 9) und inkubiert den Ansatz mit einer Einheit *alkalischer Phosphatase* pro pmol 5'-Enden eine Stunde bei 37°C. Nach Phenol-Chloroform Extraktion (s.h. 3.2.2.13) und

Zugabe von Probenpuffer wird eine Gelelektrophorese (s.h.3.2.2.8) durchgeführt und die linearisierte Plasmid-DNA aus dem Gel isoliert (s.h. 3.2.2.9).

3.2.2.13 Phenol/Chloroform Extraktion von Nukleinsäurelösungen

Die Nukleinsäure Lösung wird mit dem gleichen Volumen einer Phenol/Chloroform (je 50% v/v) versetzt und eine halbe Minute auf dem *Vortex* vermischt. Nach einer 2 minütigen Zentrifugation (14.000 g, *Eppendorf* Tischzentrifuge) wird die wässrige Phase (oben) vorsichtig abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Chloroform, zur Entfernung überschüssigen Phenols, in einem neuen Gefäß extrahiert (s.o.).

3.2.2.14 Phosphorylierung von DNA 5'-Enden

Die zu phosphorylierenden DNA-Fragmente werden in 1×RD-Puffer in Anwesenheit von 6nmol ATP mit 10 U *T4-Polynukleotidkinase* für 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion terminiert.

10×RD-Puffer: 330mM Tris-HOAc pH 7,8
 660mM KOAc
 100mM Mg(OAc)₂

3.2.2.15 Ligation von DNA

In die Ligation werden ca. 40 ng des jeweiligen Klonierungsvektors (s.h. 3.2.2.12) und eindreifach molarer Überschuß an DNA-Fragment in 1×Ligationspuffer eingesetzt. Zusätzlich enthält der Ansatz 1 mM ATP und eine Einheit *T4-DNA-Ligase*, bei einem Gesamtvolumen von 20µl. Standardmäßig wird die Reaktion für 4h bei 12°C inkubiert. Bei Ligationen mit stumpfen DNA Fragmenten enthält der Ligationsansatz zusätzlich 10% PEG-600, 250 mM NaCl und 4 mM ATP.

3.2.2.16 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgt mit dem Sequenzierungs-Kit der Firma USB unter Einhaltung der beigefügten Vorschriften. Als radioaktives Nukleotid enthalten die Ansätze $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP.

Die Elektrophorese erfolgt unter folgenden Bedingungen:

- Acrylamid-Konzentration: 6%

- Bisacrylamid-Konzentration : 0,2%
- Harnstoff-Konzentration: 8 M
- Puffer: 1×TEB
- Geldicke: 0,2-0,4 mm
- konstante Leistung der Elektrophoreseeinheit von 65 W
- Temperatur: 50°C
- Vorlaufzeit: 15 min

Das Gel wird nach beendeter Elektrophorese einmal 30 min in 10%iger Essigsäure fixiert und vom Harnstoff befreit. Nach einer Wässerung von 10 min wird es mit 96%igem Ethanol bespritzt, 2 Stunden im Heißlüfter getrocknet und anschließend je nach Signalstärke für 0,5 bis 4 Tage bei Raumtemperatur autoradiographiert.

3.2.2.17 Herstellung von Deletionsklonen durch unidirektionalen Exo III/DNase S I Verdau

Die Deletionsklone werden mit Hilfe des *unidirectional nested deletion kit* von Pharmacia hergestellt.

3.2.2.18 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe erfolgt nach der *RNAzolB* Methode, basierend auf der von Chomczynsky und Sacchi (1987) beschriebenen Methode. Während der gesamten Aufarbeitung sollten die Proben, wenn nicht anders angegeben, auf Eis gelagert werden.

100 mg Gewebe werden in 2 ml *RNAzolB* Lösung homogenisiert (*Dounce*-Homogenisator S-Stößel), danach werden 200µl Chloroform zugegeben und die Suspension 15 sec auf dem *Vortex* gut durchmischt. Darauf folgt eine 20 minütige Zentrifugation bei 3000g, 4°C. Die obere Phase (wässrige Phase) wird vorsichtig abgenommen, die RNA durch Zugabe des gleichen Volumens an 2-Propanol gefällt (20 min auf Eis) und durch eine 20 minütige Zentrifugation (3000 g; 4°C) sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 10 ml -20°C kaltem 70%igem Ethanol gewaschen (*Vortex*, 5 min 3000 g, 4°C Zentrifugation). Das Pellet trocknet man kurz im Vakuum und nimmt die RNA in 250µl 1×TE (*RNAse* frei) auf. Konzentration und Reinheit bestimmt man dann durch eine Messung der

Absorptionen bei 260 nm und 280 nm. Typischerweise ist das Verhältnis $OD_{260}/OD_{280} > 1,9$. Wird die RNA nicht sofort weiterverarbeitet, so lagert man sie als Präzipitat unter 70%igem Ethanol.

3.2.2.19 Anreicherung von poly A⁺ RNA aus Gesamt RNA durch oligo dT Cellulose Chromatographie

Prinzip der Methode ist die affinitätschromatographische Anreicherung der poly A⁺ RNA durch oligo dT Cellulose. Die Methode eignet sich sehr gut für die Aufarbeitung größerer RNA Mengen, da die verwendete Säule, in diesem Fall eine Pasteur Pipette, beliebig vergrößert werden kann.

Packen der oligo dT Cellulose Säule: Eine silanisierte Pasteurpipette, mit einer Fritte aus silanisierter Glaswolle, wird mit 10 Volumina 5 M NaOH gewaschen und anschließend mit in 0,1 M NaOH aufgeschlämmter oligo dT Cellulose unter Pufferfluß gepackt (0,5 g oligo dT Cellulose auf 1 ml Aufschlammung für 2 mg Gesamt RNA). Anschließend wird die Säule mit 10 bis 20 Volumina an Aufgabepuffer äquilibriert.

oligo dT Cellulose Chromatographie: 2 mg an Gesamt RNA in TE werden für 10 min auf 70°C aufgeheizt. Danach gibt man sofort 10 M LiCl hinzu (Endkonzentration an LiCl = 0,5 M) und gibt die Lösung auf die Säule auf. Die Säule wird mit einem 1 ml Aufgabepuffer gewaschen und sämtliches Eluat aufgefangen, welches man ein zweites mal aufgibt. Die Säule wird dann mit 2 ml Waschpuffer gewaschen und die RNA mit 2 ml an Elutionspuffer eluiert. Die Säule wird nun erneut mit Aufgabepuffer äquilibriert und die Chromatographie einmal wiederholt. Gefällt wird die RNA dann durch Zugabe von 3 M NaOAc (Endkonzentration = 0,3 M) und 2,5 Volumina Ethanol (-20°C über Nacht, Zentrifugation 13000 g, 4°C).

Aufgabepuffer: 500 mM LiCl
10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA
0,1% SDS

Waschpuffer: 150 mM LiCl
10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA
0,1% SDS

Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA
0,1% SDS

3.2.2.20 Anreicherung von poly A⁺ RNA aus Gesamt RNA durch oligo dT

Dynabead Chromatographie

Die Methode basiert auf dem gleichen Prinzip wie das unter 3.2.2.19 beschriebene Verfahren, Trägermaterial für das oligo dT sind hier allerdings Polystyrolkugeln mit einem ferromagnetischen Kern (*Dyna Beads*). Die Bindung erfolgt unter Aufschlammung der *Dyna Beads*, welche dann über einen Magneten eingesammelt werden. Die Methode ist vor allem für kleine Mengen an Gesamt RNA ca. 100 µg oder weniger gut geeignet und in diesem Mengenbereich der oligo dT Cellulose-Chromatographie vorzuziehen. Die Aufarbeitung der Gesamt RNA erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

3.2.2.21 Gelelektrophorese von RNA

Je 10 µg Gesamt RNA oder weniger poly A⁺ RNA werden in 3 µl TE gelöst und mit 10 µl RNA Probenpuffer versetzt. Die RNA wird dann für 10 min bei 70°C denaturiert, danach sofort auf Eis abgekühlt und die Lösung in die Starttaschen eines Formaldehyd-Agarosegels überführt. Als Molekulargewichtsstandard finden entweder 1 µg Gesamt-RNA aus Gewebe (s.h. 3.2.2.18), der 0,5 µl einer 1 mg/ml Ethidiumbromidlösung beifügt werden (vor der Hitzedenaturierung) oder 1 µg einer RNA Leiter (0,24-9,5 kb, auch mit Ethidiumbromid) Verwendung. Auch den anderen Proben kann Ethidiumbromid beigefügt werden, dieses verringert aber die Nachweisempfindlichkeit in nachfolgenden Hybridisierungen. Aufgetrennt wird die RNA bei Feldstärken von 0,4 bis 1,5 V/cm in 1×MOPS Laufpuffer. Nach der Elektrophorese werden die Marker-Banden unter einer UV-Lampe visualisiert.

denaturierendes Gel:	1% Agarose 1MOPS 2,2M Formaldehyd (37%ige aq. Lsg)
10×MOPS:	500 mM MOPS-Acetat pH 7,0 10 mM EDTA
RNA Probenpuffer:	322 µl Puffer A 678 µl Puffer F/FA 400 mG Sacharose 0,4 mg Bromphenolblau 0,4 mg Xylencyanol
Puffer A:	294 µl 10×MOPS 706 µl Wasser (DEPC behandelt)
Puffer F/FA:	89 µl 37%ige Formaldehydlösung 250 µl deionisiertes Formamid

3.2.2.22 cDNA-Erststrangsynthese

Die Synthese einzelsträngiger cDNA (antisense Orientierung) aus Gesamt-RNA oder Poly A⁺ RNA geschieht unter Verwendung der *Superscript II* Reversen Transkriptase (*MMLV* Derivat).

In Röhrchen werden folgende Komponenten pipettiert:

0,1-2 µg	RNA Matrize
1 µl	Primer 0,5 pmol spezifischer Primer oder dT ₁₂₋₁₈ (0,5µg/µl)
ad 12 µl	aqua bidest
10 min 70°C, dann sofort auf Eis	
2 µl	10×Reaktionspuffer (<i>Superscript II</i>)
2 µl	dNTP (10 mM je dNTP)
1 µl	<i>RNAse</i> Inhibitor plazental
2 µl	100 mM DTT
1 µl	<i>Superscript II Reverse Transkriptase</i>

Der Reaktionsansatz wird 1 h bei 45°C inkubiert, es können Reaktionstemperaturen bis zu 55°C gefahren werden. Bei Verwendung eines dT₁₂₋₁₈ Primer sollte allerdings eine Starttemperatur von 45°C nicht überschritten werden. Nach 5 min kann die Reaktionstemperatur dann erhöht werden. Terminiert wird die Reaktion entweder durch ein 10 minütiges Aufheizen auf 65°C oder durch Zugabe von 0,5 µl 500 mM EDTA.

3.2.2.23 in vitro Transkription

Ausgangsmaterial für die in vitro Synthese von RNA sind DNA-Fragmente, welche in Vektoren mit *T3*, *T7* oder *SP-6* Promotoren inkloniert sind. Standardmäßig sind dies entweder *Bluescript SK/KS⁺*, *pCRScript* oder *pCR II* Vektoren, bei denen die jeweiligen Promotoren direkt neben der *multiple cloning site* liegen.

Den ersten Schritt stellt die Linearisierung des Vektors mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease dar. Hierbei ist zu beachten, daß keine Enzyme benutzt werden, welche 3'-überhängende Enden erzeugen, da die o.g. Polymerasen diese zum Teil als Transkriptionsstartpunkt erkennen. Läßt sich die Verwendung eines solchen Restriktionsenzym nicht vermeiden, da keine weiteren geeigneten Schnittstellen vorhanden

sind, so sind die 3'-überhängenden Enden aufzufüllen, so daß stumpfe Enden entstehen. Der unten definierte Reaktionsansatz wird 1 h bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 1 µl *DNAse* (*RNAse* frei) und eine 15 minütige Inkubation bei 37°C terminiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide geschieht durch Gelfiltrationschromatographie oder Ethanol Fällung unter Anwesenheit von 2,5 M Ammoniumacetat. Bei in vitro Transkripten, die in eine in vitro Translation eingesetzt werden sollen, wird statt des +U-Mixes der CAP-U-Mix verwendet.

2-5 µg	linearisierte Plasmid DNA (1-2 pmol)
5 µl	10×-U-Mix /+U-Mix (oder bei DIG-Markierung 10×DIG LabellingMix)
5 µl	10×Reaktionspuffer
1 µl	<i>RNAse</i> Inhibitor plazental
5 µl	
ad 49,5 µl	$\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (50 µCi mit 800pmol/µl) (bei radioaktiver Markierung)
	aqua bidest
0,5 µl	<i>RNA Polymerase T3,T7,SP-6</i>

10×Transkriptionspuffer:	30 mM MgCl ₂
	10 mM NaCl
	100 mM DTT
	200 mM Tris-HCl pH 7,4
	10 mM Spermidin
-U-Mix:	jeweils 2,5 mM ATP, CTP, GTP
+U-Mix:	jeweils 2,5 mM ATP, CTP, GTP, UTP
CAP-U-Mix:	je 2,5 mM ATP, CTP, UTP, GpppGTP und 0,25 mM GTP

2.2.2.24 Kapillar-Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen

Nach der Elektrophorese werden die Agarosegele für 30 min in 20×SSC inkubiert, und auf ein *Whatman* Papier (auf beiden Enden eingetaucht in einen Tank mit 20×SSC) gelegt. Die Seiten werden mit Plastikfolie ebgedichtet. Auf das Gel legt man nun die Nylonmembran (*Hybond N⁺*) und plaziert nacheinander 2 *Whatman*-Filterpapiere auf dem Gel. Nun walzt man Luftblasen mit einer Glaspipette aus dem Sandwich und plaziert einen Stapel saugfähigen Papiers auf dem Gel. Auf den Stapel legt man eine Glasplatte und beschwert den Aufbau mit einem Gewicht von ca. 500 g. Transferiert wird über Nacht bei 4°C. Nach beendetem Transfer werden die Nylonmembran kurz in 2×SSC, zur Entfernung von Agarose-resten, gewaschen und anschließend auf einem *Whatman* Filterpapier getrocknet. Zur kovalenten Fixierung der RNA auf der Membran, legt man diese mit der Oberseite nach unten auf ein Filterpapier und bestrahlt in einem *Stratalinker* mit der Einstellung 1200 J/cm².

20×SSC: 300 mM NaCitrat pH 7,0
3 M NaCl
20 mM EDTA

3.2.2.25 alkalischer downward Transfer von DNA aus Agarosegelen auf positiv geladene Nylonmembranen

Die Methode funktioniert ähnlich wie ein Kapillartransfer (s.h 3.2.2.24) auf Nylonmembranen, allerdings wird hier mit einem alkalischen Puffer transferiert und der Transfer erfolgt von oben nach unten, was zu einer deutlich geringeren Kompression des Gels führt. Dadurch verkürzt sich die Transferzeit auf 1 h.

Nach einer 30 minütigen Inkubation in 0,25 M HCl (zur Depurinierung für effizienten Transfer von Fragmenten > 1 kB, optional) wird das Gel 20 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Auf einen Stapel saugfähigen Papiers und 2 *Whatman*-Filterpapiere, legt man die Membran und darauf das Gel. Nach der Abdichtung der Seiten mit fester Plastikfolie kommen zwei weitere *Whatman*-Filterpapiere, sowie ein langes Stück *Whatman*-Filterpapier, dessen eines Ende in ein Reservoir mit 0,4 M NaOH taucht, auf den Stapel. Dieser wird durch Auswalzen mit einer Glaspipette von Luftbalsen befreit und eine Glasplatte zuoberst gelegt. Nach 1 h Transfer wird die Membran kurz in 2×SSC gewaschen und getrocknet. Eine Quervernetzung der DNA mit der Membran ist bei positiv geladenen Membranen nicht notwendig.

3.2.2.26 Hybridisierung immobilisierter Nukleinsäuren mit DNA/RNA Sonden

Die trockene Membran mit immobilisierten Nukleinsäuren wird kurz in 2×SSC angefeuchtet und in eine Hybridisierungsröhre gelegt. Zur Prähybridisierung füllt man den entsprechenden Hybridisierungspuffer ein (1 ml/cm²). Nach einer 15 minütigen Inkubation bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur im Hybridisierungs-ofen wird die Lösung verworfen und durch Hybridisierungslösung (1 ml/cm²) mit der jeweiligen Sonde ersetzt. Anschließend wird 1 bis 2 h bei der entsprechenden Temperatur im Ofen hybridisiert. Danach wird die Lösung entfernt und die Membran durch zweimaliges Waschen je 20 ml 2×SSC; 0,1% SDS von überschüssiger Hybridisierungslösung befreit. Je nach gewünschter Stringenz wäscht man die Membran 2×30 min in 0,1×SSC; 0,1% SDS bei der gewünschten Temperatur. Bei radioaktiv markierten Sonden wird die Membran direkt autoradiographiert (³²P: mit Verstärkerfolie bei -70°C).

Hybridisierungslösung:	<i>Dextransulfat</i>	50% Formamid (deionisiert mit Ionentauscherharz)
	<i>haltig:</i>	5×SSPE 5×Denhardt Lösung 10 % Dextransulfat 100 µg/ml tRNA/100 µg/ml denaturierte Lachssperma/Kalbsthymus DNA 0,1% SDS
	<i>Quickhyb:</i>	Stratagene <i>Quickhyb</i> Lösung, besonders für Screening von cDNA Bibliotheken geeignet, da Transfer, Hybridisierung, Waschen und Autoradiographie an einem Tag zu erledigen sind; sehr wenig Hintergrund

50×Denhardt: 2% BSA
2% Polyvinylpyrolidon 10
2% Ficoll 400

<i>Typ</i>	<i>Hybridisierungstemperaturen</i>	<i>Waschtemperaturen</i>
DNA/DNA	42°C (Quickhyb: 68 °C)	42°C, bei starkem Hintergrund bis 65°C
DNA/RNA	55°C	55°C, bei starkem Hintergrund bis 65°C
RNA/RNA	70°C	68°C bis 72°C, je nach Hintergrund

3.2.2.27 Entfernung hybridisierter Sonde von Membranen (stripping)

Um hybridisierte Sonden von immobilisierten Nukleinsäuren abzulösen, dürfen die Membranen nach der Hybridisierung niemals trocken werden. Abgelöst werden die Nukleinsäuren dann durch einminütiges Kochen in 90%igem Formamid + 0,1M Tris-HCl pH 7,4. Anschließend werden sie mit 0,1% SSPE; 0,1% SDS bei 65°C gewaschen bis keine Radioaktivität mehr meßbar ist (Handmonitor).

3.2.2.28 Herstellung radioaktiv markierter DNA Sonden durch oligo labelling

100 bis 300 µg gereinigtes DNA Fragment und *Primer* (Hexameren oder spezifische *Primer*) in 5 µl werden 2 min auf 95°C erhitzt und sofort auf Eis inkubiert.

DNA + <i>Primer</i>	5,0 µl
200 mM DTT	1,5 µl
-dA Mix (je 5 mM)	1,0 µl
10× <i>Klenow</i> Puffer	1,5 µl
α ³² P-dATP (50 µCi,)	5,0 µl
<i>Klenow</i> Fragment 1u/µl	1,0 µl

Der Ansatz wird 1 h bei 37°C inkubiert, durch 5 min Erhitzen auf 95°C terminiert und nicht eingebaute Nukleotide durch Gelfiltration (Stratagene *Pushcolumn*) entfernt. Die Aktivität wird durch Messung eines Mikroliters (in Eppendorf Hütchen) im Zählrohr gemessen. Vor dem Einsatz in Hybridisierungsreaktionen ist die Probe 10 min auf 100°C zu erhitzen und auf Eis zu inkubieren.

3.2.2.29 Screening einer λ -ZAP cDNA Bibliothek unter hochstringenten Bedingungen

a) Titerbestimmung einer λ -cDNA Bibliothek

Je 200 μ l Bakteriensuspension aus 32.2.3 (0,5 OD₆₀₀) werden mit einer dekadischen Verdünnungsreihe an Phagen in SM für 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend in 2 ml flüssigem Top-Agar (48°C) auf kleinen LB-Platten ausplattiert. Nach einer über Nacht Inkubation bei 37°C wählt man die Platte, deren Plaque Zahl in der Größenordnung von 100 ist, zählt die genaue Zahl der Plaques und berechnet mit Hilfe der dazugehörigen Verdünnung die *plaque forming units* (pfu) pro ml der Phagenlösung.

b) Ausplattieren einer λ -cDNA Bibliothek

Auf 20 große LB Platten werden in 7 ml Top-Agar jeweils 50.000 pfu ausplattiert (präadsorbiert an *XL-1Blue* OD₆₀₀ = 0,5 in 600 μ l). Die Platten werden für ca. 8 h bei 37°C inkubiert, b.z.w. so lange bis die Plaques gerade aneinander grenzen. Anschließend kommen die Platten für mindestens 2 h in den Kühlschrank bevor die Filterabzüge gemacht werden.

c) Screening durch Hybridisierung mit ³²P markierten DNA Sonden

Hybond N⁺ Filter (Amersham, rund, in Größe der Platten) werden vorsichtig von der Mitte aus auf die Top-Agar Schicht gelegt und die Position durch Einstiche mit einer glühend heißen Kanüle (1×1, 2×1, 3×1) markiert. Anschließend zieht man die Filter vorsichtig von einer Seite aus mit Hilfe einer Pinzette ab und legt sie mit der Plaque Seite nach oben. Zur Denaturierung und Fixierung legt man die Filter mit der Plaque Seite nach oben auf ein mit 0,4 M NaOH getränktes *Whatman* Papier. Nach 7 min entfernt man die Filter und neutralisiert ihn durch 0,5 M Tris pH 7,4; 1,5 M NaCl (2×3 min auf *Whatman* Papier). Anschließend werden sie in 2×SSPE gewaschen und auf *Whatman* Papier getrocknet. Je 10 Filter werden dann in 2×SSPE kurz angefeuchtet und auf einer Hybridisierungsröhre verteilt (Platz möglichst gut ausnutzen). Nach Zugabe von 25 ml *Quick Hyb* Lösung werden sie 30 min bei 68°C prähybridisiert (Hybridisierungsöfen). Danach verwirft man die Lösung und ersetzt sie durch

25 ml *Quick Hyb* Lösung mit der ^{32}P markierten Probe (10^6 counts/Filter). Nach einer 2 h Hybridisierung bei 68°C wird die Lösung entfernt und die Filter in den Röhren zweimal kurz mit $2\times\text{SSPE}$ gewaschen. Darauf folgen 2 Waschgänge à 30 min bei 60 bis 65°C , je nach Hintergrundsignal. Die Filter werden über Nacht autoradiographiert, positive Plaques werden (mit Hilfe der Markierungen) mittels der weiten Seite einer Pasteurpipette aus dem Top-Agar gestochen und in SM Puffer (+ 1 Tropfen CHCl_3) transferriert. Zur Elution der Phagen in den SM Puffer inkubiert man 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Um einen einheitliche Phagenklon zu erhalten, wiederholt man die gesamte Prozedur auf kleinen LB Platten unter der Annahme, daß 1 cm^2 Top-Agar 10^7 pfu liefert. Je zwei Platten à 50 und 250 pfu werden dann pro Klon benutzt.

d) **in vivo Excision von Bluescript Plasmiden aus λ -ZAP Vektoren**

Ist ein Klon einheitlich, d.h. stammt er aus einem runden isolierten Plaque, dann kann das Insert mitsamt einem *Bluescript SK* Vektor als Phagimid aus einem Phagen infizierten Bakterium herausgeschleust werden. Hierzu ist ein sog. Helferphage vom *M13* Typ notwendig. Nach der *in vivo* Excision (s.u.) werden *XL-1 Blue* (Tetracyclin selektiert, $\text{OD}_{600} = 1,0$) mit den Phagimiden infiziert und auf LB Amp Platten selektiert.

In einem 50 ml Falcon Röhrchen werden pipettiert:

- 200 μl *XL-1 Blue* $\text{OD}_{600} = 1,0$ (frisch ! und Tetracyclin selektioniert)
- 200 μl Phagenlösung ($> 10^5$ Phagen)
- 1 μl *R418* Helferphage ($> 10^6$ pfu)

und 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend werden 5 ml $2\times\text{YT}$ Medium zugegeben und das Röhrchen im Schüttler bei 37°C für 3 h inkubiert. Danach erhitzt man das Röhrchen für 20 min auf 70°C im Wasserbad und zentrifugiert den Bakteriendebris ab (4000 g, 5 min, RT). Der Überstand wird anschließend in ein steriles 15 ml Röhrchen dekantiert. 10 μl dieser Lösung werden nun mit 200 μl *XL-1 Blue* ($\text{OD}_{600} = 1,0$) 15 min bei 37°C inkubiert und 1 bis 100 μl dieser Suspension auf einer LB Amp Platte ausplattiert. Nach einer über Nacht Inkubation bei 37°C kann man mit den Kolonien Flüssigkulturen animpfen, die DNA daraus isolieren und analysieren.

3.2.3 Histologische Methoden

3.2.3.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Unfixiertes Gewebe (Hirn, Retinae, ganze Larven) von Goldfischen wird 5-60 min bei 4°C in Tissue Tek inkubiert. Anschließend bettet man das Gewebestück in *Tissue Tek* (in Behälter aus Aluminiumfolie) durch Kühlung mit flüssigem Stickstoff ein. Nach Äquilibration des Blocks auf die Schneidetemperatur (-16°C bis -22°C) entfernt man die Aluminiumfolie und befestigt den Block mit Tissue Tek auf dem Teller des Kryostaten. Die Schnitte (5 µm bis 20 µm) werden auf einen Objektträger aufgenommen (für in situ Protokolle mit Vectabond beschichten), an der Luft getrocknet (30 bis 60 min) und entweder direkt weiterverarbeitet oder nach Einschweißen in Plastikfolie bei -20°C eingefroren.

3.2.3.2 Immunhistologische Fluoreszenzmarkierung an Kryoschnitt Präparaten

Kryoschnitt-Präparate werden für 5 min in -20°C kaltem Methanol fixiert und delipidiert, dann 3×5 min in PBS gewaschen und mit dem primären Antikörper (1h bei RT oder über Nacht bei 4°C; Konzentration 10 µg/ml in 1% BSA oder Hybridoma Überstand) inkubiert. Nach 3×5 minütigem Waschen in PBS werden sie mit dem sekundären Antikörper (FITC/TRITC konjugiert 1/200 Verdünnung in 1% BSA oder Cy2/Cy3 konjugiert 1/1000 in 1% BSA) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem 3×5 minütigem Waschen werden die Präparate in einer Mischung aus 5 g *Moviol 4-88* (Hoechst), 20 ml PBS, 10 ml Glycerin (gesättigt mit n-Propylgallat) eingebettet.

3.2.3.3 *In situ* Hybridisierung an Gesamt-Präparaten (whole mount)

Goldfisch Retinae (lebend präpariert) oder Goldfisch Embryonen (bis 4 Tage) werden folgender Prozedur unterzogen:

- Fixierung:**
- Fixierung des Gewebes über Nacht bei 4°C in 4% Formaldehyd aus Paraformaldehyd in 100 mM Natriumphosphat pH 7,4
 - 4×5 min waschen in PBST (PBS + 0,1% Tween-20)
 - Transfer in 100% Methanol (MeOH), nach 5 min erneuern und auf -20°C bringen für mindestens 30 min (so mehrere Monate haltbar)
 - zurück auf Raumtemperatur und je 5 min 75% MeOH in PBST, 50% MeOH, 25% MeOH
 - 2×5 min in PBST waschen
 - 20 min fixieren mit 4% Formaldehyd
 - 4×5 min in PBST waschen
- Proteinase K Verdau und Postfixierung:**
- Verdau mit Proteinase K (10 µg/ml in PBST) bei RT, 10 min
 - kurz mit PBST abspülen und 5 min in PBST waschen
 - Postfixierung in 4% Formaldehyd (20 min, RT)
 - 5×5 min waschen in PBST
- Hybridisierung:**
- Gewebe in 2 ml Eppendorf Hütchen und 1 h Prähybridisierung bei 55°C in Hyb. Lösung
 - Hybridisierung in Hyb. Lösung mit Probe (ca. 100 ng/ml; vorher 10 min 80°C und sofort auf Eis) über Nacht bei 55°C (Wasserbad)
 - Entfernung der Proben (können 2 mal wiederverwendet werden)
 - 2×30 min bei 55°C waschen in 50% Formamid und 2×SSCT (SSC + 0,1% Tween-20)
 - 1×15 min bei 55°C in 2×SSCT
 - 2×30 min bei 55°C in 0,2×SSCT
- Detektion:**
- 2 h blocken in 5% BSA in PBST (alle Reaktionen auf Schüttler)
 - 2h Inkubation in einer 1/5000 Verdünnung der anti-DIG-F_{ab}-AP Konjugate in 5% BSA/PBST
 - 6×20 min waschen in PBST
 - Inkubation in *BM Purple* Farbsubstrat bis zur gewünschten Farbtiefe
 - 3×10 min PBST
 - aufbewahren in 4% Formaldehyd
 - einbetten in Moviol (s.h. 2.4.2)
- Hyb. Lösung:** 50% Formamid
5×SSC
0,1% Tween-20
1 mg/ml tRNA
50 µg/ml Heparin

3.2.3.4 *In situ* Hybridisierung an Kryo-Schnitt Präparaten

Bis auf die unten aufgeführten Änderungen entspricht die Prozedur der *whole mount* in situ Hybridisierung (s.h. 3.2.3.3).

Die getrockneten Kryoschnitte werden 15 min lang in 4%igem Formaldehyd (aus Paraformaldehyd in 100 mM Natriumphosphat pH 7,4) fixiert und danach 2×5 min in PBST gewaschen. Anschließend werden sie durch die unten aufgeführte Methanolreihe gezogen in Chloroform inkubiert und durch die Methanolreihe wieder in entgegengesetzter Richtung gezogen. Daraufhin werden die Präparate 2×5 min in PBST gewaschen und 2 h bei Raumtemperatur prähybridisiert. Hybridisierung und Waschen der Schnitte erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie in 3.2.3.3. Danach wird 15 min in 5% BSA/PBST geblockt und 2 h mit einer 1/5000 Verdünnung an anti DIG-F_{ab}-AP Konjugaten in 5% BSA/PBST inkubiert. Gewaschen werden die Schnitte dann 4×10 min in PBST und anschließend erfolgt die Farbentwicklung durch Inkubation mit dem *BM Purple* Substrats.

70% MeOH in PBST	3 min
80% MeOH	3 min
95% MeOH	5 min
100% MeOH	3 min
CHCl ₃	1 min

3.2.4 Produktion von Antikörpern

3.2.4.1 Produktion polyklonaler Antikörper

Die Produktion polyklonaler Antikörper erfolgt in der Regel durch Immunisierung eines Kaninchens. Vor der Immunisierung ist das 0-Serum des Tieres zu testen (Western Blot oder Immunhistochemie an Kryoschnitten), da viele Kaninchenserum mit Goldfischproteinen kreuzreagieren. Die Immunisierung beginnt mit einer Applikation des Antigens (5-100 µg) in 500 µl Lösung, diese werden zusammen mit 500 µl komplettem Adjuvans (*Freund* oder *Ribi*) subkutan injiziert. Im Abstand von 3 Wochen erfolgen dann die weiteren Immunisierungen der gleichen Menge an Antigen mit inkomplettem Adjuvans. Jeweils 10 Tage nach einer Immunisierung testet man das Serum mit der geeigneten Nachweismethode (Western Blot, Immunhistochemie, ELISA).

3.2.4.2 Produktion monoklonaler Antikörper

Eine *balb/c* Maus wird nach folgendem Schema immunisiert:

1. *Immunisierung*: 1-10 µg Antigen; in 100 µl mit 100 µl komplettem Adjuvans (Freund), subkutan
- 2-4. *Immunisierung*: nach jeweils 2 Wochen, gleiche Menge Antigen, inkomplettes Adjuvans (Serum jeweils 10 Tage nach der Immunisierung testen)
5. *Immunisierung*: 3 Tage vor der Fusion der Milzzellen mit den Myelomazellen, intravenös ohne Adjuvans

Die Herstellung der Hybridoma Linien erfolgt dann nach der in Paschke, 1990 beschriebenen Methode.

Literatur

- Aguayo, A.J., Rasminsky, M., Bray, G.M., Carbonetto, S., McKerracher, L., Villegas-Peres, Vidal-Sanz, M., and Carter, D.A. (1991) Degenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 331, 337-343.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W. und Lipman, D.W. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Anders, J. und Hibbard, E. (1974) The optic system of the teleost *Chiclasoma biocellatum*. *J. Comp. Neurol.* 158, 145-154.
- Asubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1980) *Current Protocols in Molecular Biology* (New York: Greene Publishing Associates/Wiley-Interscience)
- Attardi, D.G. und Sperry, R.W. (1963) Preferential selection of central pathways by regenerating optic fibers. *Exp. Neurol.* 7, 46-64.
- Bähr, M. und Bonhoeffer, F. (1994) Perspectives on axonal regeneration in the mammalian CNS. *TINS* 17, 473-479.
- Barthel, L.K. und Raymond, P.A.A. (1990) Improved method for obtaining 3- μ m cryosections for immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1383-1388.
- Bastmeyer, M., Ott, H., Leppert, C.A. und Stuermer, C.A.O. (1995) Fish E587-glycoprotein, a member of the L1-family of cell adhesion molecules, participates in axonal fasciculation and the age-related order of ganglion cell axons in the goldfish eye. *J. Cell Biol.* 130, 969-976.
- Bastmeyer, M., Jeserich, G. und Stuermer, C.A.O. (1994) Similarities and differences between fish oligodendrocytes and schwann cells in vitro. *Glia* 11, 300-314.
- Bastmeyer, M., Schlosshauer, B. und Stuermer, C.A.O. (1990) The spatiotemporal distribution of NCAM in the retinotectal system of goldfish detected by the monoclonal antibody D3. *Development* 108, 299-311.
- Benowitz, L.I. und Lewis, E.R. (1983) Increased transport of 44000-to 49000-dalton acidic proteins during regeneration of the goldfish optic nerve: a two-dimensional gel analysis. *J. Neurosci.* 3, 2153-2163.
- Benowitz, L.I., Shashoua, V.E. und Yoon, M.G. (1981) Specific changes in rapidly transported proteins during regeneration of the goldfish optic nerve. *J. Neurosci.* 1, 300-307.
- Beuscher, H.U. und Colten H.R. (1988) Structure and function of membrane II-1. *Mol. Immunol.* 25, 1189-1199.
- Breathnach, R. und Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 349-383.
- Bregman, B.S., Kunkel-Bagaden, E., Schnell, L., Dai, H.N., Gao, D. und Schwab, M.E. (1995) Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 378, 498-501.
- Brümmendorf, T., Rathjen, F. (1994) *Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily*. Academic Press, London.
- Burmeister, G. W., Burmeister, D. W. und Grafstein, B. (1985) Changes in protein content of goldfish optic nerve during degeneration and regeneration following nerve crush. *J. Neurochem.* 44, 1142-1151.
- Burns, F.R., von Kannen, S., Guy, L., Raper, J.A., Kamholz, J. und Chang, S. (1991) DM-GRASP, a novel immunoglobulin superfamily axonal surface protein that supports axonal extension. *Neuron* 7, 209-220.
- Caroni, P. und Schwab, M.E. (1988a) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties of neurite growth and fibroblast spreading. *J. Cell Biol.* 106, 1281-1288.
- Caroni, P. und Schwab, M.E. (1988b) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1, 85-96.
- Cavener, D.R. und Ray, S.C. (1991) Eucaryotic start and stop translation sites. *Nucl. Acids Res.* 19, 3185-3192.

- Chomczynski, P. und Sacchi, N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:2172-2175.
- Doster, S.K., Lozano, A.M., Aguayo, A.J. und Willard, M.B. (1991) Expression of the growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury. *Neuron* 6, 635-647.
- Easter, S.S., Bratton, B. und Scherer, S.S. (1984) Growth-related order in the retinal fiber layer of goldfish. *J. Neurosci.* 4, 2173-2190.
- Easter, S.S., Jr. und Stuermer, C.A.O. (1984) An evaluation of the hypothesis of shifting terminals in goldfish optic tectum. *J. Neurosci.* 4, 1952-1963.
- Easter, S.S., Rusoff, A.C. und Kish, P.E. (1981) The growth and organisation of the optic nerve and tract in juvenile and adult goldfish. *J. Neurosci.* 1, 793-811.
- Engel, J. (1989) EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation? *FEBS Lett.* 251, 1-7.
- Engelman, D.M., Steitz, T.A. und Goldman, A. (1986) Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15, 321-353.
- Englund, P.T. (1993) The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62, 121-138.
- Ey, P.L., Prowse, S.J. und Jenkin, C.R. (1978) Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Biochemistry* 15, 429-436.
- Fawcett, J.W. (1992) Intrinsic determinants of regeneration. *TINS* 15, 5-8.
- Florkiewicz, R.Z., Majack, R.A., Buechler, R.D. und Florkiewicz, E. (1995) Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy dependent, non-ER/Golgi pathway. *J. Cell Physiol.* 162, 388-399.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. und Lazarov, P.B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93, 97-102.
- Furley, A. J., Morton, S. B., Manalo, D., Karagogeos, D, Dodd, J. und Jessell, T. (1990) The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* 61, 157-170.
- Gower, H.J., Barton, C.H., Elsom, V.L., Thompson, J., Moose, S.E., Dickson, G. und Walsh (1988) Alternative splicing generates a secreted form of NCAM in muscle and brain. *Cell* 55, 955-964.
- Grafstein, B. (1991) The goldfish visual system as a model for the study of regeneration in the central nervous system. *Development and Plasticity of the Visual System, Vision and Visual Dysfunction* (J.R. Cronley-Dillon, Hrsg. MacMillan, London), Vol. II, 190-205.
- Grafstein, B. und McQuarrie, I.G. (1978) Role of nerve cell body in axonal regeneration. *Neuronal Plasticity*, (C. Cotman, Hrsg., Raven Press, New York) 155-195.
- Grumet, M., Hoffman, K.L. und Edelman G.M. (1985) Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8075-8079.
- Heukeshoven, J.R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112.
- Hirsch, S., Cahill, M.A. und Stuermer, C.A.O. (1995) Fibroblasts at the transection site of the lesioned goldfish optic nerve. *J. Comp. Neurol.* 360, 599-611.
- Hunter, D.D., Cashman, N., Morris-Valero, R., Bullock, J.W., Adams, S.P. und Sanes, J.R. (1991) An LRE (leucine-arginine-glutamate)

dependent mechanism for adhesion of neurons to S-laminin. *J.Neurosci.* 11, 3960-3971.

Hunter, D.D., Porter, B.E., Bullock, J.W., Adams, S.P., Merlie, J.P. und Sanes, J.R. (1989) Primary sequence of a motor neuron-selective adhesive site in the synaptic basal lamina protein S-laminin. *Cell* 59, 905-913.

Jessel, T.M. (1988) Adhesion molecules and the hierarchy of neural development. *Neuron* 1, 3-13.

Jocelyn, P.C. (1972) *Biochemistry of the SH group*. Academic Press, New York.

Johns, P.A. und Easter, S.S. (1977) Growth of the adult goldfish eye: III. Source of the new retinal cells. *J. Comp. Neurol.* 176, 343-357.

Johnson, A.R. (1993) Contact inhibition in the failure of mammalian CNS axonal regeneration. *BioEssays* 15, 807-813.

Kolodkin, A.L., Matthes, D.J. und Goodman, C.S. (1993) The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.

Kozak (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl. Acids Res.* 15, 8125-8148.

Kozak, M. (1990) Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eucaryotic ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 8301-8305.

Kruse, J., Keilhauer, G., Faissner, A., Timpl, R. und Schachner, M. (1985) The J1 glycoprotein - a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature* 316, 146-148.

Kyte, J. und Doolittle, R. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.

LaBate, M. und Skene, J.H.P. (1989) Selective conservation of Gap-43 structure in vertebrate evolution. *Neuron* 3, 299-310.

Laessing, U. und Stuermer, C.A.O. (1996) The spatiotemporal pattern of retinal ganglion cell differentiation as revealed by the expression of neurodin in embryonic zebrafish. *J.Neurobiol.* 29, 65-74.

Laessing, U., Giordano, S., Stecher, B., Lottspeich, F. und Stuermer, C.A.O. (1994) Molecular characterization of fish neurodin: a growth associated cell surface protein and member of the immunoglobulin superfamily in the fish retinotectal system with similarities to chick protein DM-GRASP / SC-1 / BEN. *Differentiation* 56, 21-29.

Lanners, H.N. und Grafstein, B. (1980) Early stages of axonal regeneration in the goldfish optic tract: an electron microscopic study. *J.Neurocytol* 9, 733-751.

Luo, Y., Raible, D. und Raper, J. (1993) Collapsin: A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217-227.

Lupas, A., van Dyke, M. und Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, 1162-1164.

McQuarrie, I.G. und Grafstein, B. (1982) Protein synthesis and axonal transport in goldfish retinal ganglion cells during regeneration accelerated by a conditioning lesion. *Brain Res.* 251, 25-37.

Meek, J. (1983) Functional anatomy of the tectum mesencephali of the goldfish. An explorative analysis of the functional implications of the laminar structural organization of the tectum. *Brain Res. Rev.* 6, 247-297.

Meyer, R.L., Sakurai, K. und Schauwecker, E. (1985) Topography of regenerating optic fibers in goldfish traced with local wheat germ injections into retina: evidence for discontinuous microtopography in the retinotectal projection. *J.Comp.Neurol.* 239, 27-43.

Moran, P. und Caras, I. W. (1991a) Fusion of sequence elements from non-anchored proteins to generate a fully functional signal for glycoposphatidylinositol membrane anchor attachment. *J.Cell Biol.* 115, 1595-1600.

Moran, P. und Caras, I.W. (1991b) A nonfunctional sequence converted to a signal for glycoposphatidylinositol membrane anchor attachment. *J. Cell. Biol.* 115, 1595-1600.

Mount, S. M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucl. Acid Res.* 10, 459-472.

- Northmore, D.P.M. (1989a) Quantitative electrophysiological studies of regenerating visuotopic maps in goldfish-I. Early recovery of dimming sensitivity in tectum and torus longitudinalis. *Neurosc.* 32, 739-747.
- Northmore, D.P.M. (1989b) Quantitative electrophysiological studies of regenerating visuotopic maps in goldfish-II Delayed recovery of sensitivity to small light flashes. *Neurosc.* 32, 749-757.
- Paschke, K.A. (1990) Identifizierung wachstumsassoziierter Moleküle im retinotectalen System des Goldfisches mit Hilfe neuer monoklonaler Antikörper. Dissertation.
- Paschke, K.A., Lottspeich, F. und Stuermer C.A.O. (1992) Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. *J. Cell Biol.* 117, 863-875.
- Pearson, C.A., Pearson, D., Shibahara, S., Hofsteenge, J. und Chiquet-Ehrismann, R. (1988) Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF- β . *EMBO J.* 10, 2677-2981.
- Perry, G.W., Burmeister, D.W. und Grafstein, B. (1987) Fast axonally transported proteins in regenerating goldfish optic axons. *J. Neurosci.* 7, 792-806.
- Piggot, R. und Power, C. (1993) *The Adhesion Molecule Facts Book*. London: Academic Press.
- Porter, B.E., Weis, J. und Sanes, J.R. (1995) A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-Laminin. *Cell* 14, 549-559.
- Ramon y. Cajal, S. (1968) Traumatic degeneration and regeneration in the optic nerve and retina. In: *Degeneration and regeneration of the nervous system*. R.M. May, Übersetzer. Hafner, New York, Seiten 583-596.
- Rathjen, F.G. und Schachner, M. (1984) Immunocytological and biochemical characterisation of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in neurite-neurite interactions. *EMBO-J.* 3, 1-10.
- Reinhard, E., Nedivi, E., Wegner, J., Skene, J.H.P. und Westerfield, M. (1994) Neural selective activation and temporal regulation of a mammalian GAP-43 promoter in zebrafish. *Development* 120, 1757-1775.
- Risinger, C. und Larhammar, D. (1993) Multiple loci for synapse protein SNAP-25 in the tetraploid goldfish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10598-10602.
- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. und Sitia, R. (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* 9, 1503-1510.
- Ruegg, M.A., Stoeckli, E.T., Kuhn, T.B., Heller, M., Züellig, R. und Sonderegger, P. (1989) Purification of axonin-1, a protein that is secreted from axons during neurogenesis. *EMBO-J.* 8, 55-63.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Schaden, H., Stuermer, C.A.O. und Bähr, M. (1994) Gap-43 immunoreactivity and axon regeneration in retinal ganglion cells of the rat. *J. Neurobiol.* 25, 1570-1578.
- Schägger, H. (1994) Gel Electrophoresis for sample preparation in protein chemistry. *Microcharacterization of proteins*, (R. Kellner, F. Lottspeich und H.E. Meyer, Hrsg., VCH Weinheim) 63-74.
- Schmidt, J.T. (1985) Formation of retinotopic connections: Selective stability by an activity-dependent mechanism. *Cell. Mol. Neurobiol.* 5, 65-84.
- Scholes, J.H. (1979) Nerve fiber topography in the retinal projection to the tectum. *Nature* 278, 620-624
- Schroeder, W., Stewart-Galetka, S., Mandavilli, S., Parry, D.A.D., Goldsmith und Duvic, M.L. (1994) Cloning and characterization of a novel epidermal cell surface antigen (ESA) *J. Biol. Chem.* 269, 19983-19991.
- Schultz, A.M., Henderson, L.E. und Oroszlan, S. (1992) Fatty acylation of proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4, 611-647.
- Schwab, M.E., Kapfhammer, J.P. und Brandtlow, C.E. (1993) Inhibitors of neurite growth. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 565-95.

- Schwalb, J.M., Boulis, N.M., Gu, M-f, Winickoff, J., Jackson, P.S., Irwin, N. und Benowitz, L.I. (1995) Two factors secreted by the goldfish optic nerve induce retinal ganglion cells to regenerate axons in culture. *J. Neurosci.*, 15, 5514-5525.
- Schwassmann, H.O. und Kruger, L. (1965) Organization of the visual projection of some freshwater fish. *J. Comp. Neurol.* 124, 113-126.
- Sharma, S.C. (1972) The retinotectal projection in the goldfish: an experimental study. *Brain Res.* 39, 213-223.
- Skene, J. H. P. und Willard, M. (1981) Changes in axonally transported proteins during axon regeneration in toad retinal ganglion cells. *J. Cell Biol.* 89, 86-95.
- Skene, J.H.P. (1989) Axonal growth-associated proteins. *Annu. Rev. Neurosci.* 12, 127-156.
- Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L. und Springer, T.A. (1988) Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52, 925-933.
- Stuart, R.A., Neupert, W. und Tropschlug, M. (1987) Deficiency in mRNA splicing in a cytochrome c mutant of *Neurospora crassa*: Importance of carboxy terminus for import of cytochrome c into mitochondria. *EMBO J.* 6, 2131-2137.
- Stuermer, C.A.O. (1988a) Trajectories of regenerating retinal axons in the goldfish tectum: II. Exploratory branches and growth cones on axons at early regeneration stages. *J. Comp. Neurol.* 267, 55-68.
- Stuermer, C.A.O. (1988b) Trajectories of regenerating retinal axons in the goldfish tectum: I. A comparison of normal and regenerated axons at late regeneration stages. *J. Comp. Neurol.* 267, 55-68.
- Stuermer, C.A.O. und Easter, S.S. (1984a) Rules of order in the retinotectal fascicles. *J. Neurosci.* 4, 1045-1051.
- Stuermer, C.A.O. und Easter, S.S. (1984b) A comparison of the normal and regenerated retinotectal pathways of goldfish. *J. Comp. Neurol.* 223, 57-76.
- Stuermer, C.A.O. und Raymond, P.A.A. (1989) Developing retinotectal projection in larval goldfish. *J. Comp. Neurol.* 281, 630-640.
- Stuermer, C.A.O., Bastmeyer, M., Bähr, M., Strobel, G. und Paschke, K. (1992) Trying to understand axonal regeneration in the CNS of fish. *J. Neurobiol.* 23, 537-559.
- Taratini, F., Gamble, S., Jackson, A. und Maciag, T. (1995) The cysteine residue responsible for the release of fibroblast growth factor-1 residues in a domain independent of the domain for phosphatidylserine binding. *J. Biol. Chem.* 270, 29039-29042.
- Thanos, S., Bähr, M., Barde, Y.A. und Vanselow, J. (1989) Survival and axonal elongation of adult rat retinal ganglion cells. *Eur. J. Neurosci.* 1, 19-26.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Vidal-Sanz, M., Bray, G.M., Villegaz-Perez, M.P., Thanos, S. und Aguayo, A.J. (1987) Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J. Neurosci.* 7, 2894-2909.
- Vielmetter, J., Lottspeich, F. und Stuermer, C.A.O. (1991) The monoclonal antibody E587 recognizes growing (new and regenerating) retinal axons in the goldfish retinotectal pathway. *J. Neurosci.* 11, 3581-3593.
- Vielmetter, J. und Stuermer, C.A.O. (1989) Goldfish retinal axons respond to position-specific properties of tectal cell membranes in vitro. *Neuron* 2, 1331-1339.
- Villegaz-perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Raminsky, M., Bray, G.M. und Aguayo, A.J. (1993) Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss following axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurosci.* 24, 23-36.
- von Heijne, G. und Gavel, Y. (1988) Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 174, 671-67.
- Wahle, E. und Keller, W. (1986) The biochemistry of 3' end cleavage and

polyadenylation of messenger RNA precursors. *Ann. Rev. Biochem.* 61, 419-440.

Wang, X-h und Poo, M-m. (1995) Cloning and functional study of *Xenopus* synaptophysins. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21, 136.20.

Wanner, M., Lang, D.M., Bandtlow, C.E., Schwab, M.E., Bastmeyer, M. und Stuermer, C.A.O. Re-evaluation of the growth permissive properties of goldfish optic nerve myelin. *J.Neurosci.* 15, 7500-7508.

Westerfield, M. (1994) *The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish*

(*brachydanio rerio*) Eugene, Oregon, University of Oregon Press.

Wilkinson, D.G. (1992) *In Situ Hybridization, A Practical Approach.* IRL Press at Oxford University Press, Oxford 2, 22.

Williams, A.F. und Barclay, A.N. (1988) The immunoglobulin superfamily - domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 381-405.

Zaremba, S., Guimaraes, A., Kalb, R.G. und Hockfield, S. (1989) Characterization of an activity dependent, neuronal surface proteoglycan identified with monoclonal antibody Cat-301. *Neuron* 2, 1207-1219.