

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung von leukozytärer Gesamt-RNA

Um Ausgangsmaterial zur Isolierung von CD44-RNA zu erhalten, wurde aus einem „Buffy coat“ (siehe Abschnitt „Materialien und Methoden“) der Leukozytenanteil gewonnen. Die Ausbeute an Leukozyten ist hierbei im Vergleich zur Aufarbeitung eines üblichen humanen Erythrozytenkonzentrates etwa zehnfach höher. Mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden die mononukleären Zellen (Lymphozyten/Monozyten-Fraktion) und die polymorphkernigen Zellen (Granulozyten-Fraktion) voneinander separiert. Beide Zellfraktionen wurden anschließend für ca. 24 Stunden in Zellkultur genommen.

Die Isolierung der Leukozyten-RNA erfolgte aus beiden Fraktionen mit Hilfe des RNeasy-Kits™ der Firma Quiagen. Um Degradation durch RNAsen auszuschließen, wurde die Integrität der gewonnenen RNA durch Darstellung der charakteristischen 18S- und 28S-Banden mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel verifiziert (siehe Abbildung 5).

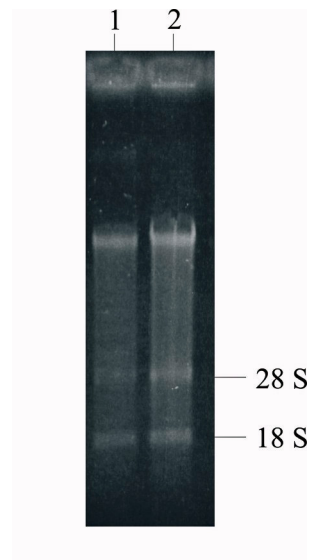


Abbildung 5: Gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten Leukozyten-RNA. Spur 1: isolierte Lymphozyten-Monozyten-Gesamt-RNA, Spur 2: isolierte Granulozyten-Gesamt-RNA. Die beiden Banden stellen 18S- und 28S-RNA dar und zeigen die erhaltene Integrität der RNA an.

3.2 Isolierung der den transmembranären Abschnitt codierenden CD44-cDNA

Für die Konstruktion der L- Selektin/tmCD 44-Chimäre wurde der transmembranäre Teil des CD44-Gens benötigt. Dieser Abschnitt wird von Exon 17 des CD44-Gens codiert. Es wurde deshalb über eine Reverse Transkriptase (RT)-PCR mit Oligo(dt)-Primer Poly A⁺-mRNA generiert. Sie diente als Matrize zur Amplifikation eines 207 bp-Fragmentes, das die Exons 15-17 beinhaltet (siehe Abbildung 6).

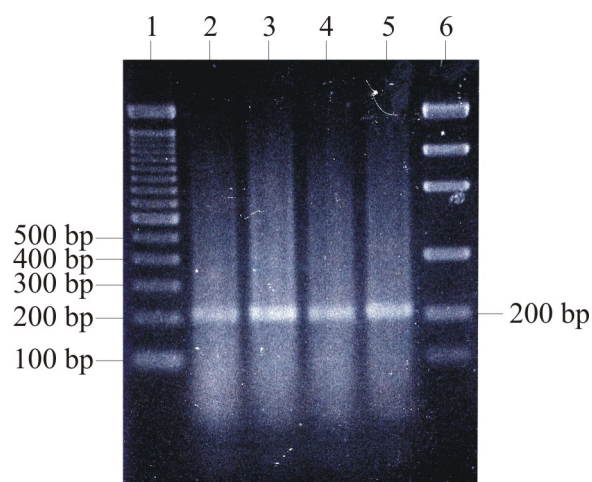


Abbildung 6: Gelelektrophoretische Darstellung des 207 bp-Fragments von CD44 (Spur 2-5). Das enthaltene Exon 17 kodiert für den transmembranären Abschnitt des CD44-Moleküls. Spur 1: 100bp-DNA-Leiter, Spur 6: DNA-Massenstandard, Spur 2-5: variierende PCR-Bedingungen (Annealing Temperatur: 50°C-55°C-60°C-65°C)

Das gewonnene 207 bp-Fragment wurde zur dauerhaften Archivierung in den prokaryontischen Expressionsvektor pCR 2.1 mit Hilfe des TA Cloning Kits der Firma Invitrogen kloniert (siehe Abbildung 7) und die korrekte Basenabfolge über Sequenzierung verifiziert. Die größere Fragmentlänge erleichterte hierbei die Klonierung und erhöhte die Spezifität der PCR-Reaktion.

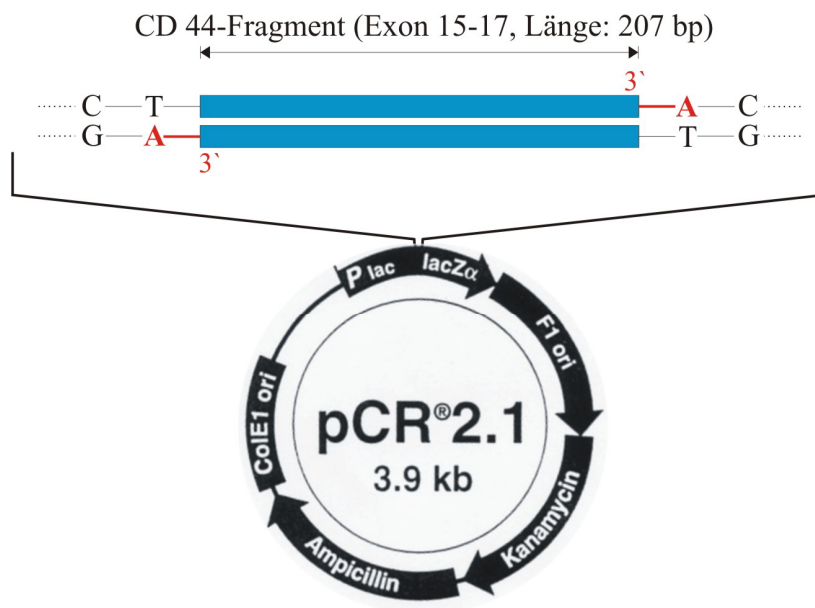


Abbildung 7: Klonierung des gewonnenen CD44-Fragments in den Vektor pCR 2.1. Die Insertion findet über komplementäre Basenpaarung zwischen den Thymidinüberhängen des Vektors und den Adeninüberhängen des Amplifikats statt.

3.3 Konstruktion der L-Selektin/tmCD44-Chimäre

Die Konstruktion der L-Selektin/tmCD44-Chimäre erfolgte durch die PCR-ähnliche Methode „Splicing by overlap extension“ (SOE). Dieses Verfahren ermöglicht es, zwei DNA-Fragmente mit Hilfe der PCR-Technik an definierten Stellen sequenzunabhängig miteinander zu verknüpfen.

Das allgemeine Prinzip der Fusion von zwei DNA-Fragmenten A und B ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Beide DNA-Fragmente werden zunächst in einer modifizierenden PCR mit überhängenden Primern synthetisiert, die an der Fusionsstelle komplementär sind. Nach Hybridisierung beider Fragmente kann dann mit flankierenden Primern das fusionierte DNA-Fragment generiert werden.

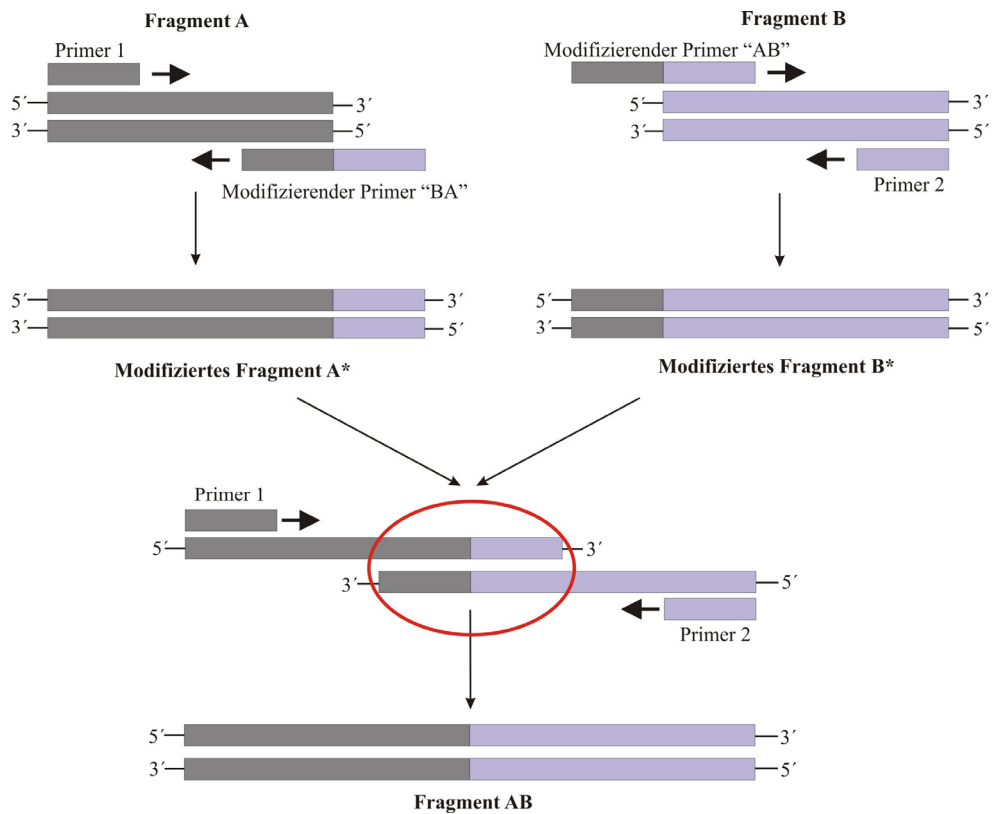


Abbildung 8: Allgemeines Prinzip der „Splicing by overlap extension“ –PCR zur Fusion von zwei DNA-Fragmenten. Die Fragmente A und B werden in getrennten PCR-Reaktionen mit überhängenden Primern gezielt so modifiziert, dass sie im Bereich der Fusionsstelle komplementär zueinander sind (roter Kreis). In der eigentlichen SOE-Reaktion hybridisieren die so modifizierten Fragmente und durch die flankierenden Primern kommt es (wie bei einer konventionellen PCR) zur Vervielfältigung des chimären Fragments AB.

Nachfolgend findet sich eine Übersicht über die Teilschritte der Chimärenkonstruktion.

3.3.1 Übersicht: L- Selektin/tmCD44 - Chimärenkonstruktion

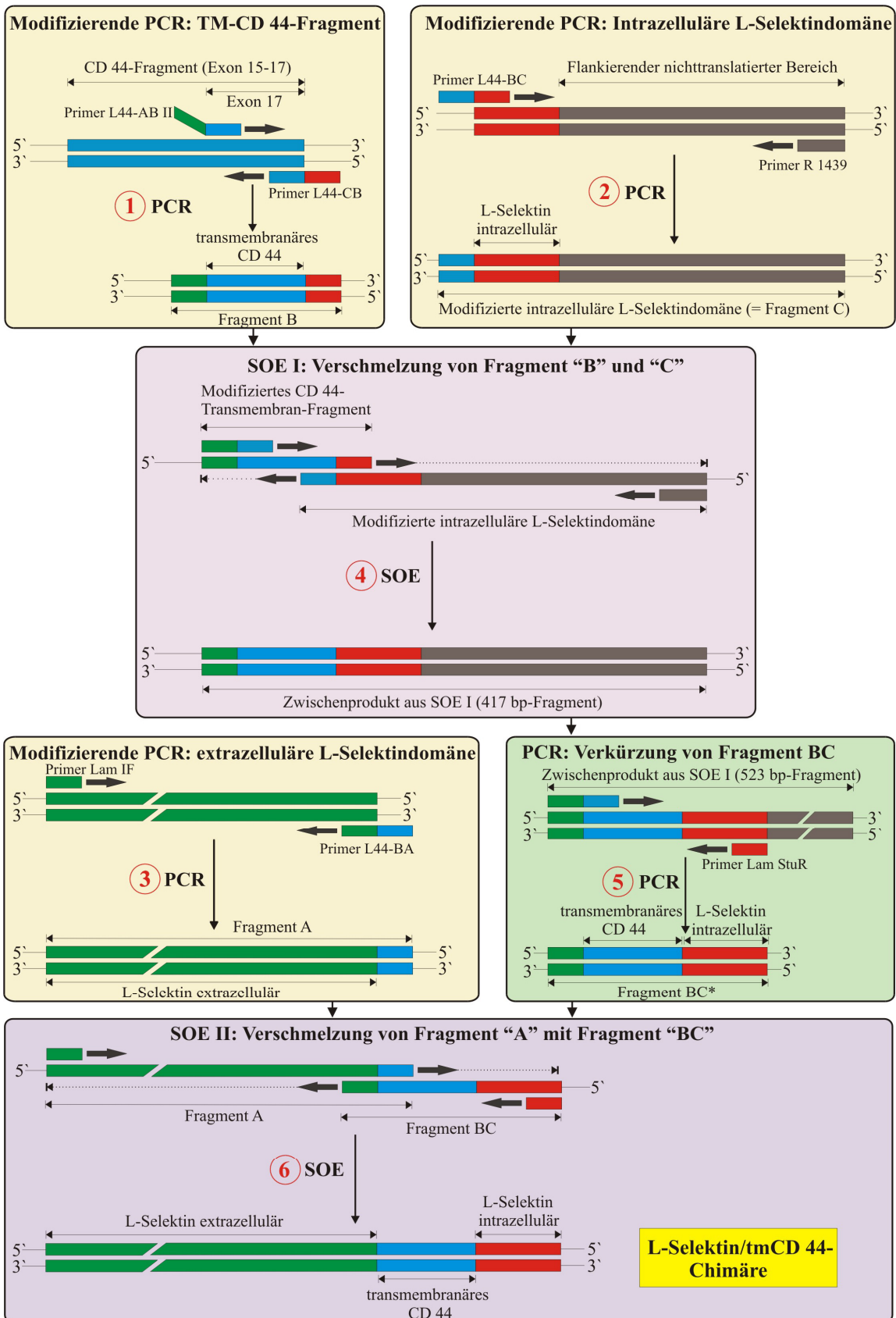


Abbildung 9: Übersicht sämtlicher Teilschritte der L-Selektin/tmCD44-Chimärenkonstruktion. Die jeweiligen modifizierenden PCRs der drei Chimärenenteile (Extrazelluläres L-Selektin, transmembranäres CD44, intrazelluläres L-Selektin) mit überhängenden Primern sind *gelb* hinterlegt (Schritt 1-3). Die beiden eigentlichen SOE-Reaktionen (Schritt 4 und 6), in der die Fragmente B und C (SOE I) bzw. A und BC* (SOE II) zusammengefügt werden, sind *lila* hinterlegt. Die Verkürzung von Fragment BC zu BC* erfolgte durch konventionelle PCR (Schritt 5) und ist *grün* hinterlegt. In allen Abbildungen dieser Arbeit wird der die Extrazellulärdomäne codierende Teil des L-Selektingens dunkelgrün, der die zytoplasmatische Domäne codierende Teil rot und das CD44-Gen blau dargestellt.

3.3.2 Modifizierende PCR zur Fragmentgewinnung

Für die nachfolgenden DNA-Fusionen wurden zunächst modifizierte Fragmente der extra- und intrazellulären L-Selektindomäne sowie der transmembranären CD44-Domäne mittels PCR mit überhängenden Primern generiert (siehe Abbildung 10-12).

Als Template für die beiden L-Selektinteilstücke diente der Klon LAM T4, für die CD44-Transmembranregion das bereits klonierte 207-bp-Fragment. Die entsprechenden Amplifikate wurden mit Fragment „A“ (extrazelluläre L-Selektindomäne), „B“ (transmembranärer CD44-Abschnitt) und „C“ (intrazelluläre L-Selektindomäne) benannt. Das Fragment C benannte Teilstück beinhaltet neben der kurzen Gensequenz für die zytoplasmatische L-Selektindomäne zusätzlich einen Teil der in 3'-Richtung angrenzenden „nicht translatierten Sequenz“ (NTS), der erst in einem späteren Teilschritt entfernt wurde (siehe Kapitel 3.3.4).

Die aus präparativen Agarosegelen gereinigten DNA-Fragmente wurden in den Vektor pCR 2.1 kloniert (siehe Abbildung 13), die korrekte Basenabfolge durch Sequenzierung verifiziert.

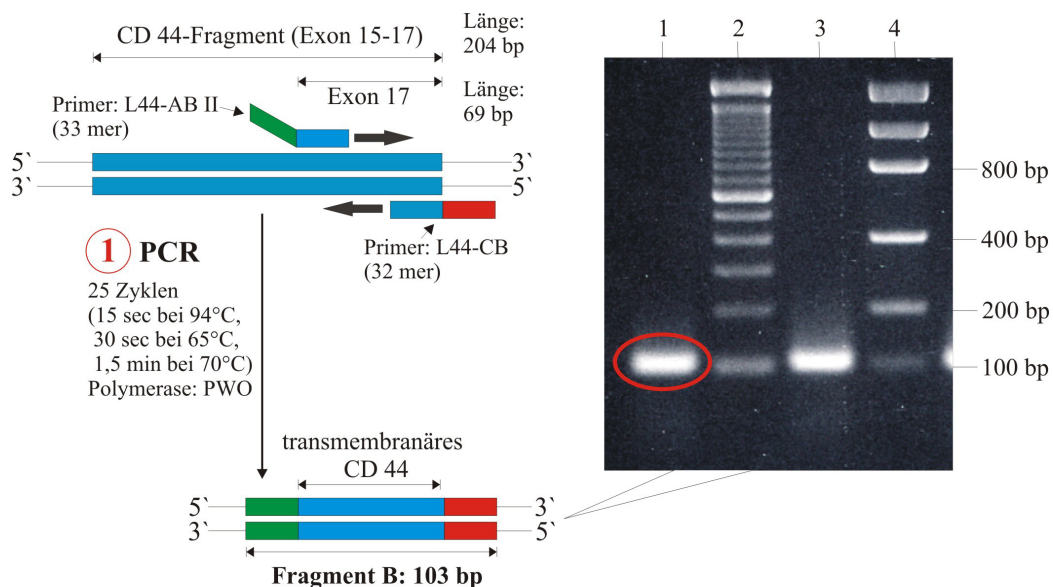


Abbildung 10: Modifizierende PCR des transmembranären Abschnitts von CD44 (Teilschritt 1 der Übersicht). Als Template diente das klonierte 207 bp-Fragment. Während der blaue Teil der Primer den Transmembranabschnitt des CD44-Gens (Exon 17) komplementär flankiert, repräsentiert der grüne Überhang die letzten 15 C-terminalen Basen der

extrazellulären L-Selektinsequenz. Der rote Überhang symbolisiert die N-terminal ersten 19 Basen der zytoplasmatischen L-Selektinsequenz. Der so modifizierte Transmembranabschnitt von CD44 wurde Fragment B genannt. *Gelelektrophorese*: Spur 1 und 3: Fragment B, Spur 2: 100 bp-Leiter, Spur 4: DNA-Massenstandard

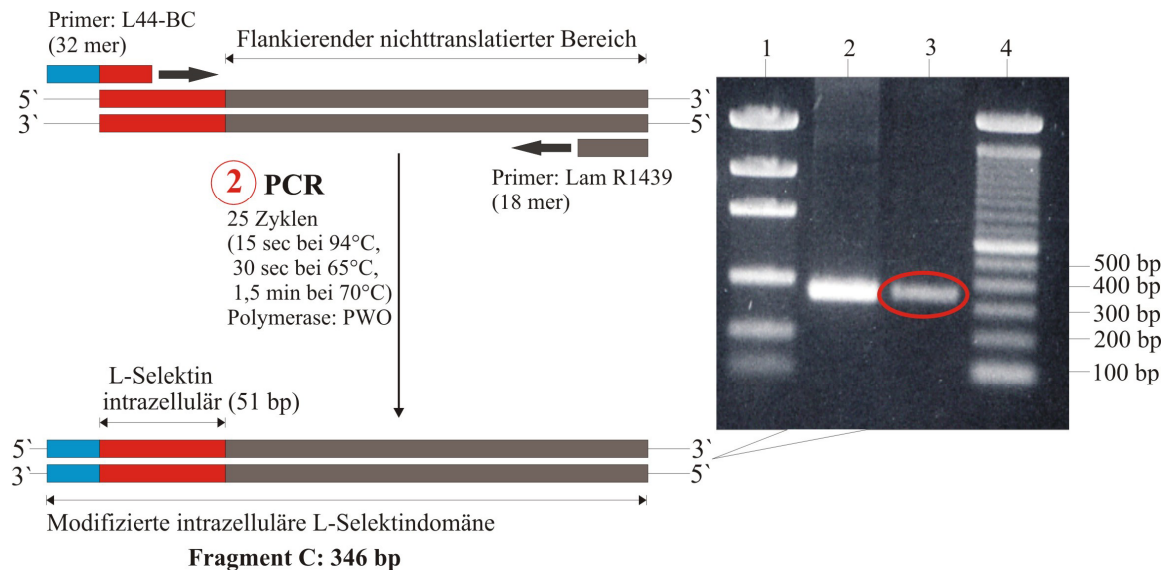


Abbildung 11: Modifizierende PCR des zytoplasmatischen Abschnitts von L-Selektin (Teilschritt 2 der Übersicht). Als Templat diente der Klon Lam TA4. Der blaue Anteil des Primers L44-BC entspricht den N-terminal letzten 13 Basen des Transmembranabschnitts von CD 44, der reverse Primer R 1439 bindet innerhalb der „Nicht translatierten Sequenz“ (NTS) von L-Selektin (braun). Das amplifizierte PCR-Produkt wurde Fragment C genannt, der Anteil der NTS wurde in einem späteren Teilschritt (siehe 2.3.4) über PCR entfernt. *Gelelektrophorese*: Spur 2 und 3: Fragment C, Spur 1: DNA-Massenstandard, Spur 4: 100 bp-Leiter

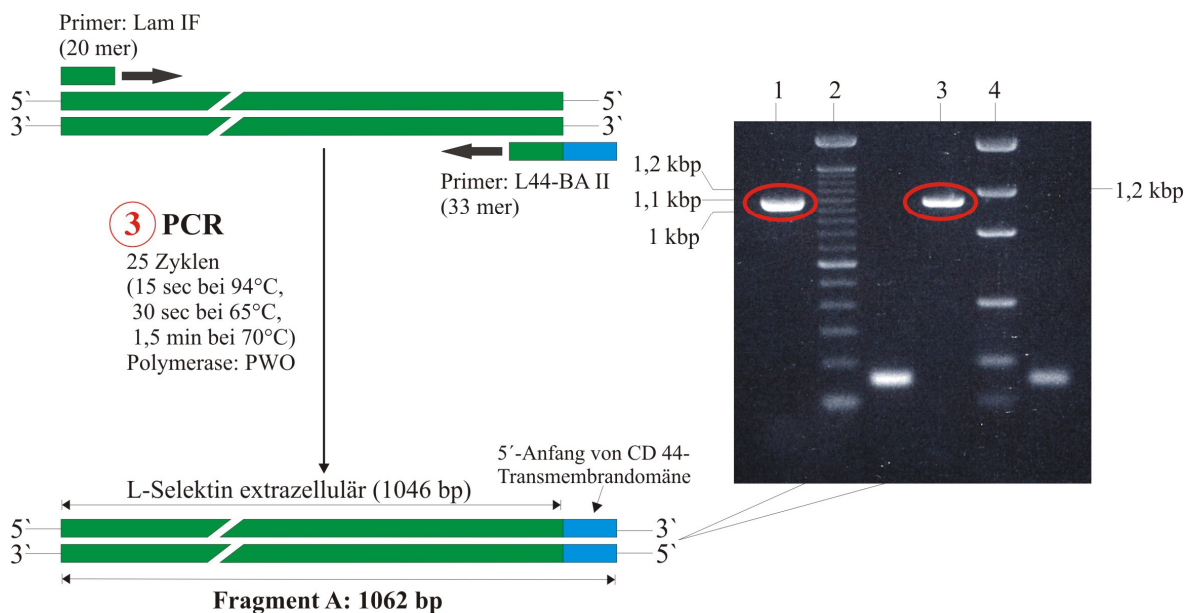


Abbildung 12: Modifizierende PCR des extrazellulären Abschnitts von L-Selektin (Teilschritt 3 der Übersicht). Templat: Klon Lam TA4. Der blaue Anteil vom Primer L44-BA II sind die ersten 16 N-terminalen Basen der CD44-Transmembrandomäne. Der Primer Lam IF flankiert das extrazelluläre L-Selektin N-terminal. *Gelelektrophorese*: Spur 1 und 3: Fragment A, Spur 2: 100 bp-Leiter, Spur 4: DNA-Massenstandard

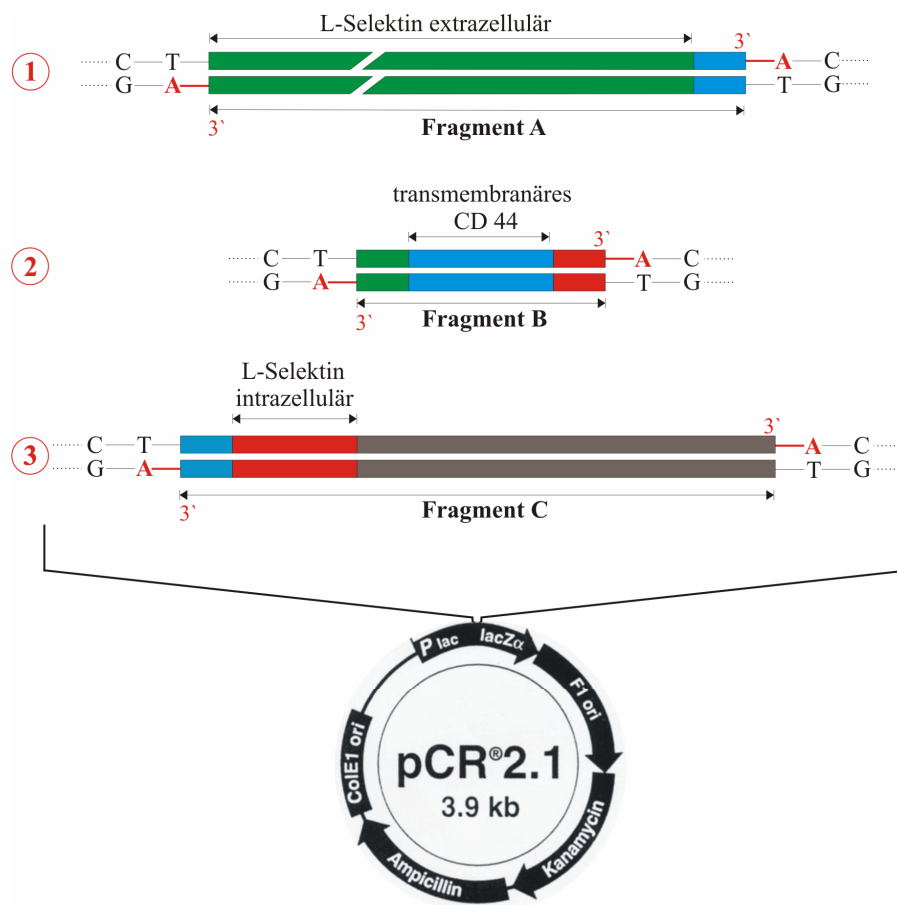


Abbildung 13: Klonierung der modifizierten Fragmente A, B und C in den Vektor pCR 2.1.

3.3.3 SOE I: Herstellung von Fragment BC

Zunächst erfolgte in einer ersten SOE-Reaktion die Fusionierung der Fragmente B und C. Durch die vorher durchgeführte Fragmentmodifikation besitzen die beiden Teilstücke einen Bereich von 32 komplementären Basenpaaren, über die sie hybridisieren können. Ab dem zweiten SOE-Zyklus kommt es mit Hilfe der flankierenden Primer zur Amplifizierung eines 417 bp langen Fusionsfragments BC. Die beste Ausbeute an Fragment BC erhielt man durch Einsatz von Fragment B und C im molaren Verhältnis von 1:1.

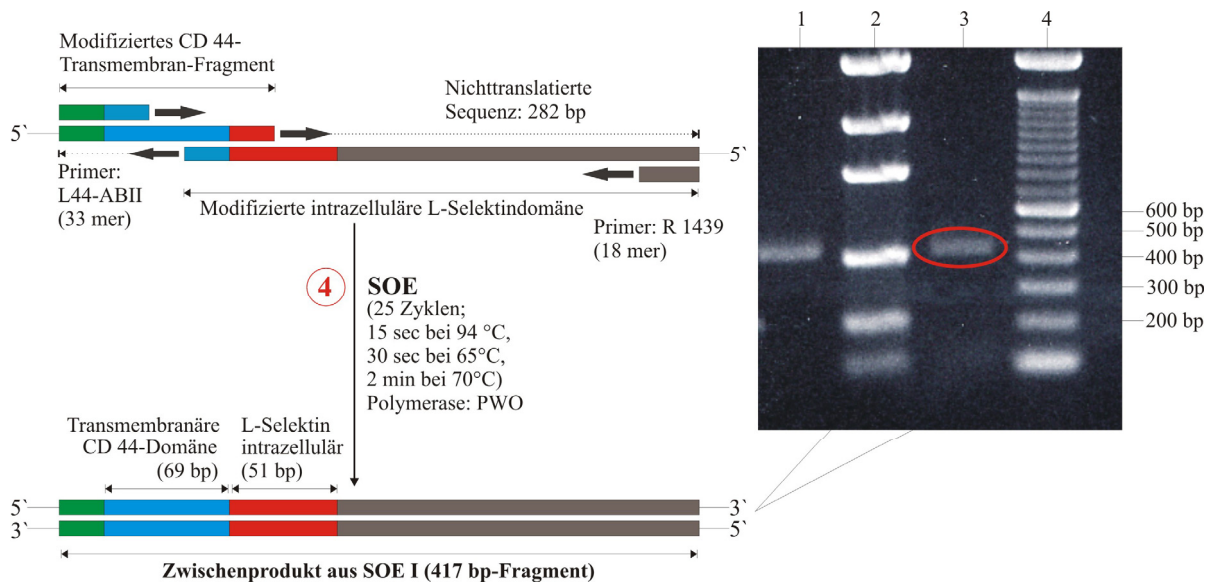


Abbildung 14: Fusion der beiden Fragmente B und C mittels SOE (Teilschritt 4 der Übersicht). Der Bereich um die Fusionsstelle ist 32 Basen lang komplementär, so dass B und C hybridisieren konnten. Mit den flankierenden Primern L44-AB II und R 1439 erfolgt die Amplifikation des Fragmentes BC (Bande bei ca. 420 bp in der gelelektrophoretischen Auftrennung). *Gelelektrophorese*: Spur 1 und 3: Fragment BC, Spur 2: DNA-Massenstandard, Spur 4: 100 bp-Leiter.

In der gelelektrophoretischen Auftrennung zeigte das Amplifikat die erwartete Fragmentgröße (siehe Abbildung 14). Durch Sequenzierung wurde es als das gewünschte Genfusionsprodukt identifiziert, nach Aufreinigung erfolgte die Klonierung in den Vektor pCR 2.1 (siehe Abbildung 15).

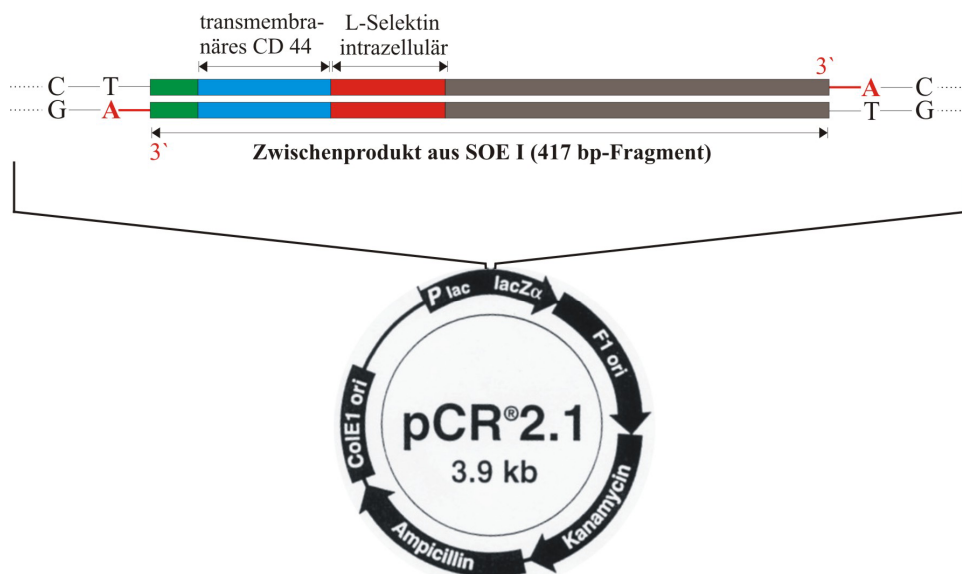


Abbildung 15: Klonierung des SOE I-Produkts (Fragment BC) in den Vektor pCR 2.1.

3.3.4 Verkürzung von Fragment BC

Mittels PCR wurde das Fragment BC auf den für die Chimärenkonstruktion relevanten Bereich bestehend aus der transmembranären Sequenz von CD44 und der zytoplasmatischen Sequenz von L-Selektin verkürzt (siehe Abbildung 16).

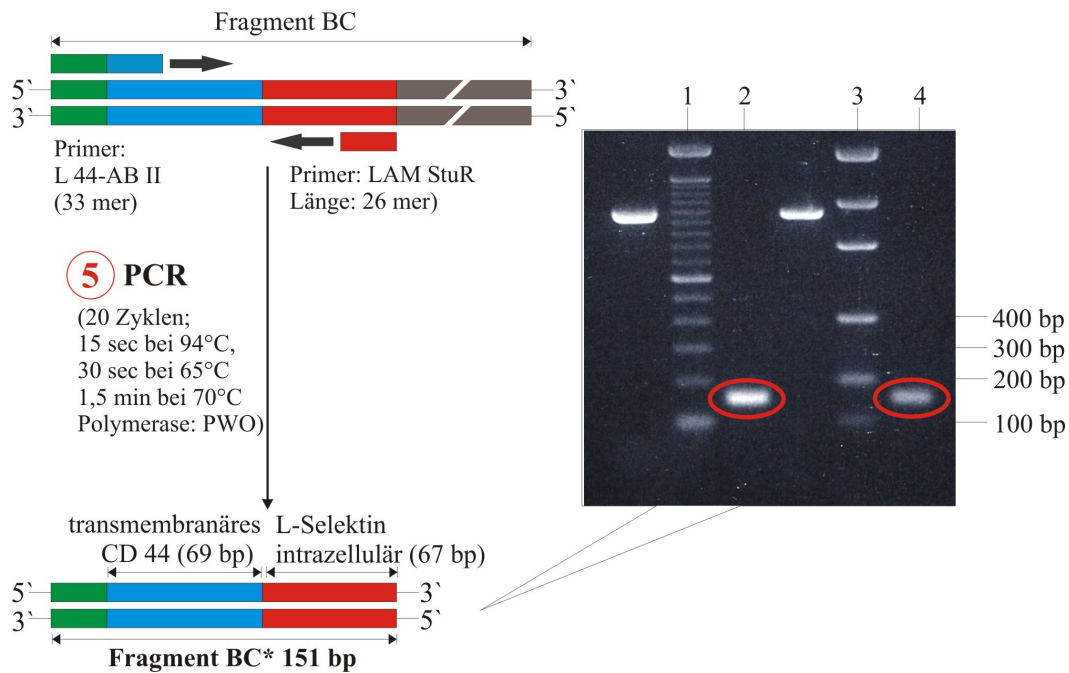


Abbildung 16: Verkürzung von Fragment BC (Teilschritt 5 der Übersicht). Das verkürzte PCR-Produkt (Fragment BC*) enthält die Gensequenz von transmembranärem CD44 (blau), daran schließt sich C-terminal diejenige von intrazellulärem L-Selektin an (rot), wobei der Primer Lam StuR nur noch 16 bp in die NTS hineinreicht ($51+16 = 67$ bp). *Gelelektrophorese*: Spur 2 und 4: Fragment BC*, Spur 1: 100 bp-Leiter, Spur 3: DNA-Massenstandard.

3.3.5 SOE II: Herstellung von Fragment „ABC“

Durch die zweite SOE erfolgte die Fusion von Fragment A mit Fragment BC*. Beide Fragmente besitzen durch die vorherigen Modifikationen eine komplementäre Sequenz von 31 Basen. Analog zur ersten SOE hybridisieren A und BC* in diesem Bereich und durch die flankierenden Primer wird ab dem zweiten SOE-Zyklus das Fragment ABC repliziert (siehe Abbildung 17). Die erwartete Fragmentlänge beträgt ca. 1,2 kbp. Auch bei dieser SOE ergab der Einsatz von A und BC* im molaren Verhältnis 1:1 die beste Ausbeute am SOE-Produkt ABC. Die elektrophoretische Auftrennung zeigte eine Bande in der erwarteten Höhe. Die Sequenzierung bewies die korrekte Fusion an den Übergangsstellen (siehe Abbildung 18), das Genprodukt entspricht dem gewünschten L-Selektin/tmCD44-Chimärenkonstrukt.

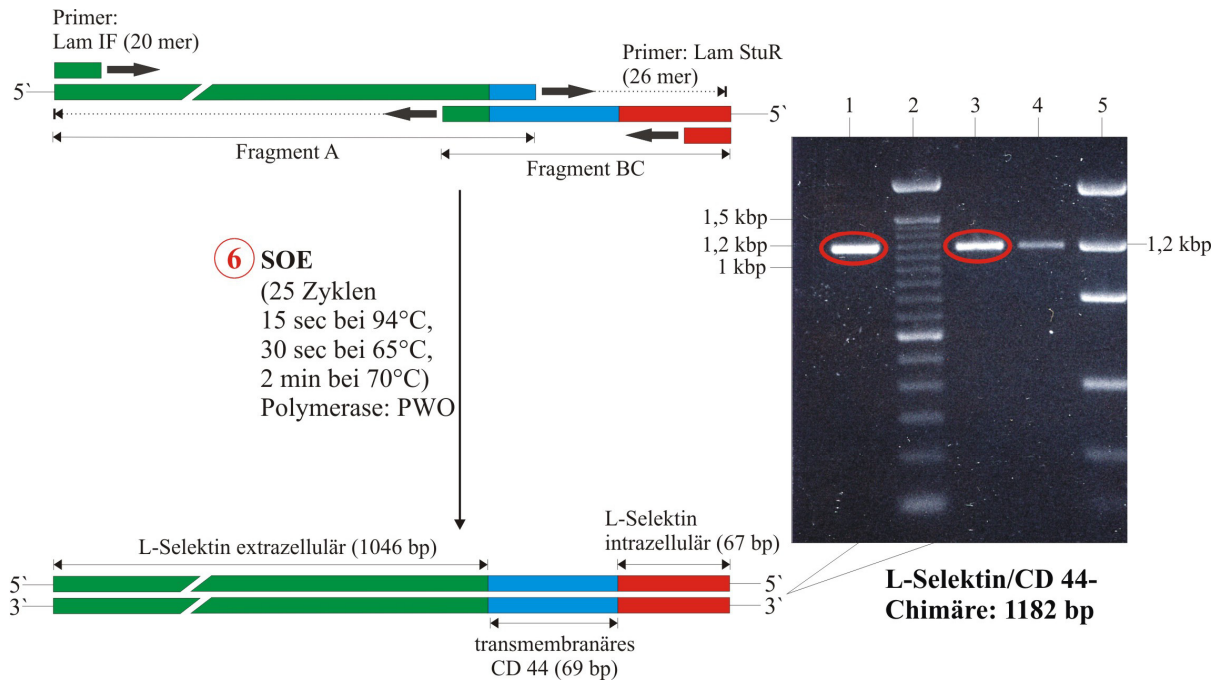


Abbildung 17: Fusionierung von Fragment A mit BC* durch SOE. (Teilschritt 6 der Übersicht) Fragment A und BC* hybridisieren in ihrem komplementären Bereich, durch die flankierenden Primern Lam IF und Lam StuR wird das Fragment ABC amplifiziert. In der gelelektrophoretischen Auftrennung erkennt man ABC als Bande bei knapp 1,2 kbp (Spur 1 und 3). Die Länge der L-Selektinchimäre beträgt 1182 bp und besteht aus dem extrazellulären Anteil von L-Selektin (grün), dem transmembranären Teil von CD44 (blau) und dem intrazellulären Abschnitt von L-Selektin (rot). Die ersten acht Basen des Primers Lam IF werden ebenso wie die ersten 16 Basen des Primers Lam StuR nicht translatiert.

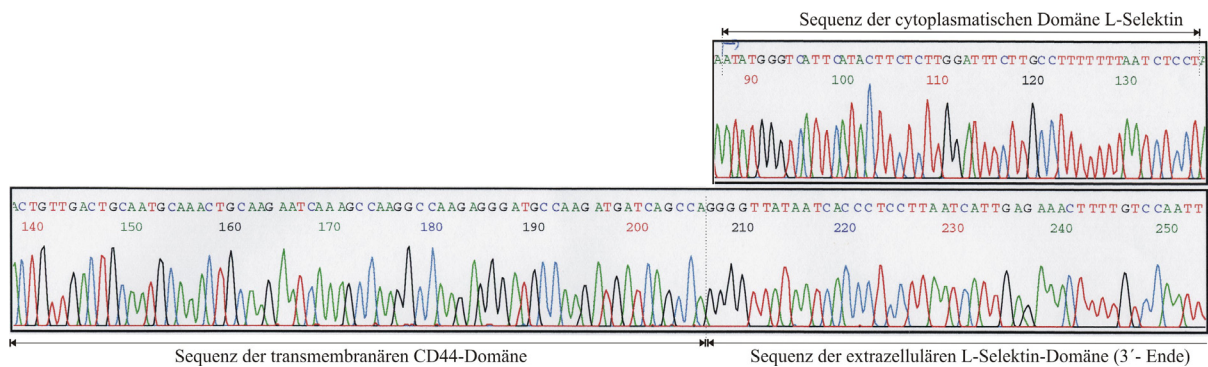


Abbildung 18: Übergänge der Gensequenz der L-Selektin/tmCD44-Chimäre. Die korrekte Fusion der Teilfragmente wurde durch Sequenzierung bestätigt. Dargestellt sind die Übergänge der Chimären-Gensequenz zwischen intra- bzw. extrazellulärem L-Selektin und transmembranärem CD44. Darstellung in 3'→5'-Richtung.

Das Konstrukt wurde zunächst im Vektor pCR 2.1 zwischenkloniert (Abbildung 19). Die anschließende Sequenzierung schloss Fehler in der Basenabfolge durch die Polymerase aus.

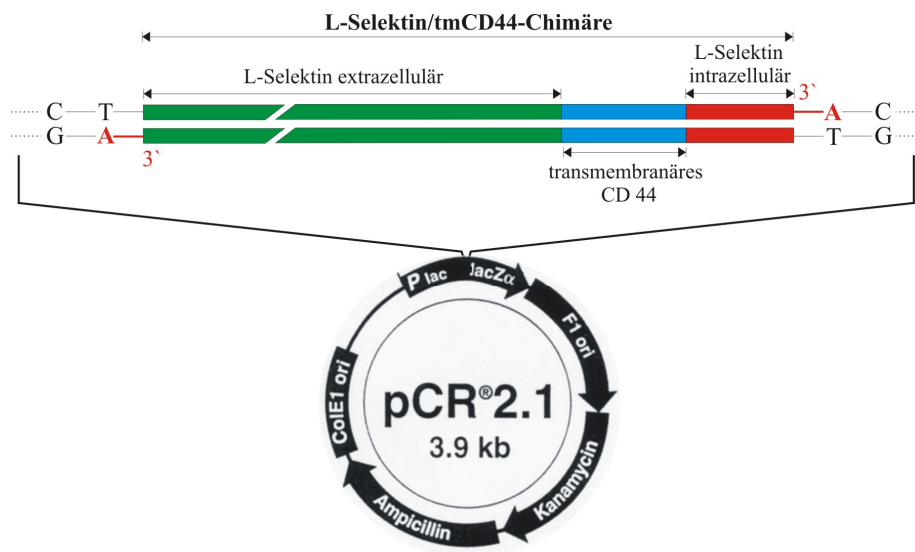


Abbildung 19: Zwischenklonierung der L-Selektin/tmCD44-Chimäre (Fragment ABC) in den Vektor pCR 2.1.

3.4 Klonierung der L-Selektin/tmCD44-Chimäre in einen eukaryontischen Expressionsvektor

Um die L-Selektin/tmCD44-Chimäre in humane Leukozyten einzubringen und zu exprimieren, war die Umklonierung in einen eukaryontischen Expressionsvektor notwendig. Es wurde der Vektor pCR 3.1 der Firma Invitrogen verwendet. Er besitzt, wie der zur Zwischenklonierung von Fragment ABC verwendete prokaryontische Vektor pCR 2.1, 5'- sowie 3'- der Fragmentinsertionsstelle eine EcoR I-Restriktionsschnittstelle.

Die Umklonierungsstrategie ist schematisch in Abbildung 20 dargestellt. Es wurde zunächst ein EcoR I-Verdau des leeren pCR 3.1-Vektors sowie des in den Vektor pCR 2.1 klonierten Fragmentes ABC durchgeführt. Der verdaute pCR 3.1-Leervektor wurde mit Alkalischer Phosphatase (CIP: calf intestine phosphatase) behandelt (Dephosphorylierung). Hierdurch werden die freien Enden des Vektors an 5'-Position dephosphoryliert und damit die Religation der freien Vektorenden verhindert. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit des Einbringens eines Inserts. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Aufreinigung des EcoR I-geschnittenen Fragments ABC und des aufbereiteten Vektors pCR 3.1 fand die Ligation statt. Hierbei erwies sich ein molares Vektor:Insert-Verhältnis von 1:2 als besonders effizient.

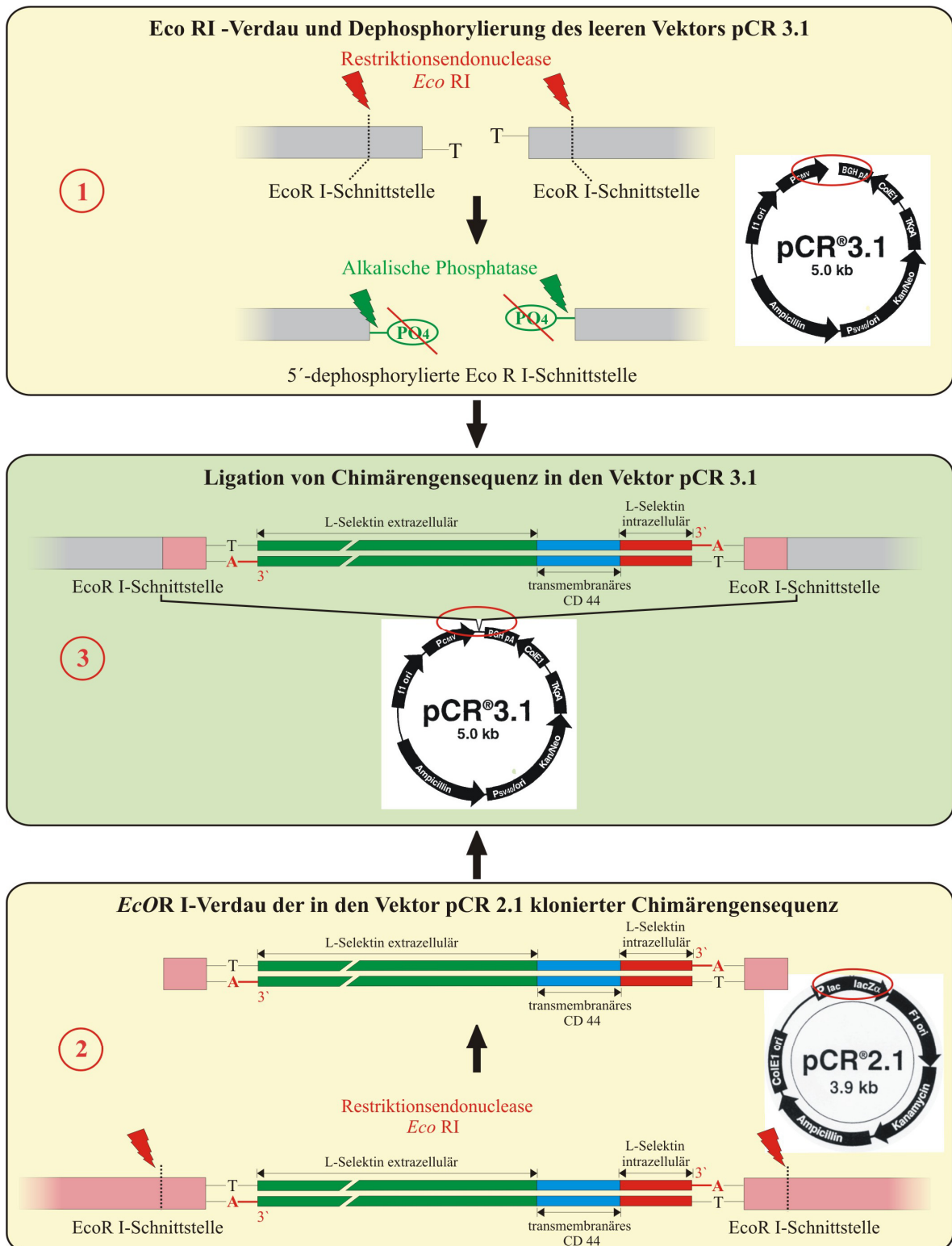


Abbildung 20: Übersicht über die Umklonierung des Fragmentes ABC vom Vektor 2.1 in den eukaryontischen Expressionsvektor pCR 3.1. Der leere eukaryontische Expressionsvektor pCR 3.1 wurde mit *EcoR I*-Restriktionsenzym geschnitten und anschließend mit Alkalischer Phosphatase behandelt (1). Der pCR 2.1-Klon der L-Selektin/tmCD44-Chimäre wurde ebenfalls *EcoR I*-geschnitten (2). Anschließend wurde das so geschnittene Chimäreninsert in den präparierten Vektor pCR 3.1 eingebracht (3).

Nach Transformation wurde die erfolgreiche Umklonierung zur Schnellanalyse mittels Kolonie-PCR überprüft. Durch Verwendung eines Vektorprimers (T7) in forward-Richtung und eines genspezifischen (internen) Primers (R 480) in reverse-Richtung kommt es nur bei Vorhandensein der chimären Gensequenz in korrekter Orientierung zur Amplifikation eines ca. 630 bp langen Fragmentes (siehe Abbildung 21). Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden positive Klone (PCR-Produkt „A“ in Abbildung 21) nochmals sequenziert, um die fehlerfreie Basenabfolge zu bestätigen.

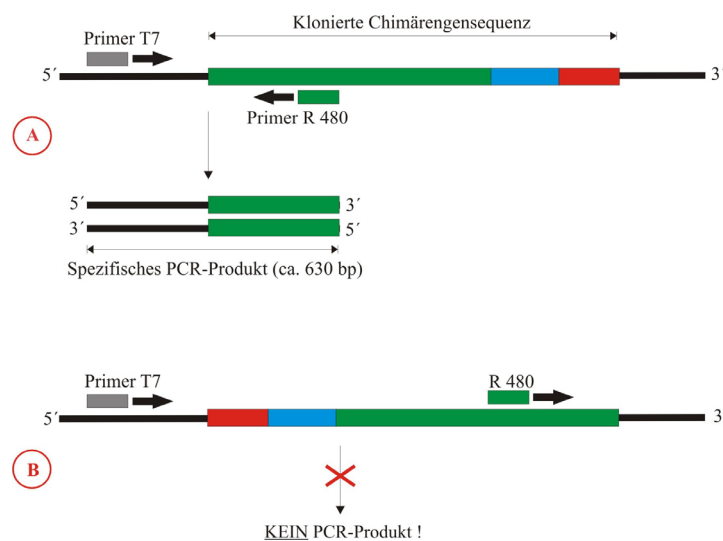


Abbildung 21: Prinzip der Kolonie-PCR. Einbringen des Inserts und Orientierung von diesem in den Vektor pCR 3.1 wurden durch Kolonie-PCR mit Einsatz eines innerhalb des Vektors paarenden Primers T7 (*forward*-Primer) und eines innerhalb der Gensequenz der extrazellulären L-Selektindomäne (grün) paarenden Primers R 480 (*reverse*-Primer) überprüft. Nur bei Klonen mit *forward*-Orientierung kommt es zur Amplifikation eines ca. 630 bp-PCR-Produkts (A). Bei *reverse*-Orientierung laufen beide Primer in die gleiche Orientierung, es wird kein PCR-Produkt amplifiziert (B).

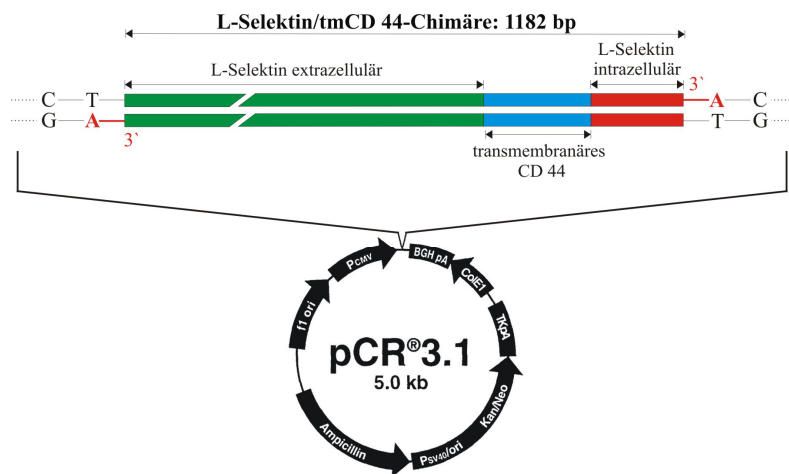


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Gensequenz der L-Selektin/tmCD44-Chimäre in korrekter *forward*-Orientierung im eukaryontischen Expressionsvektor pCR 3.1.

3.5 Transfektion von Nalm6-Zellen und K562-Zellen mit der L-Selektin/tmCD44-Chimäre

Mit dem L-Selektin/tmCD44-Genkonstrukt wurden sowohl Nalm6- als auch K562-Zellen transfiziert. Nalm6-Zellen entstammen einer humanen Prä-B-Zelllinie, sie besitzen keine Sheddingaktivität und sind deshalb nicht in der Lage, die Extrazellulärdomäne von L-Selektin von der Zelloberfläche abzuspalten. Demgegenüber besitzt die humane myeloische Leukämie-Zelllinie K562 eine hohe Proteaseaktivität. Durch die Etablierung beider Zelllinien eröffnen sich vielfältige experimentelle Einsatzmöglichkeiten zur Charakterisierung der L-Selektin/tmCD44-Chimäre.

Die Zellen wurden durch Elektroporation mit dem L-Selektin/tmCD44-Konstrukt transfiziert. Hierbei wird der Vektor immer nur von einem Teil der Zellen aufgenommen. Zur Diskriminierung zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen wurde dem verwendeten Kulturmedium das Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin (G 418) zugesetzt, für das der Vektor pCR 3.1 ein Resistenzgen besitzt. Hierdurch erfolgte die Selektion transfizierter Leukozyten.

Die transfizierten Zellen sind in Hinblick auf ihr Expressionsverhalten heterogen, d.h. nur ein Teil von ihnen exprimiert die L-Selektin/tmCD44-Chimäre in hoher Dichte auf ihrer Zelloberfläche. Um diese Subpopulation möglichst vollständig von den Zellen mit geringer Expressionsdichte zu separieren, wurden die Zellen nach Abschluß der Selektionsphase mehrfach durch Magnetpartikel angereichert. Das genaue Prinzip des Verfahrens ist im Kapitel „Materialien und Methoden“ ausführlich beschrieben. Kurz zusammengefasst werden magnetische Partikel mit Antikörpern gegen die Extrazellulärdomäne von L-Selektin gecoatet und mit transfizierten Nalm6- bzw. K562-Zellen inkubiert. Hochexprimierende Zellen binden die Magnetpartikel an ihrer Zelloberfläche in hoher Dichte und können dann in einem Magnetfeld von den übrigen Zellen separiert werden (siehe Abbildung 23).

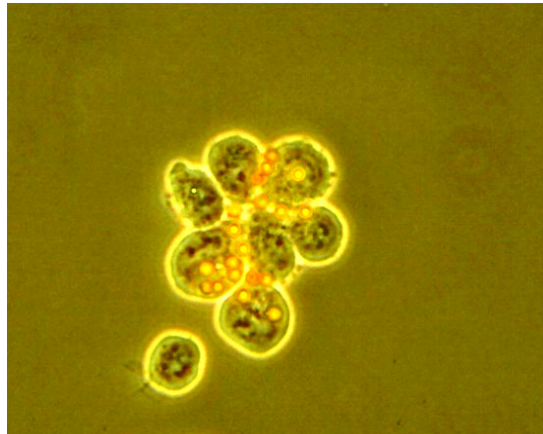


Abbildung 23: Magnetpartikelbesetzte L/tmCD44 exprimierende NALM 6-Zellen (Lichtmikroskopische Aufnahme; Vergrößerung x40). Mit Anti-L-Selektin-Antikörper gecoatete Magnetpartikel („Beads“, goldfarbene Kügelchen) binden an die Zelloberfläche L-Selektin/tmCD44-exprimierender Zellen und vernetzen die Zellen untereinander. Unten links eine nicht gecoatete Zelle.

Der Nachweis der Oberflächenexpression des L-Selektin/tmCD44-Proteins und dessen Expressionsstärke der angereicherten Zellen wurden mittels FACS-Analyse ermittelt (siehe Abbildung 24).

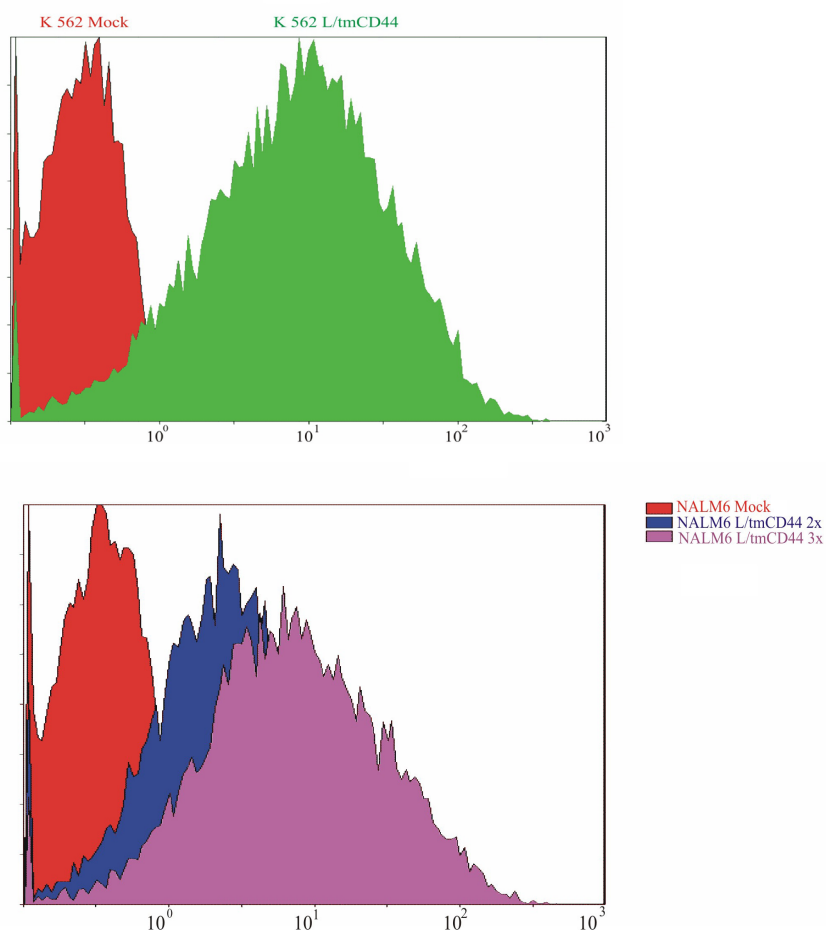


Abbildung 24: FACS-Analyse: Graphische Darstellung der Oberflächenexpressionsstärke der L/tmCD44-Chimäre auf K562 und Nalm6-Zellen. Oben: K562-Zellen (untransfiziert: *rot*; transfiziert: *grün*); Unten: Nalm6-Zellen (untransfiziert: *rot*; transfiziert und zweimalig angereichert: *blau*; dreimalig angereichert: *violett*)

3.6 Shedding der L-Selektin/tmCD44-Chimäre

Es ist nicht bekannt, welche Rolle die Transmembrandomäne von L-Selektin für das Shedding der Extrazellulärdomäne hat. Die Proteaseaktivität der K562-Zellen eröffnet die Möglichkeit, das Sheddingverhalten des L-Selektin/tmCD44-Proteins, d.h. bei fehlender originärer TMD zu untersuchen.

Um die erhaltene Fähigkeit zum Shedding zu zeigen, wurde mittels eines ELISA die Konzentration von sL-Selektin im Zellüberstand der transfizierten K562-Zellen gemessen. Im Mittel konnten 320 ng/ml sL-Selektin im Zellüberstand detektiert werden.

Somit zeigt die L-Selektin/tmCD44-Chimäre, zumindest qualitativ, erhaltenes konstitutives Shedding.

3.7 Nachweis des L-Selektin/tmCD44-Proteins mittels Western-Blot

Zusätzlich wurde das L-Selektin/tmCD44-Konstrukt auf Proteinebene mit Western-Blot-Analyse nachgewiesen (siehe Abbildung 25).

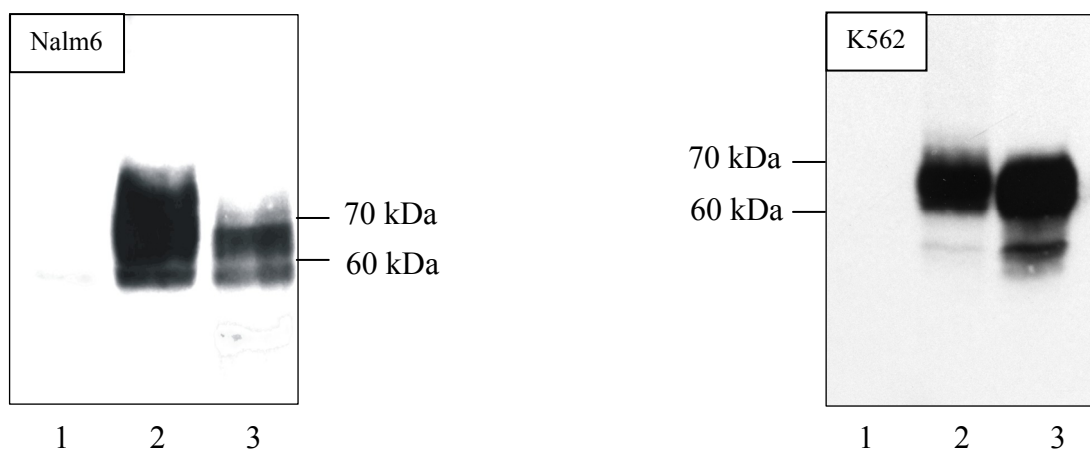


Abbildung 25: Western-Blot des L-Selektin/CD44-Proteins. Links: Western-Blot aus Nalm6-Zellen, Rechts: Western-Blot aus K562-Zellen. Spur 1: Untransfizierte Zellen (Negativkontrolle); Spur 2: Wildtyp-L-Selektin; Spur 3: L-Selektin/tmCD44-Chimäre. Aufgrund fast identischer Molekulargewichte zeigen L-Selektin und die Chimäre Banden auf gleicher Höhe (ca. 67 kDa). Durch die Negativkontrollen wurde das Vorhandensein von endogenem WT-L-Selektin in Nalm6- und K562-Zellen ausgeschlossen

Die jeweils mit dem Leervektor transfizierten Zellen (Abbildung 25; Spur 1) zeigen keine Bande zwischen 60 und 70 kDa, d.h. sie exprimieren *kein* endogenes L-Selektin. Demgegenüber zeigen mit der L-Selektin/tmCD44-Chimäre transfizierte Zellen (Abbildung 25; Spur 3) eine Bande auf Höhe des typischen Wildtyp-L-Selektin-Molekulargewichts (Abbildung 25; Spur 2).

Die jeweils unterhalb der Hauptbande erkennbare schmalere Bande stellt eine unreife, mit N-Glykanen des Oligomannosyltyps glykosylierte Vorläuferform des reifen Proteins dar.