

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und
Pathobiochemie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Ulrich Walter

**Das Phosphatidylinositol-Transfer-
Protein PITPnm2 in humanen
Thrombozyten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Daniel Kramer

aus Vellberg

Würzburg, Dezember 2011

Referent: Prof. Dr. Ulrich Walter

Korreferent: Prof. Dr. Bernhard Nieswandt

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2013

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Das Proteom humaner Thrombozyten.....	1
1.2 Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine	1
1.2.1 Entdeckung der Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine	1
1.2.2 Einteilung und Struktur der Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine	2
1.2.3 Funktion der Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine	4
1.2.4 Gen- Knockout der Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine	5
1.3 Das Phosphatidylinositol-Transfer-Protein PITPnm2.....	6
1.3.1 Das PITPNM2-Gen	6
1.3.2 Das PITPnm2-Protein	6
1.3.3 Funktion des PITPnm2-Proteins in Thrombozyten	7
1.4 Alternatives Splicen	9
1.4.1 Formen des alternativen Splicens	10
1.4.2 Funktion des alternativen Splicens	12
2. Zielsetzung.....	13
3. Material und Methoden.....	14
3.1 Material	14
3.1.1 Fertigreagenzien und Kits	14
3.1.2 Primer	16
3.1.3 Zellen.....	17

3. 1. 4 Geräte.....	17
3. 2 Methoden	18
3. 2. 1 Herstellung von gewaschenen Plättchen ("washed platelets")	18
3. 2. 2 Isolation von RNA aus Thrombozyten	19
3. 2. 3 cDNA Synthese.....	20
3. 2. 4 Vervielfältigung von DNA durch PCR	21
3. 2. 5 Agarose - Gelelektrophorese	22
3. 2. 6 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	23
3. 2. 7 Isolation von Plasmid DNA.....	24
3. 2. 8 Restriktionsverdau von DNA	24
3. 2. 9 Klonierung von PITPNM2.....	24
3. 2. 9. 1 Klonierung von PCR-Fragmenten	24
3. 2. 9. 2 Isolation eines PITPNM2 Fragments aus pCMV-SPORT6.....	25
3. 2. 9. 3 Klonierung von PITPNM2 in einen Expressionsvektor	26
3. 2. 10 Rekombinante Expression von PITPNM2 und Zellkultur	27
3. 2. 10. 1 Kultivierung von HEK 293 Zellen	27
3. 2. 10. 2 Passagieren von HEK 293 Zellen	27
3. 2. 10. 3 Bestimmung der Zellzahl.....	28
3. 2. 10. 4 Transfektion von HEK 293 Zellen	28
3. 2. 10. 5 Ernten und Proteinaufschluss von HEK 293 Zellen	29
3. 2. 10. 6 Bestimmung der Proteinkonzentration	29
3. 2. 11 Trennung von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese.....	30
3. 2. 12 Nachweis von Proteinen durch Western-Blot	32
3. 2. 13 DNA Sequenzierung	33

4. Ergebnisse	36
4. 1 Nachweis der Transkripte von membranassoziierten Phosphatidylinositol-Transfer- Proteinen in Thrombozyten	36
4. 2 Identifikation der Splice-Varianten von PITPNM2 in Thrombozyten.....	39
4. 3 Klonierung von PITPNM2	45
4. 3. 1 PITPNM2-Klon IRATp970G02136D	45
4. 3. 2 Klonierung des fehlenden Anteils von PITPNM2 und Zusammenfügung des Offenen Leserahmens.....	47
4. 4 Expression von PITPNM2 in HEK-Zellen	53
4. 5 Nachweis von PITPnm2 in Thrombozyten.....	55
5. Diskussion	57
5. 1 Nachweis der PITPNM2-Transkripte in Thrombozyten	57
5. 2 Differenzielle Spliceprodukte des PITPNM2-Proteins in Thrombozyten ..	58
5. 3 Klonierung von PITPNM2	60
5. 4 Rekombinante Expression von PITPNM2.....	61
5. 5 Nachweis des PITPnm2-Proteins in Thrombozyten.....	61
5. 6 Funktion des PITPnm2-Proteins in Thrombozyten und Ausblick.....	62
6. Zusammenfassung / Summary.....	64
7. Literaturverzeichnis	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Transfer von Phosphatidylinositol zwischen zwei Membranen.	4
Abbildung 2:	Domänenstruktur des PITPnm2-Proteins	6
Abbildung 3:	Thrombozyten: Aktivierung und Inhibition der Aggregation	8
Abbildung 4:	Alternatives Splicen	11
Abbildung 5:	Ausschnitt aus dem Alignment von PITPNM 1, 2 und 3.....	36
Abbildung 6:	PCR-Produkte mit dem Primerpaar PITM_Fw und PITM_Re.	37
Abbildung 7:	Sequenz PCR-Produkt Plättchen-cDNA, PITM_Fw, PITM_Re.....	38
Abbildung 8:	PCR-Produkte mit den Primerpaaren PITM1 und PITM3.	39
Abbildung 9:	Alignment PITPNM2_1, PITPNM2_2 und PITPNM2_3.....	40
Abbildung 10:	PCR-Produkte mit dem Primerpaar PITM2_F1 und PITM2_R1.	42
Abbildung 11:	cDNA Sequenzen der Isoformen PITPNM2_1 und PITPNM2_2	42
Abbildung 12:	PCR-Produkte mit dem Primerpaar PITM2_F2 und PITM2_R2.	43
Abbildung 13:	PCR-Produkte mit Primerpaaren PITM2_A , PITM2_B, PITM2_C.....	44
Abbildung 14:	Sequenzierung Thrombozyten-cDNA, PITM2_B Primerpaar.	45
Abbildung 15:	Sequenz PITPNM2-Klon IRATp970G02136D.	47
Abbildung 16:	Sequenz DS2-Klon.	48
Abbildung 17:	Sequenz pCR2.1 (PITPNM2)-Klon.	51
Abbildung 18:	PCR-Produkte des Offenen Leserahmens von PITPNM2	52
Abbildung 19:	Plasmidpräparationen pCMV-SC-CF (PITPNM2).....	52
Abbildung 20:	Ponceau-S Färbung der HEK-Extrakte	54
Abbildung 21:	Western-Blot HEK-Extrakte, PITPnm2 Antikörper aus Tier 3127	54
Abbildung 22:	Western Blot HEK-Extrakte mit dem Anti-Flag-Antikörper.....	55
Abbildung 23:	Western Blot Thrombozyten-Proteinextrakte, Seren Tier 3128.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die vorkommenden PITP-Klassen in Homo sapiens.....	3
Tabelle 2: Fertigreagenzien und Kits.....	15
Tabelle 3: Verwendete Primer.....	16
Tabelle 4: Verwendete prokaryotische und eukaryotische Zellen	17
Tabelle 5: Verwendete Geräte	17
Tabelle 6: Primerpaar für die Amplifikation des Offenen Leserahmens PITPNM2.....	26
Tabelle 7: Primerpaare für den Nachweis PITPNM-Transkripte in Thrombozyten.....	37
Tabelle 8: Primerpaare zur Identifikation der PITPNM2 Isoformen.....	41
Tabelle 9: Primerpaare PITM2_A, B und C mit erwarteten Fragmentgrößen bei den Splicevarianten PITPNM2_1, 2 und 3 in [Bp].....	43
Tabelle 10: Primerpaar zur Überprüfung der Insertion des MscI-Fragments.....	49

Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase (Adenylylzyklase)
ADP	Adenosindiphosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
BNP	Brain natriuretic peptide
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNDP	Desoxynucleosiddiphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
Fw	Forward (vorwärts)
GC	Guanylatzyklase (Guanylylzyklase)
GC - A	Guanylatzyklase-A Rezeptor
GP	Glycoprotein
kB(p)	Kilobasen(paar)
kDa	Kilodalton
LB - Medium	Lysogeny broth Medium zur Kultivierung von Bakterien

Abkürzungen

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MscI	Schnittstelle TGGCCA für das MscI-Enzym
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Nir	PYK2 N-terminal domain-interacting receptors
NO	Stickstoffmonoxid
Oligo(dT)	Oligodeoxythymidin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween
PC	Phosphatidylcholin
pCMV-Sport6	Expressionsvektor (Invitrogen)
pCMV-SC-CF	Expressionsvektor (Stratagene)
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerasekettenreaktion)
Pfu-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums Pyrococcus furiosus
PI	Phosphatidylinositol
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PITP	Phosphatidylinositol-Transfer-Protein
PITPNM2	Phosphatidylinositol-Transfer-Protein, membranassoziiert, Gen
PITPnm2	Phosphatidylinositol-Transfer-Protein, membranassoziiert, Protein
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PRP	Platelet Rich Plasma (plättchenreiches Plasma)
PYK2	Proline-rich tyrosine kinase 2 (Prolinreiche Tyrosinkinase 2)
Rdg	Retinal degeneration gene
Rev	Reverse (rückwärts)
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)

Abkürzungen

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Taq-polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	TRIS Borat EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
vWF	von Willebrand Faktor

1. Einleitung

1. 1 Das Proteom humaner Thrombozyten

Das Phosphoproteom der Thrombozyten wird durch einen Pool aus Proteinen dargestellt, welcher zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter bestimmten Umständen durch Phosphorylierung modifiziert ist. Hierbei wird zwischen dem Phosphoproteom von aktivierten und von ruhenden Thrombozyten unterschieden¹. Um die Funktion der Thrombozyten besser zu verstehen wurde das Phosphoproteom in ruhenden Plättchen untersucht. Dabei konnten mehr als 270 Proteine identifiziert werden, die phosphoryliert vorlagen². Unter diesen Proteinen befanden sich auch mehrere potenzielle Substrate der Proteinkinase A und der Proteinkinase G². In weiteren Untersuchungen wurde herausgefunden, dass nach einer Stimulation von Thrombozyten durch Prostazyklin das Protein PITPnm2 an der Stelle Serin 1277 phosphoryliert wird. Diese Ergebnisse gaben Anlass zur weiteren Untersuchung über das Vorkommen und die Funktion dieses Proteins in Thrombozyten.

1. 2 Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine (PITP)

1. 2. 1 Entdeckung der Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine

Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine (PITP) wurden das erste Mal in den 70er Jahren beschrieben. Ursprünglich wurden diese Proteine von Hotta und Benzer in *Drosophila melanogaster* entdeckt³. Es wurden 2 Gene beschrieben, RdgA und RdgB („retinal degeneration gene“), deren Defekt zu einer lichtinduzierten retinalen Degeneration und einer abnormalen Reaktion der Photorezeptoren in *Drosophila* führte^{3,4}. Das RdgB-Gen wurde genauer untersucht und es wurde gezeigt, dass das RdgB-Gen für ein ca. 160 kDa großes membranassoziiertes Protein kodiert, welches eine Domäne besitzt, die Übereinstimmungen mit einem zu einem späteren Zeitpunkt in Ratten isolierten Phosphatidylinositol-Transfer-Protein besitzt^{5,6}. Die ersten homologen Gene in Säugetieren wurden gefunden, indem man die vorhandenen cDNA-Datenbanken mit der Sequenz des RdgB-Genes aus *Drosophila* verglich. Homologe Proteine wurden unter

anderem im Gehirn von Mäusen und Menschen, aber auch in Zebrafischen nachgewiesen^{7,8}.

1999 wurde von Sima Lev et al. gezeigt, dass die humanen homologen Proteine des RdgB-Proteins teilweise mit der PYK2-Proteinkinase interagieren⁹. Demzufolge werden diese interagierenden Proteine auch als Nir-Proteine bezeichnet („PYK2 N-terminal domain-interacting receptors“), von denen drei Proteine in der Literatur beschrieben wurden.

1. 2. 2 Einteilung und Struktur der Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine

Bisher wurden in Säugetieren 5 Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine identifiziert¹⁰. Alle diese Proteine besitzen eine PITP-Domäne und werden in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt¹¹. Klasse I Proteine sind kleine lösliche Proteine mit nur einer einzelnen Domäne. Sie sind weitverbreitet und finden sich unter anderem in Mäusen, Ratten, Kaninchen und Menschen¹¹.

Klasse IIA-Proteine sind die RdgB-Proteine und besitzen multiple Domänen bei einer Größe von 160 kDa. Sie haben ein neuronenspezifisches Verteilungsmuster mit einer hohen Expression in der Retina und im Gyrus Dentatus des Hippocampus¹¹. Zu diesen Proteinen gehört auch das Nir3/PITPnm2-Protein. Die Klasse IIB enthält eine lösliche Form der PITPnm-Proteine, welche 38 kDa schwer ist und in der Sequenz aber den Proteinen der Klasse IIA ähnelt. Dieses Protein befindet sich in Geweben wie Herz, Muskel, Niere und Leber¹¹.

Proteine mit PITP-Domäne		
Klasse I	Klasse II A	Klasse II B
PITP α	RdgBal/Nir2/PITPnm	RdgB β
PITP β	RdgBall/Nir3	

Tabelle 1: Übersicht über die vorkommenden PITP-Klassen in Homo sapiens

Strukturell soll nun auf die Proteine der Klasse IIA eingegangen werden. Multiple Sequenz-Alignments von Proteinen dieser Klasse zeigten große Ähnlichkeit über die gesamte Sequenz hinweg¹².

N-terminal besitzen diese Proteine eine Phosphatidylinositol-Transfer-Domäne, welche spezifische Phospholipide als Substrate erkennen und den Austausch von Phosphatidylinositol oder Phosphatidylcholin zwischen zwei Membranschichten *in vitro* katalysieren kann¹³.

Die Nir/RdgB-Proteine enthalten eine 15 Aminosäuren lange Region, in der vor allem die Aminosäuren Glutamat und Aspartat vorkommen ("acidic region"). Diese Region enthält ein FFAT-Motiv ("two phenylalanines (FF) in acidic tract"). Dieses Motiv spielt eine Rolle bei der Lipid-Bindung und Lipid-Erkennung. Auch wird bei dieser Region davon ausgegangen, dass sie eine Calciumbindungsstelle darstellt^{9,14}. Gefolgt wird diese Region von der DDHD-Domäne, welche möglicherweise eine Metall-Bindungsstelle darstellt. Die Funktion ist noch nicht abschließend geklärt¹². Der C-Terminus der Nir-Proteine stellt eine Protein-Interaktionsdomäne dar. Hier ließ sich weiterhin die Interaktion mit der Tyrosin-Kinase PYK2 feststellen⁹. Die strukturellen Besonderheiten der Nir-Proteine legten nahe, dass diese eine wichtige Rolle im Phospholipid-Metabolismus, bei intrazellulären Signalwegen und beim Zytoskelettremodeling einnehmen¹².

1. 2. 3 Funktion der Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine

Phosphatidylinositol kann an den Positionen 3, 4 und 5 des Inositols durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden. Phosphorylierte Inositole spielen eine wichtige Rolle in Signalkaskaden, im Membranstoffwechsel und in der Regulation des Zytoskeletts.

Die Funktion der Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine, welche sich zellulär in der Nähe des Golgi-Apparates befinden, ist die Bindung von Phosphatidylinositol (PI) oder Phosphatidylcholin (PC) und der Transport dieser Lipide zwischen verschiedenen Membranen. Die löslichen PITP sind in der Lage, nach der Bindung von Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin diese durch die wässrige Phase von einer Donor-Membran zu einer Akzeptor-Membran zu transportieren¹³.

Dazu muss das PITP an die Donor-Membran andocken. Das Apoprotein extrahiert ein Lipid von der Donor-Membran, jetzt kann das Lipid-gebundene PITP wegdiffundieren und das Lipid an eine Akzeptor-Membran abgeben. Dies wird in folgender Abbildung dargestellt:

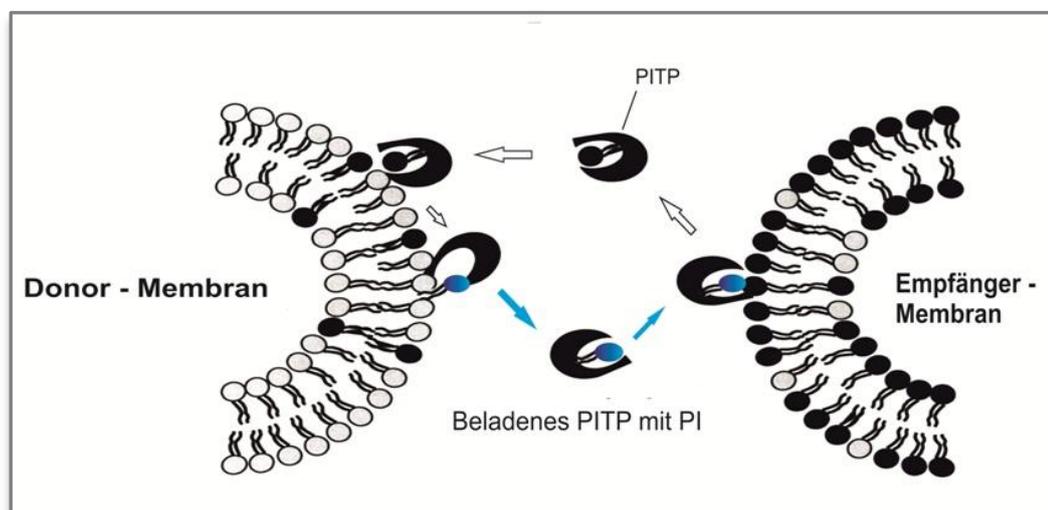


Abbildung 1: Transfer von Phosphatidylinositol zwischen zwei Membranen
 Modifiziert nach "Figure 1, Phosphatidylinositol transfer proteins couple lipid transport to phosphoinositide synthesis, *Shamshad Cockcroft*¹³."

Auch können die PITP die Lipidzusammensetzung einer Membran wahrnehmen und daraufhin PI gegen PC zweier Membranen austauschen¹³. Desweiteren spielen PITP bei der Signaltransduktion, zum Beispiel im Phospholipase C-Signalweg, eine Rolle. Bei diesem Signalweg, welcher letztendlich zu einer Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration führt, wird Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂) durch die Phospholipase C aus der Zellmembran gelöst und gespalten. PIP₂ entsteht durch die doppelte Phosphorylierung von PI. Die PITPs können nun den Pool an PI wieder auffüllen und haben somit für den PLC-Signalweg eine entscheidende Bedeutung¹³. Es wird davon ausgegangen, dass die PITPs bei der Regulation der Exozytose beteiligt sind und für den Vesikeltransport vom endoplasmatischem Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat und auch für den Vesikeltransport innerhalb des Golgi-Apparates von Bedeutung sind. Die Proteine sind am endoplasmatischen Retikulum und am cis-Golgi-Netzwerk lokalisiert¹². Nir2-Proteine sind dabei wichtig für die Aufrechterhaltung der Struktur und der funktionellen Integrität des Golgi-Apparates in Säugetierzellen. Diese wird über den Spiegel von Diacylglycerol (DAG) im Golgi-Apparat reguliert, welcher wiederum durch das Nir2-Protein beeinflusst wird¹⁵.

1. 2. 4 "Gen-Knockout" der Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine

"Gen-Knockout" Mäuse für Nir3/PITPNM2 zeigten weder in der Funktion der Photorezeptoren noch in der Funktion und Überlebensfähigkeit der Mäuse Einschränkungen¹². Im Gegensatz dazu kam es bei Mäusen, bei denen das Nir2/RdgBal Gen mit derselben Methodik ausgeschaltet wurde, zu einem frühen embryonalen Tod¹⁶. Eine Mutation des PITP α -Proteins führte zu einem progressiven Aktionstremor, einer Degeneration des Gehirnstammes und von Neuronen des Rückenmarks, gefolgt von einem frühen juvenilen Tod¹¹. Ein Defekt des PITP β -Proteins führte zu einer schweren Fehlentwicklung in der frühen embryonalen Phase¹⁷.

1. 3 Das Phosphatidylinositol-Transfer-Protein PITPnm2

1. 3. 1 Das PITPNM2-Gen

Das Gen des PITPnm2-Proteins, welches ungefähr 127 kB groß ist und 25 Exons enthält, liegt auf Chromosom 12q24.3¹⁸. Das Gen wurde im Menschen das erste Mal 1997 von Aikawa et al. beschrieben⁷.

1. 3. 2 Das PITPnm2-Protein

Das PITPnm2-Protein ist wie die anderen Proteine der Klasse IIA der Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine aufgebaut. N-Terminal befindet sich die PITP-Domäne, gefolgt von einer kurzen Region mit sauren Aminosäuren („acidic region“, AR). Im zentralen Teil befindet sich die DDHD-Domäne und C-Terminal die Protein-Interaktionsdomäne (siehe Abbildung 2). In der Literatur sind aktuell 10 differenzielle Splicevarianten (Stand Dezember 2011) des PITPnm2-Proteins beschrieben.

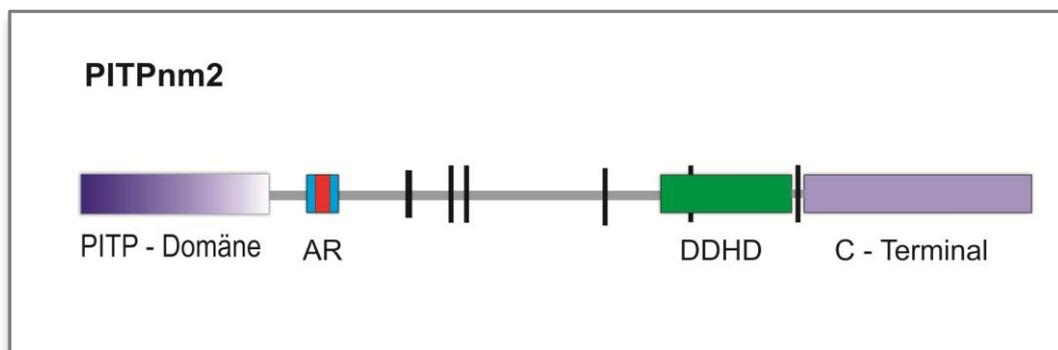


Abbildung 2: Domänenstruktur des PITPnm2-Proteins

Modifiziert nach "Figure 1, The role of the Nir/RdgB protein family in membrane trafficking and cytoskeleton remodeling", Sima Lev et al¹².

1. 3. 3 Funktion des PITPnm2-Proteins in Thrombozyten

Die Funktion des PITPnm2-Proteins in Thrombozyten ist noch ungeklärt. Bisher konnte gezeigt werden, dass das PITPnm2-Protein aufgrund bestimmter Stimuli von Thrombozyten eine Phosphorylierung aufweist und diese Phosphorylierungsstelle konnte identifiziert werden. Die Phosphorylierung stellt eine sehr häufig auftretende posttranslationale Modifikation von Proteinen dar und ist an nahezu allen zellulären Prozessen beteiligt. Durch massenspektrometrische Analysen konnten Zahedi und Mitarbeiter in nicht-aktivierten Thrombozyten mehr als 600 Phosphorylierungsstellen identifizieren². Massenspektrometrische Methoden erlauben es, den Phosphorylierungsgrad von Proteinen durch Proteinkinasen im nicht-aktivierten und aktivierten Zustand der Thrombozyten zu quantifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass das PITPnm2-Protein im aktivierten Zustand eine um den Faktor 17,8 erhöhte Phosphorylierung nach Stimulation von Plättchen mit dem Prostaglandinagonisten Iloprost aufweist als im nicht-aktivierten Zustand (pers. Mitteilung A. Sickmann, Stepan Gambaryan). Die Phosphorylierungsstelle ist die Aminosäure Serin 1277, welche sich C-Terminal in der Protein-Interaktionsdomäne befindet. Die Bindung des Prostaglandinagonisten Iloprost an seinen transmembranösen PGI₂-Rezeptor (siehe Abbildung 3), welcher Gs-Protein gekoppelt ist, führt intrazellulär zu einer cAMP-Erhöhung¹⁹. Es wird davon ausgegangen, dass das PITPnm2-Protein ein Substrat der cAMP-abhängigen Proteinkinase A ist.

Eine intrazelluläre cAMP- oder cGMP-Erhöhung ist ein sehr potenter endogener Mechanismus für die Plättcheninhibition. Über die Synthesefunktion werden diese zyklischen Nukleotide durch die Adenylatzyklen oder die Guanylatzyklen hochreguliert, über die Spaltung durch Phosphodiesterasen vermindert sich die Konzentration der zyklischen Nukleotide¹⁹. Die Folge der Erhöhung des cAMP- und des cGMP-Spiegels ist die Aktivierung von cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen (Proteinkinase A, Proteinkinase G). Eine Aktivierung dieser Kinasen führt zu einer Phosphorylierung von weiteren Proteinen.

Dies führt dann letztendlich zur Inhibition der Plättchenaggregation¹⁹. Als Gegenmechanismus aktivieren einige Plättchen-Aktivatoren wie ADP, Epinephrin und Thrombin ein inhibitorisches $G\alpha$ -Protein, was zu einem Abfall des cAMP-Levels führt¹⁹.

Die folgende Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über verschiedene Signalwege, die bei der Plättchenaktivierung und der Plättcheninhibition eine Rolle spielen. So kommt es nach Thrombinstimulation von Plättchen zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung, was eine Aktivierung des $GP_{\alpha_2\beta_3}$ bedingt und auf diese Weise mit vielen anderen Faktoren auf den Weg der Plättchenaggregation führt. Andere Mechanismen wirken der Plättchenaggregation entgegen: Die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) führt zu einer Erhöhung von cGMP, durch Prostaglandinstimulation wird der intrazelluläre cAMP-Gehalt erhöht, beides wirkt der Plättchenaggregation entgegen.

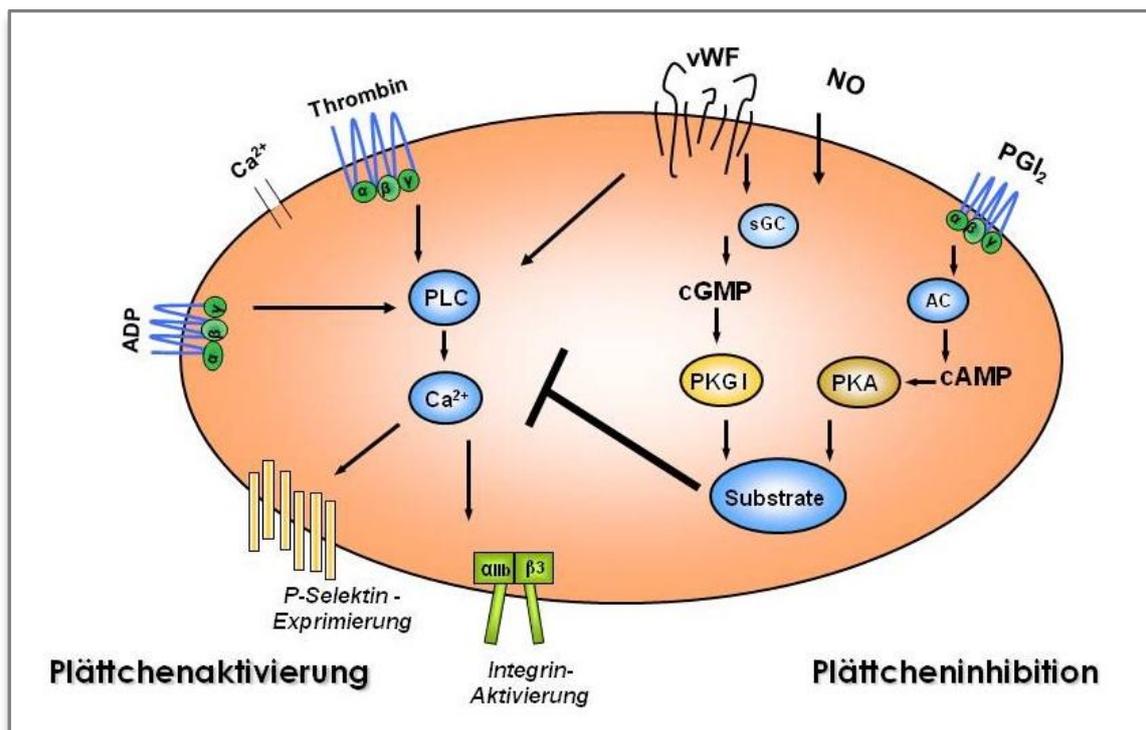


Abbildung 3: Thrombozyten: Aktivierung und Inhibition der Aggregation

ADP: Adenosindiphosphat, AC: Adenylatzyklase, Ca^{2+} : Calcium, cAMP: zyklisches Adenosin-Monophosphat, cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, $GP_{\alpha_2\beta_3}$: Glykoprotein $\alpha_2\beta_3$, NO: Stickstoffmonoxid, PKA: Proteinkinase A, PKGI: Proteinkinase GI, PGI₂: Prostaglandin I₂, PLC: Phospholipase C, sGC: lösliche Guanylatzyklase, vWF: von-Willebrand-Faktor.

1. 4 Alternatives Splicen

Das alternative Splicen stellt einen zentralen Vorgang im Rahmen der Translation bei höheren Eukaryoten dar und ist somit ein wichtiger Teil der genetischen Regulation. Neben dem konstitutiven Splicen, bei dem alle Exons des ursprünglichen Gens übernommen werden, gibt es das alternative Splicen, bei dem die prä-mRNA durch Herausschneiden bestimmter Exons oder durch die Verwendung verschiedener Splice Stellen so verändert wird, dass aus ein und derselben DNA-Sequenz mehrere verschiedene RNA-Moleküle entstehen können und somit letztendlich unterschiedliche Proteine. Das alternative Splicen kann auch als Regulationsmechanismus aufgefasst werden, bei welchem situationsabhängig spezifische Splice-Muster aktiviert werden und somit das aktuelle Proteom einer Zelle beeinflusst wird. Analysen zeigten dass 92%-94% der menschlichen Gene alternativ gespliced werden²⁰. Auch wurde gezeigt, dass alternatives Splicen und Polyadenylierung von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich sind²⁰. Alternatives Splicen wird durch die zweigeteilte Natur der menschlichen DNA notwendig, welche aus Exons und Introns besteht. Die Introns sind nicht kodierend und müssen aus der initialen prä-mRNA entfernt werden, die Exons werden miteinander verknüpft. Das findet mit Hilfe eines Proteinkomplexes, dem Spliceosom, statt²¹. Alterationen mit differenziellen Splice-Stellen können viele unterschiedliche Effekte auf die mRNA und das Protein-Produkt eines Gens haben. Folge des alternativen Splicens ist, dass von einem Gen verschiedene Isoformen existieren, die sich in ihrer chemischen und biologischen Funktion deutlich unterscheiden können²². Bereits kleine Veränderungen in der Peptid-Sequenz eines Proteins können Auswirkungen auf die Ligandenbindung, die enzymatische Aktivität, die allosterische Regulation oder auf die Proteinlokalisierung haben²³.

1. 4. 1 Formen des alternativen Splicens

Es gibt fünf Formen des alternativen Splicens (siehe Abbildung 4)^{21,23,24}:

- (1) "Exon skipping" oder "Cassette Exon": Hier werden Exons „übersprungen“. Diese Form wird bei Säugetieren am häufigsten beobachtet. Ist die Anzahl der Basen des übersprungenen Exons durch 3 teilbar, so bleibt der Offene Leserahmen des Proteins erhalten. Ist dies nicht der Fall, wird die Proteinbiosynthese oft nach dem Einbau weniger Aminosäuren terminiert.
- (2) Unterschiedliche Donor-Splice-Stellen eines Exons: Eine alternative 5´-Splice-Stelle (Donor-Seite) wird verwendet.
- (3) Unterschiedliche Akzeptor-Splice-Stellen eines Exons: Eine alternative 3´-Splice-Stelle (Akzeptor-Stelle) wird verwendet.
- (4) Beibehalten eines Introns („Intron retention“): Der Unterschied zum Exon-Skipping besteht darin, dass die beibehaltene Sequenz nicht von Introns flankiert wird. Auch hier gilt wieder, dass der Offene Leserahmen nur erhalten bleibt, wenn das Intron eine durch 3 teilbare Anzahl an Basen aufweist und nicht für ein Stopp-Codon codiert. Dieses alternative Splicen ist bei den Säugetieren selten zu finden.
- (5) Sich gegenseitig ausschließende Exons. Nur eines von zwei Exons kann in der mRNA vorkommen.

Darüber hinaus gibt es weitere Möglichkeiten, aus einem Gen unterschiedliche Transkripte zu generieren: Die Verwendung multipler Promotoren und/oder multipler Polyadenylierungsstellen führt auch zu unterschiedlichen prä-mRNAs. Zusammen mit dem alternativen Splicen sorgen diese Mechanismen für eine große Vielfalt an Proteinen: So können Splicevarianten entwicklungspezifisch oder gewebespezifisch unterschiedliche Funktionen ausüben. Daher ist es wichtig, bei dem Nachweis eines Proteins auch dessen Varianten zu identifizieren.

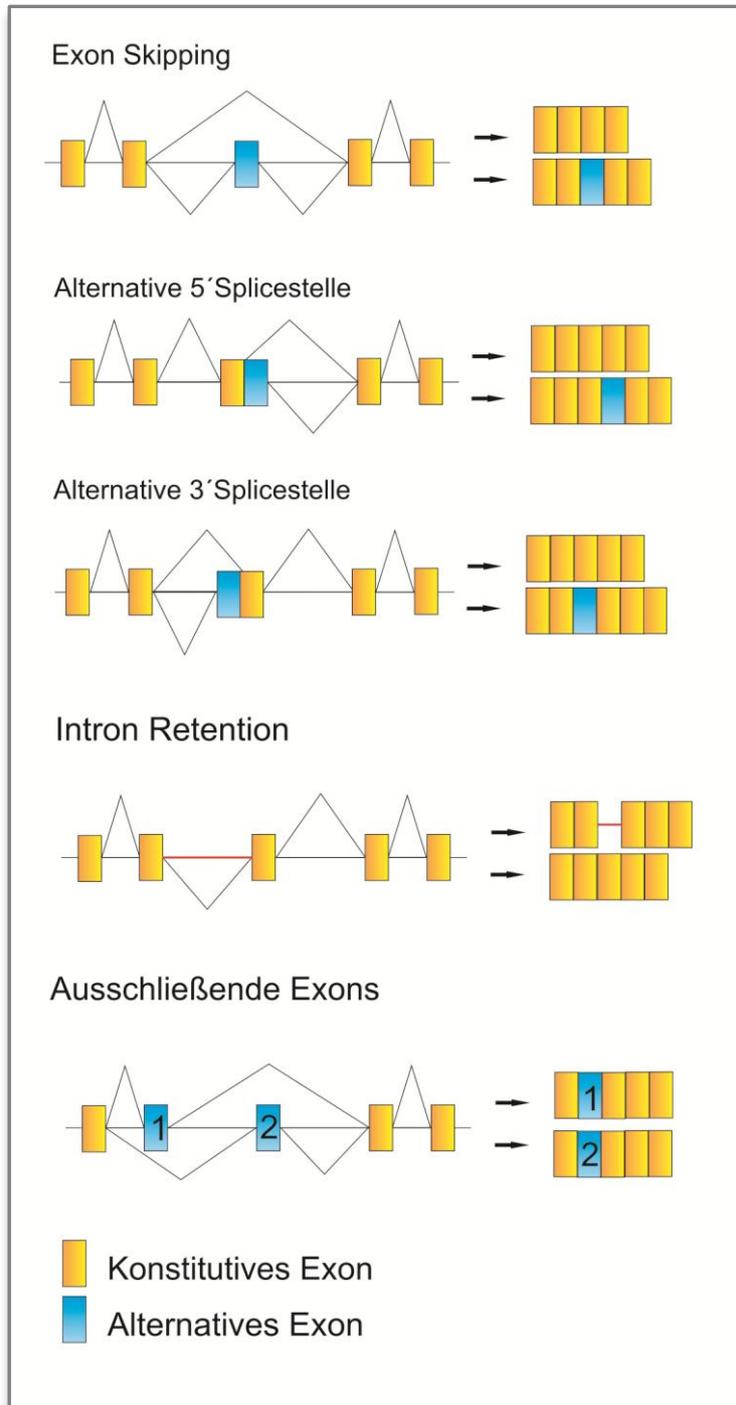


Abbildung 4: Alternatives Splicen

Modifiziert nach: "Figure 2, Alternative Splicing: New Insights from Global Analyses", Benjamin J. Blencowe²⁵.

1. 4. 2 Funktion des alternativen Splicens

Alternatives Splicen kann als Regulationsmechanismus aufgefasst werden, in welchem situationsabhängig spezifische Splice-Muster aktiviert werden und somit das aktuelle Proteom einer Zelle beeinflusst wird. Als Beispiel soll hier die Funktion des alternativen Splicens anhand des Guanylatzyklase-A Rezeptors (GC-A) dargestellt werden²⁶. Der Blutdruck wird über Stimulation dieses Rezeptors durch die natriuretischen Peptide (ANP, BNP) moduliert, eine konsekutive Erhöhung der zytoplasmatischen cGMP-Konzentration führt zu einer Vasodilatation und einer Senkung des Blutdruckes. 2008 konnte in Mausgewebe eine alternative Splicevariante des GC-A Rezeptors identifiziert werden²⁶, welcher 17 Aminosäuren im mittleren Teil des Proteins fehlen. Es wurde gezeigt, dass diese Splicevariante des Rezeptors aufgrund einer gestörten Rezeptor-Dimerbildung kein ANP binden kann und somit zu einem Funktionsverlust des Proteins führt. Eine Exposition von Mäusen mit dem vasokonstriktorisches Hormon Angiotensin II führte zu einer verstärkten Expression der alternativen funktionslosen Splicevariante. Dies könnte einen neuen Mechanismus darstellen, um die Sensitivität des GC-A Rezeptors gegenüber ANP und BNP zu vermindern²⁶. Aus diesem Beispiel wird ersichtlich, welche wichtige Rolle die Expression verschiedener Splicevarianten auf den Organismus und auf die Regulation bestimmter Mechanismen haben kann.

2. Zielsetzung

Thrombozyten spielen bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle. Einerseits gibt es Signaltransduktionswege, welche zu einer Aktivierung der Plättchenfunktion (ADP, Epinephrin, Thrombin) führen. Andererseits gibt es auch Signalkaskaden, welche die gegensätzliche Funktion besitzen, sie leiten nämlich eine Inhibition der Plättchenaggregation ein. Hierzu zählen unter anderem der cGMP- und der cAMP-Signalweg (siehe Kapitel 1.3.3). Bei der Untersuchung des Phosphoproteoms von Thrombozyten wurden Phosphorylierungsstellen von mehreren Proteinen gefunden. Hierbei konnte PITPnm2 im Phosphoproteom von humanen Thrombozyten nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass das PITPnm2-Protein bei einer Stimulation von Thrombozyten mit dem Prostazyklinanalogon Iloprost phosphoryliert wird. Prostazyklin vermittelt eine Inhibition der Plättchenaggregation.

Zielsetzung dieser Arbeit ist der Nachweis und die Identifikation des PITPnm2-Proteins in humanen Thrombozyten sowie die Charakterisierung des PITPNM2-Transkripts. Unterschiedliche Splicevarianten des PITPNM2-Transkripts sind bekannt, die Translation dieser unterschiedlichen Transkripte führt zu unterschiedlichen PITPnm2-Proteinen. Diese Splicevarianten sollen in humanen Thrombozyten auf cDNA-Ebene identifiziert werden.

Desweiteren soll gezeigt werden, ob noch andere Transkripte der PITPnm-Proteine außer dem PITPNM2-Transkript in humanen Thrombozyten vorhanden sind. Dieser Nachweis erfolgt ebenfalls auf cDNA-Ebene.

Eine weitere Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit ist die Expressionsklonierung von PITPnm2. Durch diesen Klon soll die Funktion des PITPnm2-Proteins weiter untersucht werden. PITPnm2 wurde als Fusionsprotein mit einem "Tag" kloniert, so dass dieser Klon auch für die Testung von Antikörpern und für weitere funktionelle Untersuchungen herangezogen werden kann.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Fertigreagenzien und Kits

Hersteller / Lieferfirma (Firmensitz)	Material
Amersham (Freiburg, Deutschland)	EXO SAP IT™ (Art.Nr.: US78200) ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Art.Nr.: RPN2106)
Applichem (Darmstadt, Deutschland)	Coomassie Brilliant Blue G250 (Art.Nr.:A3480,0010) Ethidiumbromid (Art.Nr.: A1152,0025) X-Gal (Art.Nr.: A 1007,0250), TEMED (Art.Nr.: A1148,0025) DTT (Art.Nr.: A19480010)
Beckman-Coulter (Krefeld, Deutschland)	GenomeLab DTCS - Quick Start Kit (Art. Nr.: 608120)
Biogenes (Berlin, Deutschland)	Polyklonale PITPnm2-Antikörper 3127, 3128
Bio Rad (Hercules, USA)	Precision Plus Protein Standards (Art.Nr.: 161-0374)
Fermentas (Burlington, England)	GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Art.Nr.: SM0321) Page Ruler Prestained Protein Ladder (Art.Nr.: SM0671)
Fujifilm (Tokio, Japan)	Fuji Medical Super RX (Art.Nr.: 4741008389)
Greiner (Kremsmünster, Österreich)	6-Well Platte (Art.Nr: 657-16) 50ml – Röhrchen (Art. Nr.: 227 261)
Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)	SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Art. Nr.: 11904-018) Topo TA Cloning Kit (Art.Nr.: 450001) DMEM (Art.Nr.: 31966-047), FCS (Art.Nr.: 10270) PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Art.Nr.: 12183-018) Trypsin (Gibco Art.Nr.: 25300) PBS-Puffer (Gibco Art.Nr.: 14190)

Jackson Immuno Research (West Grove, USA)	Goat Anti-Rabbit IgG (Art.Nr.: 111-035-046)
Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)	NucleoSpin Plasmid (Art. Nr.: 740 588 50)
New England Biolabs (Ipswich, USA)	EcoRI (Art. Nr: Art. Nr: R3101S) MscI (Art.Nr.: R0534S)
Peqlab (Erlangen, Deutschland)	PeqGOLD Universal Agarose (Art. Nr.: 35-1020)
Qiagen (Hilden, Deutschland)	MinElute Gel Extraction Kit (Art. Nr. 28604) HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Art. Nr: 12662)
Roche (Basel, Schweiz)	FuGENE 6 Transfection Reagent (Art.Nr.: 11 814 443 001) Expand Long Range dNTP Pacl (Art.Nr.: 04829034001) Roche complete EDTA free (Art.Nr.: 04693132001)
Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Kanamycin (Art.Nr.: T832.1) Milchpulver (Art.Nr.: T145.1)
Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)	Tween 20 (Art.Nr.: 080168) Anti - Flag M2 Monoclonal Antibody (Art.Nr.: F3165)
Sigma Aldrich (St. Louis, USA)	2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol) (Art. Nr.: M6250) 123 Bp DNA Ladder (Art.Nr.: D5042) Penicillin-Streptomycin (Art.Nr.: P0781) EGTA (Art.Nr.: E4378) Anti-Flag monoklonaler Antikörper (Art.Nr.: F3165)
Stratagene (jetzt Agilent Technologies, Santa Clara, USA)	StrataClone Mammalian Expressions Vector Systems, C-terminal FLAG Vector System (Art.Nr.: 240230) QuickChange Mult Site-Directed Mutagenesis Kit (Art.Nr.: 200514) Pfu DNA-Polymerase (Art.Nr.: 600135)

Tabelle 2: Fertigreagenzien und Kits

3. 1. 2 Primer

Primername	Sequenz
PITM_Fw	CCACGCCAGCTACTGGGAGTC
PITM_Re	CTTGGGGTTCGCTGCCCATGAT
PITM1_Fw	AGTCCACGCCCTCTTCCTTA
PITM1_Re	CTGAGTAGGCCTGGTTGGTG
PITM3_Fw	CCTTCGATGCCATCTGCTAC
PITM3_Re	CGAGCCGAAGAGGAAGAAGT
PITM2_F1	AACGAGACATATGGCGAAGG
PITM2_R1	TG TTCAGCTGCTCCACACTG
PITM2_F2	GTCCTGGCCTTGAGGAAGAC
PITM2_R2	TGTGGGTCTGGAGCACAGCCG
PITM2_F_2	GGTTCACCTGTCCTTTCGTG
PITM2_F6	CGTAAGATGGCCCAGTTCAA
PITM2_F7	CTGGAACGGCGCTTTCAC
PITM2_F8	GCTCTGCCTCACCTCTTCC
PITM2_F10	GCTCTGCCTCACCTCTTCC
PITM2_F11	GGCACAGAGTTCGTGGTCTT
PITM2_F12	CAGCAGTGCCAGTTCATCAC
PITM2_AFw	AGCAGTCAGGACCACATTCC
PITM2_ARe	GGTGAACACCGACACTTCCT
PITM2_BFw	TGGAACGGCGCTTTCAC
PITM2_BRe	AGGACCAGCTCAGGGTTTCT
PITM2_CFw	CTACACGGCATCCAGCATC
PITM2_CRe	GCTGGGGGTATGGCTGAG
PITM2_RSeq4	CCCGGTGGCTGTACTTCA
PITM2R_Klon	GTCTTCCTCAAGGCCAGGAC
PITM2_Ex_F	GGCGGCCGCATGATTATAAAGGAATATCGGA
PITM2_Ex_R	GGCCTTGGGGCCCGCGGCT
T3 Vektorprimer	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7 Vektorprimer	TAATACGACTCACTATAGGG

Tabelle 3: Verwendete Primer

3. 1. 3 Zellen

Zelltyp	Beschreibung
HeLa	Aus menschlichem Gebärmutterhalskrebs isolierte Zellen (ATCC-Nummer: CCL-2)
Leukozyten für cDNA Synthese	aus Spenderblut isoliert
HEK 293	menschliche embryonale Nierenzellen, Zelllinie 293
DH 5 Zellen	E.coli Zellen
StrataClone SoloPack kompetente Zellen	Zellen aus „StrataClone PCR Cloning Kit“ von Stratagene (Katalog-Nr.: 240205)
One Shot Chemically competent E.coli	Zellen aus „Topo TA Cloning Kit“ von Invitrogen (Art.Nr.: 450001)
XL1-Blue kompetente Zellen	Zellen aus „QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Art.Nr.: 200514)“ von Stratagene

Tabelle 4: Verwendete prokaryotische und eukaryotische Zellen

3. 1. 4 Geräte

Hersteller (Firmensitz)	Gerät
Beckman-Coulter (Krefeld, Deutschland)	Sequenzer CEQ 8000 Allegra 2IR Zentrifuge
Biometra (Jena, Deutschland)	TGradient Thermocycler
Bio Rad (Hercules, USA)	MyCycler
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Zentrifuge 5810 R
Sigma Aldrich (St. Louis, USA)	Zentrifuge 3K-1

Tabelle 5: Verwendete Geräte

3. 2 Methoden

3. 2. 1 Herstellung von gewaschenen Plättchen ("washed platelets")

Ziel dieser Methode ist die Gewinnung von Thrombozyten aus frisch abgenommenem Vollblut. Zuerst werden in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen jeweils 10 ml CCD-Puffer (100 mM Natriumcitrat, 7 mM Zitronensäure, 140 mM Glucose) mit 15 mM EGTA (Sigma Aldrich) vorgelegt. Das EGTA dient als Antikoagulans, alternativ kann der CCD-Puffer auch mit 100 µM Acetylsalicylsäure als Endkonzentration versetzt werden. Diese beiden Greiner-Röhrchen werden nun mit jeweils 40 ml frisch venös abgenommenem Blut gefüllt. Das Blut wird durch eine Venenpunktion, z.B. in der Ellenbeuge eines freiwilligen Spenders, gewonnen. Durch ein- bis zweimaliges vorsichtiges Schwenken der beiden Greiner-Röhrchen wird das Blut mit der Pufferlösung vermischt. Im ersten Schritt werden die beiden Röhrchen 20 min bei 300 x g und 18° C zentrifugiert. Der Überstand, auch PRP („Platelet Rich Plasma“) genannt, wird nun vorsichtig mit einer Einwegpipette abgenommen und in frischen 50 ml Greiner-Röhrchen 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgt nochmals ein Zentrifugationsschritt bei 320 x g für 10 min mit dem Ziel, das PRP weiter von anderen Zellen, wie z.B. Erythrozyten, zu reinigen. Der Überstand wird erneut abpipettiert und 10 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Im letzten Schritt wird das gereinigte PRP durch eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 380 x g und 18° C zu washed platelets weiterverarbeitet. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das entstandene Plättchen-Pellet wird in 5 ml HEPES-Puffer aufgenommen (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, pH = 7,4) und die Thrombozyten-Suspension wird erneut bei 380 g für 10 min bei 18° C pelletiert. Das Pellet wird umgehend in 300-500 µl Lysis-Puffer aufgenommen. Dieser Puffer ist in dem PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System enthalten, muss aber vor Gebrauch noch mit 2-Mercaptoethanol (10 µl pro 1 ml Lysis-Puffer) versetzt werden.

3. 2. 2 Isolation von RNA aus Thrombozyten

Zur RNA-Isolation aus den „washed platelets“ wird das "PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System" von Invitrogen verwendet. Das Plättchen-Pellet wird in Lysis-Puffer, der mit 2-Mercaptoethanol (10 µl pro 1 ml Lysis-Puffer) versetzt ist, aufgenommen. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wird das Pellet in 300-500 µl Lysis-Puffer vollständig gelöst bis eine klare Suspension ohne Präzipitate entstanden ist. Anschließend wird die Suspension mit gleicher Menge an 70% Ethanol (Avantor) versetzt und gevortext. Um die Thrombozyten-RNA zu isolieren wird die Probe nun in eine RNA-bindende Membran pipettiert, welche in ein Sammelröhrchen eingesetzt ist. Die Probe wird bei 12,000 x g und Raumtemperatur für 15 s zentrifugiert, der Durchfluss wird verworfen und in den Einsatz werden 700 µl Wasch-Puffer I gegeben. Es folgt ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 12,000 x g und Raumtemperatur für 15 s. Nach erneuter Verwerfung des Durchflusses wird der Dreheinsatz in eine RNA „Wash Tube“ eingesetzt. Es werden 500 µl des Wasch-Puffers II hinzugegeben und es erfolgt wiederum eine Zentrifugation mit den gleichen Bedingungen wie im Schritt zuvor. Dieser Schritt wird danach noch einmal wiederholt. Um die Membran mit der aufgelagerten RNA zu trocknen wird der Dreheinsatz nun für eine Minute bei 12,000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, danach werden 30-40 µl RNase-freies Wasser auf die Mitte des Dreheinsatzes gegeben und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Um die RNA zu eluieren wird der Einsatz nun auf ein frisches Sammelröhrchen gesetzt und bei 15,000 x g für 2 min zentrifugiert. Man erhält nun 30-40 µl isolierte Thrombozyten-RNA.

3. 2. 3 cDNA Synthese

Die gewonnene Thrombozyten-RNA wird in cDNA umgeschrieben, cDNA steht für „complementary DNA“ und wird mittels des Enzyms reverser Transkriptase (RT) aus mRNA synthetisiert. Als Enzym wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet. Die Umschreibung erfolgt mithilfe des SuperScript First-Strand Synthesis System für RT-PCR von Invitrogen. Dieser Ansatz bezieht sich nun auf die Herstellung von jeweils 20 µl Thrombozyten-cDNA, welche sowohl mit Oligo(dT) Primern als auch mit zufälligen Hexamer-Oligonukleotiden („random hexamers“, zufällig zusammengesetzte Nukleotide) hergestellt wird. Alle Komponenten des Systems werden direkt vor Gebrauch nochmals kurz zentrifugiert. In einem sterilen PCR-Tube wird folgender Ansatz vorbereitet: Für jeden Ansatz wird 1 µl 10 mM dNTP Mix vorgelegt, dazu wird entweder 1 µl Oligo(dT, 0.5 µg/µl) oder 1 µl random Hexamers hinzupipettiert. Die beiden Ansätze werden nun auf insgesamt 10 µl mit jeweils 8 µl Thrombozyten-RNA aufgefüllt. Die Proben werden 5 min bei 65° C inkubiert und danach mindestens eine Minute auf Eis gestellt. In dieser Zeit werden für jeden Ansatz folgende Komponenten zusammengestellt: 2 µl 10 X RT Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0.1 M DTT und 1 µl RNaseOUT™ (Rekombinanter RNase Inhibitor). Diese Komponenten werden zu der RNA/Primer-Mischung hinzugegeben, behutsam gemischt und kurz zentrifugiert. Diese Proben werden 2 min bei 42° C inkubiert. Nun wird zu jeder Probe 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase zugegeben und bei 42° C für 50 min inkubiert. Um die Reaktion zu beenden erfolgt eine kurze Inkubation bei 70° C für 15 min. Die Proben werden nun für einige Minuten im Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert, jeweils 1 µl RNase H hinzugegeben und bei 37° C für 20 min inkubiert.

3. 2. 4 Vervielfältigung von DNA durch PCR

Zur Anreicherung spezifischer DNA-Fragmente dient die PCR nach Mullis et al²⁷. Die Amplifikation von cDNA zum Nachweis unterschiedlicher Transkriptvarianten wird mit der *Taq*-Polymerase (Eigenisolation, Klinik für Psychiatrie) durchgeführt.

Der PCR-Ansatz wird in einem Volumen von 25 µl durchgeführt, die Konzentration der Primer beträgt 0,2 µM. Die Reaktion wird in 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH = 8,3, 1,5 mM MgCl₂ und 0,25 % Tween 20 durchgeführt. Pro Ansatz werden 0,2 µl *Taq*-Polymerase verwendet. Als Template wird 1 µl der cDNA eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wird zur vollständigen Denaturierung für 2 min auf 96° C erhitzt. Daran schließen sich 30 PCR-Zyklen (96° C 20 s, 58° C 30 s, 72° C 1 min) an. Bei allen PCR-Produkten, die kloniert werden sollen, wird anstatt der *Taq*-Polymerase die *Pfu*-Polymerase (Stratagene) verwendet. Diese Polymerase besitzt eine höhere Genauigkeit bei der Kopierung der Matrize. Dabei wird der von der Firma (Stratagene) mitgelieferte 10-fach-Puffer verwendet. Die Primerkonzentration beträgt auch hier 0,2 µM, die Template-Menge 1 µl der cDNA. Die Durchführung erfolgt unter Verwendung des *Taq*-Polymerase-Protokolls, als Hybridisierungstemperatur werden allerdings 56° C gewählt und nach den PCR-Zyklen schließt sich eine 5-minütige Inkubation bei 72° C an.

Für die Umklonierung von PITPNM2 wird die "Expand Long Range Polymerase" (Roche) verwendet. Auch diese Polymerase besitzt eine höhere Genauigkeit bei der Kopierung der Matrize und ist in der Lage, auch größere PCR-Produkte fehlerfrei zu generieren. Dabei wird der von der Firma mitgelieferte 10-fach-Puffer verwendet. Die Primerkonzentration beträgt auch hier 0,2 µM und die Template-Menge 1 µl einer 1:10 verdünnten Plasmid-DNA. Dem PCR-Ansatz wird Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt (Endkonzentration: 3%). Bei der Durchführung werden 10 PCR-Zyklen (96° C für 10 s, 58° C für 15 s und 68° C für 4 min) gefolgt von 20 PCR-Zyklen (96° C für 10 s, 58° C für 15 s und 68° C für 4 min + 20 s zusätzlich/Zyklus) verwendet. Eine 7-minütige Inkubation bei 68° C schließt sich an.

3. 2. 5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wird mithilfe einer Gelelektrophorese durchgeführt. Es wird ein 1-prozentiges Agarosegel verwendet, wofür 1 g peqGOLD Universal Agarose mit 100 ml 1x TBE-Puffer (10,8 g Tris Base, 5,5 g Borsäure, 0,75 g EDTA-Dinatriumsalz ad 1 l demineralisiertes H₂O) in einen Erlenmeyerkolben gegeben wird, kurz geschwenkt und für 5 min in einer Mikrowelle erhitzt werden. Die Agarose sollte vollständig aufgelöst sein und wird danach auf 60° C abgekühlt bevor 2 µl Ethidiumbromid (2 mg/ml in H₂O) hinzugegeben werden. Die noch flüssige Agarose wird nun in einen Gelschlitten gegossen, welcher vorher mit Klebestreifen abgedichtet worden ist. Danach werden je nach Gelschlitten und benötigter Anzahl von Taschen die entsprechenden Kämme eingesetzt. Das Agarosegel wird eine halbe Stunde bei Raumtemperatur ausgehärtet, die Klebestreifen werden abgezogen und die Kämme entfernt. Durch das Einsetzen der Kämme sind mehrere Taschen entstanden, welche mit den entsprechenden Proben befüllt werden können. Das Agarosegel wird zusammen mit dem Gelschlitten in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt, welche vorher mit 1 x TBE-Laufpuffer gefüllt wurde. Die Proben werden vor der Beladung in die Taschen mit einem Stopppuffer (30% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau in 1 x TBE) gemischt. Hierfür werden auf eine dafür vorgesehene Platte jeweils 2 µl des Stopppuffers in kleine Taschen aufgetragen und mit 5 µl der entsprechenden Probe durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt. Danach wird das Gel mit 2 µl eines Längenstandards, hier die 123 Bp DNA Leiter und GeneRuler™ 100bp Plus DNA Leiter, und den Proben beladen. Bei einer Spannung von 10 Volt/cm wird das Gel für 30 min in der Gelelektrophoresekammer unter den Einfluss eines elektrischen Feldes gesetzt. Die DNA wandert abhängig von ihrer Größe in Richtung Anode, da die DNA durch ihre Phosphatreste eine negative Ladung aufweist. So wird die DNA aufgrund ihrer Größe aufgetrennt. Um die DNA sichtbar zu machen wird das Gel mit UV-Licht bestrahlt. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen den Basen der DNA, wodurch die Fluoreszenz der Substanz bei ultraviolettem Licht sehr stark erhöht wird. Das Agarosegel leuchtet an den

Stellen wo sich Nukleinsäuren befinden. Die Intensität ist proportional zur Menge der DNA, welche sich im Gel befindet. Anhand des Größenstandards kann die Größe der DNA bestimmt werden.

3. 2. 6 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen dient der Reinigung des Fragments von anderen DNA-Fragmenten. Um aus einem Agarosegel eine DNA-Bande zu extrahieren wird das "MiniElute Gel Extraction Kit" von Qiagen verwendet. Zuerst wird das Gewicht eines Eppendorf-Tubes bestimmt. Dann wird unter einer UV-Lampe das entsprechende DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und in das gewogene Eppendorf-Tube gegeben. Anschließend wird durch erneutes Wiegen das Gewicht des DNA-Fragments bestimmt. Es werden pro 100 mg Gel-Gewicht 300 µl des Puffers QG (im Kit enthalten) hinzugegeben und für 10 min bei 50° C inkubiert. Um das DNA-Fragment mit dem Agarosegelrest vollständig zu lösen, wird das Eppendorf-Tube mehrmals gevortext. Nachdem das Gelstück vollständig gelöst ist, sollte die Mischung einen gelblichen Farbton annehmen. Nun wird pro Volumenteil des Agarosegelstücks ein Volumenteil Isopropanol hinzugegeben und gemischt. Danach wird der Inhalt des Eppendorf-Tubes auf eine Säule gegeben und für eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und es werden 500 µl des QG-Puffers auf die Säule gegeben und eine Minute zentrifugiert. Nach erneuter Verwerfung des Durchflusses werden 750 µl des Waschpuffers PE (im Kit enthalten) auf die Säule gegeben und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Sammelsäule wird 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Um die DNA zu eluieren wird die Säule auf ein frisches Tube gesetzt, es werden 10 µl Puffer EB (im Kit enthalten) auf die Mitte der Säule gegeben, eine Minute stehen gelassen und danach für eine Minute zentrifugiert. Im Durchfluss der Säule befindet sich nun die im Gel enthaltene DNA.

3. 2. 7 Isolation von Plasmid DNA

Zur Gewinnung kleinerer Mengen an Plasmiden wird der "Plasmid Isolation Kit (Mini)" von Machery und Nagel verwendet. 3 ml LB-Medium (5 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt pro 1 l Wasser) mit spezifischem Antibiotikum (hier: Kanamycin, 50 µg/ml) werden mit einem einzelnen Klon von einer LB-Kan-Platte (LB-medium mit 1,5 % Agar, 50 µg/ml Kanamycin) angeimpft und über Nacht bei 37° C auf einem Schüttler inkubiert. Bei der Durchführung wird exakt nach der Arbeitsanleitung des Herstellers vorgegangen.

Die Gewinnung größerer Plasmidmengen erfolgt über das "HiSpeed Plasmid Maxi Kit" (Qiagen). Dazu wird eine einzelne Kolonie von der LB-Kanamycin Agarplatte gepickt und eine Übernachtskultur angesetzt. Es werden 100 bis 200 ml LB-Kanamycin Medium angeimpft und für 6 h bei 37° C auf einem Schüttler inkubiert. Die Präparation wird nach der Vorschrift von Qiagen durchgeführt.

3. 2. 8 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau erfolgt nach den vom Hersteller der Restriktionsenzyme angegebenen Bedingungen. Hierfür werden 16 µl Plasmid-DNA mit 1 µl Restriktionsenzym (hier *MscI*), 2 µl 10 x Puffer 4 (wird mit dem Enzym geliefert) ad 20 µl Wasser für 4h bei 37° C inkubiert. Die entstandenen Fragmente werden durch 2-prozentige Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

3. 2. 9 Klonierung von PITPNM2

3. 2. 9. 1 Klonierung von PCR-Fragmenten

DNA-Fragmente werden mit dem "TOPO-TA-Cloning-Kit" (Invitrogen) in den TA-Cloning Vektor pCR2.1 inseriert. Dabei wird genau nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen: 2 µl des PCR-Produkts werden vorgelegt, dazu werden 1 µl "Salt Solution", 2 µl H₂O und 1 µl "TOPO-Vector" gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wird das Reaktionsgemisch auf Eis gestellt. 2 µl dieser Lösung werden nun zu den kompetenten Zellen ("One Shot Chemically competent E.coli") gegeben und für weitere 5 bis 10 min auf Eis inkubiert. Nach

einem Hitzeschock (30 sec bei 42° C) werden die Zellen erneut auf Eis gestellt. 250 µl SOC-Medium (20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 1 M MgCl₂, 10 ml 1 M MgSO₄, 10 ml Filter-sterilisierte 2 M Glucose) werden zugegeben, der Transformationsansatz für 1 h unter sanftem Schwenken inkubiert und anschließend unterschiedliche Mengen (2 µl, 10 µl und 100 µl) auf Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Zusätzlich enthalten die Platten X-Gal (Stammlösung 40 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO), 40 µl dieser Lösung werden in eine Agarplatte eingekreistelt). Die Platten werden über Nacht inkubiert. Blaue Kolonien zeigen den Leervektor, weiße Kolonien werden zur weiteren Analyse gepickt.

3. 2. 9. 2 Isolation eines PITPNM2 Fragments aus pCMV-SPORT6

Von "ImaGene" wurde ein Klon von PITPNM2 erworben (40147891, IMAGE ID), welcher einen Teil des Offenen Leserahmens der cDNA von PITPNM2 inseriert hat. Nach Plasmidpräparation wird das *MscI*-Fragment der cDNA isoliert. Dazu werden 10 µg der Plasmid-DNA mit *MscI* verdaut und der Restriktionsansatz auf einem 0,8-prozentigem Agarosegel getrennt. Das 2,8 kB-Fragment wird aus dem Agarosegel gereinigt (s.Kap. 3.2.6).

Das gereinigte Fragment und ein mit *MscI* verdauter cDNA Klon von PITPNM2 in pCR2.1 (DS2, siehe Ergebnisse Kapitel 4.3.2) werden ligiert. 7 µl des gereinigten Fragments und 1 µl des verdauten Plasmids pCR2.1 (PITPNM2) werden mit 1 µl Ligase-Puffer und 1 µl Ligase über Nacht bei 16° C inkubiert. Das geöffnete Plasmid wird vor der Ligation mit SAP ("shrimps alkaline phosphatase", Amersham) behandelt, um eine Selbstligation zu verhindern. Dabei werden 1 µl SAP, 1 µl PCR 10-fach Puffer und 8 µl Plasmid für 15 min bei 37° C inkubiert. Das Enzym wird durch 30-minütige Inkubation bei 63° C inaktiviert. 1 µl und 5 µl des Ligationsansatzes werden in kompetente E.coli-Zellen transformiert und Klone werden gepickt.

3. 2. 9. 3 Klonierung von PITPNM2 in einen Expressionsvektor

Das PITPNM2-Gen wird in den Expressionsvektor pCMV-SC-CF (Stratagene) umkloniert. Das ermöglicht die Expression von PITPnm2 in Eukaryontenzellen. PITPnm2 wird dabei als Fusionsprotein mit einem "Flag"-Epitop (Flag-Tag) exprimiert. Das "Flag"-Epitop befindet sich bei diesem Vektor am C-Terminus von PITPNM2.

Der Offene Leserahmen von PITPNM2 wurde amplifiziert. Als Template diente der pCR 2.1 (PITPNM2)-Klon.

Primername	Sequenz
PITM2_Ex_Fw	GGCGGCCGCATGATTATAAAGGAATATCGGA
PITM2_Ex_Re	GGCCTTGGGGCCCGCGGCT

Tabelle 6: Primerpaar für die Amplifikation des Offenen Leserahmens von PITPNM2

Für den Ligationsschritt, welcher den Vektor mit dem PCR-Produkt verbindet, wird ein Reaktions-Mix entsprechend Herstellerangaben zubereitet. 3 µl StrataClone Blunt Cloning Buffer, 2 µl PCR-Produkt und 1 µl StrataClone Vector Mix werden durchmischt und dann 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transformation wird ein Tube der kompetenten Zellen „StrataClone SoloPack Competent Cells“ aufgetaut. Es werden 2 µl Ligationsprodukt zu den Zellen gegeben und vorsichtig durchmischt. Die Zellen werden 20 min auf Eis inkubiert, dann für 45 s bei 42° C hitzegeschockt und für 2 min auf Eis inkubiert. Es werden 250 µl SOC-Medium (siehe Kapitel 3.2.9.1) pro Reaktionsmix auf 42° C vorgewärmt und zu der Mischung dazugegeben. Nun werden die Zellen 1 h bei 37° C unter Schütteln inkubiert, anschließend werden 25 µl und 200 µl der Zellen auf LB-Platten mit Kanamycin (50 µg/ml) ausgekreiselt und über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag können zur Gewinnung der Plasmide einzelne Kolonien gepickt und damit LB-Medium mit Kanamycin für eine Plasmidpräparation angeimpft werden (siehe Kapitel 3.2.7).

3. 2. 10 Rekombinante Expression von PITPNM2 und Zellkultur

3. 2. 10. 1 Kultivierung von HEK 293 Zellen

Die HEK 293-Zelllinie ("human embryonal kidney cells") stammt von menschlichen Nierenzellen ab. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T 75-Kulturflaschen mit 10 ml Nährmedium (Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)), 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin-Streptomycin bei 37° C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Der Medium-Wechsel erfolgt alle 3-4 Tage. Die Kultivierung erfolgt unter sterilen Bedingungen in einem Begasungsbrutschrank sowie an einer Werkbank der Klasse 2.

3. 2. 10. 2 Passagieren von HEK 293 Zellen

Für das Passagieren der Zellen wird bei etwa 80-90-prozentiger Konfluenz das Medium verworfen und durch 10 ml PBS-Puffer (Gibco) ersetzt. Die Zellen werden gewaschen, um noch vorhandene Mediumreste zu entfernen. Nun wird 1 ml frische Trypsinlösung (Gibco) hinzugegeben und die Zellen werden für 1 min bei 37° C inkubiert. Das Enzym Trypsin spaltet extrazelluläre Proteine, welche für die Adhärenz der Zellen verantwortlich sind. Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen wird diese leicht geschwenkt und beklopft. Durch Zugabe von 10 ml frischem Medium wird die Trypsinisierung gestoppt. Die Zellen werden durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Nun werden die Zellen im Verhältnis von 1:5 gesplittet.

3. 2. 10. 3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kammerfaktor: 10.000). Dabei werden Zellen einer T 75-Zellkulturflasche mit Trypsin versetzt und in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Daraufhin werden 10 µl dieser Suspension in die Zählkammer gegeben und alle Zellen in vier Großquadraten ausgezählt (Zellzahl/ml = (Summe der Zellzahl aus vier Großquadraten)* 104).

3. 2. 10. 4 Transfektion von HEK 293 Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Für die Transfektion wird das Fugene 6-Transfektionsreagenz (Roche) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Als Empfängerzellen für die Transfektion werden HEK 293 Zellen verwendet und in 6 Well-Platten (Greiner) ausgesät. Hierfür werden in jedes Well 2 ml Medium (DMEM, 10 % FCS, Penicillin-Streptomycin) vorgelegt. Die Zellen werden wie in Abschnitt 3.2.10.2 passagiert und die Zellzahl wird anhand der Neubauer-Zählkammer (siehe Kapitel 3.2.10.3) bestimmt. Dann werden pro Well 800.000 Zellen ausgesät. Für jede Transfektionsreaktion wird zuerst das Fugene 6 Reagenz mit serumfreiem Kulturmedium (DMEM) gemischt. Dafür wird für jede Transfektionsreaktion ein 2 ml Cap vorbereitet. In das Cap wird ein entsprechendes Volumen an serumfreiem Medium (98 µl) vorgelegt. Danach wird das Fugene-Reagenz in das Cap mit dem serumfreien Medium pipettiert, kurz gevortext und dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei beträgt das Verhältnis von Fugene-Reagenz zu der verwendeten DNA 2:1, hier werden 2 µl Fugene-Reagenz verwendet. Danach wird 1 µg Plasmid-DNA hinzugegeben, kurz gevortext und dann für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Letztendlich wird der DNA-Fugene-Medium-Mix tropfend in das entsprechende Well pipettiert. Nach 24 h werden die Zellen geerntet (siehe Kapitel 3.2.10.5).

3. 2. 10. 5 Ernten und Proteinaufschluss von HEK 293 Zellen

Um die HEK 293 Zellen zu ernten wird RIPA-Puffer verwendet (50 mM Tris-HCl, pH=7,5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5 % Na-Desoxycholate; 0,1% SDS; Proteinase Inhibitor (Roche Complete EDTA-free)). Hierfür wird das Zellmedium abgenommen und die Zellen werden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Danach werden 600 µl RIPA-Puffer hinzugegeben und die Zellen für 5 min auf Eis auf einem Schüttler inkubiert. Nun werden die Zellen in ein 1,5 ml Cap überführt und mit einer Kanüle homogenisiert. Daraufhin erfolgt ein Zentrifugationsschritt (14000 rpm) für 10 min bei 4° C. Von dem Überstand werden 10 µl des Zelllysats für den Bradford-Test abgenommen (siehe Kapitel 3.2.10.6). Das restliche Zelllysats wird für den Western-Blot vorbereitet und mit Stopppuffer versetzt (siehe Kapitel 3.2.11).

3. 2. 10. 6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G 250 bildet in saurer Lösung einen Komplex mit kationischen und unpolaren Seitenketten von verschiedenen Proteinen. Durch diese Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm. Durch die Zunahme der Extinktion bei 595 nm kann die vorhandene Proteinkonzentration gemessen werden.

Es wird eine BSA-Eichgerade aufgetaut. 1 ml der Bradford-Lösung (100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 in 50 ml 96% EtOH, 850 ml ddH₂O, 100 ml 85% H₃PO₄) wird in eine Küvette vorgelegt. Das zu messende Protein wird sowohl unverdünnt als auch in einer Verdünnung von 1:10 vorbereitet.

10 µl der Probe werden in die Küvette pipettiert, in der 1 ml Bradford-Lösung vorgelegt wurde, sofort gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgt nun bei 595 nm, über eine Eichgerade lässt sich die Proteinkonzentration bestimmen.

3. 2. 11 Trennung von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli ist eine Methode zum Auftrennen von Proteinen nach ihrer Größe²⁸. Als Trennmedium dieser Gelelektrophorese dient ein Gel auf Acrylamidbasis. Die Proben werden mit 3-fach SDS-Probenpuffer (Sodium Dodecylsulfate, enthält: 2,42 g Tris/HCl; 6% SDS (6 g), 15% Glycerin (15 ml), 1 ml Bromphenolblau Lösung ad 100 ml H₂O pH=6,7) versetzt. Die Disulfidbrücken der Proteine werden durch Reduktion gespalten. Dazu werden die Proben mit 2-Mercaptoethanol abgestoppt. Hierfür werden ein Volumenteil 2-Mercaptoethanol (1,4 M) und 1,5 Volumenteile Wasser verwendet. Je 1 µl dieser Verdünnung wird pro 10 µl Probe zugegeben. Dann werden die Proben 5 min in einem Heizblock auf 90° C erhitzt und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Hier wird mit dem Mini-PROTEAN II System von Bio-Rad gearbeitet. Zunächst werden Glasplatten der Größe 10,1 cm x 8,3 cm mit 70-prozentigem Ethanol abgespült und danach mit einem fusselfreien Tuch gesäubert. Auf die Platte werden 2 Spacer aufgelegt. Es gibt Spacer verschiedener Größe, die dünnen Spacer (0,5 mm) können bis zu einem Füllvolumen der Taschen von 30 µl verwendet werden, bei einem größeren Füllvolumen sollten dickere Spacer (1mm) verwendet werden. Auf die Spacer wird die andere Platte gesetzt. Die Platten werden in einen Gel-Gießrahmen geschoben und dort fixiert. Der Gel-Gießrahmen wird zusammen mit den Glasplatten und den Spacern nun in den Gel-Gießstand eingesetzt und dort befestigt. Um zu sehen, bis zu welcher Markierung das Trenngel eingegossen werden soll, wird ein Kamm eingesteckt. Die Höhe des Kamms wird markiert. Danach wird der Kamm wieder entfernt. Das Gel wird nun gegossen: Das 3-prozentige Sammelgel besteht aus 2 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid, 2,5 ml Puffer A (0,5 M Tris pH=6,7), 200 µl 10% SDS, 10 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), 800 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS, angesetzt in Wasser) und 14,5 ml destilliertem Wasser. Das 9-prozentige Trenngel setzt sich aus 12 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid, 5 ml Puffer B (3 M Tris pH=8,9), 400 µl 10% SDS, 20 µl TEMED, 400 µl 10% Ammoniumpersulfat und 22,43 ml destilliertem Wasser zusammen.

Die Gele werden vorbereitet, wobei das APS und das TEMED erst am Ende hinzugegeben werden, um eine vorzeitige Polymerisation zu vermeiden. Um eine gerade Abschlussfläche zu bekommen wird das Trenngel bis zur Markierung in den Zwischenraum der beiden Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Anschließend wird das Gel mindestens 30 min bei Raumtemperatur zur Polymerisation stehen gelassen. Dann wird das Isopropanol abgegossen, das Gel mit Wasser abgespült und mit einem fuselfreien Tuch werden Resttropfen entfernt. Das Sammelgel wird auf das polymerisierte Trenngel gegossen und der Kamm wird eingesteckt. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bilden. Nach 45 min Polymerisation kann das Gel verwendet werden.

Die Taschen werden auf der Glasplatte gekennzeichnet, der Gel-Gießrahmen wird vorsichtig entfernt und die Glasplatten werden in einen Fixierahmen eingespannt. Die Elektrophoresekammer wird mit Elektrophoresepuffer (30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS, ad 1 l mit H₂O pH=8,9) gefüllt, der gesamte Fixierahmen wird mit den Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Nun kann der Kamm vorsichtig nach oben abgezogen und die Taschen mit Elektrophoresepuffer geflutet werden. Es ist darauf zu achten, dass Luftblasen, die sich am unteren Rand des Gels bilden, entfernt werden. Die Proben werden in die Taschen gefüllt. Während sie sich im Sammelgel befinden wird für 15 min eine Spannung von 100 V angelegt, zur Auftrennung im Trenngel wird die Spannung für 2 h auf 140 V erhöht. Die Proteine wandern aufgrund ihrer negativen Ladung durch das Sammelgel und das Trenngel zur Anode. Das Trenngel wirkt hierbei wie ein Sieb, kleinere Proteine wandern leicht durch das Gel während größere Proteine zurückgehalten werden. Nachdem die Proteine auf dieser Trägermatrix aufgetrennt worden sind, können sie auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (geblottet) werden.

3. 2. 12 Nachweis von Proteinen durch Western-Blot

Zum Blotten des Gels wird zuerst die Nitrozellulosemembran zugeschnitten, die Membran sollte ungefähr 1 cm länger und breiter als das Trenngel sein. Zwei Blottingpapiere werden zugeschnitten, welche etwas größer als die Nitrozellulosemembran sind. Der Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 1 l Methanol ad 5 l dH₂O) wird in die dafür vorgesehene Schale gefüllt und die Nitrozellulose wird vorsichtig darin geschwenkt. Auch werden 2 Schwämme und das Blottingpapier in den Blotpuffer eingelegt. Die Blottingkassette wird aufgeklappt, auf die durchsichtige Seite wird einer der Schwämme, ein Blottingpapier (ca. 9 cm x 7,5 cm), die Nitrozellulosemembran (ca. 6 cm x 9 cm), das Gel, ein zweites mit Blotpuffer getränktes Blottingpapier (ca. 9 cm x 7,5 cm) und der zweite Schwamm gelegt. Die Kassette wird geschlossen und mit der schwarzen Seite gegen die schwarze Seite der Blottinghalterung in der Blotkammer gesteckt. In die Blotkammer wurde zuvor das mit Eis gefüllte Kühlelement gestellt und die Kammer mit Blotpuffer befüllt. Das Blotten erfolgt bei 30 V und dauert ungefähr 1,5 h. Die Nitrozellulosemembran wird nach dem Blotten für wenige Minuten mit 0,5 % Ponceau-S gefärbt (0,5 g Ponceau-S, 1 ml Essigsäure, 99 ml dH₂O) und danach mit destilliertem Wasser abgespült. Es wird eine Kopie der gefärbten Nitrozellulosemembran erstellt bevor diese zweimal kurz in H₂O gewaschen und dadurch wieder komplett entfärbt wird. Danach wird die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4° C in PBST (40 g NaCl; 1 g KCl; 5,75 g Na₂HPO₄; 1 g KH₂PO₄; ad 500 ml destilliertes H₂O; pH=7,4, 0,1 % Tween 20) mit 3 % Milchpulver (0,3 g Milchpulver in 10 ml PBST) geblockt. Nach dem Blocken wird das Blockmedium abgenommen und die Membran für 1 h mit dem ersten Antikörper (der primäre Antikörper) bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper wird dabei 1:50000 („Anti-Flag“-Antikörper) oder 1:1000 (Antiserum aus Kaninchen) in PBST verdünnt. Danach wird die Membran dreimal für jeweils 5 min in PBST gewaschen. Das Waschmedium wird abgenommen und der sekundäre Antikörper, ein polyklonaler Anti-Rabbit-Antikörper, wird in einer Verdünnung von 1:5000 in PBST mit 3 % Milchpulver aufgenommen und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit diesem Antikörper inkubiert. Danach wird die Membran

wieder dreimal für 5 min mit PBST gewaschen. Zum Proteinnachweis mit erhöhter Sensitivität wurde das ECL-Detektionsverfahren mit Hilfe des "ECL™ Western Blotting Detection Reagents" (Amersham) verwendet. Dabei wird nach Oxidation von zyklischem Diacylhydrazid durch Peroxidasen unter alkalischen Bedingungen eine Chemilumineszenz hervorgerufen, die durch Exposition auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. In dem Kit sind 2 Reagenzien enthalten, welche im Verhältnis eins zu eins gemischt werden. Diese Mischung wird jetzt unmittelbar auf die Nitrozellulosemembran gegeben und eine Minute bei Dunkelheit mit der Membran inkubiert, welche jetzt nicht mehr bewegt wird. Danach wird die Membran vorsichtig auf Blottingpapier kurz getrocknet und dann in eine Sichthülle eingelegt. In der Dunkelkammer wird in einer lichtdichten Kassette ein Röntgen-Film (Fujifilm) für wenige Sekunden (1-10 s) auf die Membran aufgelegt und anschließend werden in einer Entwicklungsmaschine die Röntgenfilme entwickelt.

3. 2. 13 DNA Sequenzierung

Zur Aufschlüsselung der Basenabfolge der DNA wird die Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al.²⁹ verwendet. Ausgehend von einem spezifischen Primer wird der komplementäre DNA-Strang durch die *Taq*-Polymerase verlängert. Wichtig ist, dass die Nukleotide zur Verlängerung auch als ddNTPs vorliegen und somit durch die fehlende 3'-Hydroxygruppe zu einem Kettenabbruch führen. In der Sequenzierungsreaktion entstehen DNA-Fragmente verschiedener Länge und am Ende jedes Fragments befindet sich ein mit Fluoreszenz-Farbstoff markiertes ddNTP. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt. Mittels Kapillarelektrophorese werden die Sequenzierprodukte aufgetrennt, durch einen Laser am Ende der Kapillare werden die Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt, die Basenabfolge kann in einem Elektropherogramm dargestellt werden.

Zunächst ist jedoch eine Reinigung des PCR-Produkts von Nukleotiden und Primern, welche bei der PCR-Reaktion nicht verbraucht wurden, notwendig. Verwendet wird ein ExoSAP-IT Enzymgemisch von Amersham. ExoSAP-IT ist ein Gemisch aus Exonuklease I, die nicht umgesetzte einzelsträngige Primer

zerstört, und aus Shrimps Alkalischer Phosphatase (SAP), welche dNTPs zu dNDPs dephosphoryliert und somit überflüssige dNTPs entfernt. Zu 4 µl des PCR-Produkts werden jeweils 0,5 µl ExoSAP-IT (Amersham) hinzugegeben. Die Proben werden anschließend im Thermocycler für 15 min auf 37° C erwärmt, durch 2 minütiges Erhitzen auf 96° C werden diese Enzyme wieder inaktiviert.

Zur eigentlichen Sequenzierung wird der "GenomeLab DTCS Quick Start Kit" von Beckman-Coulter verwendet. Darin enthalten sind Puffer (20 mM TrisCl pH=8,3; 5 mM MgCl), dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs und eine *Taq*-Polymerase. Um die gereinigten PCR-Produkte zu sequenzieren werden 2 µl des gereinigten PCR-Produkts, 2 µl Quick Start Kit, 5 µl Wasser und 1 µl eines spezifischen Primers (5 pmol/µl) in ein 0,5 ml Cap gegeben und gemischt. Im Gegensatz zur PCR wird nur ein Primer und kein Primerpaar verwendet, es gibt aber 2 Ansätze, in denen jeweils der Strang- und Gegenstrang-Primer der entsprechenden PCR-Reaktion verwendet werden. Die Sequenzierreaktion kann in einem Thermocycler mit folgendem Programm gestartet werden: 98° C für 40 s, anschließend 35 Zyklen: 96° C für 20 s, 50° C für 30 s und 65° C für 1 min; daraufhin abkühlen auf 4° C. Zur Reinigung und Konzentrierung der Sequenzierprodukte wird eine Ethanolpräzipitation angeschlossen. Hierfür wird ein Mastermix hergestellt, welcher pro Ansatz jeweils 10 µl Wasser, 2 µl EDTA (100 mM, pH=8,0), 2 µl Natriumacetat (3 M, pH=5,2) und 1 µl Glykogen (20 mg/ml) (im Quick Start Kit enthalten) enthält. Dieser Ansatz wird in ein 1,5 ml Tube vorgelegt, der Sequenzieransatz wird zugegeben, gemischt und mit 60 µl Ethanol (absolut, -20°C) versetzt. Nach Zentrifugation bei 4° C für 5 min und bei maximaler Geschwindigkeit (21460 x g) entsteht ein Pellet, welches durch eine Copräzipitation der DNA mit dem Glykogen sichtbar wird. Der Überstand wird vorsichtig abgehoben ohne das Pellet zu beschädigen und 180 µl Ethanol (70%, Raumtemperatur) wird zum Pellet hinzugegeben. Die Probe wird erneut bei 4° C für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand wird vorsichtig abgehoben. Danach wird das Pellet für 5 min bei Raumtemperatur im Dunklen getrocknet und in 35 µl Sample-Loading-Solution (Bestandteil des Quick Start Kits) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren

gelöst. Nun werden die kompletten Proben in eine Sequenzierungs-Platte pipettiert und mithilfe eines Öltropfens vor Verdunstung geschützt.

Abschließend werden in einer Puffer-Platte die der Sequenzierungs-Platte entsprechenden Positionen mit „GenomeLab Sequencing Separation Buffer„ (Beckman-Coulter) befüllt und beide Platten in den CEQ 8000 bzw. CEQ 8800 gestellt. Die Probe wird 10 Sekunden bei 2 kV injiziert, die Trennung der Sequenzierprodukte erfolgt über 60 min bei 4 kV. Die Elektropherogramme werden aufgezeichnet und können von der Beckmann CEQ-Software als Basenabfolge dargestellt werden.

4. Ergebnisse

PITPnm2 konnte im Phosphoproteom von Thrombozyten nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung A. Sickmann). Das Transkript PITPNM2 und die in Thrombozyten vorhandenen Splicevarianten sollten daher charakterisiert werden. Auf Transkriptionsebene sollte weiterhin untersucht werden, ob die membranassoziierten Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine PITPNM1 und PITPNM3 in Thrombozyten nachweisbar sind.

4.1 Nachweis der Transkripte von membranassoziierten Phosphatidylinositol-Transfer-Proteinen in Thrombozyten

Zunächst wurde ein Primerpaar entworfen, welches ermöglichen sollte, alle 3 PITPNM Transkripte zu amplifizieren. Dafür wurden die Referenzsequenzen von PITPNM1, 2 und 3 miteinander verglichen. Ein Ausschnitt des erhaltenen Alignments, das die Primerbindestellen enthält, ist in Abbildung 5 gezeigt.

```

Q9BZ71 | PITM3      TTCCACGCCAGTTACTGGGAGTCCACAGACGTGGTGGCCTTCATCCTGAG
Q9BZ72 | PITM2      TTCCACGCCAGCTACTGGGAGTCCACAGACGTGGTCTCCTTTCTGCTGAG
O00562 | PITM1      TTCCACGCCAGCTACTGGGAGTCCGCGGACGTGGTGGCGTTCATCCTGCG
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Q9BZ71 | PITM3      ACAGGTAATGCGCTATGAGAGCGTGAACATCAAGGAAAGCGCCCGCTGG
Q9BZ72 | PITM2      ACAGGTCATGAGGCATGACAACCTCAGCATCTTGGAGCTGGATGGCAAGG
O00562 | PITM1      CCAGGTGATCGAGAAGG--AGCGCCACAGCTGG----CGGAATGCGAGG
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
[...Ausschnitt von 400 Basen nicht gezeigt...]

Q9BZ71 | PITM3      GTTCAGCATTGATGGGTCCTTCGCGGCCAGCGTGTCTATCATGGGAAGCG
Q9BZ72 | PITM2      CTCAGCATCGACGGTTCCTTTGCCGCTAGCGTGTCCATCATGGGCAGCG
O00562 | PITM1      CTCAGCATCGACGGTTCCTTCACCGCCAGCGTCTCCATCATGGGCAGCG
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Q9BZ71 | PITM3      ACCCCAAGGTCCGGCCGGGTGCAGTGGATGTTGTCCGGCACTGGCAGGAC
Q9BZ72 | PITM2      ACCCCAAGGTGCGGGCCGGGGCCGTGGACGTGGTGCGGCACTGGCAGGAC
O00562 | PITM1      ACCCCAAGGTGCGAGCTGGCGCCGTGGACGTGGTCAGGCACTGGCAGGAC
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Abbildung 5: Ausschnitt aus dem Alignment von PITPNM 1, 2 und 3
Identität ist durch * gekennzeichnet, die Primerbindestellen sind grün markiert.

Strang- und Gegenstrangprimer weisen je eine Basenfehlpaarung bei einem der Transkripte auf, die jedoch genügend weit vom 3'-Ende entfernt sind, um eine Amplifikation auch im Falle einer Fehlpaarung zu ermöglichen. Dieses Primerpaar wurde mit PITM_Fw und PITM_Re bezeichnet (siehe Tabelle 7). Darüber hinaus wurden auch Gen-spezifische Primer für PITPNM1 und PITPNM3 entworfen (siehe Tabelle 7).

Primername	Sequenz
PITM_Fw	CCACGCCAGCTACTGGGAGTC
PITM_Re	CTTGGGGTCGCTGCCCATGAT
PITM1_Fw	AGTCCACGCCCTCTTCCTTA
PITM1_Re	CTGAGTAGGCCTGGTTGGTG
PITM3_Fw	CCTTCGATGCCATCTGCTAC
PITM3_Re	CGAGCCGAAGAGGAAGAAGT

Tabelle 7: Primerpaare für den Nachweis der PITPNM-Transkripte in Thrombozyten

In Abbildung 6 sind die PCR-Produkte aufgetragen, die mit den Primern PITM_Fw und PITM_Re erhalten wurden. Als Template diente cDNA aus Plättchen (sowohl Oligo(dT)-geprimt als auch Hexamer-geprimt) und cDNA aus HeLa-Zellen. Alle cDNAs führten zu einem Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe. Bei dem PCR-Ansatz mit HeLa-cDNA sind 2 Banden zu erkennen, eine Stärkere auf der Höhe von etwa 500 Bp und eine Schwächere, die deutlich größer ist.

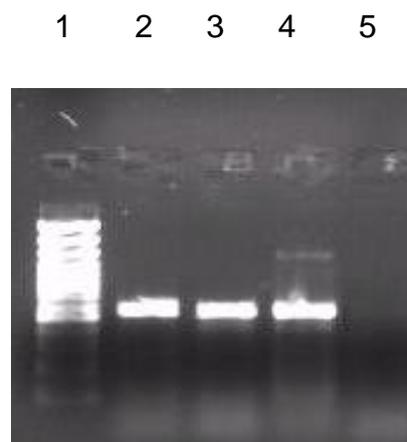


Abbildung 6: PCR-Produkte mit dem Primerpaar PITM_Fw und PITM_Re
 Spur 1: Standard, Spur 2: cDNA Plättchen Oligo(dT), Spur 3: cDNA Plättchen random Hexamere, Spur 4: cDNA HeLa, Spur 5: H₂O.

Die PCR-Produkte (Spuren 3 und 4) wurden sequenziert. Während das Amplifikat aus Thrombozyten-cDNA die PITPNM2-Sequenz zeigt (ein Ausschnitt ist in Abbildung 7 dargestellt), lieferten die Sequenzdaten des Amplifikats aus HeLa-Zellen eine überlagerte Sequenz. Das deutet darauf hin, dass in Plättchen nur PITPNM2, in HeLa-Zellen aber mehrere PITPNM-Transkripte vorhanden sind.

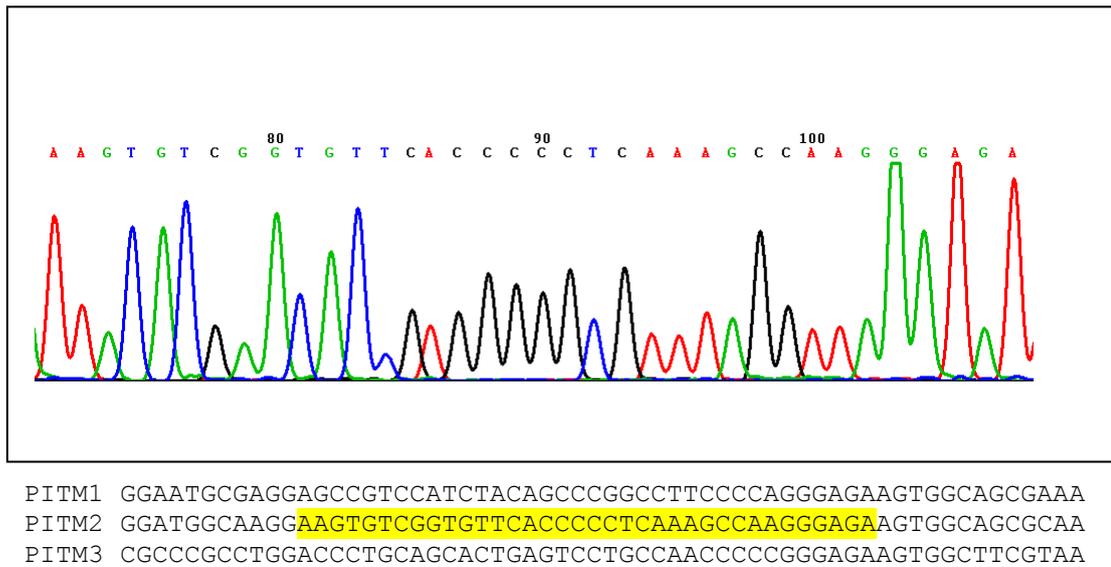


Abbildung 7: Ausschnitt aus der Sequenz des PCR-Produktes aus Thrombozyten cDNA, Primerpaar PITM_Fw und PITM_Re. Unten ist ein Ausschnitt des Alignments von PITPNM1, 2 und 3 gezeigt. Die oben dargestellte Sequenz ist gelb markiert.

Das konnte durch die PCR mit den spezifischen Primerpaaren für PITPNM1 und PITPNM3 bestätigt werden. Beide Primerpaare lieferten unter Verwendung der Thrombozyten-cDNA keine Amplifikate, HeLa-cDNA zeigt aber sowohl PITPNM1- als auch PITPNM3-Amplifikationsprodukte. Eine weitere cDNA, die aus Leukozyten (cDNA Leu) präpariert wurde, zeigt ein Amplifikationsprodukt für PITPNM1, nicht aber für PITPNM3. Das Hauptprodukt hier ist etwa 600 Bp groß, in HeLa-cDNA findet sich als Hauptprodukt ein deutlich kleineres DNA-Fragment (siehe Abbildung 8).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

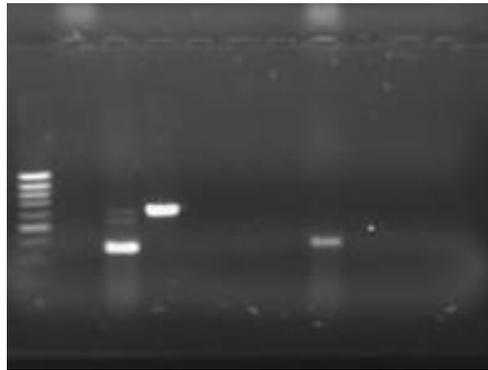


Abbildung 8: PCR-Produkte mit den Primerpaaren PITM1 (Spuren 2 - 5) und PITM3 (Spuren 6 - 11) Fw und Re. Spur 1: DNA-Standard, Spuren 2 und 7: H₂O, Spuren 3 und 8: cDNA HeLa, Spuren 4 und 9: cDNA Leu, Spuren 5 und 10: cDNA Plättchen Oligo(dT).

Die Sequenzierung der PCR-Produkte aus HeLa-cDNA (Spuren 3 und 8) führten zu den erwarteten Sequenzen von PITPNM1 und PITPNM3. Von den membranassoziierten PITP konnte nach diesen Ergebnissen in Thrombozyten nur PITPNM2 auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden.

4. 2 Identifikation der Splice-Varianten von PITPNM2 in Thrombozyten

In der Datenbank "UniprotKB"³⁰ werden zum Zeitpunkt der Untersuchungen 3 Isoformen von PITPNM2 beschrieben, die durch unterschiedliche Splicevarianten codiert sind: Q9BZ72-1, 2 und 3 sind in Abbildung 9 als Alignment gezeigt. In Splicevariante 3 fehlen im vorderen Anteil des Proteins die Aminosäuren 50-328. Varianten 1 und 2 unterscheiden sich jeweils um ein unterschiedlich exprimiertes Exon:

PITM2_1	1	MIIKEYRIPLPMTVEEYRIAQLYMIQKKSERNETYGEGSGVEILENRPYTDGPGGSGQYTHKVYHV
PITM2_2	1	MIIKEYRIPLPMTVEEYRIAQLYMIQKKSERNETYGEGSGVEILENRPYTDGPGGSGQYTHKVYHV
PITM2_3	1	MIIKEYRIPLPMTVEEYRIAQLYMIQKKSERNETYGEGSGVEILENRPYT.....
<hr/>		
PITM2_1	66	GMHIPSWFRSILPKAALRVVEESWNAYPYTRTRFTCPFVEKFSIDIETFYKTDAGENPDVFNLSF
PITM2_2	66	GMHIPSWFRSILPKAALRVVEESWNAYPYTRTRFTCPFVEKFSIDIETFYKTDAGENPDVFNLSF
PITM2_3	50
<hr/>		
PITM2_1	131	VEKNQLTIDFIDIVKDPVPHNEYKTEEDPKLFQSTKTQRGPLSENWIEEYKQVFPIMCAYKLCK
PITM2_2	131	VEKNQLTIDFIDIVKDPVPHNEYKTEEDPKLFQSTKTQRGPLSENWIEEYKQVFPIMCAYKLCK
PITM2_3	50
<hr/>		
PITM2_1	196	VEFRYWGMQSKIERFIHDTGLRRVMVRAHRQAWCWQDEWYGLSMENIRELEKEAQLMLSRKMAQF
PITM2_2	196	VEFRYWGMQSKIERFIHDTGLRRVMVRAHRQAWCWQDEWYGLSMENIRELEKEAQLMLSRKMAQF
PITM2_3	50

Ergebnisse

PITM2_1	261	NEDGEATELVKHEAVSDQTSGEPEPSSSNGEPLVGRGLKQWSTSSKSSRSSKRASPSRHSI
PITM2_2	261	NEDGEATELVKHEAVSDQTSGEPEPSSSNGEPLVGRGLKQWSTSSKSSRSSKRASPSRHSI
PITM2_3	50
PITM2_1	326	SEWRMQSIARDSDESSDDEFFDAHEDLSDTEEMFPKDITKSSNDLMDKIESPEPEDTQDGLYRQ
PITM2_2	326	SEWRMQSIARDSDESSDDEFFDAHEDLSDTEEMFPKDITKSSNDLMDKIESPEPEDTQDGLYRQ
PITM2_3	50	...RMQSIARDSDESSDDEFFDAHEDLSDTEEMFPKDITKSSNDLMDKIESPEPEDTQDGLYRQ
PITM2_1	391	GAPEFRVASSVEQLNIEDEVSQPLAAPPKIHVLLLVHGGTILDTGAGDPSSKKGDANTIANV
PITM2_2	391	GAPEFRVASSVEQLNIEDEVSQPLAAPPKIHVLLLVHGGTILDTGAGDPSSKKGDANTIANV
PITM2_3	112	GAPEFRVASSVEQLNIEDEVSQPLAAPPKIHVLLLVHGGTILDTGAGDPSSKKGDANTIANV
PITM2_1	456	FDTVMRVHYPALGRLAIRLVPCPPVCSDAFALVSNLSPYSHDEGLSSSQDHIPLAALPLLATS
PITM2_2	456	FDTVMRVHYPALGRLAIRLVPCPPVCSDAFALVSNLSPYSHDEGLSSSQDHIPLAALPLLATS
PITM2_3	177	FDTVMRVHYPALGRLAIRLVPCPPVCSDAFALVSNLSPYSHDEGLSSSQDHIPLAALPLLATS
PITM2_1	521	SPQYQEA VATVIQRANLAYGDFIKSQEGMTFNGQVCLIGDCVGGILAFDALCYSNPVSESQSSS
PITM2_2	521	SPQYQEA VATVIQRANLAYGDFIKSQEGMTFNGQVCLIGDCVGGILAFDALCYSNPVSESQSSS
PITM2_3	242	SPQYQEA VATVIQRANLAYGDFIKSQEGMTFNGQVCLIGDCVGGILAFDALCYSNPVSESQSSS
PITM2_1	586	RRGSVVSMQDNDLLSPGILMNAAHCCGGGGGGGGGGSSGGGGSSGGSSLESRRHLSRNSVDIPR
PITM2_2	586	RRGSVVSMQDNDLLSPGILMNAAHCCGGGGGGGGGGSSGGGGSSGGSSLESRRHLSRNSVDIPR
PITM2_3	307	RRGSVVSMQDNDLLSPGILMNAAHCCGGGGGGGGGGSSGGGGSSGGSSLESRRHLSRNSVDIPR
PITM2_1	651	NGTEDPKRQLPRKRSDSSTYELDTIQHQAFLLSSSLHASVLRTEPCSRHSSSTMLDGTGALGRF
PITM2_2	651	NGTEDPKRQLPRKRSDSSTYELDTIQHQAFLLSSSLHASVLRTEPCSRHSSSTMLDGTGALGRF
PITM2_3	372	NGTEDPKRQLPRKRSDSSTYELDTIQHQAFLLSSSLHASVLRTEPCSRHSSSTMLDGTGALGRF
PITM2_1	716	DFEITDLFLFGCPLGLVLAALRKTVIPALDVFQLRPACQVYNLFHPADPSASRLEPLLERRFHAL
PITM2_2	716	DFEITDLFLFGCPLGLVLAALRKTVIPALDVFQLRPACQVYNLFHPADPSASRLEPLLERRFHAL
PITM2_3	437	DFEITDLFLFGCPLGLVLAALRKTVIPALDVFQLRPACQVYNLFHPADPSASRLEPLLERRFHAL
PITM2_1	781	PPFSVPRYQRYPLGDCSTLLA.....
PITM2_2	781	PPFSVPRYQRYPLGDCSTLLVETVQRNPELVLEGGPLAPLPHGDGFLETSMFPVPAPTWQDGRFP
PITM2_3	502	PPFSVPRYQRYPLGDCSTLLA.....
PITM2_1	803DVLQTHNAAFQEHGAPSSPGTAPASRGFRRASEISIASQVSGMAESYTASSIAQKAPDAL
PITM2_2	846	GCAESDVLQTHNAAFQEHGAPSSPGTAPASRGFRRASEISIASQVSGMAESYTASSIAQI.....
PITM2_3	524DVLQTHNAAFQEHGAPSSPGTAPASRGFRRASEISIASQVSGMAESYTASSIAQKAPDAL
PITM2_1	863	SHTPSVRRLSLLALPASPPTTPGPHPPARKASPGLERAPGLPELDIGEVAAKWWGQKRIDYALYC
PITM2_2	906AAKWWGQKRIDYALYC
PITM2_3	584	SHTPSVRRLSLLALPASPPTTPGPHPPARKASPGLERAPGLPELDIGEVAAKWWGQKRIDYALYC
PITM2_1	928	PDALTAFPTVALPHLFHASYWESTDVVSFLLRQVMRHDNSSILELDGKEVSVFTPSKPREKWQRK
PITM2_2	922	PDALTAFPTVALPHLFHASYWESTDVVSFLLRQVMRHDNSSILELDGKEVSVFTPSKPREKWQRK
PITM2_3	649	PDALTAFPTVALPHLFHASYWESTDVVSFLLRQVMRHDNSSILELDGKEVSVFTPSKPREKWQRK
PITM2_1	993	RTHVKLRNVTANHRINDALANEDGQVLTGRFMYGPLDMVTLTGEKVDVHIMTQPPSGEWLYLDT
PITM2_2	987	RTHVKLRNVTANHRINDALANEDGQVLTGRFMYGPLDMVTLTGEKVDVHIMTQPPSGEWLYLDT
PITM2_3	714	RTHVKLRNVTANHRINDALANEDGQVLTGRFMYGPLDMVTLTGEKVDVHIMTQPPSGEWLYLDT
PITM2_1	1058	LVTNNSGRVSYTIPESHRLGVGVYPIKVVVRGDHTFADSYITVLPKGTEFVVSIDGSFAASVSI
PITM2_2	1052	LVTNNSGRVSYTIPESHRLGVGVYPIKVVVRGDHTFADSYITVLPKGTEFVVSIDGSFAASVSI
PITM2_3	779	LVTNNSGRVSYTIPESHRLGVGVYPIKVVVRGDHTFADSYITVLPKGTEFVVSIDGSFAASVSI
PITM2_1	1123	MGSDPKVRAGAVDVRHWQDLGYLIIYVTGRPDMQQRVVAVLAQHNFPHGVVSFCDLVHDPLR
PITM2_2	1117	MGSDPKVRAGAVDVRHWQDLGYLIIYVTGRPDMQQRVVAVLAQHNFPHGVVSFCDLVHDPLR
PITM2_3	844	MGSDPKVRAGAVDVRHWQDLGYLIIYVTGRPDMQQRVVAVLAQHNFPHGVVSFCDLVHDPLR
PITM2_1	1188	HKANFLKLLISELHLRVHAAYGSTKDVAVYSAISLSPMQIYIVGRPTKKLQQCQFITDGYAAHL
PITM2_2	1182	HKANFLKLLISELHLRVHAAYGSTKDVAVYSAISLSPMQIYIVGRPTKKLQQCQFITDGYAAHL
PITM2_3	909	HKANFLKLLISELHLRVHAAYGSTKDVAVYSAISLSPMQIYIVGRPTKKLQQCQFITDGYAAHL
PITM2_1	1253	AQLKYSHRARPARNTATRMALRKGSFGLPGQDFLRSRNLHLLRTISAQPSGPSHRHERTQSQADG
PITM2_2	1247	AQLKYSHRARPARNTATRMALRKGSFGLPGQDFLRSRNLHLLRTISAQPSGPSHRHERTQSQADG
PITM2_3	974	AQLKYSHRARPARNTATRMALRKGSFGLPGQDFLRSRNLHLLRTISAQPSGPSHRHERTQSQADG
PITM2_1	1318	EQRGQRSMSVAAGCWGRAMTGRLEPGAAGPK
PITM2_2	1312	EQRGQRSMSVAAGCWGRAMTGRLEPGAAGPK
PITM2_3	1039	EQRGQRSMSVAAGCWGRAMTGRLEPGAAGPK

Abbildung 9: Alignment PITPM2_1, PITPM2_2 und PITPM2_3

Es wurden Primerpaare entworfen, die bei den unterschiedlichen Isoformen zu spezifischen Produkten führen (siehe Tabelle 8). Die in Thrombozyten exprimierten Isoformen sollten so identifiziert werden.

Primername	Sequenz
PITM2_F1	AACGAGACATATGGCGAAGG
PITM2_R1	TGTTTCAGCTGCTCCACACTG
PITM2_F2	GTCCTGGCCTTGAGGAAGAC
PITM2_R2	TGTGGGTCTGGAGCACAGCCG
PITM2_AFW	AGCAGTCAGGACCACATTCC
PITM2_ARe	GGTGAACACCGACACTTCCT
PITM2_BFW	TGGAACGGCGCTTTCAC
PITM2_BRe	AGGACCAGCTCAGGGTTTCT
PITM2_CFW	CTACACGGCATCCAGCATC
PITM2_CRe	GCTGGGGGTATGGCTGAG

Tabelle 8: Primerpaare zur Identifikation der PITPNM2 Isoformen

Abbildung 10 zeigt die Amplifikationsprodukte, die mit dem Primerpaar PITM2_F1 und PITM2_R1 erhalten wurden. Dieses Primerpaar führt bei den Isoformen PITPNM2_1 und PITPNM2_2 zu einem PCR-Produkt von 1126 Bp. Isoform 3 als Template führt zu einem PCR-Produkt von nur 289 Bp. Nach Aminosäure 49 fehlen dieser Isoform 279 Aminosäuren, also auf Transkriptionsebene 837 Bp (siehe Alignment der Isoformen, Abbildung 9).

Sowohl bei Thrombozyten cDNA als auch bei HeLa-cDNA als Template konnte nur das 1126 Bp-Fragment amplifiziert werden, ein Transkript für die Isoform 3 konnte damit nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10).

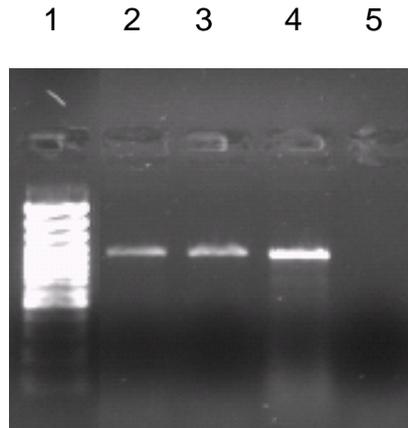


Abbildung 10: PCR-Produkte mit dem Primerpaar PITM2_F1 und PITM2_R1
 Spur 1: DNA-Standard, Spur 2: cDNA Plättchen Oligo(dT), Spur 3: cDNA Plättchen random Hexamere, Spur 4: cDNA HeLa, Spur 5: H₂O.

Das Primerpaar PITM2_F2 und PITM2_R2 kann die Splicevarianten 1 und 3 von der Splicevariante 2 unterscheiden. Nur die Splicevariante 2 (PITPNM2_2) enthält das Exon 15. Zur Verdeutlichung ist dieses Primerpaar in den cDNAs der Splicevarianten PITPNM2_1 und PITPNM2_2 farblich markiert, Exon 15 ist unterstrichen. Aufeinander folgende Exons sind abwechselnd in blau und schwarz gezeigt. Splicevariante 1 führt dabei zu einem Amplifikat von 232 Bp, Splicevariante 2 zu 376 Bp.

```

PITM2_1
GGATGGCACAGGTGCCCTGGGCAGGTTTGACTTTGAGATCACCGACCTCTTCCTCTCGGGTGCCCGCTGGGGC
TGTCCTGGCCTGAGGAAGACTGTCATCCCAGCCCTGGATGTTTTCCAGCTGCGGCCGGCCTGCCAGCAAGTC
TACAACCTCTTCCACCCCGCGGACCCGTCAGCTTCACGCCTGGAGCCGCTGCTGGAACGGCGCTTTCACGCCCT
GCCGCCTTTCAGCGTCCCCCGCTACCAACGCTACCCGCTGGGGGATGGCTGCTCCACGCTGCTGGCGGATGTGC
TCCAGACCCACAATGCAGCCTTCCAAGAGCATGGCGCCCCCTCTCGCCGGGCACTGCCCTGCCAGTCGTGGC
TTCCGC

PITM2_2
GGATGGCACAGGTGCCCTGGGCAGGTTTGACTTTGAGATCACCGACCTCTTCCTCTCGGGTGCCCGCTGGGGC
TGTCCTGGCCTGAGGAAGACTGTCATCCCAGCCCTGGATGTTTTCCAGCTGCGGCCGGCCTGCCAGCAAGTC
TACAACCTCTTCCACCCCGCGGACCCGTCAGCTTCACGCCTGGAGCCGCTGCTGGAACGGCGCTTTCACGCCCT
GCCGCCTTTCAGCGTCCCCCGCTACCAACGCTACCCGCTGGGGGATGGCTGCTCCACGCTGCTGGTCGAGACCG
TGCAGAGAAACCCTGAGCTGGTCCTGGAGGGCGGCCCTGGCCCTCTCCCCACGGGGACGGCTTCCTGGAA
ACCAGTATGCCTGTTCCCGCGCCACCTGGCAAGACGGGCCCGCCGGGCTGTGCCGAGTCGGATGTGCTCCA
GACCCACAATGCAGCCTTCCAAGAGC
    
```

Abbildung 11: Ausschnitte aus den cDNA Sequenzen der Isoformen PITPNM2_1 und PITPNM2_2. Blau markiert ist das Primerpaar PITM2_F2 und PITM2_R2. Unterstrichen ist Exon 15, das nur in Splicevariante PITPNM2_2 zu finden ist.

Unter Verwendung dieses Primerpaares konnten in Thrombozyten cDNA und HeLa-cDNA die erwarteten Fragmente amplifiziert werden (siehe Abbildung 12). Die cDNA aus HeLa-Zellen zeigt darüber hinaus noch weitere, größere Amplifikate (Abbildung 12, Spur 4).

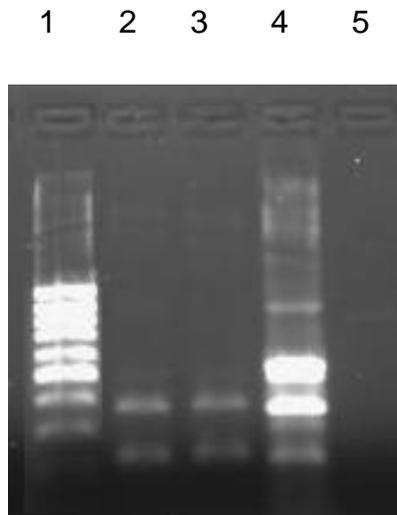


Abbildung 12: PCR-Produkte mit dem Primerpaar PITM2_F2 und PITM2_R2

Spur 1: DNA-Standard, Spur 2: cDNA Plättchen Oligo(dT), Spur 3: cDNA Plättchen random Hexamere, Spur 4: cDNA HeLa, Spur 5: H₂O.

Drei weitere Primerpaare wurden verwendet, die bei den unterschiedlichen Splicevarianten zu unterschiedlichen Produkten führen: PITM2_A, PITM2_B und PITM2_C (siehe Tabelle 8). In Tabelle 9 sind die erwarteten Fragmentgrößen in Bp bei den unterschiedlichen Isoformen unter Verwendung dieser Primer aufgeführt.

Primerpaar Isoform	PITM2_A	PITM2_B	PITM2_C
PITPNM2_1	934	245	189
PITPNM2_2	934	389	351
PITPNM2_3	97	245	351

Tabelle 9: Primerpaare PITM2_A, B und C mit erwarteten Fragmentgrößen bei den Splicevarianten PITPNM2_1, 2 und 3 in [Bp]

In Abbildung 13 sind die erhaltenen PCR-Produkte gezeigt. Mit dem Primerpaar PITM2_A konnte aus Thrombozyten und HeLa-Zellen nur das 934 Bp-Fragment amplifiziert werden. Dies schließt aus, dass die Isoform 3 in den cDNAs vorhanden ist. Mit dem Primerpaar PITM2_B konnten beide erwarteten Produkte, 389 Bp und 245 Bp, amplifiziert werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Isoformen 1 und 2 in Thrombozyten und in HeLa-Zellen exprimiert werden. Primerpaar C zeigt jedoch in Thrombozyten nur das 189 Bp Fragment, in HeLa-Zellen ist andeutungsweise ein größeres Fragment von etwa 350 Bp zu erkennen. Ein Fragment von 351 Bp wäre aber für die Isoform 2 zu fordern, da diese Isoform durch das Primerpaar PITM2_B nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse deuten auf das Vorhandensein einer bisher nicht in den Datenbanken beschriebenen Splicevariante in Thrombozyten hin.

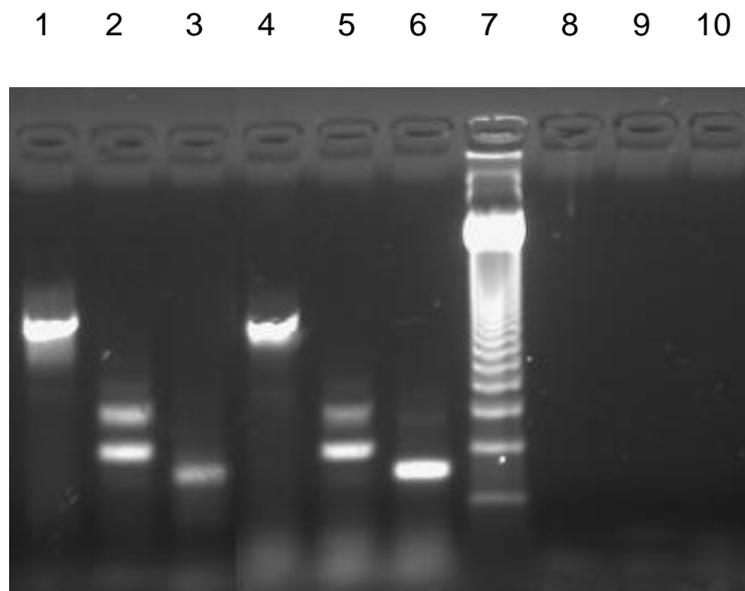


Abbildung 13: PCR-Produkte mit den Primerpaaren PITM2_A (Spuren 1, 4, 8), PITM2_B (Spuren 2, 5, 9) und PITM2_C (Spuren 3, 6, 10). Spuren 1, 2, 3: cDNA Plättchen; Spuren 4, 5, 6: cDNA HeLa, Spur 7: DNA-Standard, Spuren 8, 9, 10: H₂O.

Die Identität der PCR-Produkte wurde durch Sequenzierung bestätigt. In Abbildung 14 ist der Ausschnitt aus der Sequenzierung der Amplifikationsprodukte mit dem PITM2_B-Primerpaar gezeigt (siehe Abbildung 13, Spur 2), der die differenzielle Splicestelle wiedergibt. In der Sequenz in

Abbildung 14 ist das nur in der Isoform PITPNM2_2 enthaltene Exon 15 unterstrichen. Die Sequenz ist im Unterschied zu der in Abbildung 11 gezeigten Sequenz revers-komplementär, da in Abbildung 14 die Gegenstrang-Sequenz des PCR-Produktes gezeigt ist. Nach Exon 16 ist in der Sequenz also eine Überlagerung der Sequenzen von Exon 15 und 14 zu erkennen.

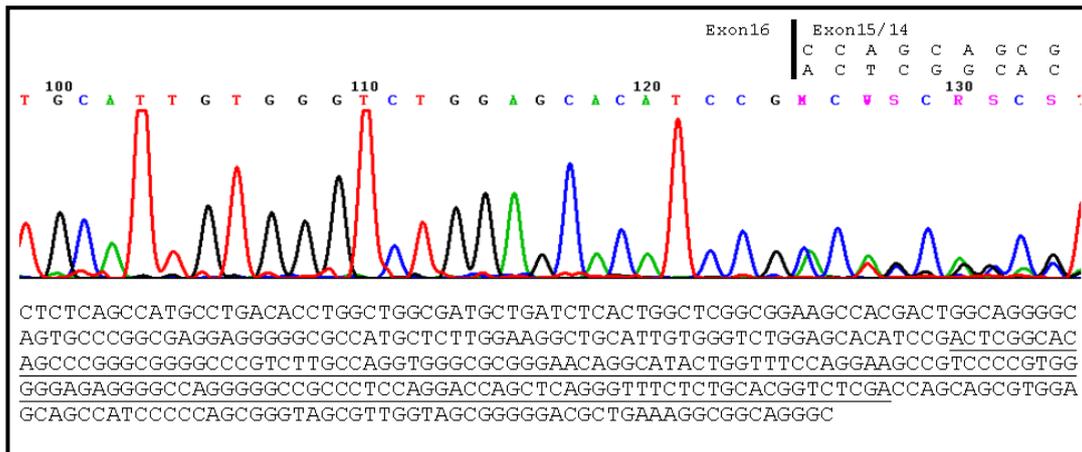


Abbildung 14: Sequenzierung Thrombozyten cDNA mit dem PITM2_B Primerpaar
 Die Sequenz der Isoform PITPNM2_2 dargestellt, unterstrichen ist das Exon 15.

Die Sequenzierungsreaktion zeigt damit, dass die in Abbildung 13, Spur 2 zu erkennende Doppelbande auf ein Gemisch aus PITPNM2-Transkripten mit und ohne Exon 15 zurückzuführen ist.

4. 3 Klonierung von PITPNM2

PITPnm2 sollte als Fusionsprotein mit einem durch Antikörper detektierbaren "Tag" exprimiert werden. Das rekombinante Protein kann dann zur Qualitätsprüfung von PITPnm2-Antikörpern verwendet werden.

4. 3. 1 PITPNM2-Klon IRATp970G02136D

Da es nicht gelungen war, den vollständigen Offenen Leserahmen von PITPNM2 zu amplifizieren, wurde von der Firma BioScience imaGenes (Berlin) der Klon IRATp970G02136D erworben. In dem Vektor pCMV-SPORT6 sollte die cDNA von PITPNM2 inseriert sein. Das in den Vektor inserierte cDNA-Fragment wurde vollständig sequenziert, aber nur ein Teil der cDNA war in dem

Klon enthalten. In Abbildung 15 ist der Offene Leserahmen (ATG und TAG sind rot markiert) und der 3'-untranslatierte Bereich des PITPMN2 Transkripts (Splicevariante 1) wiedergegeben. Unterstrichen wurde der Bereich des Transkripts, der in den Vektor pCMV-SPORT6 inseriert war. Grün hinterlegt ist die Erkennungssequenz TGGCCA für das Restriktionsenzym MscI.

ATGATTATAAAGGAATATCGGATTCCTCTGCCAATGACCGTGGAGGAGTACCGCATCGCCCAGC
TGTACATGATACAGAAGAAGAGCCGTAACGAGACATATGGCGAAGGCAGCGCGTGGAGATCCT
GGAGAACCGGCCGTACACAGATGGCCCAGGCGGCTCTGGGCAGTACACACACAAGGTGTATCAT
GTGGGCATGCACATTCCCAGCTGGTTCCGCTCCATCCTGCCAAGGCAGCCCTGCGGGTGGTGG
AGGAGTCTTGGAATGCCTACCCCTACACCCGAACCAGGTTACCTGTCTTTTCGTGGAGAAATT
CTCCATCGACATTGAAACCTTTTATAAAAATGATGCTGGAGAAAACCCCGACGTGTTCAACCTC
TCTCCTGTGGAAAAGAACCAGCTGACAATCGACTTCATCGACATTGTCAAAGACCCGTGCCCC
ACAACGAGTATAAGACAGAAGAGGACCCCCAAGCTGTTCCAGTCAACCAAGACCCAGCGGGGGCC
CCTGTCCGAGAACTGGATCGAGGAGTACAAGAAGCAGGTCCTCCCCATCATGTGCGCATAACAAG
CTCTGCAAGGTGGAGTTCCGCTACTGGGGCATGCAGTCCAAGATCGAGAGGTTTCATCCACGACA
CCGACTACGGAGGGTGTGGTGCAGGCTCACCAGGAGGCTGGTGTGTCAGGACGAGTGGTA
TGGGCTGAGCATGGAGAACATCCGGGAGCTGGAGAAGGAGGCACAGCTCATGCTTTCCGTAAG
ATGGCCCAGTTCATGAGGATGGTGGAGGAGCCACTGAGTCGTCAAGCACGAAGCCGTCTCGG
ACCAGACCTCTGGGGAGCCCCGGAGCCCAGCAGCAATGGGGAGCCCCTAGTGGGGCGCGG
CCTCAAGAAACAGTGGTCCACATCCTCCAAGTCGTCTCGGTGTCGAAGCGGGGAGCGAGTCTC
TCCCGCCACAGCATCTCAGAGTGGAGGATGCAGAGTATTGCCAGGGACTCGGATGAGAGCTCAG
ATGATGAGTTCCTCGATGCGCACGAGGACCTGTCCGACACAGAGGAAAATGTTCCCCAAGGACAT
CACCAAGTGGAGTCCAATGACCTCATGGACAAGATCGAGAGCCCAGAGCCGGAAGACACACAA
GATGGTCTGTACCGCCAGGGTGGCCCTGAGTTCAGGGTGGCCTCCAGTGTGGAGCAGCTGAACA
TCATAGAGGACGAGGTTAGCCAGCCGCTGGCTGCACCGCCCTCCAAGATCCACGTGCTGCTACT
GGTGTGACAGGAGGCACCATCCTGGACACAGGCGCCGGGGACCCAGCTCCAAGAAGGGCGAT
GCTAACACCATCGCCAACGTGTTGACACCGTCATGCGCGTGCACACTACCCAGCGCCCTGGGCC
GCCTTGCCATCCGCCTGGTGCCCTGCCCGCCGCTGCTGCTGACGCTTTGCCCTGGTCTCCAA
CCTCAGCCCCCTACAGCCATGACGAAGGCTGTCTGTCCAGCAGTCAGGACCACATTCCCCTGGCT
GCCCTCCCCCTGC**TGGCCA**CCTCCTCCCCCAGTACCAGGAGGCAGTTGCCACAGTGATTACAGC
GAGCCAACCTTGCCTATGGGGACTTCATCAAGTCCCAGGAGGCATGACCTTCAATGGGCAGGT
CTGCCTGATTGGGGACTGCGTCCGGGGCATCCTGGCATTGTGATGCCCTGTGCTACAGTAACCAG
CCGGTGTCTGAGAGTCAGAGCAGCAGCCGCCGGGGCAGCGTGGTCAGCATGCAGGACAATGACC
TGCTGTCCCCGGGCATCCTGATGAATGCAGCACACTGCTGCGGTGGTGGCGGTGGCGGCGGTGG
CGGTGGTGGCAGCAGTGGTGGTGGTGGCAGTAGTGGTGGCTCCAGCCTGGAGAGCAGTCGGCAC
CTGAGCCGAAGCAACGTGACATCCCCCGCAGCAACGGCACTGAGGACCCCAAAAGGCAACTGC
CCCGCAAGAGGAGCGACTCATCCACCTACGAGCTGGATACCATCCAGCAGCACCAGGCCTTCTCT
GTCCAGCCTCCATGCCAGCGTGTGAGGACTGAGCCCTGCTCACGCCATTCCAGCAGCTCCACC
ATGCTGGATGGCACAGGTGCCCTGGGCAGGTTTGACTTTGAGATCACCGACCTCTTCTCTTTCCG
GGTGCCCCGCTGGGGCTGGTCCCTGGCCTTGAGGAAGACTGTCATCCCAGCCCTGGATGTTTTCCA
GCTGCGGCCCGCCTGCCAGCAAGTCTACAACCTCTTCCACCCCGCGGACCCGTCAGCTTCACGC
CTGGAGCCGCTGCTGGAACGGCGCTTTACAGCCCTGCCGCTTTTACAGCTCCCCGCTACCAAC
GCTACCCGCTGGGGGATGGCTGCTCCACGCTGCTGGCGGATGTGCTCCAGACCCACAATGCAGC
CTTCCAAGAGCATGGCGCCCCCTCCTCGCCGGGCACTGCCCTGCCAGTCTGTGGCTTCCGCCGA
GCCAGTGAGATCAGCATCGCCAGCCAGGTGTCAGGCATGGCTGAGAGCTACACGGCATCCAGCA
TCGCCCAGAAGGCCCCCGATGCGCTCAGCCATAACCCCGAGCGTCAGGCGTCTGTCCCTGCTCGC
CCTGCCCGCCCCAGCCCCACCACCCTGGCCCCACCCTCCAGCCAGGAAGGCAAGCCCTGGC
CTGGAGAGGGCCCCCTGGCCTCCCTGAGCTGGACATTGGAGAAGTCGCTGCAAAGTGGTGGGGCC
AGAAGCGGATCGACTACGCCCTGTACTGCCCTGACGCCCTCACGGCTTCCCCACGGTGGCTCT

GCCTCACCTCTTCCACGCCAGCTACTGGGAGTCAACAGACGTGGTCTCCTTTCTGCTGAGACAG
 GTCATGAGGCATGACAACCTCCAGCATCTTGGAGCTGGATGGCAAGGAAGTGTGGTGTTCACCC
 CCTCAAAGCCAAGGGAGAAGTGGCAGCGCAAGCGGACCCACGTGAAGCTGCGGAACGTGACGGC
 CAACCACCGGATCAATGATGCCCTTGCCAATGAGGACGGCCCCCAGGTTCTGACGGGCAGGTTT
 ATGTATGGGCCCTGGACATGGTCCACCTGACTGGGGAGAAGGTGGATGTGCACATCATGACCC
 AGCCGCCCTCAGGCGAGTGGCTCTACCTGGATACGCTGGTGACCAACAACAGTGGGCGTGTCTC
 CTACACCATCCCTGAGTCGCACCGCCTGGGCGTGGGTGTCTACCCTATCAAGATGGTGGTCAGG
 GGAGACCACACGTTTGGCGACAGCTACATCACCGTGCTGCCAAGGGCACAGAGTTCGTGGTCT
 TCAGCATCGACGTTTCTTTGCCGCTAGCGTGTCCATCATGGGCAGCGACCCCAAGGTGCGGGC
 CGGGGCCGTGGACGTGGTGCGGCACTGGCAGGACCTGGGCTACCTCATCATCTACGTGACGGGC
 CGCCCCGACATGCAGAAGCAGCGGGTGGTGGCGTGGCTGGCCAGCACAACCTTCCCCATGGCG
 TGGTGTCTTCTGTGACGGCCTGGTGCATGACCCGCTGCGGCACAAGGCCAACTTCTGAAGCT
 GTCATCTCCGAGCTGCACCTGCGCGTGCACGCGGCTATGGCTCCACCAAGGACGTGGCGGTG
 TACAGCGCCATTAGCCTGTCCCCATGCAGATCTACATCGTGGGCCGGCCACCAAGAAGCTGC
 AGCAGCAGTGCCAGTTCATCACGGATGGCTACGCGGCCACCTGGCGCAGCTGAAGTACAGCCA
 CCGGGCGCGGCCCGCTCGCAACACGGCCACCCGCATGGCGCTGCGCAAGGGCAGCTTCGGCCTG
 CCGGCCAGGGCGACTTTCTGCGCTCCCGGAACACCTGCTTCGCACCATCTCGGCCAGCCCA
 GCGGGCCAGCCACCGGCACGAGCGGACACAGAGCCAGGCGGATGGCGAGCAGCGGGGCCAGCG
 CAGCATGAGTGTGGCGGGCTGCTGGGGCCGCGCCATGACTGGCCGCTGGAGCCGGGGGCA
 GCCGCGGGCCCCAAGTAGGGCACCGTGAGTGCAGCGGGGTCTCCATGGTGTAGGCCAGGGT
 GGCCA GCCCCGCCAGGAGGCCTGGCCTGGGCACACGCACTGACGTGGGCCTGGGAGATTGTCCC
 AGGGCCTTGTGGAGGACACGGGCCGACACACAGTGTCCCTGCCCTGCCTCACGTCTCGGG
 CCTGACGGGTCCGGCTTGTTCATGGAAGCTGGCAGGGACCACCAGCCCCAGGATGGCAGAGGGAC
 CAGAACCTCCCCTCAGACTGGCCCCGGGAGTCTCCCAGACATTTTGCCTGTGTGGATCTCC
 AAGTGTCTTGGTCCAGGTGTGGGCCAGGCGCAGCCTGCCACCTCCCATCCACTGGGCCA CCC
 TCACTCCCAGGTCCCCTCCCATTGGTAGCAGCTCCAACAGGGGTCCAGCCTGCATCTTGTAA
 CTCGAGTTTCTCAACTGTTC

Abbildung 15: Sequenz PITPNM2-Klon IRATp970G02136D

Diesem Klon fehlt vom ATG beginnend ein Teil des Offenen Leserahmens von PITPNM2. Das Transkript beginnt erst an Position c.1414, die ersten 471 Aminosäuren von PITPnm2 fehlen. Dieser fehlende Teil der cDNA wurde aus Thrombozyten-cDNA amplifiziert und kloniert.

Der in dem PITPNM2-Klon IRATp970G02136D inserierte Teil des Transkripts kann durch einen Restriktionsverdau mit *MscI* aus dem Klon geschnitten werden.

4. 3. 2 Klonierung des fehlenden Anteils von PITPNM2 und Zusammenfügung des Offenen Leserahmens

Der fehlende, vordere Teil des Transkripts von PITPNM2 wurde amplifiziert und das PCR-Produkt wurde in einen PCR-Klonierungsvektor inseriert. Diese Arbeit wurde von Frau Daniela Scheld, Technische Assistentin am Institut für Klinische

Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg, durchgeführt. Der Klon wurde DS2 (siehe Abbildung 16) genannt. Die klonierte Sequenz von PITPNM2 ist angegeben, in Blau ist die Vektorsequenz markiert. Rot markiert ist das ATG-Startcodon, die *MscI*-Erkennungssequenz ist grün hinterlegt. Der Überlappungsbereich mit dem Klon IRATp970G02136D ist unterstrichen.

ACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCCGCGGTGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGG
 GCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTGCGAAGCTTGGACTCCAAGATGATTATAAAGGAATA
 TCGGATTCTCTGCCAATGACCGTGGAGGAGTACCGCATCGCCCAGCTGTACATGATACAGAAG
 AAGAGCCGTAACGAGACATATGGCGAAGGCAGCGCGTGGAGATCCTGGAGAACCGGCCGTACA
 CAGATGGCCCAGGCGGCTCTGGGCAGTACACACACAAGGTGTATCATGTGGGCATGCACATTCC
 CAGCTGGTTCGCTCCATCTGCCCCAAGGCAGCCCTGCGGGTGGTGGAGGAGTCTTGGAAATGCC
 TACCCCTACACCCGAACCAGGTTACCTGTCTTTTCGTGGAGAAATTCTCCATCGACATTGAAA
 CCTTTTATAAACTGATGCTGGAGAAAACCCCGACGTGTTCAACCTCTCTCTGTGGAAAAGAA
 CCAGCTGACAATCGACTTCATCGACATTGTCAAAGACCCTGTGCCCCACAACGAGTATAAGACA
 GAAGAGGACCCCAAGCTGTTCCAGTCAACCAAGACCCAGCGGGGGCCCTGTCCGAGAAGTGA
 TCGAGGAGTACAAGAAGCAGGTCTTCCCCATCATGTGCGCATAACAAGCTCTGCAAGGTGGAGTT
 CCGTACTGGGGCATGCAGTCCAAGATCGAGAGGTTTATCCACGACACCGGACTACGGAGGGTG
 ATGGTGCGGGCTCACCGGCAGGCTGGTGTGGCAGGACGAGTGGTATGGGCTGAGCATGGAGA
 ACATCCGGGAGCTGGAGAAGGAGGCACAGCTCATGCTTCCCGTAAGATGGCCCAGTTCAATGA
 GGATGGTGGAGGAGCCACTGAGCTCGTCAAGCACGAAGCCGTCTCGGACCAGACCTCTGGGGAG
 CCCCCGAGCCAGCAGCAGCAATGGGGAGCCCTAGTGGGGCGCGGCTCAAGAAACAGTGGT
 CCACATCCTCCAAGTCTGCTCGGTCTGTTCAAGCGGGAGCGAGTCTTCCCGCCACAGCATCTC
 AGAGTGGAGGATGCAGAGTATTGCCAGGGACTCGGATGAGAGCTCAGATGATGAGTTCTTCGAT
 GCGCACGAGGACCTGTCCGACACAGAGGAAATGTTCCCAAGGACATACCAAGTGGAGCTCCA
 ATGACCTCATGGACAAGATCGAGAGCCAGAGCCGGAAGACACACAAGATGGTCTGTACCGCCA
 GGGTGGCCCTGAGTTTCAAGGTGGCCTCCAGTGTGGAGCAGCTGAACATCATAGAGGACGAGGTT
 AGCCAGCCGCTGGCTGCACCGCCCTCCAAGATCCACGTGCTGCTACTGGTGTGCACGGAGGCA
 CCATCCTGGACACAGGCGCCGGGGACCCAGCTCCAAGAAGGGCGATGCTAACACCATCGCCAA
 CGTGTTCGACACCGTTCATGCGCGTGCACACTACCCAGCGCCCTGGGCGCCTTGCCATCCGCCTG
 GTGCCCTGCCC GCCGTCTGCTCTGACGCCTTTGCCCTGGTCTCCAACCTCAGCCCCCTACAGCC
 ATGACGAAGGCTGTCTGTCCAGCAGTCAGGACCACATTCCTCCCTGGCTGCCCTCCCCCTGC
 TGGC
 CACTCTCTCCCCCAGTACCAGGAGGCAGTTGCCACAGTGATTCAGCGAGCCAACCTTGCCTAT
 GGGACTTCATCAAGTCCCAGGAGGGCATGACCTTCAATGGGCAGGTCTGCCTGATTGGGGACT
 GCGTCCGGGGCATCCTGGCATTGATGCCCTGTGCTACAGTAACCAGCCGGTGTCTGAGAGTCA
 AAGCAGCAGCCCGGGGCGAGCGTGGTTCAGCATGCGGGACAATGACCTGCTGTCCCCGGGCATC
 CTGATGAATGCAGCACACTGCTGCGGTGGTGGCGGTGGCGGCGGTGGCAGCAGTGGTGGTGGT
 GCAGTAGTGGTGGCTCCAGCCTGGAGAGCAGTCGGCACCTGAGCCGAAGCAACGTCGACATCCC
 AAGGGCGAATTCCACAGTGGATATCAAGCTTATCGATACCGTTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGT
 ACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGAGC

Abbildung 16: Sequenz DS2-Klon

Aus dem Klon IRATp970G02136D wurde das 2546 Bp große *MscI*-Fragment ausgeschnitten und aus dem Agarosegel gereinigt. Der Klon DS2 wurde mit *MscI* linearisiert und das aus dem Klon IRATp970G02136D isolierte *MscI*-Fragment inseriert. Da es sich dabei um eine ungerichtete Klonierung handelt wurden mittels Kolonie-PCR nur solche Klone ausgewählt, die mit dem Primerpaar PITM2_F6 und PITM2R_Klon (siehe Tabelle 10) zu einem PCR-Produkt führen.

Primername	Sequenz
PITM2_F6	CGTAAGATGGCCCAGTTCAA
PITM2R_Klon	GTCTTCCTCAAGGCCAGGAC

Tabelle 10: Primerpaar zur Überprüfung der Insertion des *MscI*-Fragments

Aus allen positiven Klonen wurde ein Klon zur Überprüfung des gesamten Offenen Leserahmens ausgewählt. Die Sequenzierungen mit Vektorprimern und internen PITPNM2 Primern wurde sowohl mit den Primern, die für die Transkriptcharakterisierung verwendet wurden, als auch mit einigen neuen Primern (PITM2_F_2, PITM2_F6, PITM2_F7, PITM2_F8, PITM2_F10, PITM2_F11, PITM2_F12, PITM2_RSeq4, siehe Tabelle 3), durchgeführt.

Der Offene Leserahmen erwies sich als korrekt und vollständig, nach dem TAG-Stoppcodon war allerdings ein Teil des PITPNM2-Transkripts dupliziert. Dieser Klon wurde pCR2.1 (PITPNM2) benannt. In Abbildung 17 ist die Sequenz des Klons pCR2.1 (PITPNM2) gezeigt. Die Vektorsequenz ist blau, das duplizierte PITPNM2-Fragment ist gelb hinterlegt, ATG und TAG sind rot hinterlegt. Unterstrichen ist der Teil des Offenen Leserahmens, der aus dem Klon DS2 stammt.

Ergebnisse

ACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCCgCGGTGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGG
GCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTGCGAAGCTTGGACTCCAAGATGATTATAAAGGAATA
TCGGATTCTCTGCCAATGACCGTGGAGGAGTACCGCATCGCCCAGCTGTACATGATACAGAAG
AAGAGCCGTAACGAGACATATGGCGAAGGCAGCGCGTGGAGATCCTGGAGAACCGGCCGTACA
CAGATGGCCCAGGCGGCTCTGGGCAGTACACACACAAGGTGTATCATGTGGGCATGCACATTCC
CAGCTGGTTCCGCTCCATCTGCCAAGGCAGCCCTGCGGGTGGTGGAGGAGTCTTGGAATGCC
TACCCCTACACCCGAACCAGGTTACCTGTCTTTTCGTGGAGAAATTCTCCATCGACATTGAAA
CCTTTTATAAACTGATGCTGGAGAAAACCCCGACGTGTTCAACCTCTCTCTGTGGAAAAGAA
CCAGCTGACAATCGACTTCATCGACATTGTCAAAGACCCTGTGCCCCACAACGAGTATAAGACA
GAAGAGGACCCCAAGCTGTTCCAGTCAACCAAGACCAGCGGGGGCCCTGTCCGAGAACTGGA
TCGAGGAGTACAAGAAGCAGGTCTTCCCCATCATGTGCGCATAACAAGCTCTGCAAGGTGGAGTT
CCGCTACTGGGGCATGCAGTCCAAGATCGAGAGGTTTATCCACGACACCCGACTACGGAGGGTG
ATGGTGC GGCTCACCGGCAGGCCTGGTGCTGGCAGGACGAGTGGTATGGGCTGAGCATGGAGA
ACATCCGGGAGCTGGAGAAGGAGGCACAGCTCATGCTTTCCCGTAAGATGGCCCAGTTCAATGA
GGATGGTGGAGGAGGCCACTGAGCTCGTCAAGCACGAAGCCGTCTCGGACCAGACCTCTGGGGAG
CCCCGGAGCCAGCAGCAGCAATGGGGAGCCCTAGTGGGGCGCGGCCCTCAAGAAACAGTGGT
CCACATCCTCCAAGTTCGTCTCGGTTCGTCCAAGCGGGGAGCGAGTCCCTTCCCGCCACAGCATCTC
AGAGTGGAGGATGCAGAGTATTGCCAGGGACTCGGATGAGAGCTCAGATGATGAGTTCTTCGAT
GCGCACGAGGACCTGTCCGACACAGAGGAAATGTTCCCCAAGGACATCACCAAGTGGAGCTCCA
ATGACCTCATGGACAAGATCGAGAGCCAGAGCCGGAAGACACACAAGATGGTCTGTACCGCCA
GGGTGCCCTGAGTTCAGGGTGGCCTCCAGTGTGGAGCAGCTGAACATCATAGAGGACGAGGTT
AGCCAGCCGCTGGCTGCACCGCCCTCCAAGATCCACGTGCTGCTACTGGTGTGCACGGAGGCA
CCATCCTGGACACAGGCGCCGGGGACCCAGCTCCAAGAAGGGCGATGCTAACACCATCGCCAA
CGTGTTCGACACCGTTCATGCGCGTGCACACTACCCAGCGCCCTGGGCCGCTTGCCATCCGCCTG
GTGCCCTGCCCGCCCGTCTGCTCTGACGCCTTTGCCCTGGTCTCCAACCTCAGCCCCTACAGCC
ATGACGAAGGCTGTCTGTCCAGCAGTACAGGACCACATTTCCCTGGCTGCCCTCCCCCTGCTGGC
CACTCTCTCCCCCAGTACCAGGAGGCAGTTGCCACAGTGATTCAGCGAGCCAACCTTGCCTAT
GGGGACTTCATCAAGTCCCAGGAGGGCATGACCTTCAATGGGCAGGTCTGCCTGATTGGGGACT
GCGTCGGGGGCATCCTGGCATTGATGCCCTGTGCTACAGTAACCAGCCGGTGTCTGAGAGTCA
GAGCAGCAGCCCGCGGGGCAGCGTGGTTCAGCATGCAGGACAATGACCTGCTGTCCCCGGGCATC
CTGATGAATGCAGCACACTGCTGCGGTGGTGGCGGTGGCGGGCGGTGGCGGTGGTGGCAGCAGTG
GTGGTGGTGGCAGTAGTGGTGGCTCCAGCCTGGAGAGCAGTCCGGCACCTGAGCCGAAGCAACGT
CGACATCCC CGCAGCAACGGCACTGAGGACCCCAAAAGGCAACTGCCCCGCAAGAGGAGCGAC
TCATCCACCTACGAGCTGGATAACCATCCAGCAGCACCAGGCCTTCCCTGTCCAGCCTCCATGCCA
GCGTGTGAGGACTGAGCCCTGCTCACGCCATTCCAGCAGCTCCACCATGCTGGATGGCACAGG
TGCCCTGGGCAGTTTTGACTTTGAGATCACCGACCTCTTCCCTCTTCGGGTGCCCGCTGGGGCTG
GTCCCTGGCCTTGAGGAAGACTGTCATCCCAGCCCTGGATGTTTTCCAGCTGCGGGCCGGCCTGCC
AGCAAGTCTACAACCTCTTCCACCCCGCGGACCCGTGAGCTTCCAGCCTGGAGCCGCTGCTGGA
ACGGCGCTTTCACGCCCTGCCGCTTTCAGCGTCCCCCGCTACCAACGCTACCCGCTGGGGGAT
GGTGTCTCCACGCTGCTGGCGGATGTGCTCCAGACCCACAATGCAGCCTTCCAAGAGCATGGCG
CCCCCTCCTCGCCGGGCACTGCCCTGCCAGTCGTGGCTTCCGCCGAGCCAGTGGATCAGCAT
CGCCAGCCAGGTGTGAGGCATGGCTGAGAGCTACACGGCATCCAGCATCGCCAGAAGGCCCCC
GATGCGCTCAGCCATACCCCGAGCGTACGGCGTCTGTCCCTGCTCGCCCTGCCCGCCCCAGCC
CCACCACCCCTGGCCCCCACCCTCCAGCCAGGAAGGCAAGCCCTGGCCTGGAGAGGGCCCCCTGG
CCTCCCTGAGCTGGACATTGGAGAAGTCGCTGCAAAGTGGTGGGGCCAGAAGCGGATCGACTAC
GCCCTGTACTGCCCTGACGCCCTCACGGCCTTCCCCACGGTGGCTCTGCCTCACCTCTTCCACG
CCAGCTACTGGGAGTCAACAGACGTGGTCTCCTTTCTGCTGAGACAGGTTCATGAGGCATGACAA
CTCCAGCATCTTGGAGCTGGATGGCAAGGAAGTGTCCGGTGTTCACCCCTCAAAGCCAAGGGAG
AAGTGGCAGCGCAAGCGGACCCACGTGAAGCTGCGGAACGTGACGGCCAACCACCGGATCAATG
ATGCCCTTGCCAATGAGGACGGCCCCAGGTTCTGACGGGCAGGTTTCATGTATGGGCCCCCTGGA
CATGGTACCCCTGACTGGGGAGAAGGTGGATGTGCACATCATGACCCAGCCGCCCTCAGGCGAG
TGGCTCTACCTGGATACGCTGGTACCAACAACAGTGGGCGTGTCTCCTACACCATCCCTGAGT
CGCACCGCCTGGGCGTGGGTGTCTACCCTATCAAGATGGTGGTTCAGGGGAGACCACACGTTTGC

```
CGACAGCTACATCACCGTGCTGCCCCAAGGGCACAGAGTTCGTGGTCTTCAGCATCGACGGTTCC
TTTGCCGCTAGCGTGTCCATCATGGGCAGCGACCCCAAGGTGCGGGCCGGGGCCGTGGACGTGG
TGCGGCACTGGCAGGACCTGGGCTACCTCATCATCTACGTGACGGGCCGGCCGACATGCAGAA
GCAGCGGGTGGTGGCGTGGCTGGCCCAGCACAACCTTCCCCCATGGCGTGGTGTCTTCTGTGAC
GGCCTGGTGCATGACCCGCTGCGGCACAAGGCCAACCTTCCTGAAGCTGCTCATCTCCGAGCTGC
ACCTGCGCGTGCACGCGGCCATGGCTCCACCAAGGACGTGGCGGTGTACAGCGCCATTAGCCT
GTCCCCCATGCAGATCTACATCGTGGGCCGCCCCACCAAGAAGCTGCAGCAGCAGTGCCAGTTC
ATCACGGATGGCTACGCGGCCACCTGGCGCAGCTGAAGTACAGCCACCGGGCGCGGCCGCTC
GCAACACGGCCACCCGCATGGCGCTGCGCAAGGGCAGCTTCGGCCTGCCCGGCCAGGGCGACTT
TCTGCGCTCCCGGAACCACCTGCTTCGCACCATCTCGGCCAGCCCAGCGGGCCAGCCACCGG
CACGAGCGGACACAGAGCCAGGCGGATGGCGAGCAGCGGGGCCAGCGCAGCATGAGTGTGGCGG
CCGGCTGCTGGGGCCGCGCCATGACTGGCCGCTGGAGCCGGGGGCAGCCGCGGGCCCCAAGTA
GGCACCGTGAGTGCAGCGCGGGGTCTCCATGGTGTAGGCCAGGGTGGCCAACCTCCTCCCCC
AGTACCAGGAGGCAGTTGCCACAGTGATTCAGCGAGCCAACCTTGCCATATGGGGACTTCATCAA
GTCCCAGGAGGGCATGACCTTCAATGGGCAGGTCTGCCTGATTGGGGACTGCGTCCGGGGGCATC
CTGGCATTGATGCCCTGTGCTACAGTAACCAGCCGGTGTCTGAGAGTCAAAGCAGCAGCCGCC
GGGGCAGCGTGGTGCAGCATGCGGGACAATGACCTGCTGTCCCGGGCATCCTGATGAATGCAGC
ACACTGCTGCGGTGGTGGCGGTGGCGGGCGGTGGCAGCAGTGGTGGTGGTGGCAGTAGTGGTGGC
TCCAGCCTGGAGAGCAGTCGGCACCTGAGCCGAAGCAACGTCGACATCCC AAGGGCGAATTCCA
CAGTGGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGT
CCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGAGC
```

Abbildung 17: Sequenz pCR2.1 (PITPNM2)-Klon

Dieser Klon ist geeignet für die Umklonierung des Offenen Leserahmens in einen Expressionsvektor. Hierzu wurde das "Strataclone Mammalian Expression System" ausgewählt. Ein Vektor, der die C-terminale Fusionierung mit einem "Flag-Tag" ermöglicht, wurde dabei eingesetzt (pCMV-SC-CF, Stratagene).

Zunächst wurde mit dem Klon pCR2.1(PITPNM2) als Template eine PCR zur Amplifikation des vollständigen Leserahmens von PITPNM2 durchgeführt. Die flankierenden Sequenzen des Primers wurden nach der Arbeitsanleitung von Stratagene entworfen (PITM2_Ex_F und PITM2_Ex_R, siehe Tabelle 3).

Das erhaltene PCR-Produkt wurde aus dem Agarosegel gereinigt und nach der Reinigung erneut auf einem Agarosegel überprüft. In Abbildung 18 ist das gereinigte, etwa 4 kBp große PCR-Fragment gezeigt.

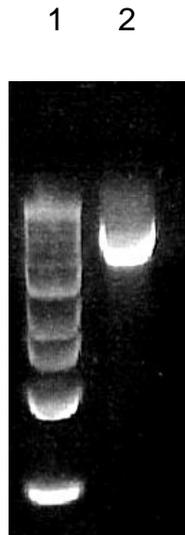


Abbildung 18: PCR-Produkt des gesamten Offenen Leserahmens von PITPM2 mit dem Primerpaar PITM2_Ex_Fw und Re
Spur 1: DNA-Standard, Spur 2: Amplifikationsprodukt.

Die Klonierung in den Vektor führte zu 14 Klonen. Von 8 dieser Klone wurden Plasmid-Minipräparationen durchgeführt. Die Plasmid-DNA ist in Abbildung 19 gezeigt.

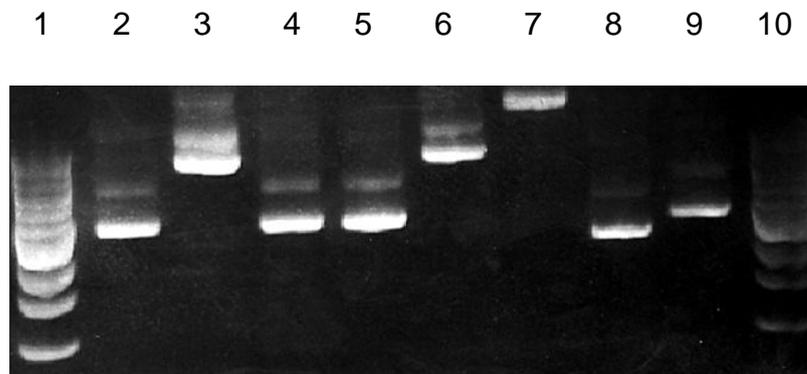


Abbildung 19: Plasmidpräparationen pCMV-SC-CF (PITPM2)
Spuren 1 und 10: DNA-Längenstandard, Spuren 2 bis 9: Klone 1 bis 8.

Diese Plasmid-DNA wurde als Template für die Amplifikation mit den Primern PITM2_AFw und PITM2_R2 (siehe Tabelle 3) eingesetzt. Das korrekte Produkt von etwa 1,4 kBp konnte von den Klonen 2 und 5 (Spuren 3 und 6, Abbildung 19) erhalten werden.

Die Sequenzierung mit den Vektorprimern T3 und T7 (siehe Tabelle 3) zeigte für diese beiden Klone die korrekte Orientierung im Vektor, Klon 2 zeigte darüber hinaus einen Basenaustausch im sequenzierten Bereich, der auch zu einem Aminosäureaustausch führte. Für Klon 5 wurde der gesamte Offene Leserahmen überprüft. Dabei zeigte sich, dass auch dieser Klon eine Basensubstitution aufwies, die zu einem Aminosäureaustausch führt: An Position 229 des Proteins wird ein Cystein durch ein Arginin ersetzt (p.C229R). Diese Mutation wurde von Frau Sabine Gätzner, technische Assistentin am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg, durch Rückmutagenese entfernt.

Nun stand der korrekte PITPNM2-Expressionsklon pCMV-SC-CF (PITPNM2) mit fusioniertem "Flag-Tag" für die Expression des Proteins zur Verfügung.

4. 4 Expression von PITPnm2 in HEK-Zellen

Um das PITPnm2-Protein nachzuweisen wurden polyklonale Antikörper generiert (Biogenes, Berlin). Ein Peptid des PITPnm2-Proteins aus dem vorderen Teil des Proteins, KKQWSTSSKSSRSS, wurde dabei als Antigen für die Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen verwendet. Präimmenserum und Immenserum von 2 Tieren standen zur Verfügung.

Um die Qualität dieser Antikörper zu überprüfen wurde PITPnm2 rekombinant in HEK Zellen exprimiert. Dazu wurde das Konstrukt pCMV-SC-CF (PITPNM2) transient in HEK-Zellen transfiziert und ein Gesamtprotein-Extrakt gewonnen. Die Proteinmenge wurde mittels des Bradford-Tests bestimmt.

Dieser Proteinextrakt wurde in einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Ponceau-S-Färbung und der Western-Blot sind in Abbildung 20 und Abbildung 21 für das Tier 3127 gezeigt. Bei dem Immenserum von Tier 3128 erhielt man ein vergleichbares Bild.

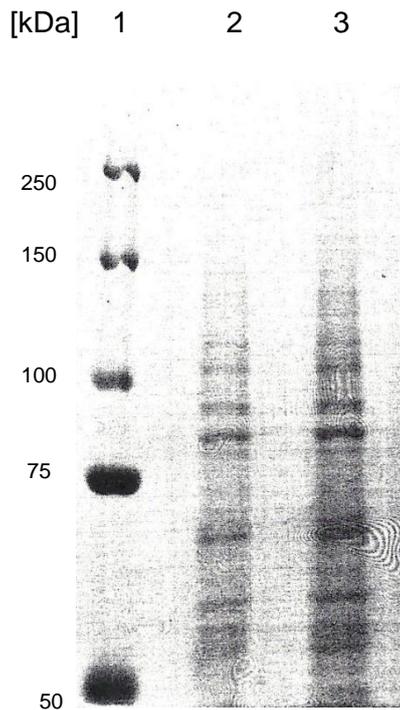


Abbildung 20: Ponceau-S Färbung der HEK-Extrakte
 Spur 1: Protein-Standard, Spur 2: HEK-Zellen, nicht transfiziert, Spur 3: HEK-Zellen mit pCMV-SC-CF (PITPNM2).

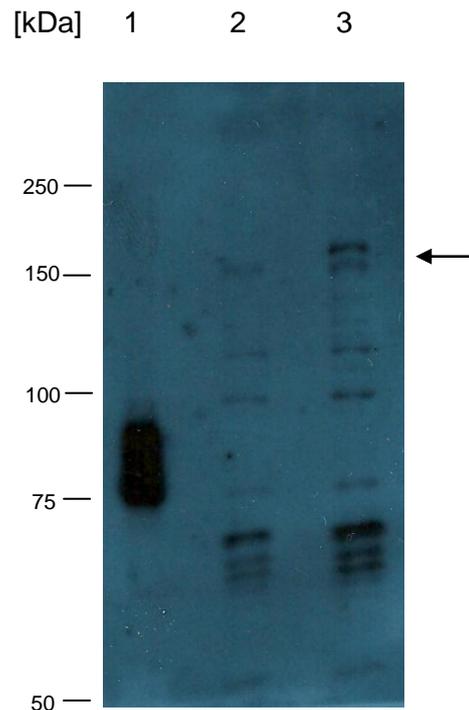


Abbildung 21: Western-Blot der HEK-Extrakte mit PITPNM2 Antikörper aus Tier 3127
 Spur 1: Protein-Standard, Spur 2: HEK-Zellen, nicht transfiziert, Spur 3: HEK-Zellen mit pCMV-SC-CF (PITPNM2).

Der Antikörper erkennt zahlreiche Proteine, die auch in nicht-transfizierten HEK-Zellen vorhanden sind und ein deutlich geringeres Molekulargewicht aufweisen als es für PITPNM2 zu erwarten wäre. Das mit Pfeil gekennzeichnete Fragment in Spur 3 des Western-Blots könnte das rekombinante PITPNM2 darstellen. Die identischen Zellextrakte wurden auch mit dem Flag-spezifischen Antikörper untersucht. In Abbildung 22 ist der Western-Blot gezeigt.

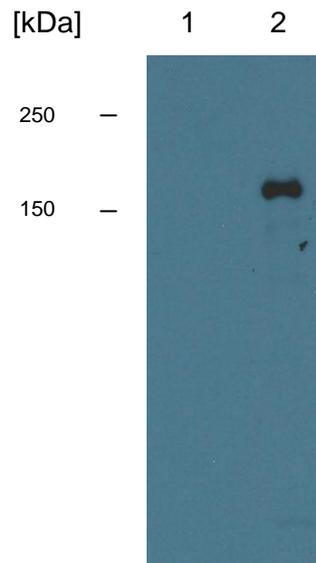


Abbildung 22: Western Blot der HEK-Extrakte mit dem Anti-Flag-Antikörper
Spur 1: Nicht transfizierte HEK-Zellextrakte, Spur 2: mit pCMV-SC-CF (PITPNM2) transfizierte HEK-Zellextrakte.

Hier ist bei den nicht-transfizierten Zellen kein Signal zu beobachten, die mit pCMV-SC-CF (PITPNM2) transfizierten Zellen zeigen ein deutliches Signal im erwarteten Größenbereich von 160 kDa (siehe Abbildung 22, Spur 2).

4. 5 Nachweis von PITPnm2 in Thrombozyten

Thrombozyten-Proteinextrakt wurde in einer SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Für den Western Blot wurden Seren des Tieres 3128 verwendet. Sowohl Präimmunserum als auch Immunserum des Tieres wurden getestet.

Während mit dem Präimmunserum nur schwache Banden auf dem Blot generiert werden können, zeigt der Blot mit dem Immunserum zahlreiche Banden über den gesamten Trennbereich des Gels. Im erwarteten Größenbereich von 160 kDa kann mit dem Immunserum keine dominante Bande detektiert werden (siehe Abbildung 23).

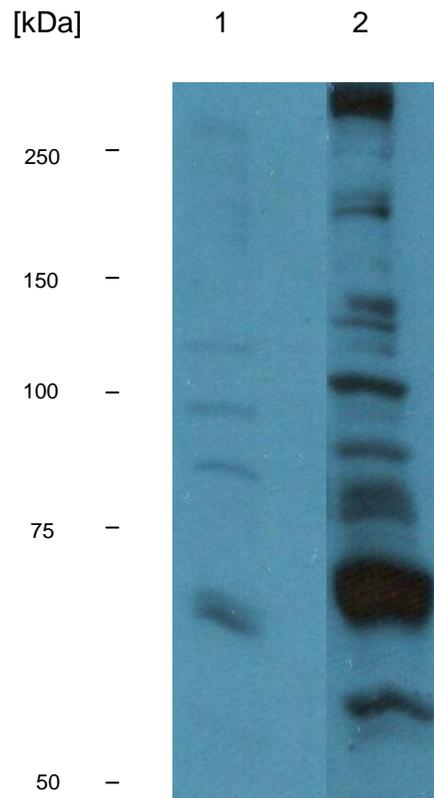


Abbildung 23: Western Blot mit Thrombozyten-Proteinextrakten und Seren des Tieres 3128. Spur 1: Präimmunsereum 3218, Spur 2: Immunsereum 3218.

Obwohl PITPnm2 in Proteomansätzen und auf Transkriptionsebene nachgewiesen wurde, kann mit diesen Antikörpern der Proteinnachweis in Thrombozyten nicht erbracht werden. Die durchgeführten Western Blot Analysen zeigen, dass die Peptid-Antikörper gegen PITPnm2 für weitere Untersuchungen nicht geeignet sind.

5. Diskussion

5.1 Nachweis der PITPNM2-Transkripte in Thrombozyten

Bisher sind in Säugetieren fünf Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine (PITP) identifiziert worden¹⁰. Die PITP teilen sich in mehrere Klassen auf, wobei Klasse I von Klasse II-Proteinen unterschieden werden. Klasse I-Proteine sind lösliche Einzeldomänen-Proteine, im Gegensatz dazu besitzen Klasse IIA-Proteine multiple Domänen mit verschiedenen Funktionen und stellen die humanen Homologen zu den RdgB α -Proteinen dar (siehe Kapitel 1.2.2).

Die Klasse IIA-Proteine interagieren mit der Tyrosinkinase PYK2. Demnach werden diese Proteine auch Nir-Proteine („PYK2 N-terminal domain-interacting receptors“) genannt⁹. Diese Interaktion führte zur Identifikation von drei humanen Nir-Proteinen durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H)⁹.

In Thrombozyten wurde aufgrund massenspektrometrischer Analysen durch Zahedi et al. gezeigt, dass in nicht-aktivierten Thrombozyten mehr als 600 Phosphorylierungsstellen vorhanden sind², unter denen sich auch PITPnm2 befindet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass PITPnm2 an der Aminosäure Serin 1277 eine um den Faktor 17,8 erhöhte Phosphorylierung nach Stimulation von Plättchen mit dem Prostaglandinagonisten Iloprost aufweist, als in nicht-aktiviertem Zustand. Das deutet darauf hin, dass PITPnm2 in den Plättchen-Inhibitions-Vorgang involviert ist und somit der Grund für weitere Untersuchungen war.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass von den drei verschiedenen Nir-Transkripten nur das PITPNM2 Transkript in Plättchen nachgewiesen werden kann. Zum einen führte die Amplifikation mit einem Primerpaar, das alle 3 PITPNM-Varianten bindet, nur zu der Amplifikation von PITPNM2. Darüber hinaus konnten mit Primerpaaren, die spezifisch für PITPNM1 und PITPNM3 waren, mit Thrombozyten-cDNA keine Amplifikate erhalten werden. PITPNM2 ist daher das einzige Transkript der PITP Klasse IIA-Transkripte in Thrombozyten.

5. 2 Differenzielle Spliceprodukte des PITPNM2-Proteins in Thrombozyten

In der Datenbank "UniprotKB"³⁰ werden zum Zeitpunkt der Laboruntersuchungen drei verschiedene Splice-Varianten von PITPNM2 beschrieben. Die Isoformen PITPNM2_1, 2 und 3 führen nach Translation zu unterschiedlichen Proteinprodukten. Diese Sequenzen wurden als Referenz für das Primerdesign verwendet. Aktuell (Dezember 2011) werden 10 differenzielle Spliceprodukte des PITMN2-Proteins in der Datenbank Ensembl¹⁸ unterschieden, welche teilweise auch translatiert werden. Einige dieser Varianten weisen jedoch nur ein oder zwei Exons auf und die mögliche Funktion dieser Produkte ist ungeklärt. Ein Alignment der drei oben genannten Splicevarianten²⁸ zeigt folgende Unterschiede (siehe Abbildung 9): Variante PITPNM2_1 unterscheidet sich von Variante PITPNM2_2 dadurch, dass jeweils ein unterschiedliches Exon exprimiert wird. Hier könnte es sich um „Exon-Skipping“ handeln^{21,23,24}, die häufigste Methode, die in Säugetieren zu differenziellen Splice-Varianten führt²⁵. Eine andere Möglichkeit wäre, dass es sich um die Splicevariante der sich gegenseitig ausschließenden Exons handelt. Dies würde bedeuten, dass nur jeweils eines der differenziellen Exons in die mRNA aufgenommen wird, unter keinen Umständen aber beide.

Tatsächlich besitzt die Variante PITPNM2_2 ein Exon, das in den beiden Varianten PITPNM2_1 und 3 nicht vorhanden ist. Den beiden letztgenannten Varianten ist ein Einschub von 55 Aminosäuren gemeinsam. Die Variante PITPNM2_3 ist das Transkript, das zu dem kleinsten PITPnm2-Protein führt: Im Vergleich zu PITPNM2_1 fehlen hier die Aminosäuren 50 bis 328.

Diese kurze Variante von PITPNM2 konnte weder in Plättchen noch in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Die PCR mit dem Primerpaar PITM2_F1 und PITM2_R1 führte zu einem Amplifikat von 1126 Bp (siehe Abbildung 10). Für die Variante PITPNM2_3 wäre ein Amplifikat von 289 Bp zu fordern.

Ein Primerpaar wurde entworfen, das die Sequenz umfasst, die nur in der Variante 2 zu finden ist (siehe Abbildung 11). Mit diesem Primerpaar wurden beide Amplifikate erhalten, sowohl das 376 Bp-Fragment mit dem differenziell

gespaltene Exon der Variante 2 als auch das 232 Bp-Fragment ohne dieses differenzielle Exon. Das spricht für das Vorhandensein der beiden Varianten PITPNM2_1 und PITPNM2_2 in Thrombozyten (siehe Abbildung 12).

Das konnte auch mit weiteren Primerpaaren bestätigt werden (siehe Abbildung 13). Das Primerpaar PITM2_B führt in Thrombozyten zu zwei Amplifikationsprodukten, 245 und 389 Bp (Spur 2, Abbildung 13), beide Fragmente sind deutlich erkennbar und weisen die Transkriptvarianten 1 (245 Bp) und 2 (389 Bp) nach.

Das Primerpaar PITM2_C sollte daher auch zu 2 unterschiedlichen Amplifikaten führen, 189 Bp für die Variante 1 und 351 Bp für die Variante 2. In Thrombozyten konnte hier allerdings nur das 189 Bp-Fragment erhalten werden, in HeLa konnte das 351-Bp-Fragment als schwache Bande nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13, Spur 6). Entweder ist die Variante 1 in deutlich größeren Mengen als die Variante 2 in Thrombozyten (und auch in HeLa-Zellen) vorhanden, oder es existieren noch weitere, bisher nicht beschriebene Splice-Varianten. Gegen einen deutlichen Mengenunterschied von Variante 1 und 2 spricht allerdings das Verhältnis der PCR-Produkte mit dem Primerpaar PITM2_B: Hier sind beide PCR-Produkte, 245 Bp für die Transkriptvarianten 1 und 389 Bp für die Variante 2, in vergleichbaren Mengen amplifiziert worden. Wahrscheinlicher wird damit das Vorhandensein weiterer, nicht beschriebener Transkriptvarianten. Die Identität der PCR-Produkte konnte auch durch Sequenzierung bestätigt werden. Die Sequenzierungsreaktion des Primerpaares PITM2_B zeigte zuerst die normale Sequenz mit einer anschließenden Überlagerung zweier Sequenzen (siehe Abbildung 14). Nach Exon 16 ist in der Sequenz also eine Überlagerung der Sequenzen von Exon 15 und 14 zu erkennen.

Die Bedeutung der 2 verschiedenen Splicevarianten in Thrombozyten ist noch unklar. Sie unterscheiden sich jeweils nur in einem Exon, welches im zentralen Teil des Proteins liegt. Das bedeutet, dass dieses keinen Einfluss auf die C-Terminale Proteininteraktionsdomäne hat. Desweiteren wird auch die N-

Terminale PITP-Domäne, welche für die Bindung und den Austausch von Phospholipiden zuständig ist, nicht beeinflusst.

5. 3 Klonierung von PITPNM2

Zur Qualitätsprüfung von Antikörpern und weiteren funktionellen Untersuchungen sollte PITPnm2 als Fusionsprotein mit einem durch Antikörper detektierbaren "Tag" in einen Expressionsvektor kloniert werden.

Eine Amplifikation des gesamten Offenen Leserahmens gelang weder aus cDNA von Thrombozyten noch aus cDNA von HeLa-Zellen.

Von der Firma BioScience imaGenes (Berlin) wurde daher der Klon IRATp970G02136D erworben. Das in dem Vektor pCMV-SPORT6 inserierte cDNA-Fragment wurde vollständig sequenziert (siehe Abbildung 15). Dabei wurde festgestellt, dass nur ein Teil des Offenen Leserahmens in dem Klon enthalten war (siehe unter Kapitel 4.3.1).

Der fehlende vordere Teil des Offenen Leserahmens wurde aus Thrombozyten-cDNA amplifiziert und das PCR-Produkt wurde in einen PCR-Klonierungsvektor inseriert (siehe Abbildung 16). Durch einen geeigneten Restriktionsverdau konnten beide Teile des Offenen Leserahmens von PITPNM2 in dem Klonierungsvektor pCR2.1 (siehe Abbildung 17) zusammengeführt werden.

Dieser Klon konnte dann als Template für die Amplifizierung des gesamten Offenen Leserahmens von PITPNM2 eingesetzt werden. Die dafür verwendeten Primer ermöglichten die Klonierung in einen eukaryotischen Expressionsvektor, der PITPnm2 als Fusionsprotein mit einem Flag-Tag exprimieren kann (pCMV-SC-CF). Dieses synthetische Epitop besteht aus mehreren Aminosäuren (DYKDDDDK) und wird dreifach exprimiert („Triple-Flag“). Hierdurch kann das rekombinante PITPnm2-Protein durch gegen den "Flag-Tag" gerichtete Antikörper erkannt werden, die Lokalisierung des rekombinanten Proteins kann mit diesen Antikörpern erfolgen und Interaktionspartner können durch Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden. Nach Überprüfung des gesamten Offenen Leserahmens und des Fusionsanteils konnte pCMV-SC-CF (PITPNM2) in HEK-Zellen transfiziert werden.

5. 4 Rekombinante Expression von PITPNM2

Proteinextrakt aus mit pCMV-SC-CF (PITPNM2) transfizierten und nicht transfizierten HEK-Zellen wurde gewonnen. Peptidantikörper standen zur Verfügung, die in Kaninchen induziert wurden. Zur Verwendung kam dabei das Peptid KKQWSTSSKSSRS aus PITPnm2 (Biogenes, Berlin). Präimmunserum und Immunserum von zwei Tieren standen zur Verfügung.

Der Antikörper 3217 erkennt in den transfizierten HEK-Zellen neben zahlreichen unspezifischen Banden, die auch in den nicht transfizierten Zellen zu sehen sind, eine Bande von ca. 160 kDa, welche PITPnm2 entsprechen könnte (siehe Abbildung 21). Allerdings zeigt der Antikörper auf dieser Höhe nur ein schwaches Signal. Es überwiegen die unspezifischen Banden, die auch in dem nicht-transfizierten Zellextrakt zu sehen sind. Das zweite zur Verfügung stehende Antiserum zeigte vergleichbare Resultate: Zahlreiche unspezifische Banden und nur eine schwache Bande bei der erwarteten Größe (Ergebnisse nicht gezeigt).

Unter Verwendung der Proteinextrakte aus transfizierten und nicht-transfizierten HEK-Zellen konnte mit dem Flag-Antikörper die Expression des rekombinanten Fusionsproteins eindeutig nur in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 22).

5. 5 Nachweis des PITPnm2-Proteins in Thrombozyten

Der Versuch wurde dennoch unternommen PITPnm2 in Thrombozyten-Extrakten mit den polyklonalen PITPnm2-Antikörpern 3127 und 3128 (Biogenes, Berlin) nachzuweisen. Präimmunserum und Immunserum wurden dabei im Western Blot verglichen, hier ist nur der Antikörper 3128 dargestellt (siehe Abbildung 23). Mit Präimmunserum können nur schwache Banden auf dem Blot generiert werden, welche sich über den ganzen Trennbereich verteilen. Auch sind mit dem Immunserum zahlreiche unspezifische Banden detektiert worden. Für weitere Untersuchungen sind diese Antikörper nicht geeignet.

5. 6 Funktion des PITPnm2-Proteins in Thrombozyten und Ausblick

Über die Funktion des PITMPnm2-Proteins in Thrombozyten ist bisher nichts bekannt. Jedoch gibt es Einblicke in die Funktion der PITPs in anderen Geweben und Zellen. Diese können Hinweise über die Funktion von PITPnm2 in Thrombozyten liefern.

Die Beteiligung der PITPs am Austausch von Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin zwischen zwei Membranen¹³ könnte darauf hindeuten, dass PITPnm2 auch in Thrombozyten einen Einfluss auf die Membranzusammensetzung nehmen könnte. Boesze-Battaglia et al. zeigten 1997, dass die Membranzusammensetzung eine wichtige Rolle in der Plättchenfunktion spielt und eine Antwort auf eine Plättchenstimulation darstellt³¹. Es ist bekannt, dass PITP durch bestimmte Domänen in der Lage sind, Phosphatidylinositol oder Phosphatidylcholin zu transportieren. Dies könnte auch die Hauptfunktion dieses Proteins in Thrombozyten sein.

PITPnm2 wird an der Aminosäure Serin 1277 nach Prostaglandinstimulation in Plättchen phosphoryliert. Die Bindung des Prostaglandinagonisten Iloprost an seinen transmembranösen Rezeptor, welcher Gs-Protein gekoppelt ist, führt intrazellulär zu einer cAMP-Erhöhung und ist somit ein sehr potenter endogener Mechanismus für die Plättcheninhibition¹⁹. PITPnm2 ist daher vermutlich bei der Plättcheninhibition beteiligt.

PITPnm2 interagiert mit PYK2, einer Tyrosin-Kinase⁹, die auch in Plättchen nachgewiesen wurde. Nir-Proteine („PYK2 N-terminal domain-interacting receptors“) können durch die PYK2 phosphoryliert werden und sind wahrscheinlich ein Substrat der PYK2⁹. Die Rolle der Tyrosinkinase PYK2 in Plättchen ist noch nicht geklärt. Sima Lev et al. konnten zeigen, dass die PYK2-Kinase nach Interaktion des von Willebrand Faktors (vWF) mit dem Glycoprotein Ib-IX-V Komplex phosphoryliert wird⁹. Außerdem transloziert die PYK2 nach vWF-Stimulation von humanen Plättchen in das Zytoskelett⁹. Lei Sun et al. zeigten 2003, dass pathologischer Scher-Stress zu einer innerhalb von fünf Sekunden sehr schnell stattfindenden Tyrosin-Phosphorylierung der

PYK2 führt³². Es kann also angenommen werden, dass die PYK2-Kinase an der Regulation der Plättchenaktivierung beteiligt ist. Das Zusammenspiel der beiden Proteine in Thrombozyten ist jedoch bisher nicht näher untersucht.

Viele weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle, die PITPnm2 in Thrombozyten spielt, näher zu charakterisieren: Ist PITPnm2 tatsächlich ein Substrat der Proteinkinase A? Interagieren PITPnm2 und PYK2 auch in Plättchen und wie ist diese Interaktion reguliert?

Welche Bedeutung hat die Phosphorylierung von PITPnm2 an Serin 1277? Möglicherweise ist die Interaktion von PYK2 dadurch reguliert, denn diese Phosphorylierungsstelle liegt im Bereich der Interaktionsdomäne von PITPnm2 mit PYK2. Die subzelluläre Lokalisation des Proteins oder eine gemeinsame Lokalisation mit Interaktionspartnern könnte auch zur Aufklärung der Funktion des Proteins beitragen.

Voraussetzung für funktionelle Untersuchungen in Thrombozyten wird aber sein, dass geeignete Antikörper zur Detektion von PITPnm2 vorhanden sind. Parallel zur Generierung von guten Antikörpern sollten auch Antikörper hergestellt werden, die spezifisch für das phosphorylierte PITPnm2 sind. So kann Einblick gewonnen werden in den Mechanismus, der zur Phosphorylierung des Proteins führt.

Die rekombinante Expression von PITPnm2 und von spezifischen Mutanten von PITPnm2 ermöglicht die Untersuchung in anderen Zellsystemen. Hier ist zum Beispiel das Serin 1277 eine Position, die so mutiert werden kann, dass entweder nicht mehr phosphoryliert werden kann oder dass der phosphorylierte Zustand permanent hergestellt wird.

Eine „knock-out“-Maus für PITPnm2 existiert und scheint keinen ausgeprägten Phänotyp zu zeigen¹⁶. Die Mäuse zeigen selbst in der Retina keine Ausfallerscheinungen. Die Plättchenfunktion dieser Mäuse zu untersuchen und diese mit Wildtyp-Mäusen zu vergleichen wäre dennoch ein sehr interessantes Projekt, das Aufschluss über die Funktion von PITPnm2 in Thrombozyten liefern könnte.

6. Zusammenfassung

Die Analyse des Phosphoproteoms in ruhenden und in aktivierten humanen Plättchen führte zur Identifikation des PITPnm2-Proteins. Dieses Protein wird bei einer Stimulation von Thrombozyten mit dem Prostazyklinanalogon Iloprost phosphoryliert. Diese Ergebnisse gaben Anlass zu weiteren Untersuchungen zum Vorkommen und zur Funktion dieses Proteins in Thrombozyten.

In der Arbeit wurde gezeigt, dass das PITPnm2-Protein das einzige Protein der PITP-Familie ist, welches in humanen Thrombozyten exprimiert wird. Die membranassoziierten Phosphatidylinositol-Transfer-Proteine PITPnm1 und PITPnm3 sind auf cDNA-Ebene nicht in Thrombozyten nachweisbar.

Von den drei zur Zeit der Untersuchung bekannten Splicevarianten des PITPnm2-Proteins konnten zwei Varianten in Thrombozyten mittels RT-PCR identifiziert werden. Diese zwei Varianten unterscheiden sich durch ein unterschiedlich exprimiertes Exon, welches im zentralen Teil des Proteins liegt. Ein weiteres Spliceprodukt, dem die Aminosäuren 50 bis 328 im vorderen Teil des Proteins fehlen, wird nicht in Thrombozyten exprimiert.

PITPNM2 (Splicevariante 1) wurde als Fusionsprotein mit einem sogenannten „Flag-Tag“ kloniert und in Eukaryonten exprimiert (pCMV-SC-CF, Stratagene). Mit dem rekombinanten Fusionsprotein wurden gegen PITPnm2 gerichtete Antikörper getestet. Der Vergleich mit Flag-Tag-spezifischen Antikörpern zeigte, dass der PITPnm2-spezifische Antikörper zahlreiche Banden detektiert und für weitere Untersuchungen nicht geeignet ist.

Dieser PITPnm2-Klon wird auch in weiterführenden Arbeiten eingesetzt werden, die sich mit der Identifizierung der Interaktionspartner dieses Proteins, der subzellulären Lokalisierung und der Teilnahme des Proteins an spezifischen Zell-Signalwegen beschäftigen werden.

6. Summary

In order to gain a deeper insight into the function of platelets the protein composition of both resting and activated human thrombocytes was characterized by using mass spectrometry. One of the identified proteins is the phosphatidylinositol transfer protein PITPnm2. The treatment of platelets by the platelet inhibitor prostacyclin leads to a phosphorylation of the PITPnm2 protein. These results gave rise to further investigations regarding both the occurrence and the function of this protein in human thrombocytes.

The phosphatidylinositol transfer proteins are a protein family including the three proteins PITPnm1, PITPnm2, PITPnm3. RT-PCR analysis demonstrated that only the PITPnm2 protein of the PITP-family is expressed in platelets.

At the time of investigation, three different splice products of the PITPnm2 protein are described. Two of these three splice products are expressed in platelets at the RNA level. These two splice variants differ in the expression of a variable spliced exon in the central part of the protein. The third splice variant shows the same sequence as the first, however the amino acids 50-328 at the N-terminus of the protein are missing.

Cloning and expression of flag-tagged PITPnm2 (pCMV-SC-CF, Stratagene) allowed testing of PITPnm2-specific antibodies. In comparison with flag-tag specific antibodies, PITPnm2-specific antibodies showed numerous unspecific crossreactions and are not suitable for further experiments.

The expression clone of PITPnm2 will be very useful for further investigations regarding both the different interaction partners of the PITPnm2 protein and the involvement of the PITPnm2 protein in different signalling cascades.

7. Literaturverzeichnis

1. Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF. The platelet proteome. *Curr Opin Hematol.* Sep 2009;16(5):329-333.
2. Zahedi RP, Lewandrowski U, Wiesner J, et al. Phosphoproteome of resting human platelets. *Journal of proteome research.* Feb 2008;7(2):526-534.
3. Hotta Y, Benzer S. Genetic dissection of the Drosophila nervous system by means of mosaics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 1970;67(3):1156-1163.
4. Harris WA, Stark WS. Hereditary retinal degeneration in Drosophila melanogaster. A mutant defect associated with the phototransduction process. *J Gen Physiol.* Mar 1977;69(3):261-291.
5. Vihtelic TS, Hyde DR, O'Tousa JE. Isolation and characterization of the Drosophila retinal degeneration B (rdgB) gene. *Genetics.* Apr 1991;127(4):761-768.
6. Dickeson SK, Lim CN, Schuyler GT, Dalton TP, Helmkamp GM, Jr., Yarbrough LR. Isolation and sequence of cDNA clones encoding rat phosphatidylinositol transfer protein. *J Biol Chem.* Oct 5 1989;264(28):16557-16564.
7. Aikawa Y, Hara H, Watanabe T. Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of the Drosophila retinal degeneration B gene. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 30 1997;236(3):559-564.
8. Elagin VA, Elagina RB, Doro CJ, Vihtelic TS, Hyde DR. Cloning and tissue localization of a novel zebrafish RdgB homolog that lacks a phospholipid transfer domain. *Vis Neurosci.* Mar-Apr 2000;17(2):303-311.
9. Lev S, Hernandez J, Martinez R, Chen A, Plowman G, Schlessinger J. Identification of a novel family of targets of PYK2 related to Drosophila retinal degeneration B (rdgB) protein. *Mol Cell Biol.* Mar 1999;19(3):2278-2288.
10. Cockcroft S, Carvou N. Biochemical and biological functions of class I phosphatidylinositol transfer proteins. *Biochim Biophys Acta.* Jun 2007;1771(6):677-691.
11. Allen-Baume V, Segui B, Cockcroft S. Current thoughts on the phosphatidylinositol transfer protein family. *FEBS Lett.* Oct 30 2002;531(1):74-80.
12. Lev S. The role of the Nir/rdgB protein family in membrane trafficking and cytoskeleton remodeling. *Exp Cell Res.* Jul 1 2004;297(1):1-10.
13. Cockcroft S. Phosphatidylinositol transfer proteins couple lipid transport to phosphoinositide synthesis. *Semin Cell Dev Biol.* Apr 2001;12(2):183-191.
14. Vihtelic TS, Goebel M, Milligan S, O'Tousa JE, Hyde DR. Localization of Drosophila retinal degeneration B, a membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein. *J Cell Biol.* Sep 1993;122(5):1013-1022.
15. Litvak V, Dahan N, Ramachandran S, Sabanay H, Lev S. Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nat Cell Biol.* Mar 2005;7(3):225-234.
16. Lu C, Peng YW, Shang J, Pawlyk BS, Yu F, Li T. The mammalian retinal degeneration B2 gene is not required for photoreceptor function and survival. *Neuroscience.* 2001;107(1):35-41.
17. Alb JG, Jr., Phillips SE, Rostand K, et al. Genetic ablation of phosphatidylinositol transfer protein function in murine embryonic stem cells. *Mol Biol Cell.* Mar 2002;13(3):739-754.
18. Ensembl Genome Browser. <http://www.ensembl.org>.

19. Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol.* Nov 1 2001;62(9):1153-1161.
20. Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature.* Nov 27 2008;456(7221):470-476.
21. Matlin AJ, Clark F, Smith CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol.* May 2005;6(5):386-398.
22. Grabowski PJ, Black DL. Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog Neurobiol.* Oct 2001;65(3):289-308.
23. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:291-336.
24. Sammeth M, Foissac S, Guigo R. A general definition and nomenclature for alternative splicing events. *PLoS Comput Biol.* 2008;4(8):e1000147.
25. Blencowe BJ. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell.* Jul 14 2006;126(1):37-47.
26. Hartmann M, Skryabin BV, Muller T, et al. Alternative splicing of the guanylyl cyclase-A receptor modulates atrial natriuretic peptide signaling. *J Biol Chem.* Oct 17 2008;283(42):28313-28320.
27. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 1986;51 Pt 1:263-273.
28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
29. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1977;74(12):5463-5467.
30. UniProtKB/Swiss-Prot. <http://www.uniprot.org/>.
31. Boesze-Battaglia K, Schimmel RJ. Cell membrane lipid composition and distribution: Implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *J Exp Biol.* Dec 1997;200(23):2927-2936.
32. Sun L, Feng S, Resendiz JC, Lu X, Durante W, Kroll MH. Role of the Pyk2-MAP kinase-cPLA2 signaling pathway in shear-dependent platelet aggregation. *Ann Biomed Eng.* Sep 2004;32(9):1193-1201.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Ein großer Dank gilt Professor Dr. med. Ulrich Walter (Leiter des Instituts für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor) für die gute Zusammenarbeit und die Betreuung meiner Doktorarbeit. Er gab mir die Möglichkeit, an dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg zu forschen und die Dissertation zu erstellen.

Besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Sabine Herterich (Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor) für die Überlassung des Dissertationsthemas, die außerordentliche Unterstützung und die Anleitung in wissenschaftlichen Fragestellungen bedanken. Sie war mir stets Ansprechpartnerin und bereicherte mein Forschungsprojekt durch ihre Ideen und ihre Anregungen.

Ich bedanke mich bei dem Team bestehend aus Lilo Fischer, Sabine Gätzner und Daniela Scheld (Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor). Es erfolgte eine sehr gute Einarbeitung, die Weitergabe von vielen Erfahrungswerten und Hilfestellung bei Problemen in allen Belangen.

Darüber hinaus danke ich Dr. rer. nat. Stepan Gambaryan für seinen Rat in wichtigen Fragestellungen sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Pathobiochemie und des Zentrallabors für eine kollegiale und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben und mich uneingeschränkt unterstützt haben.