

Facharbeit

aus dem Fach

Chemie

Thema: Nachweis von Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten
Oberflächenproteinen am Beispiel des Eisenstoffwechsel steuernden
Proteins Hämojuvelin

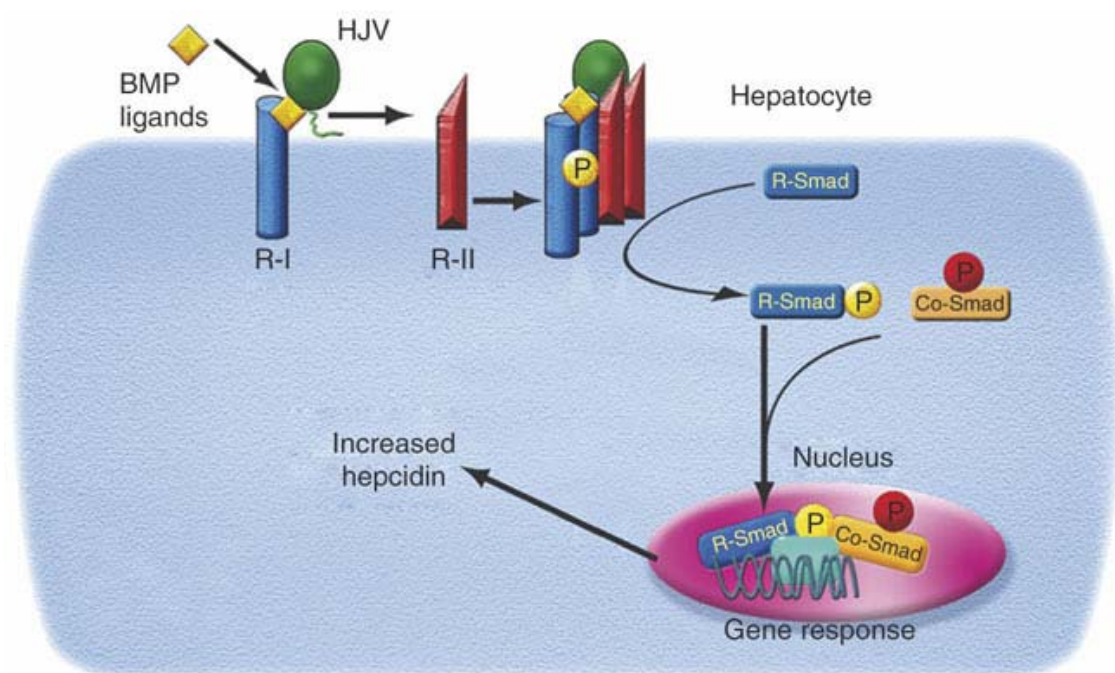
Verfasser: Norbert Wünsche
Leistungskurs: 3C1
Kursleiter: LAss K. Gallenberger
Abgabetermin: 25. Januar 2008

Erzielte Note : in Worten:
Erzielte Punkte: in Worten:

Abgabe beim Kollegstufenbetreuer am

.....
(Unterschrift des Kursleiters)

**Nachweis von
Glykosylphosphatidylinositol (GPI)
verankerten Oberflächenproteinen am
Beispiel des Eisenstoffwechsel steuernden
Proteins Hämojuvelin**



Facharbeit von Norbert Wünsche

Inhaltsverzeichnis

1	ZIELSETZUNG DER FACHARBEIT	- 3 -
2	DIE ROLLE DES EISENS BEI DER MENSCHLICHEN BLUTBILDUNG	- 3 -
2.1	Pathologie der Anämie und Hämochromatose	- 3 -
2.2	Der menschliche Eisenstoffwechsel	- 4 -
2.3	Wirkung von Hepcidin und Hämojuvelin (HJV)	- 8 -
2.4	Kuninger-Hypothese der Hämojuvelin-Zellverankerung	- 11 -
2.5	GPI-Verankerung von Proteinen und deren Spaltung durch Phospholipase C	- 12 -
3	MATERIAL UND METHODEN	- 14 -
3.1	Material	- 14 -
3.2	Methoden	- 14 -
3.2.1	Kultivierung der Zelllinie	- 14 -
3.2.2	Behandlung mit dem Enzym Phospholipase C (PLC)	- 15 -
3.2.3	Immunzytochemischer Nachweis von HJV mittels FACS- Messung	- 15 -
3.2.4	Biochemische Analyse des Proteins HJVs mittels Western Blot	- 18 -
4	AUSWERTUNGEN UND ERGEBNISSE	- 22 -
4.1	FACS- Analyse des Hämojuvelins	- 22 -
4.1.1	Nachweis des Hämojuvelins	- 22 -
4.1.2	Konzentrationswirkung der PLC bei der Abspaltung des HJVs	- 24 -
4.1.3	Zeiteinfluss bei der Abspaltung des HJVs durch PLC	- 25 -
4.2	Analyse des Hämojuvelins mittels Western Blot	- 26 -
5	DISKUSSION	- 28 -
6	LITERATURVERZEICHNIS	- 29 -
7	DANKSAGUNG	- 31 -
8	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	- 32 -
9	ANHANG	- 33 -

1 Zielsetzung der Facharbeit

Laut einer WHO-Studie beträgt die Anzahl der Menschen, die an einer Störung des Eisenstoffwechsels leiden, knapp zwei Milliarden. Die häufigste Ursache hierfür ist der Eisenmangel, aber auch Eisenüberladungen stellen ein Problem dar. Angesichts dieser erschreckenden Zahl wird deutlich, wie immanent wichtig Pharmaforschung im Bereich des Eisenstoffwechsels ist.

In meinem zweiwöchigen Praktikum bei der Firma Roche Diagnostics GmbH, durfte ich einen Einblick in die intensive Forschung an einem Eisenstoffwechsel steuernden Protein, namens Hämojuvelin, erhalten. Einige Studien zeigen, dass Mutationen dieses Proteins für verschiedene Krankheiten, die den Eisenhaushalt betreffen, verantwortlich sind. Außerdem wird angenommen, dass dieses Eiweiß mit einer Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Verankerung an der Zellmembran fixiert ist.

Ziel dieser Facharbeit war es, diese Verankerungshypothese durch die Spaltung mit dem Enzym Phospholipase C anhand von HEK-293-Zellen zu verifizieren, sowie die Hypothese zu überprüfen, dass dieses Protein auf der Zelloberfläche sowohl gespalten als auch ungespalten vorliegt. Hierzu wird zuerst auf das Problem der Anämie eingegangen, sowie der humane Eisenstoffwechsel näher erläutert. Danach wird die Rolle der Peptide Hämojuvelin und Heparin im Eisenhaushalt aufgezeigt, sowie die daraus resultierende Problemstellung geschildert, mit der sich der praktische Teil befasst. Hierfür bedarf es einer detaillierteren Charakterisierung des GPI-Ankers und seines Spaltenzyms, der Phospholipase C.

Anschließend werden die für das Praktikum notwendigen Materialien und Methoden aufgeführt und die erhaltenen Ergebnisse ausgewertet, um später im Diskussionsteil die verschiedenen Aussagen und ihre Bedeutungen hinsichtlich des Eisenstoffwechsels zu interpretieren.

2 Die Rolle des Eisens bei der menschlichen Blutbildung

2.1 Pathologie der Anämie und Hämochromatose

Die Krankheit Anämie ist als Abfall der Hämoglobinkonzentration oder Verminderung der Erythrozyten im peripheren Blut, also vereinfacht als Blutarmut definiert¹. Die häufigste Ursache der Anämie ist die mangelnde Versorgung mit Eisen durch eine unausgewogene Ernährung und kann folglich auch als Eisenmangelanämie bezeichnet werden. Da fast ein Drittel der Weltbevölkerung (knapp zwei Milliarden Menschen) an Eisenmangel leidet² und dieser als Hauptursache für eine auftretende Anämie gilt, kann die Anämie als eine der am häufigsten auftretenden Krankheiten der heutigen Zeit bezeichnet werden. Umso wichtiger erscheint es, Symptome, Ursachen und Folgen der Anämie aufzudecken. In Entwicklungsländern ist wegen der Nahrungsknappheit fast jeder Zweite vom Eisenmangel

¹ vgl. Beutel 2003, Seite 3

² vgl. Horn 2003, Seite 505

betroffen. Aufgrund einer unausgewogenen Ernährung sind es in den westlichen Industrieländern 10 % der Bevölkerung.

Erste Anzeichen des Eisenmangels sind eine blasse Haut und zunehmende Müdigkeit. Wird der Eisenmangel nicht rechtzeitig behandelt, kann es bei gleichzeitigem Schwinden der körpereigenen Eisenvorräte, zu deutlichen Beeinträchtigungen und Schädigungen des Körpers kommen. Das Immunsystem wird geschwächt, die Infektionsanfälligkeit nimmt zu. Für Schwangere und Neugeborene erhöht sich das Risiko körperlicher Schäden. Es häufen sich Fehlfunktionen des Magen- / Darmtraktes und im Hormonhaushalt, das Nervensystem wird negativ beeinflusst³.

Neben dem Fall der Anämie, bedingt durch Eisenmangel, kann es aber auch zu einer Störung des Eisenhaushaltes im Körper durch Eisenüberladung kommen. Dieser seltener auftretende Fall wird als Hämochromatose bezeichnet. Dabei verursacht ein genetischer Defekt eine unkontrollierte Eisenaufnahme mit der Nahrung. Die jugendliche Hämochromatose ist eine besonders schwere Form der Eisenüberladung, bei der schon im frühen Alter die vollen Ausmaße der Krankheit diagnostiziert werden können. Schwere Organschädigungen, die bis zum Tod führen können, sind die Folge, bei der besonders Leber, Herz und Bauchspeicheldrüse betroffen sind.

2.2 Der menschliche Eisenstoffwechsel

Das Element Eisen hat einen essenziellen Wert für die Vitalität eines Organismus. In zu großen Mengen wirkt es jedoch toxisch. Um das Gleichgewicht der „richtigen“ Eisenmenge im Körper aufrechtzuerhalten, entwickelten Organismen im Verlauf der Evolution ein sensibles System um diese Gratwanderung zu meistern. Störfaktoren in diesem empfindlichen Eisenhaushalt können zu Krankheiten führen.

Wirkung	Wirkungsort
O ₂ -Transport	Hämgruppe des Hämoglobins
	Hämgruppe des Myoglobins
	O ₂ -Rezeptoren des zentralen Nervensystems
Elektronentransport	Cytochrom der Atmungskette
Regulierung der DNA-Synthese	Zellkern
Cofaktor in Enzymen	Katalasen, Peroxidasen
Vermehrung der T-Zellen	Lymphozyten
Regulation des Insulins	Pankreas

Tab. 1: Funktionen des Eisens im menschlichen Körper⁴

³ vgl. Huch 2006, Seite 6-9

⁴ vgl. Huch 2006, Seite 14-16

Eisen spielt eine zentrale Rolle im Körper (siehe Tab.1), da es nicht nur in der Lage ist, feste, koordinative Bindungen mit Proteinen einzugehen, sondern durch seine verschiedenen Oxidationsstufen (Fe^{2+} , Fe^{3+}) auch biochemisch sehr wirksam ist⁵.

Da 75 % des Gesamtkörpereisens im Hämoglobin und weitere 5 % im Myoglobin gebunden sind, wird deutlich, dass die Kernaufgabe des Eisens im Sauerstofftransport liegt. Das Häm enthält ein zentrales, zweiwertiges Eisenatom, das von einem Protoporphyrinring (1,3,5,8-tetramethyl-2,4-divinyl-6,7-dipropionsäureporphyrin) umgeben ist. Die Stickstoffatome zweier Pyrrolringe, sind an die beiden Valenzen des Eisens innerhalb des Protoporphyrinrings gebunden. Ein Histidinrest besetzt die fünfte Koordinationsstelle und molekularer Sauerstoff kann an die sechste Stelle reversibel binden. Hämoglobin setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, die je aus einer Polypeptidkette und einer Häm-Gruppe bestehen (siehe Abb. 1). Jeweils zwei der vier Untereinheiten sind identisch. Bei diesem tetrameren Aufbau werden sie mit α und β bezeichnet ($\alpha_2\beta_2$)⁶.

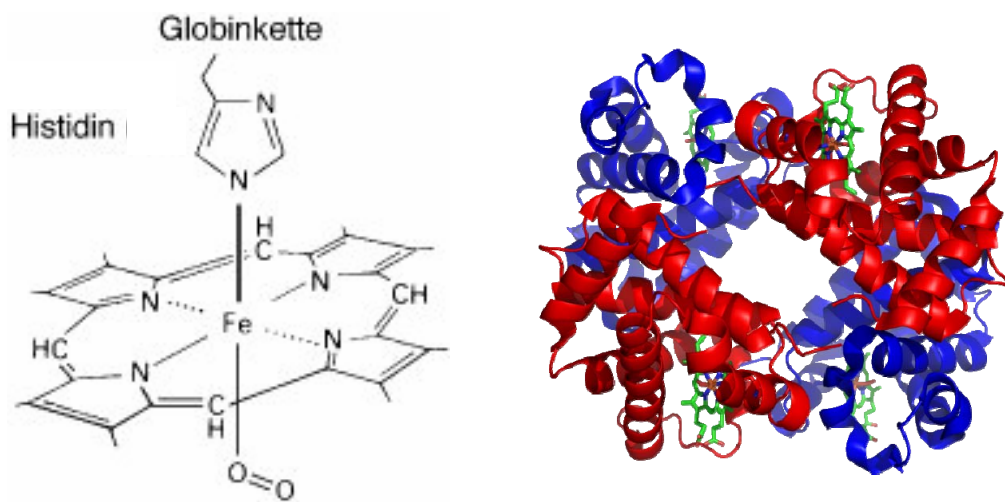


Abb. 1: Strukturformel einer Hämoglobin Untereinheit⁷ und Proteinstruktur des Hämoglobins⁸

Hämoglobin ist der Hauptbestandteil der Erythrozyten. Der Häm-Komplex ist rot und für die charakteristische Farbe des Hämoglobins in den Erythrozyten verantwortlich. Während das Hämoglobin für den Sauerstofftransport im Blut zuständig ist, versorgt das Myoglobin das Muskelgewebe mit genügend Sauerstoff für die Zellatmung in den Myelfasern.

Die nachfolgende Grafik (siehe Abb. 2) verdeutlicht, dass durch natürliche Apoptose (Absterben) der Erythrozyten ca. 20-25 mg Eisen pro Tag für eine Neusynthese der roten Blutkörperchen zum Ausgleich bereitgestellt werden müssen. Der Körper erneuert ca. $2 \cdot 10^{11}$ Erythrozyten am Tag, d. h. etwa 2.000.000 pro Sekunde.

⁵ vgl. Horn 2003, Seite 505-511

⁶ vgl. Vollhardt 2000, Seite 1315f

⁷ vgl. Penzlin 2005, Seite 287

⁸ <http://www.answers.com/topic/metabolism-19>

Nur ein kleiner Bruchteil von 1-2 mg wird über die Nahrung bereitgestellt, der Hauptanteil des benötigten Eisens wird aus der Wiederaufbereitung des Häm-Eisens aus den gealterten Erythrozyten gewonnen, welche von den Fresszellen, den Makrophagen, aufgenommen werden⁹.

Bei einem gesunden Erwachsenen beträgt der Gesamtkörperbestand an Eisen 3-5 g. Das zentrale Speicherprotein des Eisenstoffwechsels ist das Ferritin. Dieser Proteinkomplex kann auf-

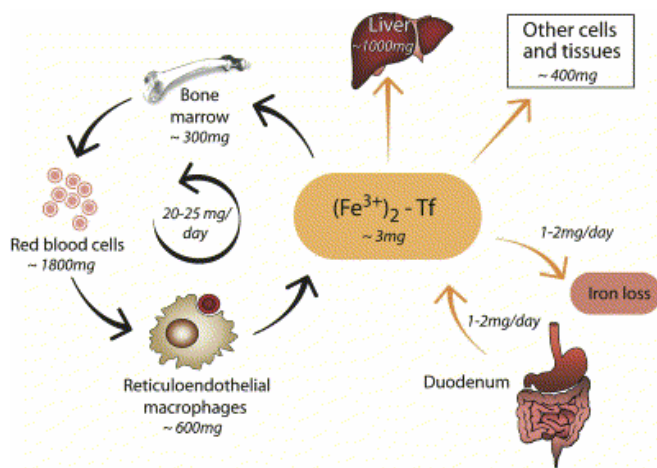


Abb. 2: Eisenverteilung im menschlichen Körper¹⁰

grund der Tertiärstruktur bis zu 4500 Eisen(III)-Ionen in seinem Kern binden, so dass das gespeicherte Eisen 25 % des Gesamtgewichtes beträgt. Mit der Abschürfung der Darmepithelzellen (Enterozyten), der sogenannten Desquamation, dem Absterben von Hautzellen, sowie der Ausscheidung

von Galle, Schweiß und Urin werden täglich etwa 1-2 mg Eisen aus dem Körper ausgestoßen. Dieser Verlust ist demzufolge die Mindestmenge, die täglich mit der Nahrung aufgenommen werden muss um einen Eisenmangel zu vermeiden¹¹.

Die Eisenresorption erfolgt in den ersten Abschnitten des Duodenums. Das Häm gebundene Eisen im Fleisch und Fisch kann über Häm-Rezeptoren der Enterozyten, gut in den Intrazellulärbereich gelangen, in dem das Eisen über einen Häm-Abbau mittels Häm-Oxygenase gewonnen wird. Der größte Teil des Eisens in der Nahrung befindet sich aber in seiner oxidierten Form Fe^{3+} , die nicht durch die Epithelmembran diffundiert. Zur Aufnahme muss das Enzym Ferrireduktase (**Duodenal cytochrome b, Dcytb**) Eisen in seine reduzierte Form überführen (Fe^{2+}). Das so reduzierte Ion gelangt mittels **DMT-1 (divalent metal transporter 1)** in das Enterozyt. Durch eine vitaminreiche (v. a. Vitamin C) und SH-gruppenhaltige Ernährung (z. B. in der Aminosäure Cystein), wird die Wirkung der Ferrireduktase unterstützt und somit die Absorptionsrate des Eisens erhöht. Da sich das Eisen aus den Häm-Gruppen des Muskelfleisches und Fisches leichter resorbieren lässt als das oxidierte Eisen in den Pflanzen, müssen sich Vegetarier und Veganer mit möglichst eisenreichen Pflanzen (z. B. Soja, Vollkorngetreide, Reis etc.) versorgen.

⁹ vgl. Huch 2006, Seite 18

¹⁰ vgl. Hentze 2004, Seite 290

¹¹ vgl. Horn 2003, Seite 506

Nachdem das Eisen in die Epithelzelle des Duodenums gelangt ist, kann es entweder im Enterozyt gespeichert oder direkt an das Blut abgegeben werden. In der Zelle wird das Eisen im Ferritin gespeichert, wobei das potenziell toxische Eisen(II)-Ion als Eisenoxid (Fe_2O_3) oder Eisenphosphat (FePO_4) in seine dreiwertige, stabile Oxidationsstufe übergeführt wird. Bei Bedarf kann das gespeicherte Element wieder freigesetzt werden. Ist der Eisengehalt im Körper gesättigt, so wird das Eisen zusammen mit der Epithelzelle durch die physische Desquamation des Dünndarms in den Verdauungstrakt ausgeschieden¹².

Durch diesen Vorgang wird die Eisenhomeostase (Eisengleichgewicht) aufrechterhalten und eine Eisenüberladung vermieden, da kein spezielles Organ für die Ausscheidung von Eisen existiert. Der Eisenhaushalt wird nur über die Resorption gesteuert. Soll das Eisen direkt in den peripheren Blutkreislauf übergehen, wird es mittels des Eisentransporters Ferroportin aus der Zelle ausgeschleust. An der Außenmembran angelangt, wird das Eisen(II)-Ion mit den Ferroxidasen Hephästien und Ceruloplasmin zu Fe^{3+} oxidiert, an Transferrin (Tf) gebunden und in den Blutkreislauf gebracht (siehe Abb. 3).

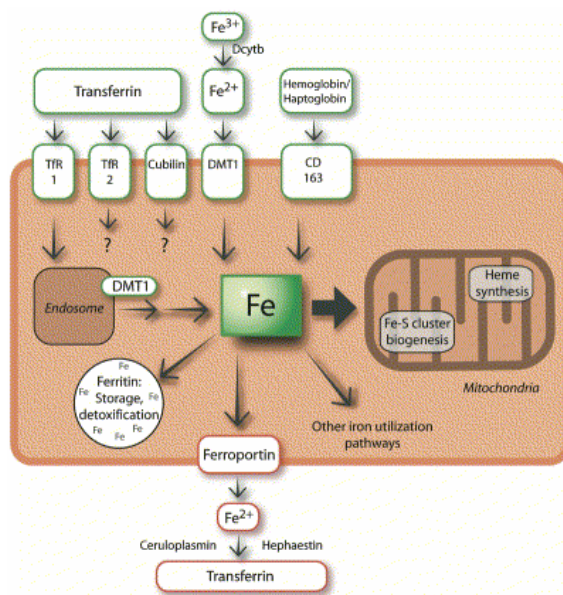
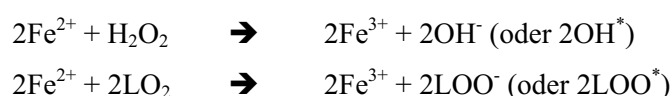


Abb. 3: Weg des Eisens vom Dünndarm (Fe^{3+}) in den Blutkreislauf (Transferrin)¹³

Im Blut werden jeweils zwei Fe^{3+} -Ionen an das glykolisierte Transportprotein Transferrin gebunden. Mit einem Molekulargewicht von 80 kDa (kilo Dalton $\pm$ 1000 u) wird dieses Plasmaprotein von der Niere nicht ausgeschieden, so dass es zu keinem Verlust des gebundenen Eisens kommen kann. Da freies Eisen hochtoxisch wirkt, hat der Körper einen breiten Pufferbereich für die Eisenaufnahme im Blut durch Transferrin eingerichtet. Im Normalfall sind nur 30 % der Transferrinmoleküle mit Eisen gesättigt¹⁴.

Bei einer Transferrinsättigung von über 100 % treten freie Ionen im Blut auf. Das Eisen(II)-Ion reagiert so mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Lipidperoxiden (LO_2), um zur stabileren dreiwertigen Form zu gelangen:



¹² vgl. Horn 2003, Seite 506-509

¹³ vgl. Hentze 2004, Seite 286

¹⁴ vgl. Ganz 2007, Seite 395-396

Die freien alkalischen Ionen, sowie die entstehenden Radikale sind chemisch höchst aktiv und schädigen die Lipidmembranen, Proteine und Nukleinsäuren, schwere Organnekrosen sind die Folge¹⁵.

Auf jeder Zelle befinden sich Transferrinrezeptoren (TfR), an die das mit Eisen gesättigte Transferrin bindet (siehe Abb. 4). Der Hauptabnehmer des mit Eisen beladenen Transferrins ist mit ca. 75 % das Knochenmark, da hier die eisenverbrauchende Erythropoese stattfindet. Bei Annäherung des Transferrins an seinen Rezeptor wird eine Ligand-Rezeptorbindung ausgelöst und beide Moleküle über Endozytose in den intrazellulären Bereich transportiert. Eine Protonenpumpe löst die beiden gebundenen Fe^{3+} -Ionen vom Transferrin und sowohl das freie Transferrin als auch sein Rezeptor werden an die Oberfläche zurückgeführt. Die Eisen-Ionen werden über den DMT-1 in das Zytosol aufgenommen.

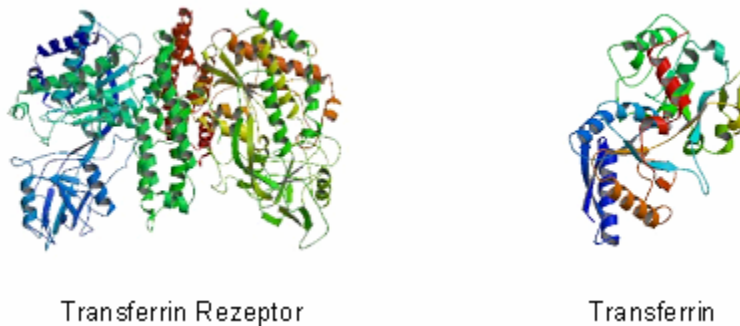


Abb. 4: Kristallstruktur des humanen Transferrins und Transferrinrezeptors¹⁶

Der Transport ist damit abgeschlossen und das Eisen kann so für verschiedene Zellvorgänge eingesetzt werden¹⁷.

Nach einer durchschnittlichen Lebenszeit von 120 Tagen werden gealterte Erythrozyten in einem mononuklearen Phagozytensystem, in der Milz, abgebaut, das enthaltene Eisen damit recycelt. Die konstante Anzahl der Erythrozyten im Blut (ca. $4\text{-}6 \cdot 10^{12}$ Zellen/l Blut) wird durch eine kontinuierliche Erneuerung der gealterten, roten Blutkörperchen erreicht.

Der Hauptwachstumsfaktor bei der Entwicklung von Erythrozyten aus Stammzellen (Erythropoese) ist das Hormon Erythropoetin (EPO). Die Erythropoese kann aber nur dann stattfinden, wenn Eisen, sowie Folsäure und Vitamin B12, im erforderlichen Maß vorhanden sind¹⁸.

2.3 Wirkung von Hepcidin und Hämojuvelin (HJV)

Besteht ein erhöhter Eisenbedarf im Körper, so kann das im Ferritin gespeicherte Eisen mobilisiert, und in den Blutkreislauf übergeführt werden. Falls der Eisenspiegel hoch genug ist, wird

¹⁵ vgl. Hentze 2004, Seite 285

¹⁶ <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2NSU>

¹⁷ vgl. Horn 2003, Seite 507f

¹⁸ vgl. Huch 2006, Seite 18

das gespeicherte Eisen automatisch durch die natürliche Desquamation der Enterozyten nach 2-3 Tagen in den Verdauungstrakt abgegeben. Da Enterozyten nicht im direkten Kontakt zum Blut stehen, stellt sich die Frage, wie die Information über den Eisenbedarf im Körper diesen Epithelzellen übertragen wird. Eine effiziente Art der Informationsübertragung erfolgt über Signalmoleküle, die sich sofort und im erforderlichen Maße veränderten Umwelteinflüssen anpassen können¹⁹.

Das zentrale eisenregulierende Hormon ist ein Peptid bestehend aus 25 Aminosäuren mit vier Disulfidbrücken, namens Hepcidin (siehe Abb. 5), das in den Hepatozyten der Leber

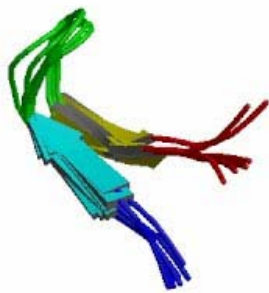


Abb. 5: Hepcidinstruktur²⁰

synthetisiert wird. Seit seiner Entdeckung wurde nachgewiesen, dass das Hepcidin (auch HAMP oder LEAP genannt) für die Homeostase des Eisens eine essenzielle Bedeutung hat. Dieses Hormon reguliert die Eisenvorräte in der Leber, die Absorption in den Darmzellen, sowie die Wiederaufbereitung des Eisens in den Makrophagen. Hepcidin ist ein negativer Regulator der Eisenaufnahme. Bei einer Eisenüberladung oder Entzündung wird es stark exprimiert, bei Anämien, Hypoxien und Eisenverlusten wird seine Synthese gehemmt. Folglich führt das Fehlen

dieses Peptids aufgrund eines genetischen Defekts zu einer besonders schweren Form der Eisenüberladung, der jugendlichen Hämochromatose.

Hepcidin zeigt seine Wirkung, indem es an das intrazelluläre Eisentransportprotein Ferroportin bindet und seine Internalisierung, sowie seine Degradation verursacht. Durch diesen Abbau von Ferroportin können keine Eisen-Ionen aus den Enterozyten und Makrophagen in den Blutkreislauf transferiert werden. Das Transportmolekül Ferroportin ist einzigartig, d. h. es gibt kein anderes Molekül, das seine Aufgabe übernehmen kann. Wird ein Großteil dieser Transportmoleküle durch die Wirkung des Hepcidins ausgeschaltet, kommt es folglich zu einer schweren Anämie. Falls dagegen die Ferroportinmoleküle aufgrund eines geringen Hepcidinspiegels unkontrolliert Eisen in den Blutkreislauf abgeben, kann somit eine schwere Eisenüberladung die Folge sein²¹ (siehe Abb. 6).

Die Einzigartigkeit und immanente Bedeutung dieses kleinen Peptids für eine adäquate Eisenkonzentration im Körper wird somit ersichtlich. Der Grund für eine Hämochromatose kann in einer Mutation von fünf verschiedenen Genen - Mutationen im HFE, Transferrinrezeptor 2 (TfR 2), HFE2 (Hämojuvelin, HJV, RGMc), HAMP (Hepcidin) und im Ferroportin-Gen - liegen. Phänotypisch zeigen alle Mutationen einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie die

¹⁹ vgl. Huch 2006, Seite 16f

²⁰ <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1M4E>

²¹ vgl. Ganz 2007, Seite 395-398

Hämochromatose, d. h. bei allen Veränderungen ist die Wirksamkeit von Hepcidin eingeschränkt. Da die jugendliche, schwere Verlaufsform jedoch nur bei Mutationen im Hepcidin- oder Hämojuvelin-Gen auftritt, nimmt man an, dass diese beiden Moleküle mit die wichtigsten Schalter in der Regulation der zellulären Eisenfreisetzung sind.

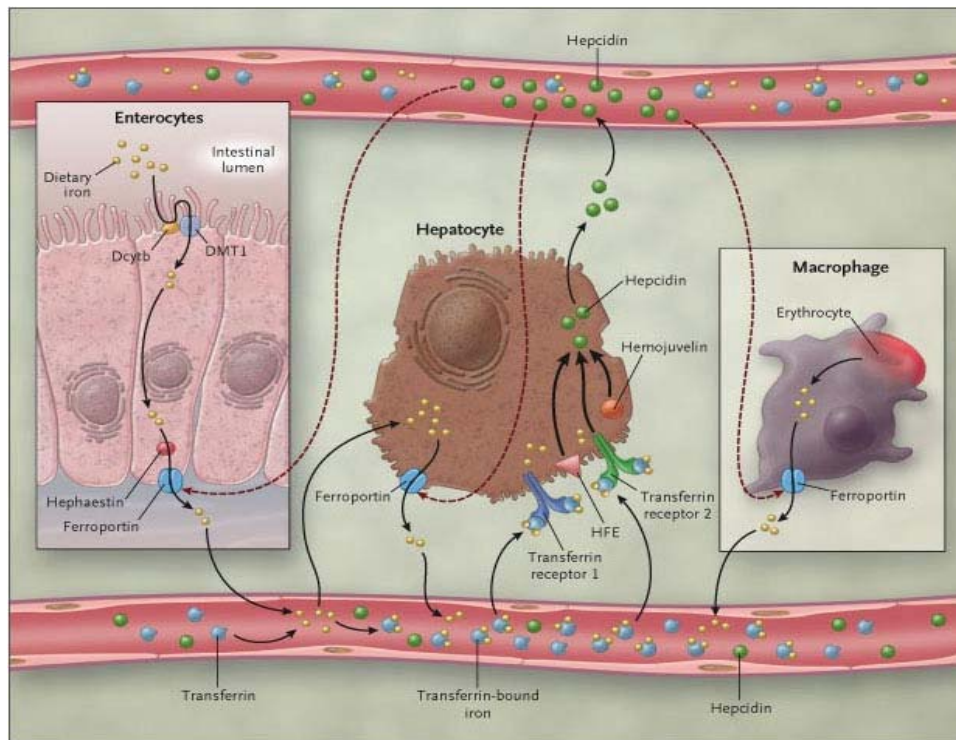


Abb. 6: Funktionsweise des Hepcidins²²

Das Protein Hämojuvelin (HJV), das durch das Gen HFE2 kodiert wird, bildet zusammen mit **BMPs** (**b**one **m**orphogenetic **p**rotein) einen Signalweg zur Expression des Hepcidins. BMPs sind Mitglieder der **TGF- β** -Liganden Superfamilie (**t**ransforming **g**rowth **f**actor- **β**) und spielen eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung (z. B. Zellproliferation, Zellwachstum). Sie reagieren, indem sie jeweils zwei Komplexe des **BMP-Rezeptors I** und **II** (**BMPR-I** und **BMPR-II**) verbinden und die Phosphorylierung des BMPR-I durch den BMPR-II induzieren. Dieser aktivierte Komplex phosphoryliert wiederum eine Einheit aus Smad-Proteinen (Smad 1, 5 und 8). Die vom Rezeptor aktivierten Smad-Proteine bilden anschließend einen heteromeren Komplex mit Smad 4 und diffundieren in den Nukleus, wo sie die Transkription des Zielgens bewirken. Den ersten Hinweis, dass Hämojuvelin über diesen Signalweg die Hepcidinsynthese steuert, ergaben die Studien von Babitt et al. Sie zeigten, dass Hämojuvelin sowohl mit BMP2 als auch mit BMP4 interagieren kann und deren Signal verstärkt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Signalkaskade über den oben beschriebenen klassischen Smad-Signalweg abläuft. Als Corezeptor verstärkt Hämojuvelin folglich den BMP-Signalweg und sorgt für eine stärkere Hepcidin-Expression. Hämojuvelin ist daher ein positiver Regulator

²² http://www.hoti-berlin.de/vortraege/10-11-2006_V02-Kettritz.pdf

des Hepcidins. Vor kurzem wurde beschrieben, dass auch Entzündungsfaktoren wie Interleukin-6 (IL-6) die Synthese des Hepcidins steigern²³. Abbildung 7 zeigt den Signalweg der Rezeptormoleküle, welcher zur Expression des Hepcidins führt.

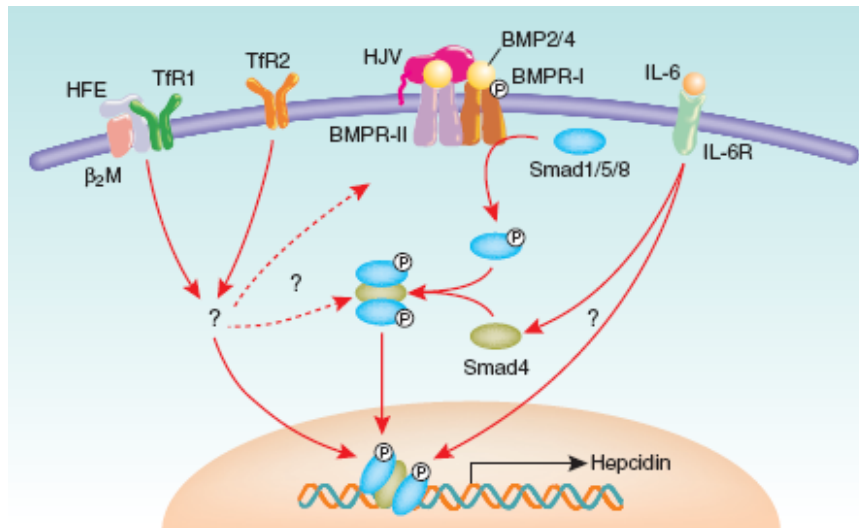


Abb. 7: Signalkaskade der Rezeptoren: HJV, TfR1, TfR2, HFE, IL-6²⁴

2.4 Kuninger-Hypothese der Hämojuvelin-Zellverankerung

David Kuninger untersuchte das Protein Hämojuvelin mittels Skelettmuskelzellen. Die Myoblasten synthetisieren zwei wichtige, verschiedene Formen von Hämojuvelin-Molekülen aus einer einzigen mRNA, welche sich nur durch eine Spaltstelle unterscheiden. Beide Moleküle werden zur Oberfläche gebracht, nachdem ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker bei der Prozessierung addiert wurde.

Hämojuvelin der vollen Länge ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von circa 50 kDa. Die gespaltene Isoform ist ein Peptid mit einem C-terminalen (20 kDa) und einem N-terminalen (35 kDa) Teil, die durch Disulfidbrücken zwischen den Molekülketten zusammengehalten werden (siehe Abb. 8). Beide Formen des RGMc sind an drei offenen Stellen glykolysiert. Die Art und Weise, sowie der Ort der Trennung beider Formen sind noch unbekannt. Man vermutet jedoch, dass der Prozess schon während der Proteinbiosynthese stattfindet. Da die geteilte Form häufiger vorkommt, ist dessen Spaltenzym vermutlich in großen Mengen vorhanden. Das ganze Molekül hat einen intakten N-Terminus und tritt in zwei Variationen auf, die sich nur in der Anzahl der asparagingebundenen Glykolysierungsstellen unterscheiden. Die spezielle Rolle des Hämojuvelins in der Muskelzelle ist noch unbekannt, da das Molekül die Proliferation und das Wachstum der Myoblasten weder positiv noch negativ beeinflusst. Hingegen ist der Einfluss des Hämojuvelins auf die Hepcidinsynthese erforscht²⁵.

²³ vgl. Anderson 2006, Seite 503f

²⁴ vgl. Anderson 2006, Seite 503

²⁵ vgl. Kuninger 2006, Seite 3273-3281

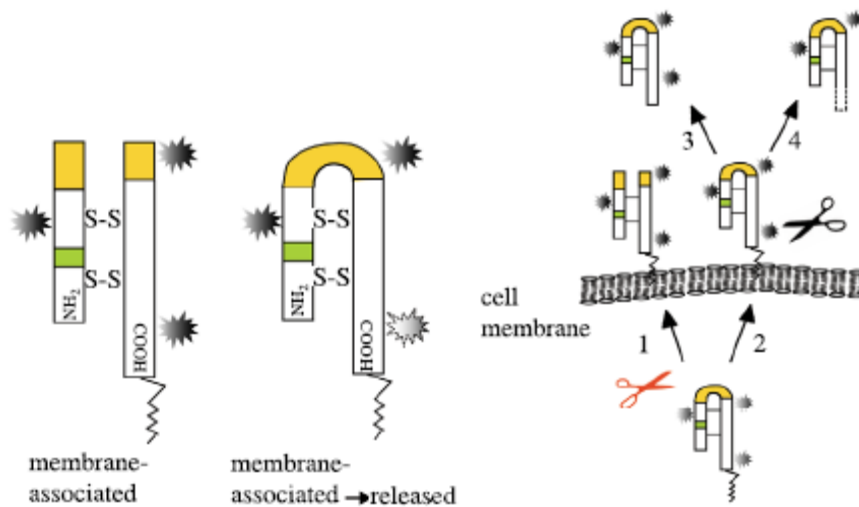


Abb. 8: Verschiedene Isoformen des Hämojuvelins und Behandlung mit einem Spaltenzym²⁶

2.5 GPI-Verankerung von Proteinen und deren Spaltung durch Phospholipase C

Die meisten Oberflächenproteine sind über hydrophobe Wechselwirkungen in der Membran verankert. Immer mehr Proteine werden entdeckt (so auch das Hämojuvelin), die über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden sind. Diese **Glykosylphosphatidylinositol (GPI)**-Verankerung besteht aus drei Teilen, zum einen aus einer Lipidverankerung zur hydrophoben Zellmembran, dem Myo-Inositol-1-Phosphat und der Mehrfachzuckerkette (Oligosaccharidkette). Gegenüber der „klassischen“ hydrophoben Polypeptidverankerung hat diese Form den Vorteil, dass sich das Protein leicht abspalten oder fixieren lässt, Proteine schnell an die Zelloberfläche gebunden oder an die extrazelluläre Flüssigkeit abgegeben werden können. Weitere Beispiele für GPI-verankerte Proteine sind Acetylcholinesterasen, Hydrolasen, sowie verschiedene Tumormarker. Unterschiedliche Phospholipasen können diesen GPI-Anker spalten und so das Protein von der Zellmembran lösen. In meiner Facharbeit spielt die Phospholipase C bei dieser Spaltung die entscheidende Rolle. Die GPI-Bindung und die Spaltstelle des Enzyms werden in der folgenden Grafik (siehe Abb. 9) aufgezeigt.

Der Carboxy-Terminus (C-Terminus) des GPI-verankerten Proteins bildet eine Amidbindung zu Ethanolamin, welches über ein Phosphat mit einem Glykan-Ring aus drei linear verbundenen Mannose-Ringen (Man) verbunden ist und zum Glukosamin (GlcN) übergeht, welches mit der Hydroxyl-Gruppe am C₆-Atom des Myoinositol des Phosphatidylinositols gebunden ist.

²⁶ vgl. Kuninger 2006, Seite 3280

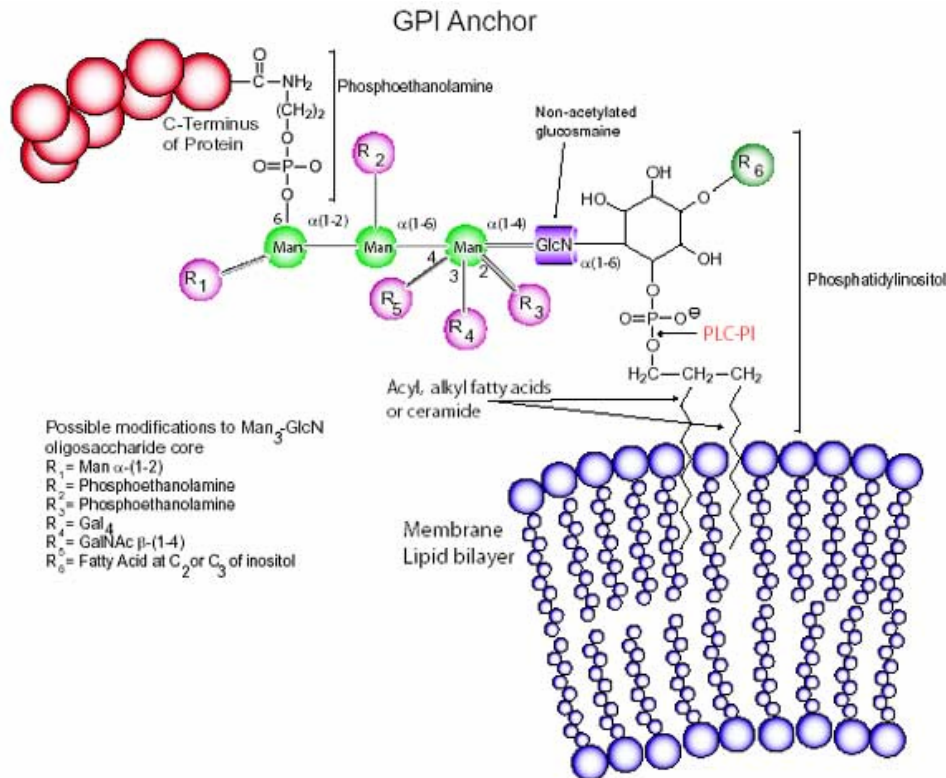


Abb. 9: GPI-Verankerung und Spaltung durch Phospholipase C²⁷

Das dargestellte Lipid ist ein 1-alkyl-2-acylglycerol. Die meisten GPI-Anker haben zusätzliche Verzweigungsreste im Glykan-Ring²⁸. Die Wirkungsstelle des Spaltungsenzyms Phospholipase C (PLC) ist mit einem Pfeil markiert (Phosphatgruppe des Phosphatidylinositols)²⁹.

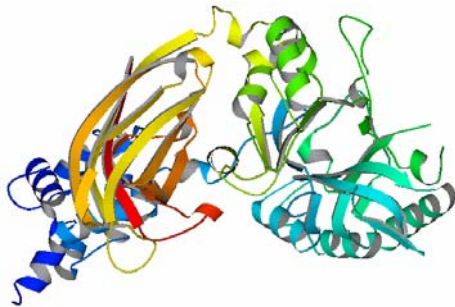


Abb.10: Struktur der Phospholipase C³⁰

Wie bereits erwähnt, stellte David Kuninger die Hypothese auf, dass Hämöjuvelin GPI-verankert ist und sowohl gespalten als auch ungespalten auf der Zellmembran von Muskelzellen vorkommt. Im Zuge dieser Facharbeit soll aufgeklärt werden, ob sich diese Tatsachen auch auf andere

eisenspeichernde Zellen übertragen lassen. Als Prüfmodell wurden HEK-293-Zellen verwendet, welche künstlich das Hämöjuvelin-Molekül exprimieren. Für diesen praktischen Teil der Facharbeit spielen der GPI-Anker, sowie das Enzym Phospholipase C (siehe Abb. 10) eine entscheidende Bedeutung.

²⁷ http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Proteomics_and_Protein_Expr_/Proteomics/Post_Translation_Modif_/Glycosylation/Structures___Symbols/GPI_Anchor_Structure.html

²⁸ vgl. Stryer 2003, Seite 364

²⁹ vgl. Heinz W. 1996, Seite 9496f

³⁰ <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1dix.html>

3 Material und Methoden

3.1 Material

Eine Auflistung der verwendeten Materialien befindet sich im Anhang (siehe 9)

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der Zelllinie

Für die nachfolgenden Experimente wurde die **HEK-293**-Zelllinie (**h**uman **e**mbyronic **k**idney cells **293**; menschliche, embryonale Nierenzelle) ausgewählt. Um mögliche Unterschiede zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Klone dieser Zelllinie, der HEK-293-Clone-4 und der HEK-293-Myc-Clone-16 verwendet. Diese Zellen exprimieren in einem hohen Maß das Oberflächenprotein Hämojuvelin unter *in-vitro*-Bedingungen.

Unter optimalen Wachstumsbedingungen wurden die Zellen in 50 ml standardisiertem Nährmedium, DMEM mit 10 % FKS (fötales Kälberserum) bei 37°C, 7 % CO₂-Begasung und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank in einer T175 Flasche kultiviert. Die Zellen müssen regelmäßig passagiert, d. h. ein Teil der Zellen in eine andere Zellkulturflasche transferiert werden, um eine optimale Vitalität bei einer idealen Zelldichte zu gewährleisten.

Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium der adhären Zellen abpipettiert und 5 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben. Das Trypsin bewirkt, dass die extrazellulären Proteinbindungen an der Oberfläche des Zellkulturgefäßes gespalten werden, und so die gelösten Zellen in Suspension übergehen. Nach 5-10 min im Brutschrank wurde die Reaktion durch Zugabe von 8 ml frischen Nährmedium (DMEM) gestoppt, da eine längere Behandlung zur Schädigung der Zellen führt. Die Zellen waren im Medium gelöst, aber zu Zellaggregaten unterschiedlicher Größe verklumpt. Mithilfe einer Pipette wurden die Zellen am Flaschenboden durch das Resuspendieren vereinzelt.

Da die Experimente in einer bestimmten Zellkonzentration ablaufen, wird eine Zellzählung der geernteten Zellen notwendig. Diese erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Dazu musste jedoch die Vitalität der enthaltenen Zellen mithilfe einer Färbung mit Trypanblau bestimmt werden. Die Zellen wurden mit diesem Farbstoff 1:1 verdünnt und anschließend in der Zählkammer unter dem Lichtmikroskop untersucht. Trypanblau kann nur durch die perforierte Membran abgestorbener Zellen eindringen, so dass nur nicht gefärbte, lebende Zellen bei der Zählung berücksichtigt werden. Der Mittelwert der Zellen aus vier untersuchten, großen Quadranten wird mit dem Verdünnungsfaktor, sowie dem Kammerfaktor multipliziert.

$Z \text{ (Zellzahl)} = M \text{ (Mittelwert)} * 0,5 \text{ (Verdünnung 1:1)} * 10^4 \text{ (Kammerfaktor)}$

Die bestimmte Zellzahl der vorbereiteten Zellsuspension betrug $2,83 * 10^6$ Zellen/ml. Für nachfolgende Versuche wurde eine Zellkonzentration von $5 * 10^5$ Zellen/ml präpariert.

3.2.2 Behandlung mit dem Enzym Phospholipase C (PLC)

Die Wirkung der Phospholipase C auf das Oberflächenprotein Hämojuvelin wurde mittels FACS-Analyse, sowie dem Western Blot-Verfahren überprüft. Dazu mussten die zu untersuchenden Zellen mit der Phospholipase C behandelt werden.

Für die FACS-Analyse soll die Wirksamkeit der Phospholipase C (PLC) auf die Zelllinie HEK-293-Myc-Clone-16 durch eine Variation der Parameter Konzentration und Inkubationszeit festgestellt werden. Laut Herstellerangaben besitzt die Stammlösung der Phospholipase eine Aktivität von 0,1 U/ μ l (Unit; 1 U: Enzymmenge, die unter Standardbedingungen ein μ mol Substrat pro min umsetzt). In der Testreihe wurde das Enzym mit Aktivitätswerten von 3 U/ml, 10 U/ml und 30 U/ml untersucht.

Für den Versuch wurden fünf Probengefäße bereitgestellt. In jedes dieser Proben wurde 1 ml der vorher geernteten Zellen pipettiert. Danach wurden die Röhrchen bei 300 g (300-fache Erdbeschleunigung) 5 min zentrifugiert und anschließend jeweils das Medium abgesaugt, so dass nur das Zellpellet im Gefäß übrig blieb. Die Zellen von zwei der fünf Probengefäße, sie sind die späteren Positiv- und Negativkontrollen, wurden in 100 μ l Medium RPMI ohne FKS resuspendiert. Die Suspension der restlichen Zellproben bestand aus 100 μ l eines Gemisches aus dem RPMI Medium ohne FKS und aus der Phospholipase C, entsprechend ihrer Aktivität. Danach wurden die Proben für 1 h bei 37°C in den Brutschrank gestellt, so dass die Phospholipase ihre maximale Aktivität entfalten konnte.

Bei der Variation der Zeit wurde der gleiche Versuch bei einer konstanten Aktivität von 10 U/ml viermal durchgeführt. Nur die Inkubationszeit des Enzyms der vier Probenreihen variierte (30 min, 1 h, 2 h, 4 h).

Für den Western Blot wurden die besten Bedingungen (Inkubationszeit 1 h, Aktivität 10 U/ml, siehe 4.1) mit der Durchflusszytometrie ermittelt und die Phospholipase-Behandlung der Hek-293-Myc-Clone-16-Zellen und der HEK-293-Clone-4-Zellen nach diesen Parametern, wie oben beschrieben, durchgeführt.

3.2.3 Immunzytochemischer Nachweis von HJV mittels FACS- Messung

3.2.3.1 Immunfärbung des Hämojuvelins

Mithilfe von Antikörpern können Oberflächenproteine, wie das Hämojuvelin, detektierbar gemacht werden. Antikörper sind Proteine die ihr Zielmolekül, das Antigen, mit hoher Spezifität erkennen und mit diesem einen stabilen Protein-Ligand-Komplex bilden. Sie sind Y-förmig und besitzen zwei identische Bindungsstellen (Paratope), die reversible Bindungen zu den komplementären Stellen des Antigens (Epitope) eingehen. Das Antikörpermolekül hat vier Polypeptidketten als Grundstruktur, zwei identische, leichte Ketten (**L**-Ketten, engl. light chain, ca. 220 Aminosäuren) und zwei schwere Ketten (**H**-Ketten, engl. heavy chain, ca. 440

Aminosäuren). Die einzelnen Ketten halten über kovalente Bindungen (Disulfidbrücken) und nicht kovalente Bindungen (van der Waals Kräfte) zusammen (Abb. 11)³¹.

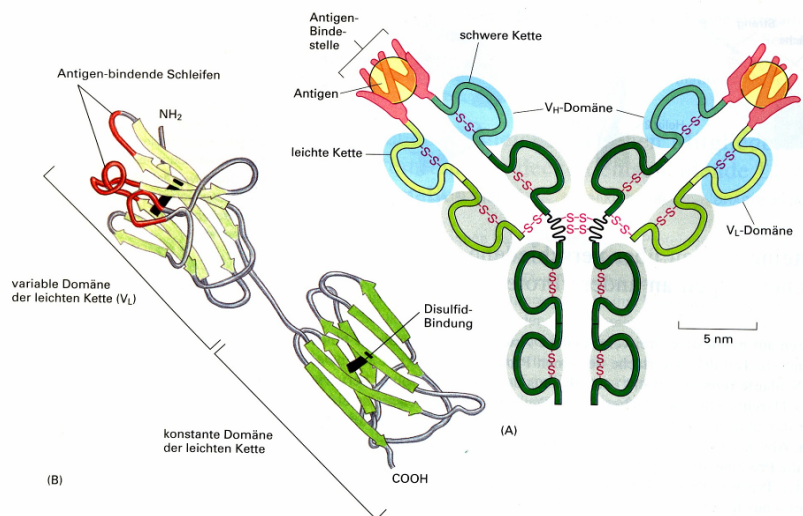


Abb. 11: Proteinstruktur eines Antikörpermoleküls³²

Der Anti-HJV-Antikörper (goat-anti-human RGM-C Antibody, 200 µg/ml), erkennt die Proteinstruktur des menschlichen Hämojuvelins an der Zelloberfläche und bindet sich spezifisch an das Molekül. Gegen diesen Antikörper ist ein Zweitantikörper (Alexa 488 donkey-anti-goat Antibody, 2 mg/ml) gerichtet, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen ist. Dieser Zweitantikörper bindet spezifisch an den Erstantikörper und kann für die Immundetektion eingesetzt werden. Da unspezifische Bindungen der Antikörper an die Zellmembran das Endergebnis verfälschen können, muss bei jeder Detektion eine Isotypkontrolle stattfinden. Hier wird die Zelle mit einem unspezifischen Normalantikörper (normal-goat IgG, 400 µg/ml) als Erstantikörper behandelt. Der Zweitantikörper bleibt dagegen gleich, auch er bindet an den Normalantikörper. Da es zu keiner spezifischen Bindung mit dem Hämojuvelin-Protein kommen sollte, würde der Normalantikörper, an dem Sekundärantikörper gebunden sind, mittels Waschschrift entfernt und somit eine Detektion des Oberflächenproteins nicht möglich werden.

Nach der Behandlung mit der Phospholipase C und jeweiliger Inkubationszeit erfolgte die Immunfärbung der Proben. Dazu wurden die Proben aus dem Brutschrank genommen und zu jeder Probe 3 ml RPMI Medium ohne FKS hinzugegeben, um die Wirkung der Phospholipase aufzuheben. Die erhaltene Suspension wurde wieder 5 min bei 300 g zentrifugiert, die gewonnen Zellpellets vom Medium getrennt. Bis auf die Probe, die für die spätere Isotypkontrolle bestimmt wurde, wurden alle Probengefäße mit dem Anti-HJV-Antikörper behandelt. Für die Versuchsreihe wurden für jede Probe (außer der Isotypkontrolle) 100 µl

³¹ vgl. Luttmann 2006, Seite 7f.

³² vgl. Alberts 2004, Seite 184

einer Lösung aus RPMI Medium ohne FKS mit der Anti-HJV-Konzentration von 10 µg/ml benötigt. Das Reaktionsgefäß des Isotyps wurde mit dem Normalantikörper behandelt. Die Konzentration der Antikörperlösung für den Isotyp betrug ebenfalls 10 µg/ml. Das Pellet des Reaktionsgefäßes wurde in dieser Lösung aus Medium und Antikörper resuspendiert. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte ein Waschschriff, um die weitere Bindung der Antikörper zu stoppen. Dazu wurden die Probengefäße mit 3 ml Medium aufgefüllt, 5 min bei 300 g zentrifugiert und danach das Zellpellet wieder vom Medium isoliert. Anschließend wurden alle Proben mit dem Zweitantikörper bei einer Testkonzentration von 10 µg/ml gefärbt. Die Reaktionslösung von 100 µl mit einer Zweitantikörperkonzentration von 10 µg/ml und RPMI Medium ohne FKS, wurde in alle Röhrchen gegeben, die darin enthaltenen Zellpellets resuspendiert. Die Inkubation erfolgte eine halbe Stunde bei Raumtemperatur, abgedunkelt, da das Fluorochrom des Zweitantikörpers lichtsensitiv ist. Nach erneutem Waschschriff (siehe oben) wurde das gewonnene Zellpellet in 500 µl des RPMI Mediums ohne FKS resuspendiert. Die Suspension jedes Reaktionsgefäßes wurde sorgfältig in ein extra FACS-Röhrchen transferiert und Propidiumiodid (**PI**) der Konzentration 1 µg/ml dazugegeben. Das PI kann durch die perforierte Zellmembran toter Zellen, nicht jedoch durch die intakte Membran von lebenden Zellen dringen und somit zur Lebend-Tot-Diskriminierung bei der nachfolgenden FACS-Analyse verwendet werden.

3.2.3.2 Analyse der HJV-Werte mittels Durchflusszytometrie (FACS)

FACS (Fluorescence activated cell sorting) ist ein immunzytochemisches Verfahren zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von Zellen, sowie zur stöchiometrischen Bestimmung der Bestandteile, die mit einem fluoreszierendem Farbstoff markiert wurden. Die allgemeine Bezeichnung hierfür ist die Durchflusszytometrie. Die zu untersuchende Zellsuspension wird über eine Kapillare in das Innere des Analysegerätes gesaugt und passiert dort einen Laserstrahl. Dabei streuen die Zellen das Licht. Die Vorwärtsstreuung **FSC** (forward scatter), sowie die Seitwärtsstreuung **SSC** (side scatter) des Lichtes werden gemessen. Der FSC dient als Maß für die Größe der Zelle. Der SSC dient als Maß für die Granularität der Zelle. Abbildung 12 zeigt die Messung der FSC- und SSC-Werte in einem FACS-Gerät.

Befinden sich fluoreszierende Farbstoffe in (z.B. Propidiumiodid) oder an (z. B. markierte Antikörper) der Zelle so werden diese durch den Laser angeregt, und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, das mithilfe von Lichtverstärkern, sogenannten **PMTs** (photo multipliers) im Gerät gemessen und dort das optische Signal in ein elektrisches umgewandelt wird. Der gemessene Wert für die Gesamtfluoreszenz ist proportional zur Leuchtstärke einer

einzelnen Zelle einer bestimmten Fluoreszenzfarbe und dient daher als direktes Maß für die Anzahl der fluoreszierenden Farbstoffmoleküle pro Zelle³³.

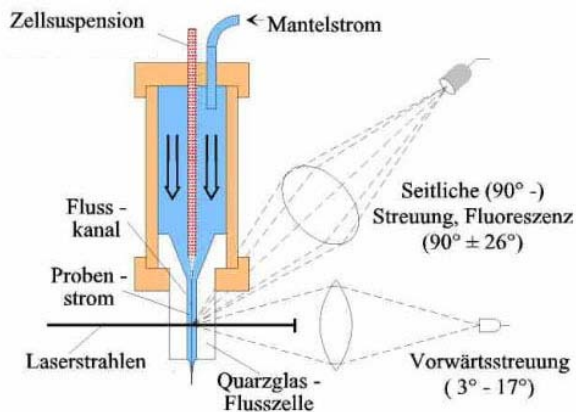


Abb. 12: Messung des FSC- und SSC-Wertes in einem FACS-Gerät³⁴

Das Oberflächenprotein Hämojuvelin wurde erst mit dem Anti-HJV- und danach mit dem Zweitantikörper, der an den Fluoreszenzfarbstoff **FITC** (Fluoreszein-Isothiocyanat) gekoppelt ist, behandelt. Wie der Name des sekundären Antikörpers (Alexa 488) schon deuten lässt, wird dieser bei einer Lichtwellenlänge von 488 nm angeregt. Der Alexa 488 Antikörper emittiert grünes Licht, welches gemessen und als elektronisches Signal übertragen wird. Das vorher zur Probeuntersuchung hinzugegebene PI wird vom Laserlicht angeregt und es erfolgt ein Fluoreszenzleuchten im roten Wellenlängenbereich, das ausgewertet und zur Darstellung der toten und vitalen Zellen gebraucht wird.

Die verschiedenen Proben in den FACS-Röhrchen werden in das Gerät befördert und anhand des Lasers analysiert. Die gewonnenen Daten wurden automatisch einem angeschlossenen Computer übertragen. Dort wurden die Einzeldaten mit dem Computerprogramm „FlowJo“ ausgewertet und in einem Punktdiagramm und Histogramm dargestellt (siehe 4.1).

3.2.4 Biochemische Analyse des Proteins HJVs mittels Western Blot

3.2.4.1 Immunfärbung des Hämojuvelins

Die Hämojuvelin-Werte der Zellen HEK-293-Myc-Clone-16 und HEK-29-Clone-4 wurden untersucht. Die Proben werden nummeriert und je nach Analyse mit oder ohne Phospholipase C der Aktivität 10 U/ml behandelt. Nach der erfolgten Enzymbehandlung (siehe 3.2.2) wurden alle Proben 5 min bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde isoliert, der Überstand diesmal nicht verworfen (er wurde für die spätere Proteinidentifizierung benötigt). Der jeweilige Überstand der Proben wurde in ein extra Eppendorf Safe-Lock Gefäß pipettiert

³³ http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_durchflusszytometrie.htm

³⁴ <http://www.berlin.ptb.de/8/83/832/DurchflussZytometrie/Laser-Durchfl-Zytometrie.html>

und auf Eis gelegt, um die weitere Reaktion der Phospholipase zu hemmen. Die Zellpellets wurden jeweils in 100 µl Lysepuffer resuspendiert. Auch hier wurde das Lysat jeweils in ein Safe-Lock Gefäß übergeführt. Die Zellproben mit den Lysepuffern wurden in den Kühlraum gebracht und bei 4°C in einen zirkulierenden Rotator gestellt. Bei diesem Vorgang wird die Zellmembran größtenteils aufgelöst und die Proteine freigesetzt. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 500 g zentrifugiert, um danach das Lysat von den Resten der Zellmembran, die als Pellet sichtbar wurden, zu trennen.

3.2.4.2 Vorbereitung der Gelelektrophorese

Vor der Auftrennung der Proteine müssen die zwölf nummerierten Proben (6 × Überstand, 6 × Lysat) mit einem Puffer (NuPage LDS Sample Buffer) und einem Reduktionsmittel (NuPage Sample Reducing Agent) behandelt werden. Das Reduktionsmittel sorgt für die Spaltung von Disulfidbrücken in den Proteinen. Für jede Probe wurde ein 30 µl Gesamtansatz, bestehend aus 3 µl Reduktionsmittel, 7,5 µl Sample Buffer und 19,5 µl der Probelösung selbst (entweder Überstand oder Lysat), hergestellt.

Jeder der zwölf Ansätze wurde in ein nummeriertes, extra Safe-Lock Gefäß überführt, kurz in einem Thermomixer auf 90°C erhitzt und abzentrifugiert.

In die Elektrophoresekammer wurden jetzt zwei NuPage 4-12 % Bis-Tris Gele fixiert, eines für den Klon 4, das andere für den Klon 16. Die Proben wurden jetzt in die jeweiligen Taschen auf beide Gele aufgetragen. Davor wurde die Kammer ausreichend mit dem Puffer NuPage MES SDS Running Buffer aufgefüllt. Dieser ist der Laufpuffer und somit Voraussetzung für die Wanderung der Proteine im Gel während der Elektrophorese.

3.2.4.3 Auftrennung der Proteine durch die Gelelektrophorese

Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, um u. a. verschiedene Proteine voneinander zu trennen. Eine Mischung aus zu trennenden Proteinen wandert beim Anlegen eines elektrischen Felds durch ein Gel. Je nach Größe und Ladung der Proteine bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel in einem elektrischen Feld.

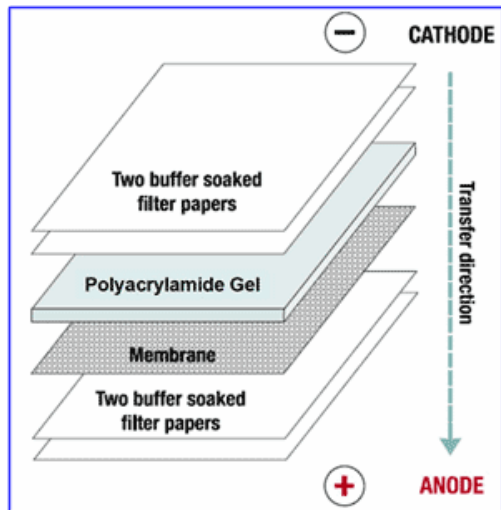
Nach 45 min bei 210 V und 140 mA erhält man das für eine Probe spezifische Proteinemuster. Diese Proteinbanden können durch eine Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht werden.

Bei dieser Färbung werden alle getrennten Proteine aus einem Gesamtzellextrakt optisch sichtbar. Will man dagegen ein einzelnes Protein (z.B. Hämojuvelin) aus dieser Probelösung detektieren, muss dieses auf eine Membran transferiert und gefärbt werden (Western Blot).

3.2.4.4 Transfer der Proteine auf eine Membran („Blotting“)

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Proteinmuster für die nachfolgende immunologische Detektion auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Dieses Verfahren wird Western Blot genannt. Die beiden Gele der Elektrophorese wurden luftblasenfrei auf die proteinbindende Nitrozellulosemembran gelegt und jede Seite von zwei



Filterpapieren (Blot-Papers) umrahmt, die in dem Transferpuffer (Semi Dry Transfer Buffer) getränkt wurden. Mithilfe der Transferapparatur (Trans Blot SD) wurde senkrecht zu den Gelen und der Membran eine Spannung angelegt, so dass die Proteine des Gels unter Beibehaltung des Auftrennungsmusters auf die Membran wandern (siehe Abb. 13). Aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen bleiben diese auf dieser Nitrozellulosemembran haften. Dieser Vorgang wurde 1 h bei 20 V und 300 mA durchgeführt.

Abb. 13: Transfer der Proteine von einem Protein-Gel auf eine Nitrozellulose Membran³⁵

3.2.4.5 Blocken der Membran und anschließende Antikörperfärbung

Nach dem sogenannten „Blotten“ wurde das Gel von der Membran entfernt und der erfolgreiche Transfer durch Anfärben mit Ponceau-Rot-Lösung überprüft. Für die nachfolgende Immunfärbung müssen die freien Stellen der Nitrozellulosemembran blockiert werden, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern. Dies erfolgt mit eiweißreichen Lösungen (z. B. 1 %ige Milchpulverlösung). Die Nitrozellulosemembran wird für 2 h in die Milchpulverlösung gegeben und auf einen Mikrotiterplattenschüttler gestellt, um alle Stellen mit Proteinen zu benetzen. Danach wird die Membran aus der Lösung entfernt und kurz mit **TBST**-Pufferlösung (**T**ris-**B**uffered **S**aline **T**ween-20) gewaschen.

Nach diesem Blockierungsschritt kann die Antikörperbehandlung erfolgen. Der primäre Anti-HJV-Antikörper wird dazu mit einer verdünnten Testkonzentration von 0,2 µg/ml verwendet. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurde dieser Antikörper ebenfalls mit der Milchpulverlösung zu einer Reaktionslösung vermischt. Die Nitrozellulosemembran wurde in diese Lösung transferiert und bei Raumtemperatur über Nacht auf einem Mikrotiterplatten-

³⁵ <http://www.fermentas.com/techinfo/electrophoresis/pproteintransfer.htm>

schüttler inkubiert, so dass die spezifischen Antikörper an das Oberflächenprotein Hämajuvelin der Membran gebunden wurden.

Danach wurde die Zellulosemembran aus der Lösung entfernt und in drei Waschschritten jeweils mit neuer TBST-Pufferlösung von überschüssigen und unspezifisch gebundenen Antikörpern getrennt. Nur die Antikörper bleiben auf der Membran, die spezifische Bindungen mit ihrem Antigen (Hämajuvelin) bilden. Nun erfolgt die Färbung mit dem Zweitantikörper, dem Detektionsantikörper (rabbit-anti-goat IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugated, 50 mg/ml), der eine spezifische Bindung mit dem Anti-HJV-Erstantikörper eingeht und mit dem Enzym Peroxidase (gewonnen aus Meerettich) gekoppelt ist. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation des Luminols und seiner Derivate, bei der eine Lumineszenz sichtbar gemacht werden kann. Durch seine Bindung an den Erstantikörper, der bereits am Protein fixiert ist, kann so das Oberflächenprotein durch das Leuchten detektiert werden (siehe Abb. 14).

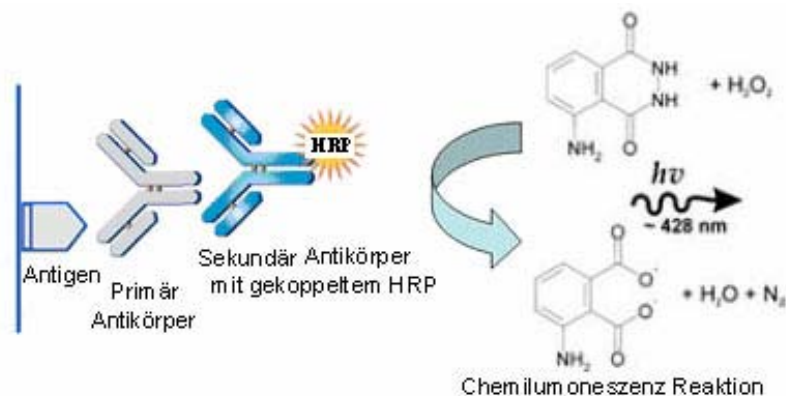


Abb. 14: Antikörperbindung und Lumineszenz auf der Nitrozellulosemembran³⁶

Für das Experiment wurde eine Testkonzentration von 10 µg/ml des sekundären Antikörpers verwendet. Die Reagenzlösung setzt sich wieder aus Antikörper und Milchpulverlösung zusammen. Um unspezifische Wechselwirkungen zu vermeiden, wurde dieser Antikörper in Milchpulverlösung verdünnt, im Anschluss zur Zellmembran gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur auf den Mikrotiterplattenschüttler gestellt. Zum Schluss wurden noch zwei Western Blot-Reagenzien hinzupipettiert: Lumi Light Plus Black, das Linol enthält und dessen Lumineszenz verstärkt, sowie Lumi Light Plus White, in der sich eine stabile Peroxidlösung befindet. Das in der Lösung enthaltene Luminol wird von der Peroxidase des Zweitantikörpers unter Lumineszenz oxidiert und kann so das Protein Hämajuvelin detektieren.

Zur endgültigen Auswertung wurde die Membran mit dem Lumi-Imager F1 untersucht. Das emittierte Licht wurde in diesem Gerät über eine Kamera in einem wählbaren Zeitraum aufgenommen und das Bild im angeschlossenen Computer entwickelt. Im Gegensatz zur Elektrophorese zeigt das gewonnene Bild nur die Banden des gefärbten Proteins (siehe 4.2).

³⁶ <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:ECL.jpg>

4 Auswertungen und Ergebnisse

4.1 FACS- Analyse des Hämojuvelins

4.1.1 Nachweis des Hämojuvelins

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden zuerst im Dot-Plot Diagramm dargestellt. Diese Darstellung ist gebräuchlich, um die Beziehung zwischen Parametern wie den FSC und den SSC-Werten oder zwischen zwei Fluoreszenzen (hier FITC und PI) aufzuzeigen. Die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzen trägt zur besseren Darstellung großer Intensitätsunterschiede bei. Es wurden jeweils die Werte von 20.000 Zellen aufgenommen. Zur weiteren Analyse wurde bei dem FSC-SSC-Diagramm der Bereich der höchsten Partikeldichte eingegrenzt (roter Rahmen), man spricht auch vom „gating“.

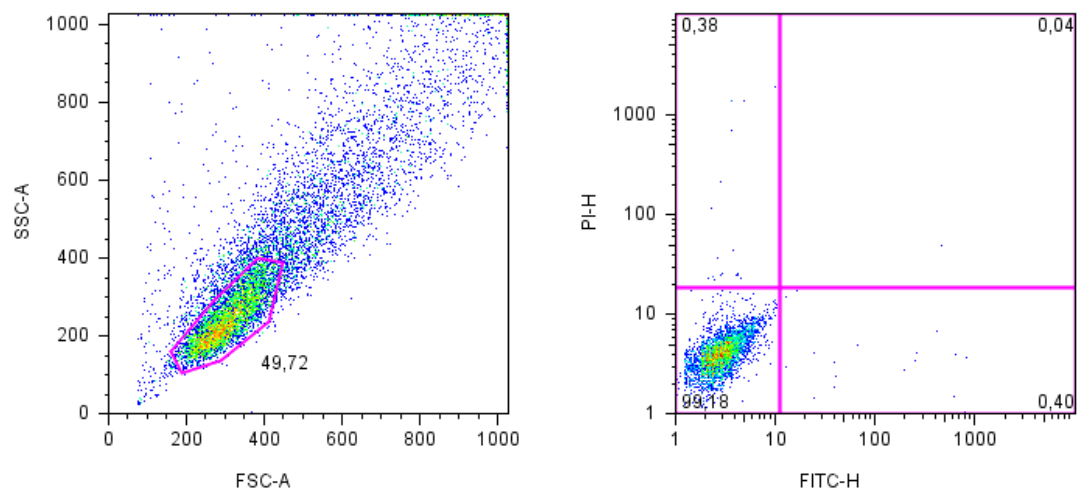


Abb. 15: Dot-Plot der Isotypkontrolle des HEK-293-Myc-Clone-16 nach Behandlung mit normal-goat IgG.

Links: SSC-A in Abhängigkeit von FSC-A. Rechts: PI-H in Abhängigkeit von FITC-H

Im linken Diagramm der Abb. 15 ist eine starke Konzentration der Signale in dem eingerahmten Bereich (knapp 50 % der Gesamtsignale) zu erkennen. Dies sind Signale der biochemisch interessanten Zellen. Ein hoher FSC-Wert deutet auf unerwünschte Zellaggregate hin. Zu hohe SSC-Werte außerhalb des Rahmens deuten auf stark granuläre Zellen hin. Zu kleine Werte der beiden Parameter weisen auf biochemisch unbedeutende Spaltprodukte hin.

Auf der rechten Seite wurden die eingerahmten Partikel auf ihre FITC- und PI-Werte mit logarithmischen Koordinatenachsen überprüft. Die waagrechte rote Linie trennt die toten Zellen von den vitalen. Die senkrechte Grenze trennt HJV fluoreszierende von nicht fluoreszierenden Partikeln, und die waagrechte lebende von toten Zellen. Nur 0,42 % aller Partikel haben einen erhöhten PI- Wert, d. h. nur eine kleinste Teilmenge weist auf tote Zellen

hin. Der Wert der Partikel, die eine Fluoreszenz aufweisen, ist mit 0,44 % schwindend gering. 99,18 % aller Zellen sind lebend und zeigen wenig bis keine Fluoreszenz.

Die Auswertung verdeutlicht, dass diese Probe mit dem Normalantikörper (Isotyp) als Negativkontrolle bei der Detektion des Hämajuvelins fungiert, da er nur eine geringe Fluoreszenz aufzeigt (Autofluoreszenz). Das Messergebnis wird also nicht von unspezifisch gebundenen Detektionsantikörpern verfälscht.

Eine weitere Darstellungsweise der Messergebnisse ist das Histogramm. Hier handelt es sich um eine Häufigkeitsverteilung, bei der die Stärke eines Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen wird. Auch hier erleichtert eine logarithmische Skala die Darstellung schwacher und starker Fluoreszenzsignale in einem Diagramm. Die nachfolgende Grafik (siehe Abb. 16) zeigt die Fluoreszenz zweier Proben, die mit unterschiedlichen Primärantikörpern gefärbt wurden.

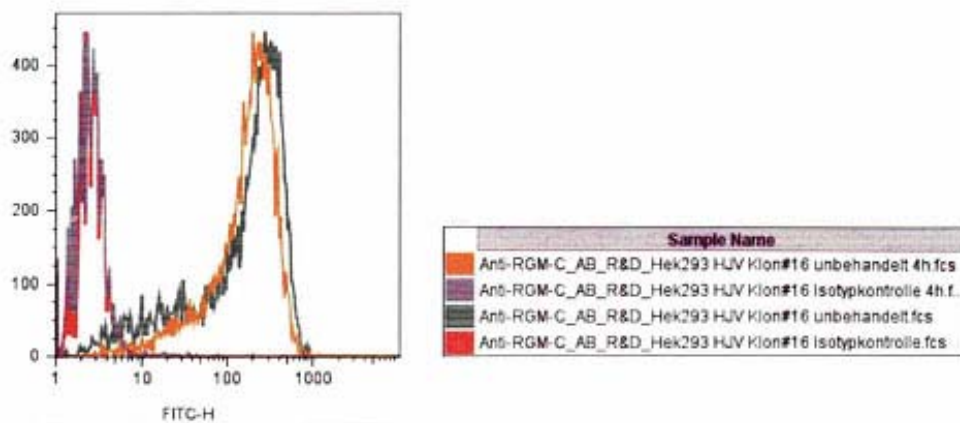


Abb. 16: Unbehandelte Proben und Isotypkontrollen zum Zeitpunkt 0 und nach 4 h Inkubation

Die Probe, die mit dem Isotyp behandelt wurde, zeigt aufgrund der geringen Zahl an gebundenen Alexa 488 Detektionsantikörpern ein geringes Fluoreszenzsignal. Die andere Probe, die mit dem spezifischen Anti-HJV-Erstantikörper behandelt wurde, zeigt ein hohes Fluoreszenzsignal. Der primäre Antikörper der zweiten Probe bindet also spezifisch an sein Antigen, dem Hämajuvelin. Damit ist die Existenz des Hämajuvelins auf der HEK-293-Zellmembran nachgewiesen. Wie aus dem Diagramm ersichtlich ist, macht der Zeitpunkt der Messung keinen deutlichen Unterschied bei der unbehandelten (ohne PLC) Probe oder bei der Probe mit dem Isotyp aus.

Bei Abspaltungsversuchen mit HJV kann also die unbehandelte Probe als Positivkontrolle und der Isotyp als Negativkontrolle für den Nachweis von Hämajuvelin auf der Zelloberfläche verwendet werden.

4.1.2 Konzentrationswirkung der PLC bei der Abspaltung des HJVs

Die Messergebnisse bei der Variation der Konzentration der Phospholipase C (siehe 3.2.2) wurden in einem Histogramm dargestellt (siehe Abb. 17).

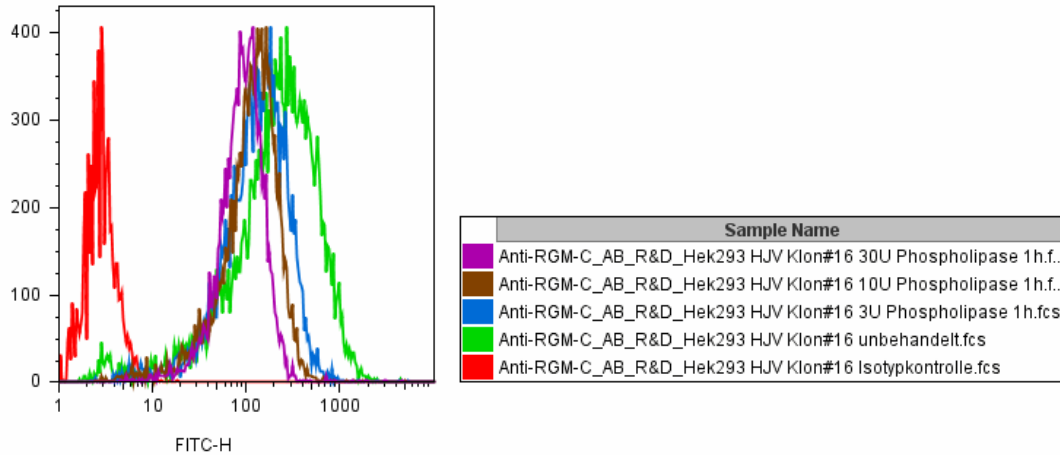


Abb. 17: Behandlung mit unterschiedlichen Phospholipase C-Konzentrationen, 1 h Inkubation

Der rote Graf dient als Negativ- (Isotypkontrolle), der grüne Graf als Positivkontrolle. Mit zunehmender PLC-Aktivität nimmt der Fluoreszenzwert der Proben ab. Hiermit wurde bestätigt, dass Hämöjuvelin GPI-verankert ist, da die Phospholipase C speziell diese Art von Verbindungen trennt und somit immer mehr Hämöjuvelin von der Oberfläche abgespalten wird. Die geringere HJV-Konzentration bewirkt so ein schwächeres Leuchtsignal. Da die logarithmische Skala optisch den Vergleich unterschiedlicher HJV-Mengen erschwert, wird der statistische Mittelwert aus den Ereignissen und den FITC-Fluoreszenz Werten der unterschiedlichen Proben gebildet. Diese Werte werden in nachfolgender Grafik beschrieben (siehe Abb. 18).

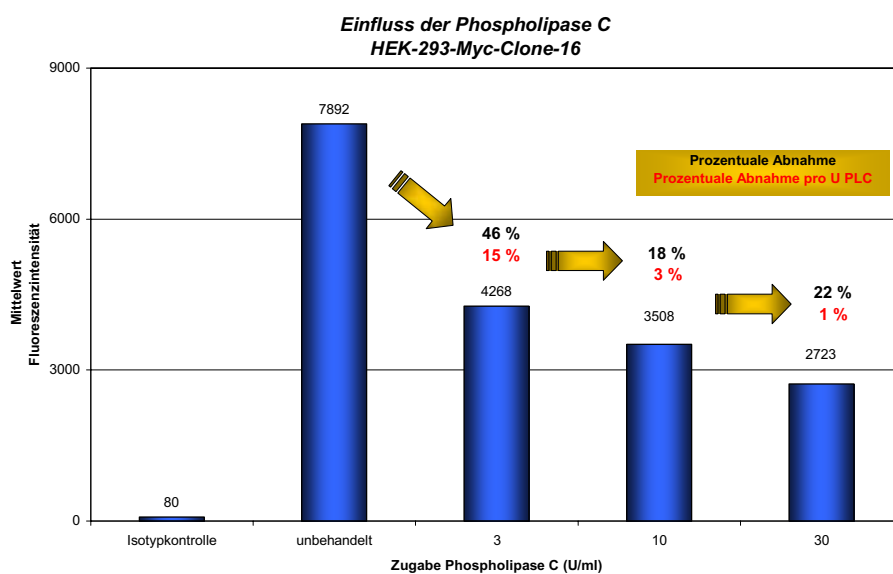


Abb. 18: HJV-Fluoreszenzmittelwerte der Proben bei unterschiedlichen PLC-Konzentrationen

Schon bei einer geringen Aktivität der PLC (3 U/ml), wird die Fluoreszenz stark verringert. Höhere PLC-Konzentrationen (10 U/ml, 30 U/ml) verstärken diesen Effekt, die prozentuale Veränderung pro Unit wird aber immer kleiner. Das bedeutet, dass die Fluoreszenz nicht linear mit der PLC-Konzentration abnimmt. Zu hohe Enzymaktivitäten können sich auch negativ auf die Zellen auswirken. So steigen die PI-Werte und damit die Rate der toten Zellen kontinuierlich mit der Aktivitätszunahme der PLC an. Deshalb wurde für die folgenden Versuche mit einer Aktivität von 10 U/ml ein Kompromiss aus HJV-Abspaltung und Zellvitalität gefunden.

4.1.3 Zeiteinfluss bei der Abspaltung des HJVs durch PLC

Auch hier wurden die Messergebnisse bei der PLC-Behandlung (10 U/ml) (siehe 3.2.2) mit unterschiedlichen Inkubationszeiten in einem Histogramm dargestellt (siehe Abb. 19).

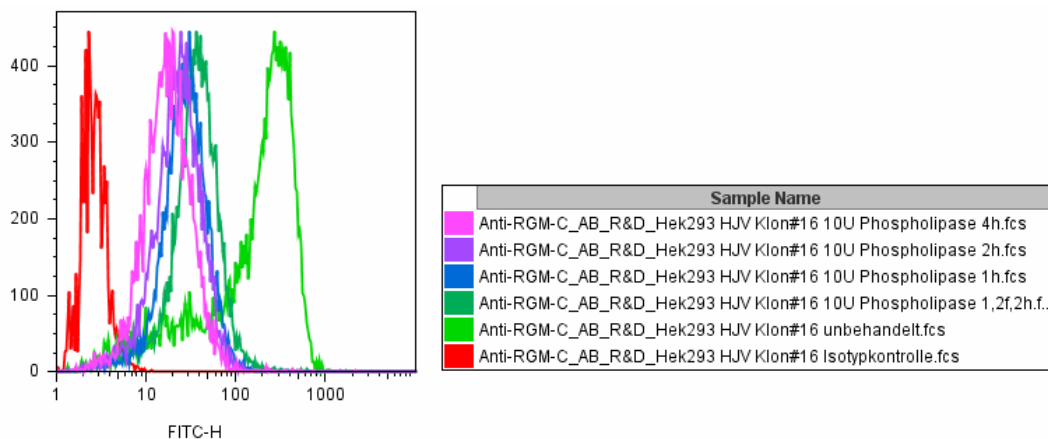


Abb. 19: Einfluss der Zeit bei konstanter Phospholipase C-Aktivität auf die HJV-Fluoreszenzintensität

Die Fluoreszenzintensität wird bei zunehmender Inkubationszeit der PLC immer geringer. Das Enzym kann also bei längerer Einwirkungszeit immer mehr Hämöjuvelin von der Oberfläche spalten. Über die Fluoreszenzmittelwerte kann die zeitabhängige Spaltung bestimmt werden. Abbildung 20 zeigt, dass die Isotypkontrollen, sowie die unbehandelten Zellen sowohl bei sofortiger Messung als auch bei einer Messung nach 4 h in etwa jeweils gleiche Werte aufweisen. Somit kann man ausschließen, dass andere Einflüsse neben der Inkubationszeit der PLC (bei konstanter Aktivität) auf die Messergebnisse wirken. Aus diesen Mittelwerten lässt sich die prozentuale Veränderung zwischen zwei Inkubationszeiten berechnen.

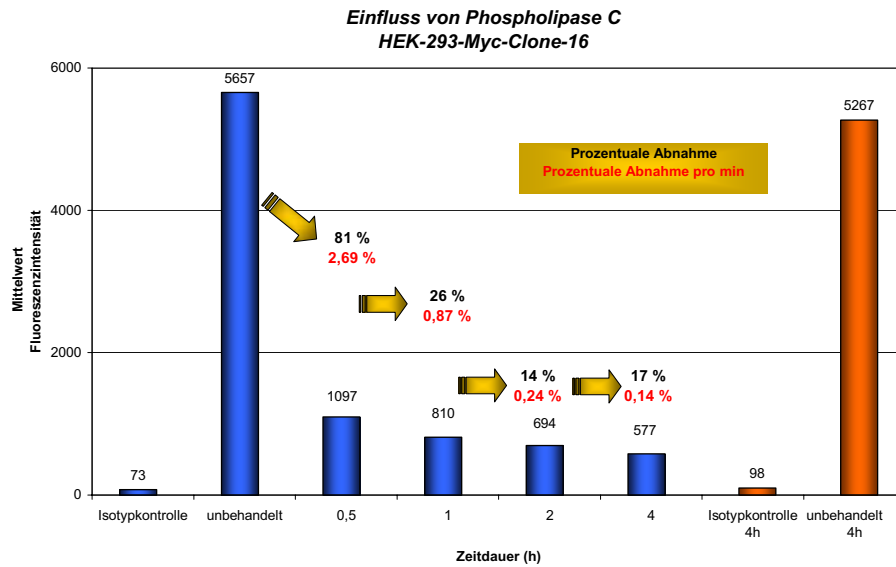


Abb. 20: HJV-Fluoreszenzmittelwerte bei unterschiedlicher Inkubationszeit der PLC

Nach 4 h waren fast 90 % der Signale von der Oberfläche entfernt, d. h. die PLC hat nach dieser Zeit knapp 90 % der Hämojuvelin-Proteine auf der Oberfläche abgespalten. Der größte Teil, nämlich über 80 %, wird schon nach einer halben Stunde von der Membran getrennt. Die restlichen 10 % werden innerhalb von 3 ½ Stunden gespalten. Längere Inkubationszeiten der Phospholipase erhöhen ebenfalls die Anzahl toter Zellen (PI-Rate). Als Kompromiss zwischen positiver und negativer Wirkung hat sich eine Inkubationszeit von einer Stunde bewährt. Die Phospholipase C spaltet das Oberflächenprotein Hämojuvelin schon in geringen PLC-Konzentrationen (3 U/ml), sowie bereits nach einer geringen Inkubationszeit (0,5 h). Die besten Parameter für die Phospholipase C-Behandlung sind eine Enzymkonzentration von 10 U/ml, sowie eine Inkubationszeit von einer Stunde.

Für die HJV-Analyse im Western Blot-Verfahren wurden die gewonnenen Erkenntnisse in der PLC-Behandlung eingesetzt.

4.2 Analyse des Hämojuvelins mittels Western Blot

Abbildung 21 zeigt das ausgewertete Proteinmuster des Hämojuvelins (siehe 3.2.4). Die jeweiligen Größenmarker geben Aufschluss über das Molekulargewicht der Proben 2 bis 5 beim Klon 4 und 2 bis 9 beim Klon 16.

Klon 4 zeigt bei der unbehandelten Probe 2, sowie bei den behandelten Proben 4 und 5, drei Proteinbanden jeweils bei ungefähr 20, 35 und 50 kDa. In der unbehandelten Probe 3 des Zellkulturüberstands ist keine Detektion des Proteins erkennbar. Die mit PLC behandelten Zellproben zeigen in etwa gleich dicke Banden wie die unbehandelten Zellen.

Klon 16 weist in den Proben 2, 4, 5, 6, 8 und 9 ebenso je drei Proteinbanden bei einem Molekulargewicht von etwa 20, 35 und 50 kDa auf.

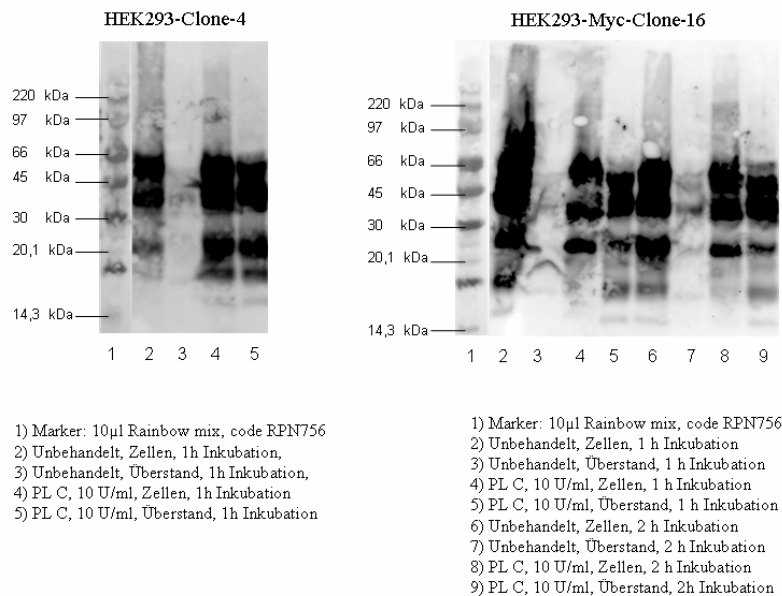


Abb. 21: Proteinbanden des Hämojuvelins der Zellen und des Zellkulturüberstands nach verschiedenen Inkubationszeiten der PLC

Die Proben 3 und 7 der Zellkulturüberstände zeigen keine detektierbare Lumineszenz, da hier keine PLC vorhanden war, die das Protein durch Spaltung des GPI-Ankers in den extrazellulären Bereich entlassen konnte. Die Proteinbanden der unbehandelten Zellen, sowie die Zellen der mit PLC versetzten Proben zeigen ungefähr die gleiche Stärke auf.

Im Zellkulturüberstand der behandelten Zellen zeigt sich ein Hämojuvelin-Signal. Dies bedeutet, dass sich vorher Hämojuvelin auf der Oberfläche befinden musste, das sich durch Spaltung eines GPI-Ankers mit der PLC im Überstand nachweisen lässt. David Kuningers GPI-Verankerungshypothese für das HJV auf der Zelloberfläche hat sich also nicht nur für Muskelzellen, sondern auch für die HEK-293-Zelllinie bestätigen lassen. Drei Proteinbanden im Überschuss der behandelten Zellen weisen auf Fragmente des HJVs hin. Eine weitere Hypothese Kuningers lautet, dass Hämojuvelin ungespalten (50 kDa), sowie gespalten (zwei Fragmente mit 20 bzw. 35 kDa, die durch Disulfidbrücken verbunden sind), vorkommt. Diese Aussage deckt sich mit dem dreiteiligen Bandenmuster der Proben, die in etwa dasselbe Molekulargewicht, wie theoretisch vermutet, besitzen.

Eine zusätzliche Erkenntnis ist, dass die HJV-Signale der unbehandelten Zellen nicht deutlicher ausgeprägt sind, als die der behandelten Zellen. Daraus lässt sich folgern, dass sich der weitaus größte Teil des Hämojuvelins im intrazellulären Bereich befindet, da trotz sichtbarer Abspaltung des Proteins im Überstand eine deutliche Abschwächung der Signalstärke der behandelten Zellen unterbleibt. Anscheinend befinden sich weitaus größere Mengen des Proteins im Zytoplasma, als durch Exozytose an die Zelloberfläche gelangen.

5 Diskussion

Eisen ist ein wichtiges Element im menschlichen Körper. Aufgrund seiner verschiedenen Oxidationsstufen ist es an zahlreichen biochemischen Reaktionen im Körper beteiligt. Die Hauptaufgabe erstreckt sich auf den Sauerstofftransport im Hämoglobin der roten Blutkörperchen. Trotz dieser lebenswichtigen Eigenschaften wirkt Eisen in zu hohen Mengen toxisch. Ein Informationsaustausch über den aktuellen Eisengehalt und die für die Erythropoese benötigte Menge sind also unabdingbar, um eine konstante Eisenmenge aufrechtzuerhalten.

Der Signalweg erfolgt über ein Hormon, namens Hepcidin. Dieses Polypeptid bindet an den Eisentransporter Ferroportin und verhindert durch dessen Internalisierung und Degradation eine Eisenabgabe aus Enterozyten und Makrophagen in den Blutkreislauf. Folglich wird bei einer Eisenüberladung mehr Hepcidin exprimiert, bei einem Eisenmangel wird dessen Synthese verringert. Dieses „Eisenregulatorprotein“ Hepcidin wird unter anderem von dem Zelloberflächenprotein Hemojuvelin in seiner Expression induziert.

David Kuninger stellte 2006 anhand von Experimenten mit Muskelzellen fest, dass das Hemojuvelin mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die Zellmembran fixiert ist. Dort liegt es sowohl gespalten, aber mittels Disulfidbrücken verknüpft, als auch ungespalten vor. Die aus Muskelgewebszellen gewonnenen Hypothesen der GPI-Verankerung von Hemojuvelin wurden im Rahmen dieser Facharbeit für die HEK-293-Zelllinie mit den biochemischen Verfahren Durchflusszytometrie und Western Blot überprüft und bestätigt. Anhand der erhaltenen Ergebnisse lässt sich zusätzlich vermuten, dass sich der größte Teil des Hemojuvelins nicht auf der Zelloberfläche, sondern im Intrazellulärbereich befindet.

Um die tatsächliche biochemische Bedeutung des Hemojuvelins erfassen zu können, bedarf es noch einer Reihe weiterer Experimente und Studien.

Aus den bisherigen Forschungsergebnissen lässt sich ableiten, dass dieses Protein in Zukunft eine wichtige Rolle im pharmazeutischen Bereich spielen könnte und die Beseitigung der Eisenmangelanämie erscheint zumindest denkbar. So könnten bei Patienten mit gestörter Eisenresorption, medizinische Präparate die Wirkung des Hemojuvelins und damit die Expression des Hepcidins verringern bzw. eine erhöhte Eisenresorption und Abgabe aus dem Darm, sowie aus Eisenspeicherzellen der Leber oder der Makrophagen verstärken. Als Beispiel für derartige Medikamente sind Inhibitoren vorstellbar, die nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip spezifisch den Rezeptor Hemojuvelin blockieren.

Für eine erfolgreiche Therapie ist zunächst jedoch die vollständige Aufklärung der Signalkaskade und der Bindepartner des Hemojuvelins erforderlich. Des Weiteren müssen ausgiebige Testreihen bezüglich der Wirkung, Bioverfügbarkeit und Verträglichkeit der Inhibitoren durchgeführt werden, um aus ihnen in Zukunft ein wirksames Medikament gewinnen zu können.

6 Literaturverzeichnis

Bücher und Zeitschriften:

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Molekularbiologie der Zelle, Weinheim, Wiley-VCH, 2004⁴

Anderson G. J. & Frazer D. M., Iron metabolism meets signal transduction, Nature Genetics, 38:503-505, Mai 2006

Beutel G., Heil G., Ganzer A., Anämie auf einen Blick, Berlin, Blackwell Verlag, 2003

Ganz T., Molecular Control of Iron Transport, Journal of the American Society of Nephrology, 18:394-400, Januar 2007

Heinz D. W., Ryan M., Smith M. P., Weaver L. H., Keana J. F. W., Griffith O. H., Crystal Structure of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C from *Bacillus cereus* in Complex with Glucosaminyl ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-D-*myo*-inositol, an Essential Fragment of GPI Anchors, Biochemistry, 35:9496-9504, Mai 1996

Hentze M. W., Muckenthaler M. U., Andrews N. C., Balancing Acts: Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism, Cell Review, 117:285-297, April 2004

Horn F., Moc I., Schneider N., Grillhösl C., Berghold S., Lindenmeier G., Biochemie des Menschen – Das Lehrbuch für das Medizinstudium, Stuttgart, Thieme, 2005³

Huch R. & Schaefer R., Iron Deficiency an Iron Deficiency Anemia, Stuttgart, Thieme, 2006

Kuninger D., Kuns-Hashimoto R., Kuzmickas R., Rotwein P., Complex biosynthesis of the muscle-enriched iron regulator RGMc, Journal of Cell Science, 119:3273-3283, Juni 2006

Luttmann W., Bratke K., Küpper M., Myrtek D., Der Experimentator: Immunologie, München, Spektrum Akademischer Verlag, 2006²

Penzlin H., Lehrbuch der Tierphysiologie, München, Spektrum Akademischer Verlag, 2005⁷

Stryer L., Tymoczko J. L., Berg J. M., Biochemie, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, 2003⁵

Vollhardt K. P. C. & Schore N. E., Organische Chemie, Weinheim, Wiley-VCH, 2000³

Internet

<http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:ECL.jpg>

<http://www.answers.com/topic/metabolism-19>

<http://www.berlin.ptb.de/8/83/832/DurchflussZytometrie/Laser-Durchfl-Zytometrie.html>

<http://www.fermentas.com/techinfo/electrophoresis/pproteintransfer.htm>

http://www.hoti-berlin.de/vortraege/10-11-2006_V02-Kettritz.pdf

http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_durchflusszytometrie.htm

<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1dix.html>

<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1M4E>

<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2NSU>

http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Proteomics_and_Protein_Expr_/Proteomics/Post_Translation_Modif_/Glycosylation/Structures___Symbols/GPI_Anchor_Structure.html

7 Danksagung

Ich danke der Firma Roche Diagnostics GmbH, die mir ermöglicht hat ein Fachpraktikum vom 30.07.-10.08.2007 in Penzberg durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Kubbies für die Bereitstellung des Themas und die fachkompetente Betreuung.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Herren N. Gräfe und W. Weckwarth für die Unterstützung bei der Durchführung des Praktikums bedanken.

8 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

....., den

Ort

Datum

.....

Unterschrift des Schülers

9 Anhang

Materialliste

Antikörper:	Alexa 488 donkey-anti-goat Antibody (Molecular Probes) Stammlösung: 2 mg/ml; Testkonzentration: 10 µg/ml goat-anti-human RGM-C Antibody (R&D Systems) Stammlösung: 200 µg/ml; Testkonzentration: 10 µg/ml normal-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) Stammlösung: 400 µg/ml; Testkonzentration: 10 µg/ml rabbit-anti-goat IgG (H&L) horseradish peroxidase (HRP) conjugated (CHEMICON International) Stammlösung: 50 mg/ml; Testkonzentration: 10 µg/ml
Blot-Papier:	Extra thick Blot Paper (BIO-RAD)
Elektrophoresegel:	NuPage 4-12 % Bis-Tris Gel (Invitrogen)
Elektrophoresepuffer:	NuPage LDS Sample Buffer (Invitrogen) NuPage MES SDS Running Buffer (Invitrogen) NuPage Sample Reducing Agent (Invitrogen)
Enzym:	Phospholipase C (0,1 U/µl) (SIGMA)
Lichtmikroskop:	Labovert (Leitz)
Lysepuffer:	Lysis and Extraction Buffer pH 7,6 (25 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 % NP-40; 1 % Sodium deoxycholate; 0,1 % SDS) (RIPA)
Medium:	DMEM (GIBCO) mit 10 % FKS RPMI (PAN Biotech GmbH) ohne FKS
Messgeräte:	Elektrophoreseapparatur: Power Ease 500 (NOVEX) Elektrophoresekammer: Xcell Sure Lock (Invitrogen) FACS-Gerät: LSR II (BD) Lumineszenz-Messer: Lumi-Imager F1 (Roche) Trans Blot-Gerät: Trans Blot SD (BIO-RAD)
Milchpulver:	Lumi Light Plus (Roche) Western Blotting-Kit
Neubauer-Zählkammer:	(Fuchs-Rosenthal)
Nitrozellulosemembran:	Nitrocellulose Membrane (Invitrogen)
Pipetten:	Einkanalpipetten (Eppendorf)
Proteinmarker:	Rainbow mix, code RPN756 (Invitrogen)
Reaktionsgefäße:	0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml Safe-Lock (Eppendorf)
Rotator:	Test-tube-rotator 34528 (Snijders)
Schüttler:	Schüttler MTS4 (IKA)

Thermomixer:	Thermomixer comfort (Eppendorf)
Transferpuffer:	Semi Dry Transfer Buffer (für 2 Liter: 5,86 g Glycin; 11,64 g Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan); 400 ml Methanol; 7,5 ml 10 % SDS-Lösung (Sodium Dodecyl Sulfate); 1592,5 ml deionisiertes Wasser
Trypanblau:	Trypan Blue Solution (0,4 %) (Sigma)
Trypsin-EDTA:	(PAN Biotech GmbH)
Vortex:	Vibrofix VF1 (Janke + Kunkel)
Waschpuffer:	TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20) (PAA Laboratories GmbH)
Western Blot-Kit:	Lumi Light Plus (Roche) Luminol/Enhancer Solution Stable Peroxide Solution
Zellen:	HEK-293 (humane, adhärenzte, embryonale Nierenzelllinie)
Zellinkubator:	CO ₂ -Inkubator mit automatischer CO ₂ -Versorgung, BBD 6220 (Heraeus)
Zellkulturflasche:	T175 (Greiner bio-one)
Zentrifuge:	Zentrifuge 5810R (Eppendorf)