

**Expression und Charakterisierung
des
Phosphatidylinositolglykan-A-Proteins**

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biol. Claudia Nischan
geb. am 24. März 1966
in Bremerhaven

1998

Referent: Herr Prof. Dr. R. E. Schmidt

Korreferent: Herr Dr. W. Müller

Tag der Promotion: 15. Juli 1998

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Klinische Immunologie (Leiter Prof. Dr. R. E. Schmidt), Zentrum Innere Medizin und Dermatologie, der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ursache für die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) liegt in einem Defekt im Biosyntheseweg des GPI-Ankers, der für die Expression von bestimmten Oberflächenproteinen auf Zellen des hämatopoetischen Systems nötig ist. Das Fehlen dieser Zelloberflächenproteine, wie CD55 und CD59, führt zu einer abnormen Aktivierung, insbesondere des alternativen Weges der Komplementkaskade und damit zu den charakteristischen Erscheinungen der Erkrankung, wie zum Beispiel der intravaskulären Hämolyse.

Neben biochemischen Untersuchungen der GPI-Intermediate des GPI-Ankersyntheseweges und Komplementationsexperimenten mit PNH-Zellen und Thy-1-negativen Maus-Lymphommutanten aus verschiedenen Komplementationsklassen konnte auch durch Transfektionsexperimente gezeigt werden, daß bei allen untersuchten PNH-Zellen eine Störung der GPI-Ankerbiosynthese die Ursache für das Fehlen der GPI-verankerten Oberflächenmolekülen ist. Dieser Defekt entspricht dem der Komplementationsklasse A im murinen Lymphommutantenmodell, bei der die Übertragung von N-Acetylglucosamin von UDP-N-Acetylglucosamin auf Phosphatidylinositol nicht stattfindet. In allen bisher untersuchten Fällen zeigten sich Mutationen im PIG-A-Gen (für Phosphatidylinositolglykan der Komplementationsklasse A) als verantwortlich für den Verankerungsdefekt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene Vektorsysteme konstruiert werden, die zu einer Expression des PIG-A-Proteins in der PIG-A-defizienten humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie JY5 führten. Der Vergleich von episomal replizierten Expressionsvektoren mit RSV- und CMV-Promotoren zeigte eine deutlich bessere Expression des PIG-A-Proteins in den JY5-Zellen unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Es konnte außerdem ein Zellklon isoliert werden, der das PIG-A-Protein stabil, sowohl mit als auch ohne Selektionsdruck, exprimiert.

Mit Hilfe von künstlichen Antikörperbindungsstellen („FLAG“ und „His-Tag“), die an das PIG-A Protein auf DNA-Ebene fusioniert wurden, konnte das Protein intrazellulär sowohl mit der Durchflußzytometrie als auch durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Mittels des „His-Tags“ konnte durch Säulenchromatographie das PIG-A-Protein aus Zellysat isoliert und im Western-Blot dargestellt werden. Über durchflußzytometrische Analysen von GPI-verankerten Oberflächenproteinen konnte die Funktionalität des veränderten Proteins gezeigt werden. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Antikörperbindungsstelle am N- oder am C-Terminus integriert war. Weder „FLAG“ noch „His-Tag“ zeigten einen negativen Einfluß auf die Funktion des PIG-A-Proteins.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von „FLAG“-PIG-A exprimierenden Zellen zeigten eine Lokalisation des Proteins an der zytoplasmatischen Seite des rauen endoplasmatischen Retikulums und an der äußeren Kernmembran.

paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie; GPI-Ankerbiosynthese; PIG-A-Protein

SUMMARY

The paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is caused by a defective biosynthesis of GPI anchors, which are essential for the expression of particular cell surface proteins on cells of the hematopoietic system. The absence of these cell surface proteins, as CD55 and CD59, leads to an abnormal activation of the alternative pathway of the complement cascade and therefore to the characteristic symptoms of the disease, e.g. intravascular hemolysis.

Besides the biochemical analysis of GPI intermediates of GPI anchor synthesis and complementation assays with cells from PNH patients and Thy-1 negative murine lymphoma mutants of different complementation classes, it has been demonstrated by transfection assays that all examined PNH cells display a defective GPI anchor synthesis responsible for the absence of cell surface proteins. This defect corresponds to the of the complementation class A in the murine lymphoma mutant model, where the transfer of N-acetylglucosamine from UDP-N-acetylglucosamine to phosphatidylinositol does not take place. For all examined cases it has been demonstrated that mutations in the PIG-A gene (phosphatidyl inositol glycan of complementation class A) are responsible for defective anchoring.

A major task of this project was the construction of different vector systems leading to an expression of the PIG-A protein in PIG-A deficient human B-lymphoblastoid cell line JY5.

The comparison of episomal replicated expression vectors with RSV and CMV promoters showed a significantly better expression of the PIG-A protein in JY5 cells under the control of the CMV promoter. Moreover, it was possible to isolate a cell clone which expressed the PIG-A protein stably, as well with and without selective pressure.

By the aid of artificial antibody binding sites („FLAG“ and „His-Tag“) which were fused to the PIG-A protein on DNA level, the protein could be detected intracellularly by flow cytometry analysis as well as by immunofluorescence.

By means of the „His-Tag“ and affinity chromatography it was possible to purify the PIG-A protein out of cell lysate and to detect it in Western blots.

The functionality of the manipulated protein could be demonstrated by flow cytometry analysis of GPI anchored cell surface proteins. No differences have been observed for the cases where the artificial antibody binding site was integrated to the N- or C-terminus of the protein. Neither „FLAG“ nor „His-Tag“ displayed negative influence on functionality of the PIG-A protein.

Immunoelectron microscopy analysis of „FLAG“-PIG-A expressing cells revealed a localization of the protein on the cytoplasmic leaflet of rough endoplasmic reticulum and the outer cell nucleus membrane.

paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; GPI-anchor biosynthesis; PIG-A protein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der GPI-Anker	1
1.1.1	Verbreitung und Funktion	2
1.1.1.1	Verbreitung	2
1.1.1.2	Funktion	3
1.1.2	Struktur	4
1.2	Die GPI-Anker-Biosynthese	8
1.3	Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie-ein GPI-Synthesedefekt	10
1.4	Das PIG-A-Protein	12
1.5	Zielsetzung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Zelllinien	17
2.1.2	Bakterienstämme	17
2.1.3	Chemikalien	17
2.1.4	Radioaktiv markierte Chemikalien	19
2.1.5	Enzyme	19
2.1.6	Nukleinsäuren	20
2.1.6.1	Plasmide	20
2.1.6.2	Oligonukleotide	20
2.1.6.3	Größenstandards	21
2.1.7	Antikörper	21
2.1.8	Medien, Lösungen und Puffer	22
2.1.9	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.10	Geräte	28
2.2	Methoden	30
2.2.1	Dünnschichtchromatographische Analyse von GPI-Anker- Metaboliten	30
2.2.1.1	In-Vitro-Markierung von Zellysat	30
2.2.1.2	Chromatographische Auftrennung	31
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	31
2.2.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
2.2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i>	31

2.2.3 Zellbiologische Methoden	32
2.2.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	32
2.2.3.2 Kultivierung von Suspensionszellen.....	32
2.2.3.3 Transfektion der Zelllinie JY5	33
2.2.3.4 Selektion für stabile Expression.....	33
2.2.3.5 Durchflußzytometrische Analysen	35
2.2.3.6 Intrazelluläre Immunfluoreszenz	35
2.2.3.7 Vorbereitung der Zellen für die Elektronenmikroskopie	37
2.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	38
2.2.4.2 DNA-Sequenzierung.....	39
2.2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.2.4.4 Enzymatische Modifikation von DNA	40
2.2.4.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	41
2.2.5 Proteinchemische Methoden	42
2.2.5.1 Herstellung von <i>E. coli</i> -Zellysat.....	42
2.2.5.2 Herstellung von JY5-Zellysat	43
2.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
2.2.5.4 Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation.....	43
2.2.5.5 Nickelchelatchromatographie	44
2.2.5.6 SDS-Gelelektrophorese.....	44
2.2.5.7 Westernblotting	45
3 Ergebnisse	47
3.1 Expression von PIG-A in JY5-Zellen	48
3.1.1 Darstellung der Expressionssysteme mit „FLAG“-Sequenz	49
3.1.2 Intrazellulärer Nachweis und Lokalisation von PIG-A.....	54
3.1.3 Isolation von PIG-A mittels Affinitätschromatographie	61
3.1.4 Darstellung der Expressionssysteme mit „His-Tag“	62
3.1.4.1 Expression von PIG-A in <i>E. coli</i>	62
3.1.5 Expression von „His-Tag“-PIG-A in JY5.....	65
3.1.6 Nickelchelat-Affinitätschromatographie.....	75
4 Diskussion	78
4.1 Expression von „FLAG-PIG-A“ und „His-Tag“-PIG-A.....	79
4.2 Intrazelluläre Lokalisation von PIG-A	83

4.3	PIG-A: Teil eines Enzymkomplexes?	84
5	Literaturverzeichnis	87
6	Abkürzungen.....	102
7	Publikationen.....	104
8	Lebenslauf	105
9	Danksagung.....	106

1 Einleitung

1.1 Der GPI-Anker

Die Verankerung von Zelloberflächenproteinen erfolgt in vielen Fällen über hydrophobe Wechselwirkungen einer Reihe von apolaren Aminosäuren des Proteins mit den hydrophoben Fettsäureketten der Phospholipidmoleküle im Inneren der Zellmembran. Diese sich durch die Lipid-Doppelschicht hindurch erstreckenden sogenannten Transmembranproteine können entweder mit einer einzigen α -Helix oder auch mit mehreren α -Helices die Membran durchdringen. Im letzteren Fall werden dann die hydrophoben Bereiche in der Lipidschicht durch hydrophile Abschnitte der Polypeptidkette außerhalb der Membran verbunden. Bei manchen dieser Proteine können die hydrophoben Eigenschaften noch durch eine kovalent angeheftete Fettsäure, die in der dem Zytoplasma zugewandten Hälfte der Doppelschicht eingelagert ist, verstärkt werden. Manche intrazellulären Membranproteine sind allein über eine solche Fettsäurekette an die Membran geheftet (WICKNER und LODISH, 1985; EISENBERG, 1984; UNWIN und HENDERSON, 1984). Für Zelloberflächenproteine ist eine weitere Möglichkeit der Proteinanheftung, die Verankerung über Glycosylphosphatidylinositol (GPI), bekannt.

Die Entdeckung der GPI-verankerten Proteine begann mit der Isolation der bakteriellen Phospholipase durch SLEIN und LOGAN während der Jahre 1960 bis 1965 (SLEIN und LOGAN, 1960, 1962, 1963, 1965). In den Jahren 1976 und 1977 zeigten, unabhängig voneinander, IKEZAWA und LOW, daß das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) von intakten Plasmazellmembranen durch die Behandlung mit bakterieller phosphatidylinositolspezifischer Phospholipase C (PI-PLC) abgespalten werden konnte. Dieses Enzym spaltet Phosphatidyl (PI) zwischen dem Glycerin-Rückgrat und der Phosphat-Gruppe (Abb. 1.1). Aus diesem Experiment schlossen sie, daß die AP durch eine Art von GPI-Anker an die Zellmembran gebunden sein mußte. Bald wurde auch über LOWs Studien hinaus bekannt, nachdem er die PI-PLC an andere Forscher weitergegeben hatte, daß die AP nicht einzigartig mit ihrem GPI-Anker war. Viele andere Proteine, wie z. B. die Acetylcholinesterase und Thy-1 (LOW und FINEAN, 1977; LOW und KINCADE, 1985) und das trypanosomale variante Oberflächenprotein (VSG) (CROSS, 1984) zeigten ein adäquates Verhalten der PI-PLC gegenüber wie die AP. Da der GPI-Anker inzwischen als erfolgreiche und verbreitete Möglichkeit der Oberflächenproteinverankerung erkannt wurde, ist ihm ein eigener Abschnitt der Einleitung gewidmet. Danach folgen die

Beschreibungen der Struktur des GPI-Ankers, dessen Biosynthese und die Folgen eines Defektes am Beispiel der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie.

1.1.1 Verbreitung und Funktion

1.1.1.1 Verbreitung

GPI-verankerte Membranproteine konnten inzwischen neben den zahlreichen Oberflächenproteinen bei Säugetieren nahezu in allen Spezies nachgewiesen werden. Mit Ausnahme einiger Proteine der sekretorischen Granula des Pankreas und des Adrenalsystems (FOUCHIER *et al.*, 1988; LeBEL und BEATTIE, 1988) ist die Position aller GPI-verankerten Proteine auf der Zellaußenseite identifiziert worden. Im folgenden werden einige Beispiele beschrieben, die die Vielfalt verdeutlichen sollen.

Bei den protozoischen Parasiten sind z. B. der Flagellat *Gardia lamblia*, dessen Oberflächenantigen GP49 (DAS *et al.*, 1991) und die Trypanosomatiden *Leishmania major* und *Trypanosoma brucei*, deren VSGs über GPIs verankert sind (BORDIER *et al.*, 1986; KRAKOW *et al.*, 1986), bekannt. Zu den intrazellulären Parasiten zählen *Toxoplasma* (TOMAVO *et al.*, 1989) und *Plasmodium* (BRAUN-BRETON *et al.*, 1988). Auch beim freilebenden *Paramecium* (DEREGNAUCORT *et al.*, 1988) wurden Oberflächenantigene als GPI-verankert identifiziert.

Bei den Trematoden (Saugwürmer) konnten bei *Schistosoma mansoni* (PEARCE und SHER, 1989) GPI-verankerte Proteine nachgewiesen werden.

Der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (EARLY *et al.*, 1988; STADLER *et al.*, 1989) weist GPI-verankerte Oberflächenantigene ebenso wie die zu den echten Pilzen gehörenden Hefen wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae* (CONZELMANN *et al.*, 1988) auf. Bei der Fruchtfliege *Drosophila* findet man u. a. neben der Acetylcholinesterase (GNAGEY *et al.*, 1987) noch Choptin (KRANTZ und ZIPURSKY, 1990), welches zelltypspezifisch auf Photorezeptorzellen exprimiert wird, und Fasciclin I (McALLISTER *et al.*, 1992), beide sind an der Zelladhäsion beteiligt.

Beim Tintenfisch konnten zwei unterschiedlich modifizierte GPI-verankerte Glycoproteine identifiziert werden (WILLIAMS *et al.*, 1988).

Viele Proteine des zentralen Nervensystems sind GPI-verankert, unter ihnen z. B. Thy-1 (TSE *et al.*, 1985), der Rezeptor des ciliären neurotrophen Faktors (DAVIS *et al.*, 1991), das Zelladhäsionsmolekül N-CAM (*neural-cell adhesion molecule*, HE *et al.*, 1986) und das Oligodendrozytenmyelinprotein (MIKOL und STEFANSSON, 1988).

Ebenso sind einige Prion-Proteine, die an neurodegenerativen Erkrankungen des Zentralnervensystems wie *Scrapie* und Creutzfeld-Jakob-Erkrankung beteiligt sind, als GPI-verankert beschrieben worden (STAHL *et al.*, 1987; CASHMAN *et al.*, 1990).

Einige GPI-verankerte Proteine gehören zur Immunglobulinsuperfamilie (WILLIAMS und BARCLAY, 1988).

Manche Zelloberflächenproteine wie z. B. der humane niedrig-affine IgG Fc γ Rezeptor Typ III (Fc γ RIII=CD16) werden als GPI-verankerte (CD16-I) und als transmembrane Variante (CD16-II) exprimiert (RAVETCH und PERUSSIA, 1989; GESSNER *et al.*, 1995 a, b; TAMM *et al.*, 1996). Sie werden durch zwei Gene kodiert, die sich nur durch einige Mutationen voneinander unterscheiden und differentiell in natürlichen Killerzellen und neutrophilen Zellen exprimiert werden. Beim neuronalen Zelladhäsionsmolekül gehen GPI-verankerte und transmembrane Variante aus alternativem Spleißen und entwicklungs-spezifischer Expression hervor (HEMPERLY *et al.*, 1986).

So wird deutlich, daß die GPI-Verankerung nicht auf eine bestimmte Klasse oder einen bestimmten Typ von Proteinen beschränkt ist. Sie ist bei membrangebundenen Enzymen (Alkalische Phosphatase und Acetylcholinesterase, s. o.) zu finden, bei Rezeptoren wie z. B. für die Urokinase (PLOUG *et al.*, 1991), zellspezifischen Antigenen und zellulären Markern wie CD58 (DUSTIN *et al.*, 1987), CD16 (SELVARAJ *et al.*, 1988), CD14 (SIMMONS *et al.*, 1989) und CD48 (STAUNTON *et al.*, 1989) und Transporten wie dem Folattransporter (VERMA *et al.*, 1992).

Bislang konnten noch keinerlei GPI-verankerte Proteine in Bakterien, Algen, höheren Pilzen und Pflanzen nachgewiesen werden.

1.1.1.2 Funktion

Obwohl inzwischen eine Vielzahl von GPI-verankerten Proteinen bekannt ist, bleibt die tatsächliche Funktion des GPI-Ankers noch weitgehend im unklaren.

Die laterale Mobilität von GPI-verankerten Proteinen zeigt einen bis zu zehnfach höheren Diffusionskoeffizienten als integrale Membranproteine, wie am Thy-1 Antigen (Nagetier), in lymphoiden Zellen und Fibroblasten (ISHIHARA *et al.*, 1987) und für DAF auf HeLa-Zellen (THOMAS *et al.*, 1987) gezeigt werden konnte.

Die bessere Mobilität im Vergleich zu transmembran verankerten Oberflächenproteinen spielt sicherlich auch eine Rolle bei der Bedeutung der GPI-Verankerung als Sortiersignal zur apikalen Oberfläche von polarisierten Endothelzellen (LISANTI *et al.*, 1989, 1990; BROWN *et al.*, 1989).

Die Komplexbildung von GPI-verankerten Oberflächenproteinen mit Tyrosinkinase ließ schon früh eine Beteiligung an Signaltransduktionsvorgängen vermuten (STEFANOVA *et al.*, 1991). In einigen Fällen konnte eine Beteiligung GPI-verankerter Proteine an Signaltransduktion nachgewiesen werden, wie z. B. Tyrosinphosphorylierung von zellulären Proteinen nach Stimulierung von T-Lymphozyten mit Schwermetallverbindungen (PU *et al.*, 1995). CINEK und HOREJSI (1992) zeigten nicht-kovalent gebundene Komplexe aus GPI-gebundenen Oberflächenproteinen wie CD55, CD59, CD48 und CD52 mit Tyrosinkinase. Sie vermuteten eine Beteiligung der Glycoproteine an der Zellaktivierung. Der eigentliche Mechanismus bei der Beteiligung an Signaltransduktionsvorgängen bleibt aber weiterhin ungeklärt, eben weil keine in das Zellinnere reichende Proteindomäne vorhanden ist.

WHITLOW *et al.* (1993) zeigte eine Beteiligung von GPI-verankerten Proteinen bei der Vesikelbildung von Erythrozyten, Thrombozyten und B-lymphoblastoiden Zellen. Er beschrieb eine bis zu 90 % verminderte Bildung von Vesikeln in den jeweiligen GPI-negativen Zellen im Vergleich zu den entsprechenden positiven Zellen.

Das VSG ermöglicht den Trypanosomen, der Immunantwort des infizierten Wirtes zu entgehen. Durch einen die äußere Trypanosomenmembran umgebenden Mantel von dicht gepackten VSGs wird die Penetration von Makromolekülen des Wirtes unmöglich gemacht (CROSS, 1990).

Bei *Plasmodium falciparum* ermöglicht die GPI-Verankerung und die damit verbundene Abspaltbarkeit durch die PI-PLC die Regulation einer Protease (p76), deren proteolytische Aktivität erst im löslichen Zustand einsetzt (BRAUN-BRETON *et al.*, 1988).

1.1.2 Struktur

Die Struktur des GPI-Anteils der VSG von Trypanosomen wurde erstmals von FERGUSON *et al.* (1985) beschrieben. Kurz darauf wurden seine Beobachtungen von anderen Forschern, die viele Strukturen von Säugetier- und parasitären GPIs studierten, bestätigt (FERGUSON und WILLIAMS, 1988; HOMANS *et al.*, 1988; LOW, 1989; CROSS, 1990; ENGLUND, 1993).

Trotz der Vielfalt der Organismen, in denen GPI-Anker gefunden wurden, und der verschiedenen Funktionen der verankerten Proteine, ist die Kernstruktur aller bekannten GPI-Anker weitgehend konserviert (Abb. 1.1). Durch ein Lipid, welches über eine Phosphodiesterbindung an *myo*-Inositol gebunden ist, wird die Verankerung in der

Zellmembran bewerkstelligt. Der Lipidanteil kann bei verschiedenen Ankern unterschiedlich sein. So besteht er z. B. aus Dimyristolglycerol beim Trypanosomen-VSG (FERGUSON *et al.*, 1985a, b), aus 1-Alkyl-2-Acyl-Glycerin bei der menschlichen Erythrozyten-Acetylcholinesterase (ROBERTS *et al.*, 1988) und einer Oberflächenprotease von *Leishmania* (SCHNEIDER *et al.*, 1990) oder Ceramid wie bei *Dictiostelium discoideum* (STADLER *et al.*, 1989). Als Variation ist bei einigen Ankern aus Hefe und Säugetier die Acylierung des Inositolringes über Veresterung an der 2-Hydroxy-Gruppe beobachtet worden, die die Struktur resistent gegen Hydrolyse durch bakterielle phosphatidylinositol-spezifische Phospholipasen macht (SIPOS *et al.*, 1994; FERGUSON, 1992; URAKAZE, 1992; MAYOR *et al.*, 1990). Die Hydrolysierbarkeit der Bindung zwischen dem Inositol und dem Phospholipidrest durch die eukaryotische PI-PLD wird dadurch nicht beeinträchtigt (DAVITZ *et al.*, 1989).

An das Inositol ist Glucosamin über eine α 1-6 glycosidische Bindung gekoppelt. Drei Mannose-Moleküle sind nacheinander an das Glucosamin gebunden und bilden ein lineares Trisaccharid, an dessen terminale Mannose über eine Phosphodiesterbindung Phosphoethanolamin gebunden ist. Bei Säugetierzellen wurden weitere Phosphoethanolaminmoleküle an der ersten und zweiten Mannose gefunden (PUOTI *et al.*, 1991; PUOTI und CONZELMANN, 1992, 1993). Das zu verankernde Protein ist über eine Amidbindung mit der α -Carboxylgruppe der C-terminalen AS an das Phosphoethanolamin gebunden.

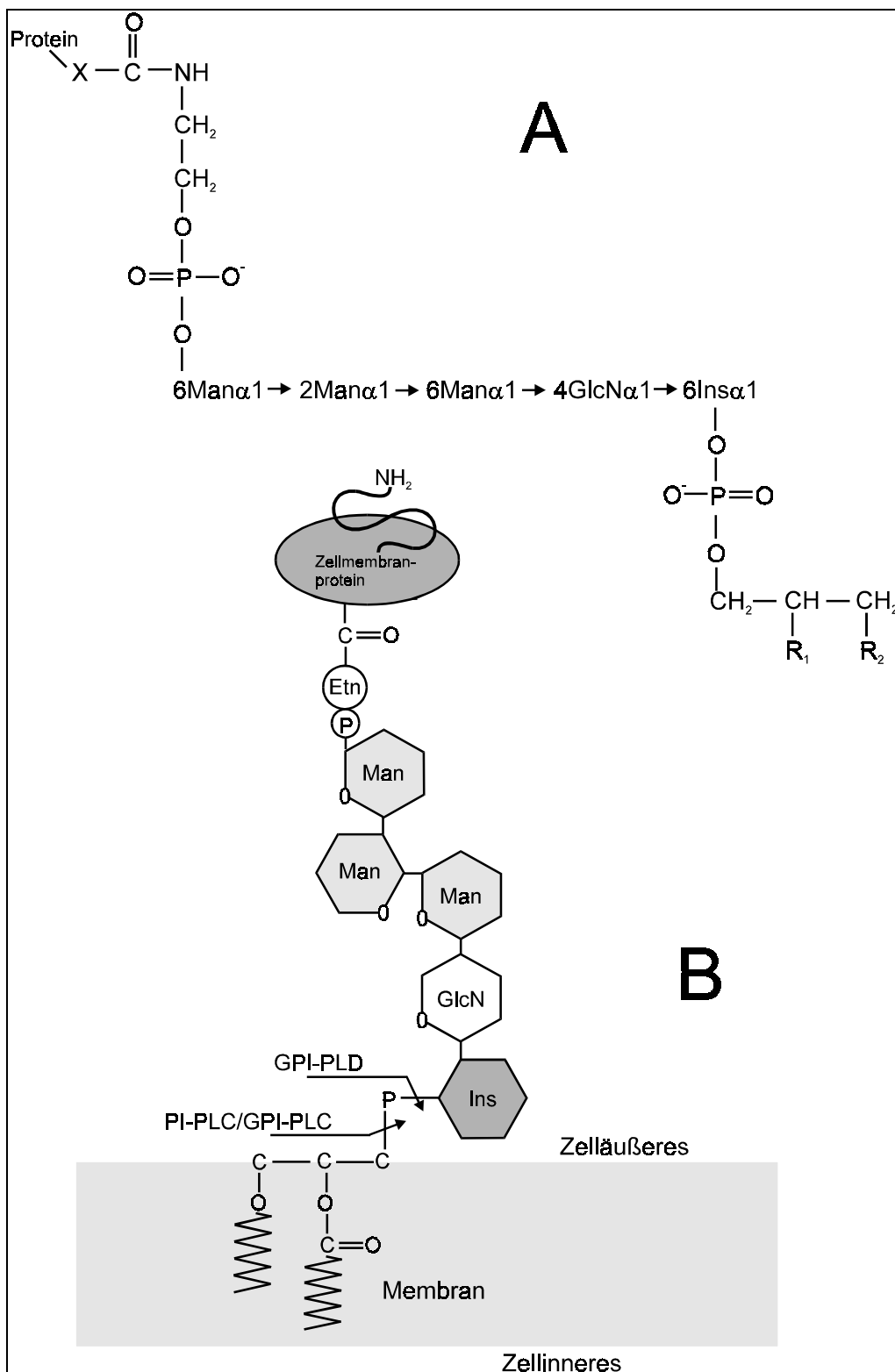


Abb. 1.1: A: Universelle Grundstruktur eines typischen GPI-Ankers. R₁ und R₂ stehen für die variablen Fettsäuren. B: Schematische Darstellung des GPI-Ankers. GPI-PLD: Schnittstelle für die eukaryotische glycosylphosphatidylinositol (GPI) - spezifische Phospholipase D (PLD); PI-PLC/GPI-PLC: Schnittstelle für die bakterielle phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PLC) bzw. die eukaryotische GPI - spezifische PLC; Ins: Inositol; P: Phosphat; GlcN: Glucosamin; Etn: Ethanolamin; Man: Mannose.

Der GPI-Kern kann zusätzlich mit Karbohydraten und Phosphoethanolaminen versehen sein, die mit den angehängten Proteinen und den Geweben bzw. Organismen, in denen sie exprimiert werden, variieren. So wurden Modifikationen mit Mannose, Glucose, Galactose, N-Acetylgalactose, N-Acetylneuraminsäure und N-Acetylglucosamin beschrieben (STEVENS, 1995). In Abb. 1.2 sind schematisch die Strukturen für das trypanosomale VSG (FERGUSON *et al.*, 1988), das Thy-1-Glycoprotein aus dem Rattenhirn (HOMANS *et al.*, 1988) und die erythrozytäre humane Acetylcholinesterase (ROBERTS *et al.*, 1988) vergleichend dargestellt. Für eine kleine Fraktion des AChE-Ankers beschrieben DEEG *et al.* (1992) ein weiteres, an der zweiten Mannose verestertes, Phosphoethanolamin.

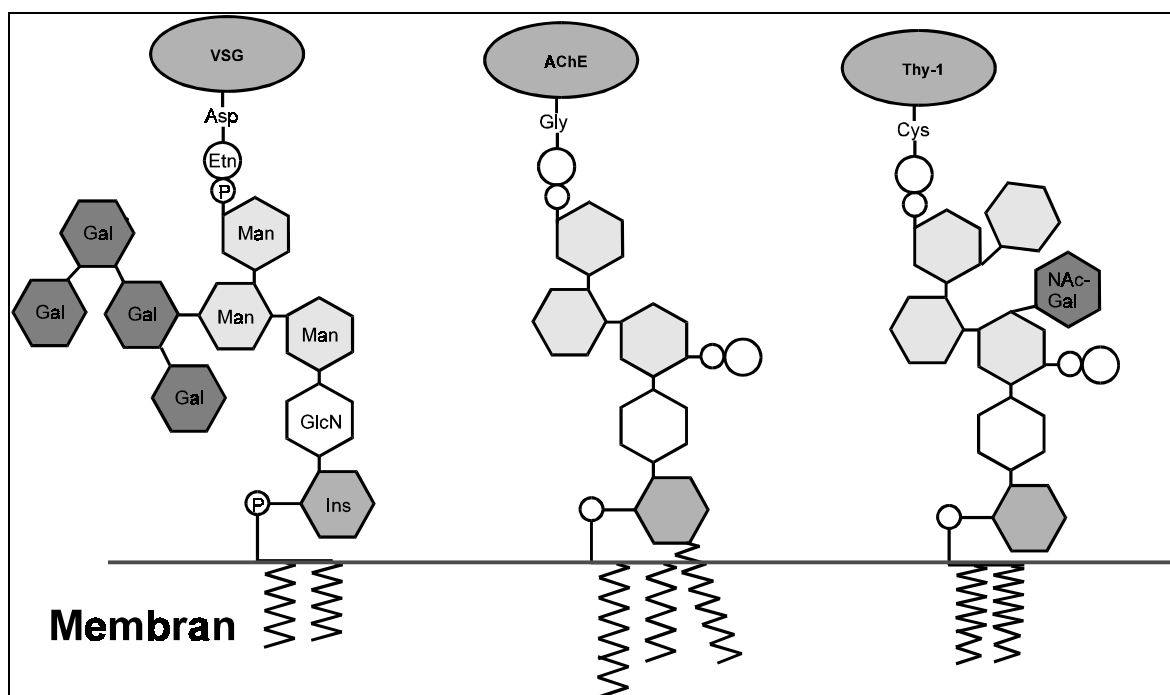


Abb. 1.2: Schematischer Vergleich der Strukturen dreier GPI-Anker. VSG, variantes Oberflächenglycoprotein von *T. brucei*; AChE, erythrozytäre humane Acetylcholinesterase; Thy-1, Aktivierungsantigen auf murinen T- und Hirnzellen; Ins: Inositol; P: Phosphat; GlcN: Glucosamin; Etn: Ethanolamin; Man: Mannose; NAc-Gal: N-Acetylgalactosamin; Gal: Galactose. Modifiziert nach CROSS (1990).

1.2 Die GPI-Anker-Biosynthese

Der GPI-Anker wird durch die aufeinanderfolgende Addition von Kohlenhydraten an Phosphatidylinositol (PI) synthetisiert (Abb. 1.3). Die erste Reaktion ist die Übertragung von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) auf PI. Der Donor für das GlcNAc ist UDP-N-Acetylglucosamin (DOERING *et al.*, 1989). Das entstandene GlcNAc-PI wird rasch zu GlcN-PI deacetyliert (STEVENS und RAETZ, 1991; SUGIYAMA *et al.*, 1991; HIROSE *et al.*, 1991). Die Deacetylierung wird durch einen noch unbekanntem Mechanismus durch die Anwesenheit von GTP stimuliert (STEVENS, 1993). Bei einigen Ankervorläufern von Hefen und Säugern erfolgt jetzt eine zusätzliche Acylierung des Inositols (COSTELLO und ORLEAN, 1992; URAKAZE *et al.*, 1992). Nacheinander werden dann drei Mannosen über unterschiedliche Bindungen übertragen (Struktur siehe Abb. 1.1). Die Übertragung erfolgt vom Mannose-Donor Dolichol-Phosphoryl-Mannose (Dol-P-Man) (MENON *et al.*, 1990; DeGASPERI *et al.*, 1990). Schließlich wird das Phosphat des Phosphoethanolamins von Phosphatidylethanolamin an die terminale Mannose des Grundgerüsts angehängt (MENON *et al.*, 1993). Die zusätzliche Addition von Phosphoethanolamin bei eukaryotischen Ankern an die Mannose-Moleküle 1 und 2 kann zum Schluß oder direkt nach der Mannosebindung erfolgen (KAMITANI *et al.*, 1992; HIROSE *et al.*, 1992a, 1992b).

Unter Einbeziehung des Amins des endständigen Phosphoethanolamins wird mittels einer Peptidbindung das zu verankernde Protein an dessen C-Terminus angeknüpft. Die unreife Form eines typischen zu verankernden Proteins besitzt ein hydrophobes N-terminales Signalpeptid, welches das Polypeptid in das Innere des ERs dirigiert. Das Signalpeptid wird dort durch eine (NH₂-terminale-) Signalpeptidase entfernt. Eine zweite hydrophobe Signalpeptidomäne befindet sich am COOH-Terminus, die ebenfalls während der Prozessierung entfernt wird. Durch eine Transamidase wird an den neuentstandenen COOH-Terminus (die ω -Position) der GPI-Anteil geknüpft (BERGER *et al.*, 1988; AMTHAUER *et al.*, 1993; KODUKULA *et al.*, 1993).

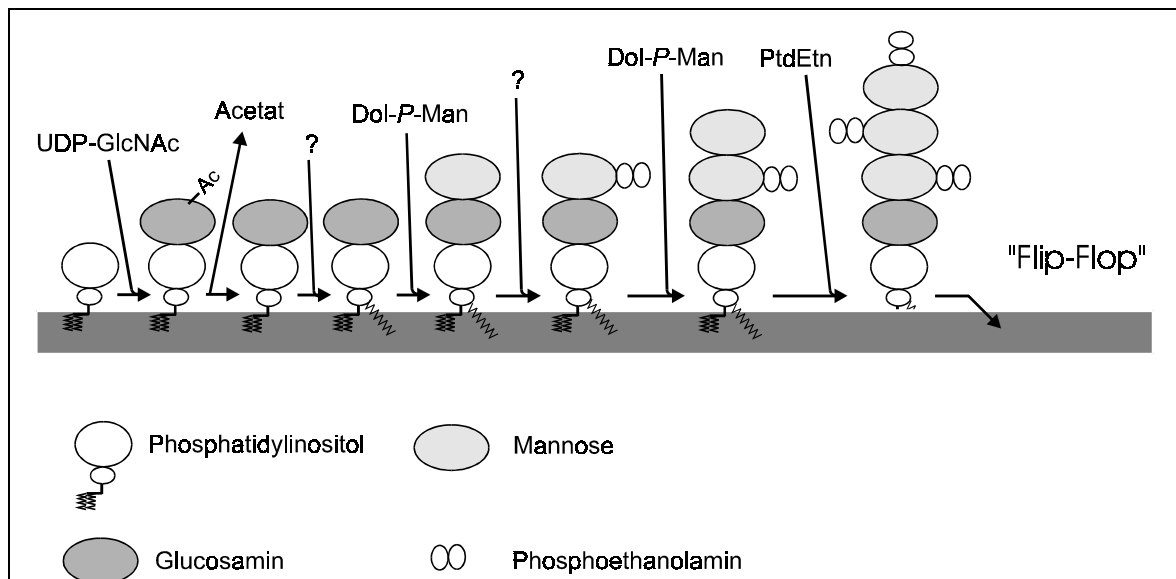


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der GPI-Anker Biosynthese. Der „Flip-Flop“ - der Wechsel des Anker-Vorläufers von der zytosomatischen Seite ins Innere des endoplasmatischen Retikulums - erfolgt zwischen der Deacetylierung und der Proteinaddition. Der exakte Zeitpunkt ist nicht bekannt. PtdEtn: Phosphatidylethanolamin

Zur Beantwortung der Frage nach den an der GPI-Biosynthese beteiligten Proteinen waren eine Reihe von Zelllinien hilfreich, die negativ für GPI-verankerte Proteine sind. Diese Thy1-negativen murinen Lymphommutanten werden in Komplementationsgruppen (A, B, C, D, E, F und H) eingeteilt, die nach somatischer Zellfusion untereinander in jeder Kombination wieder eine Expression des GPI-verankerten Thy1-Moleküls zeigen. Somit besitzen die verschiedenen Komplementationsklassen unterschiedliche Defekte in der GPI-Biosynthese (HYMAN, 1985, 1988). Bis auf die Klasse D-Zellen synthetisieren alle anderen Gruppen das Thy-1-Protein. Die Untersuchung der intrazellulären GPI-Intermediate zeigte, daß die Zellen der Klassen A, C und H weder GlcNAc-PI noch GlcN-PI synthetisieren (STEVENSON und RAETZ, 1991; SUGIYAMA *et al.*, 1991). Dadurch wurde deutlich, daß an diesem ersten Anker-Syntheseschritt mindestens drei verschiedene Genprodukte beteiligt sein müssen. In den Klasse E-Zellen wird kein Dol-P-Man, der Donor für die Mannose-Moleküle synthetisiert (LEMANSKY *et al.*, 1991). Klasse B-Zellen haben einen Defekt bei der Addition des dritten Mannoserestes und in Klasse F-Zellen wird kein EthN-P auf die dritte Mannose des Ankers übertragen (SUGIYAMA *et al.*, 1991).

1.3 Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie - ein GPI-Synthesedefekt

Als eigenständige Krankheit wurde die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) erstmals von STRÜBING im Jahre 1882 beschrieben. Er vermutete schon damals eine Störung in der Blutbildung mit einhergehender intravaskulärer Lyse der Erythrozyten. Inzwischen stellt sich die PNH als komplexes hämatologisches Krankheitsbild dar, dessen Merkmale chronische oder schubweise auftretende intravaskuläre Hämolysen sind. Der klassischen Diagnose der PNH mit dem Säurehämolysetest (HAM, 1937) liegt zugrunde, daß Erythrozyten von PNH-Patienten in einem angesäuerten autologen Serum lysiert werden. Ursache dafür ist eine Säureaktivierung der Komplementproteine aus dem autologen Plasma (HÄNSCH *et al.*, 1983; NICHOLSON-WELLER *et al.*, 1985). An den Membranen der PNH-Erythrozyten bilden sich, unabhängig von den frühen Komponenten des Komplementsystems, C5b-6-Komplexe, die gemeinsam mit den Komponenten C7, C8 und C9 die Lyse verursachen (HÄNSCH *et al.*, 1987)(Abb. 1.4).

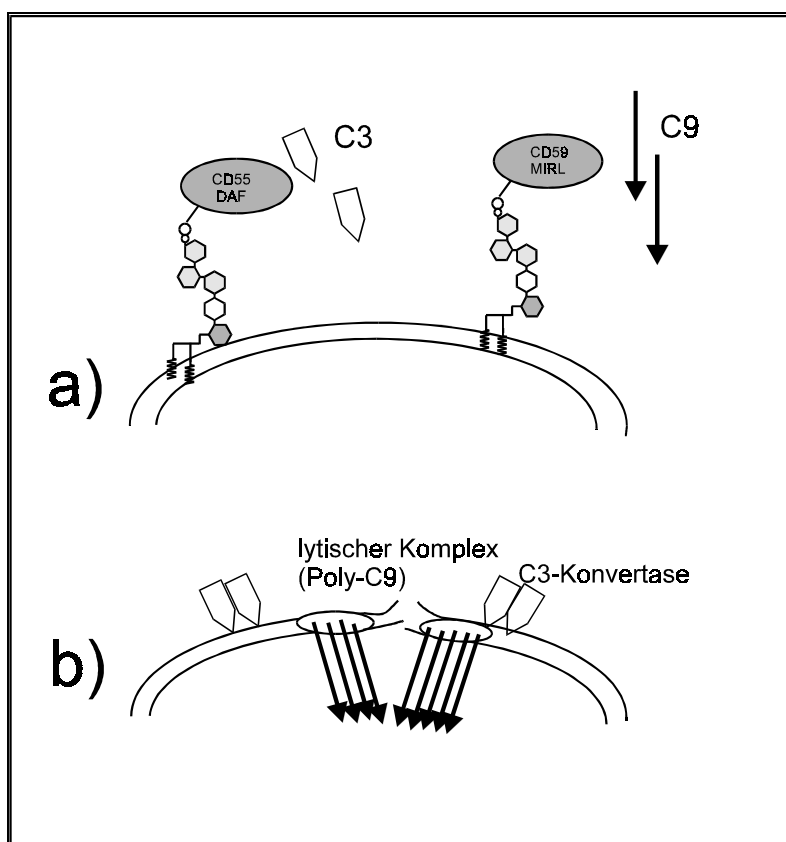


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Erythrozytenmembran a) eines normalen Erythrozyten und b) eines Erythrozyten eines PNH-Patienten. DAF: *Decay accelerating factor*; MIRL: *Membrane inhibitor of reactive lysis*. Fehlen die GPI-verankerten Moleküle CD55 und CD59 wie in b), kommt es zu einer Aktivierung der Komplementkaskade und zur Ausbildung von lytischen Komplexen (modifiziert nach Schubert und Schmidt, 1992).

Auch der Nachweis der PNH mit dem sog. Zuckerwasser- oder Sucrose-Test führt zur Lyse der Erythrozyten durch Adsorption von Komplementproteinen an die Zellmembran in einem Medium mit geringer Ionenstärke (HARTMANN und JENKINS, 1966).

Erst im letzten Jahrzehnt wurde die Ursache für die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) entdeckt - das Fehlen GPI-verankerter Zelloberflächenproteine auf den vom Knochenmark abstammenden Zellen des hämatopoetischen Systems (DAVITZ *et al.*, 1986; SELVARAJ *et al.*, 1987; HUIZINGA *et al.*, 1987; ROSSE, 1990; SCHUBERT *et al.*, 1990 und 1991). Die primäre Ursache für eine erhöhte Sensitivität der Erythrozyten gegenüber dem homologen Komplement wurde einer Reihe von fehlenden GPI-verankerten komplementregulatorischen Zelloberflächenproteinen zugeschrieben (NICHOLSON-WELLER *et al.*, 1985). Aufgrund der Beobachtung eines Patienten mit einem genetischen CD59-Defektes, der die Symptome der PNH aufwies, liegt es nahe, daß das CD59-Molekül entscheidend in der Komplementreaktion ist (YAMASHINA *et al.*, 1990). Mittels Durchflußzytometrie, bei der Antikörper gegen GPI-verankerte Proteine verwendet wurden, konnten von SCHUBERT *et al.* (1991) eine Korrelation zwischen dem Anteil GPI-defizienter Zellen und dem von im herkömmlichen Hämolysetest lysierbarer Zellen gezeigt werden. Die Durchflußzytometrie ermöglichte neben der Analyse der Erythrozyten auch die der übrigen Zellen des peripheren Blutes und ersetzt so immer mehr die klassischen Hämolysetests zur PNH-Diagnostik (van der SCHOOT *et al.*, 1990; PLESNER *et al.*, 1990; SCHUBERT *et al.*, 1991) und zur Diagnose bei Patienten mit aplastischer Anämie, von denen etwa 30 - 40 % einen GPI-Verankerungsdefekt aufweisen (SCHUBERT *et al.*, 1994). Bei der PNH-Diagnose mittels Immunfluoreszenz wird die Expression des CD48-Antigens (Blast-1-Antigen; YOKOYAMA *et al.*, 1991; KORINEK *et al.*, 1991; VAUGHAN *et al.*, 1991) auf Lymphozyten und Monozyten untersucht (KNAPP *et al.*, 1989), auf Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten die Expression von CD55 (DAF-*Decay accelerating factor*; MEDOF *et al.*, 1986), auf Lymphozyten, Granulozyten und Erythrozyten CD59 (MIRL-*Membrane inhibitor of reactive lysis*, HOLGUIN *et al.*, 1990) und CD16 auf Granulozyten (FC γ RIII, SELVARAJ, 1988).

Bei PNH-Patienten findet man neben einem erhöhtem Risiko für venöse Thrombosen und Eisenmangelanämie auch eine Tendenz zu Infektionen, eine Assoziation mit der aplastischen Anämie (AA) und eine erhöhte Inzidenz von myeloischer Leukämie (LEWIS und DACIE, 1967; ROSSE und PARKER, 1985; DEVINE *et al.*, 1987; BLAAS *et al.*, 1988; ROTOLI und LUZZATTO, 1989).

Die Tatsache, daß allen hämatopoetischen Zellpopulationen bei betroffenen Personen eine GPI-Defizienz nachzuweisen ist (klonale Ausbreitung) und keinerlei Hinweise auf eine Vererbung oder andere verwandtschaftliche Zusammenhänge vorliegen, ließ die Vermutung aufkommen, daß es sich bei der PNH um eine durch somatische Mutation verursachte Krankheit handelt, bei der pluripotente Stammzellen betroffen sind.

Der Defekt in der GPI-Biosynthese bei der PNH konnte durch biochemische Analyse der GPI-Ankermediate aus Zellen von PNH-Patienten für die Übertragung von GlcNAc auf PI festgelegt werden (ARMSTRONG *et al.*, 1992; HIDAKA *et al.*, 1993; HILLMEN *et al.*, 1993; TAKAHASHI *et al.*, 1993; NORRIS *et al.*, 1994). Durch Zellfusionsexperimente von defizienten Zelllinien (aus PNH-Patientenzellen generiert) mit oben erwähnten Thy1-Mauslymphommutanten konnte gezeigt werden, daß der Defekt bei der Übertragung von GlcNAc auf PI liegt. Das für die PNH verantwortliche Gen, PIG-A (für Phosphatidyl-inositolglykan der Komplementationsklasse A), wurde durch Expressionsklonierung von MIYATA *et al.* (1993) isoliert. Bei allen bisher untersuchten PNH-Patienten konnten Mutationen im PIG-A-Gen als Ursache für ein gar nicht oder nur funktionsuntüchtiges exprimiertes PIG-A-Protein nachgewiesen werden (TAKEDA *et al.*, 1993; BESSLER *et al.*, 1994a, b, d; MIYATA *et al.*, 1994; OSTENDORF *et al.*, 1995; WARE *et al.*, 1994). Die nachgewiesenen Mutationen zeigten eine große Heterogenität vom Basenaustausch bis hin zu Deletionen und Insertionen von einem bis mehreren Nukleotiden.

1.4 Das PIG-A-Protein

Die komplette für das humane PIG-A-Protein kodierende PIG-A-cDNA besteht aus 3589 bp (Abb. 1.5). Die Lokalisation des Genes an der chromosomalen Position Xp22.1 wurde von TAKEDA *et al.* (1993) beschrieben. Das gesamte Gen umfaßt etwa 17 kb und enthält sechs Exons, von denen allerdings nur fünf kodierende Information enthalten (BESSLER *et al.*, 1994c; IIDA *et al.*, 1994). Die genomische Organisation ist in Abb. 1.6 schematisch dargestellt. Zusätzlich wurde von BESSLER *et al.* (1994c) ein intronloses PIG-A-Pseudogen (ψ PIG-A) mit einer 91 %igen Sequenzhomologie beschrieben. Es wurde auf Chromosom 12 an Position 12q21 lokalisiert. Im Vergleich mit der PIG-A-cDNA enthält das Pseudogen zwei Leserasterverschiebungen und zwei Terminationskodons, das längste offene Leseraster mit Homologie zu PIG-A kodiert für nur 236 Aminosäuren. ψ PIG-A wird vermutlich nicht transkribiert, da auch in GPI⁻-Zellen keinerlei ψ PIG-A-mRNA durch reverse Transkriptase/Polymerasekettenreaktion nachgewiesen werden konnte (BESSLER *et al.*, 1994c; OSTENDORF, Dissertation, 1995).

```

1  ACTGGCGGCC ATGGAACTCA CCGGTAATAG AGGACACATC TCTTAACTGG GTTGCTCTAA
61  GAACTGATGT CTA AACCGTC TCAGCATGGC CTGTAGAGGA GGAGCTGGGA ATGGCCACCG
121  TGCCTCAGCT ACACTCTCTC GGGTTAGCCC TGGAAGTCTT TACACATGTA GAACCCGTAC
181  CCATAATATA TGCATGGTAT CTGACTTTTT CTACCCAAAT ATGGGAGGCA AGGAAAAGCCA
241  CATTTACCAG CTCTCTCAGT GCCTGATTGA AAGAGGGCAT AAGGTTATAA TTGTCACCCA
301  TGCTTATGGA AATCGAAAAG GCATCCGTTA CCTCACCAGT GGCCTCAAAG TCTATTACTT
361  GCCTCTGAAA GTCATGTACA ACCAGTCTAC AGCCACGACC CTCTTTCACA GTCTGCCATT
421  GCTCAGGTAC ATATTTGTTC GGGAGAGAGT CACGATAATC CATTACATA GTTCTTTTTTC
481  TGCTATGGCC CATGATGCTC TCTTCCACGC CAAGACAATG GGGCTTCAGA CAGTCTTCAC
541  GGACCATTCC CTTTTTGGAT TTGCTGATGT CAGCTCGGTG CTTACAAACA AGCTTCTAAC
601  CGTGTCTCTT TGTGATACAA ACCACATCAT TTGTGTGTCT TATACTAGTA AGGAAAATAC
661  TGTACTAAGA GCAGCACTGA ATCCTGAAAT AGTGTCCGTC ATTCCTAATG CTGTAGATCC
721  TACTGACTTC ACTCCAGACC CATTTAGAAG GCATGATAGT ATA ACTATTG TTGTTGTCAG
781  CAGACTTGTT TACAGAAAAG GGATCGATTT GCTTAGTGGT ATAATACCTG AACTCTGTCA
841  GAAATATCCA GATTTAAATT TCATAATTGG AGGAGAGGGA CCAAAGAGAA TCATTTTGGGA
901  AGAAGTTCGG GAAAGATACC AGCTGCATGA CAGGGTGCCT CTTTTGGGAG CTTTAGAACA
961  CAAGGATCGT AGAAATGTCT TAGTTCAAGG ACATATTTTT CTGAATACCT CCCTTCTAGA
1021  AGCATTCTGC ATGGCGATCG TGG AAGCAGC CAGTTGTGGT TTACAGGTTG TAAGTACCAG
1081  AGTTGGTGGG ATTCTGAGG TGCTTCCAGA AAACCTTATT ATTTTATGTG AGCCTTCAGT
1141  AAAATCTTTG TGTGAAGGAT TGGAAAAGGC TATTTTCAA CTGAAGTCAG GGACATTGCC
1201  AGCTCCAGAA AACATCCATA ACATAGTAAA GACTTTCTAC ACCTGGAGGA ATGTTGCAGA
1261  AAGAACTGAA AAGGTATATG ACCGGGTATC AGTGAAGCT GTGTTGCCAA TGGACAAACG
1321  ACTGGACAGA CTTATTTCTC ACTGCGGCC AGTAACAGGC TACATCTTTG CTTTGTGGC
1381  AGTTTTCAAC TTCCTCTTCT FCATTTTCTT GAGATGGATG ACTCCAGATT CTATCATTGA
1441  TGTTGCAATA GATGCCACTG GGCCACGGGG TGCTTGACT AATAACTATT CTCACAGTAA
1501  AAGAGGGGGT GAGAATAATG AGATATCTGA AACCAGGTAG AAGGAAGCCT AGATTGTAAG
1561  ATTTTAAACA TTTGTAATAG TTCTATAAAG ACTATGGAAA ATAACCTTGC TTTTGGGGGG
1621  TTTTGTTTTT TTTAGAGTTA ATTTAGTAAG TTATGCTACC TCTATATCAT TCAATATTTT
1681  CTGTTGAGGA AAGATAAAAA TGTATGCAAT TCCTGAGTGT AGAACTTCT TGCATTATT
1741  TAAAATTTAG GAGAGAACAT TTAAGCCACT CAGGTATGCA ATTTTTCAG CTACTGAAAT
1801  CCTGTAGCA GAGATGTTTT AACATTATAT TTTGAGAGCT TTGGGTGCTG AAGGGCCAAA
1861  CGTTTTCTGG GCATTTTTTG GCCAGTTTTT AATGTAACAC CATTAGACAC TCACCAGATG
1921  TTTACAAGTT TTCTTTAGGG GAACTACAAC AATTATATGA ACTGTTTTAT ATCATGTTCA
1981  TATACATTTA TTAGGAATCT AAATCATGTC TTTGAACATT TATTAGGTTT ACTCAGTAGG
2041  TGTTACATGT AATTAACAGG TTCCTTGAGT AAGATAGTCC ATCAGTTACC AGCACATTTT
2101  GAACCCCTGC TCTGTGTAGA ATGTTGAATC AGATGCTTCC CGCCATTAAG GACCAGGGGT
2161  GCATTACTC TTTGTTTACC ATTCAAATGG CTTACTTCAT CATAATTGTG GTTGATATGA
2221  GATCAATATC CAACATGCCA AAAATGCTCA TGCCAGTTAA TGCCAGGAAA AAAATCACCG
2281  ACACACTACT AGTACTTTGT TCCTGTTGTA TGCATTCTCC TAGGTAGAGC CTCCATCTTC
2341  AGTTGTGTTT GTGAAGGTAT TTTTGTCTTT TTAATACTG GGGACCGATA TCACTGTTGA
2401  TAGTGACAGG AAACCTTCCA CATTTTTTCAG TGCATAATTG AGTTTTCTAT AAATGCCTTC
2461  GTGTTTTCTG AGCAGAATGT ACGAGGTGTG CCATCCCAA ACCAGCTGCT ACCCTGTCTT
2521  TTTAATGTAA GTCACTCCC TTCACTGTGG CCTCGCTGAT GTCTGATAAG TATTGTCAGT
2581  GTGCAAAAGG CTTTACTTCA GAATGGTTTA TTTATAGCAA ACTAAGTTGA AAATTTTAGA
2641  AACAGTCTTT GTGGGTGGAT GTTATTAACT GTCATTGTTG TTGCCAGAG CCATGGGTTT
2701  TTTAACCCCA AATTATCCAC ATGGTGTGTA TTATGAATTC TTTGAACTCT TAAGGTTTTT
2761  GTGAGAAAAG GACTGTGAAT TCAAAAACAAT AAGGCACTTG TGGGTGCAT ACATAGATTC
2821  TGACAGTGTG GTGATTCTGT ATAGGATTTT TAAAAATGAC AACATTACA AAATTTATTA
2881  CTTTTTAAAA AATAACATGC CTATTAAC TGTTGCACTGA TATAAAAGAA ATATATTTGT
2941  GTTTTGTTTG TACTAAAATG CAAAAGCAAG AGTGCAATTT TTA AATCTA GAAGTTAGGG
3001  GTTTTGTGG AGAAAAATGG ACTGATCTTT AA ACTATTCA GTCTTACTGG GATTTTTATG
3061  CATAGAACT CACATATAAA CATGAAATAA ACAGTGCCAG TATTCATAGG AAAGTGAGAA
3121  ACTGTAATAT TTGGCCATTA TTCTATTCAA CAGGTTTTAG AGGCATGCCA CCATTTTTTC
3181  CTTATATTTT TGCTTAATTT TTTTAAATTT TCATTTAATT CTTAACTGT CATTATTTG
3241  AGATGGAAAT AAGATCTAAA GTTAGTTGCC TTTGCCTGTA AAACATGTGA TTTGCAAAT
3301  ATTATTTTCC TTTTTTTTTA ACAAATGGAA GTAAATTTGT TTCACGTAAA TCTTAATTTT
3361  CAACCTTCT GGATACCTTA ATTGTAAC TGCACTTTGCA CTGGTCGGTA TATGGAAACA
3421  CATTGCTCTA CCCTGCTACT TAGTTGATTT TAAAGTGAAT TTACAGTGT GAGAAATTTG
3481  TGAAAAATAT ATTGTATTTT TTTTGATGTT TCAAAAGGTT GCCTATGAAA AACTGATTTG
3541  TTTAAACATG CTACATGTCC AAAAATAAAG ACCAGAATGA CATTTTGAT

```

Abb. 1.5: Die PIG-A-cDNA-Sequenz (MIYATA *et al.*, 1993: Accession Number D11466, GenBank).

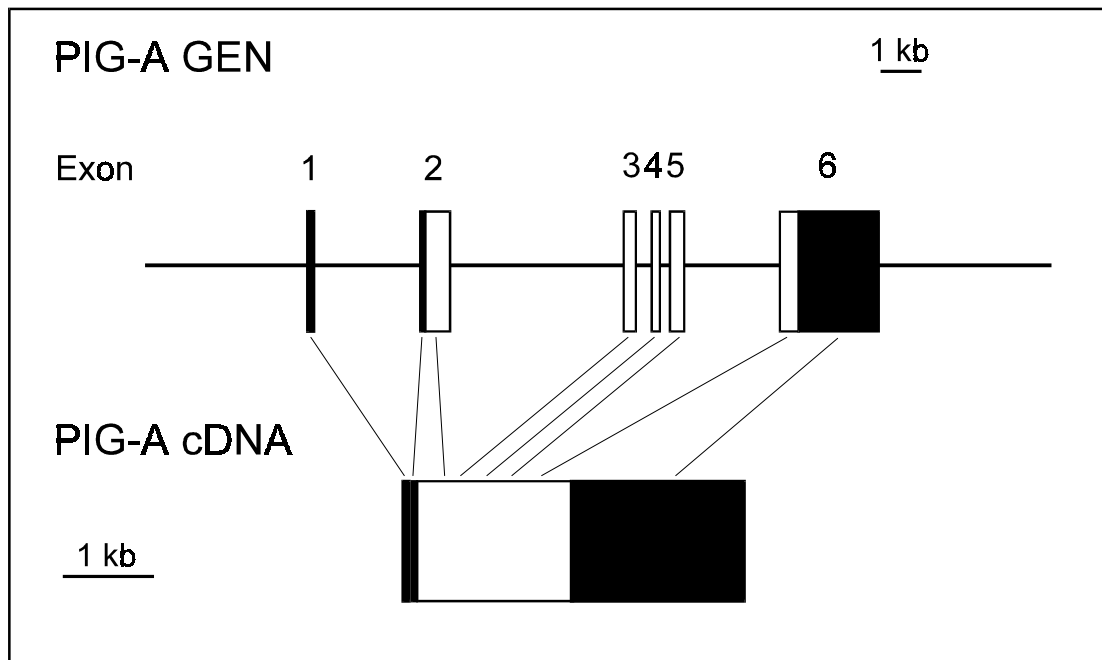


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der genomischen Organisation des PIG-A-Gens. Translatierte Bereiche sind weiß (kodierende Region); nicht-translatierte Exonbereiche sind schwarz ausgefüllt (BESSLER *et al.*, 1994c; IIDA *et al.*, 1994).

Ab Position 86 der PIG-A-cDNA beginnt ein offenes Leseraster (ORF, „*open reading frame*“), das für ein voraussagbares Protein von 484 Aminosäuren kodiert (Abb. 1.7).

```

1
ATG GCC TGT AGA GGA GGA GCT GGG AAT GGC CAC CGT GCC TCA GCT ACA CTC TCT CGG GTT AGC CCT GGA
Met-Ala-Cys-Arg-Gly-Gly-Ala-Gly-Asn-Gly-His-Arg-Ala-Ser-Ala-Thr-Leu-Ser-Arg-Val-Ser-Pro-Gly
70
AGT CTT TAC ACA TGT AGA ACC CGT ACC CAT AAT ATA TGC ATG GTA TCT GAC TTT TTC TAC CCA AAT ATG
Ser-Leu-Tyr-Thr-Cys-Arg-Thr-Arg-Thr-His-Asn-Ile-Cys-Met-Val-Ser-Asp-Phe-Phe-Tyr-Pro-Asn-Met
139
GGA GGC GTG GAA AGC CAC ATT TAC CAG CTC TCT CAG TGC CTG ATT GAA AGA GGG CAT AAG GTT ATA ATT
Ser-His-Ile-Tyr-Gln-Leu-Ser-Gln-Cys-Leu-Ile-Glu-Arg-Gly-His-Lys-Val-Ile-Ile-Val-Thr-His-Ala
208
GTC ACC CAT GCT TAT GGA AAT CGA AAA GGC ATC CGT TAC CTC ACC AGT GGC CTC AAA GTC TAT TAC TTG
Tyr-Gly-Gly-Gly-Val-Glu Asn-Arg-Lys-Gly-Ile-Arg-Tyr-Leu-Thr-Ser-Gly-Leu-Lys-Val-Tyr-Tyr-Leu
277
CCT CTG AAA GTC ATG TAC AAC CAG TCT ACA GCC ACG ACC CTC TTT CAC AGT CTG CCA TTG CTC AGG TAC
Pro-Leu-Lys-Val-Met-Tyr-Asn-Gln Ser-Thr-Ala-Thr-Thr-Leu-Phe-His-Ser-Leu-Pro-Leu-Leu-Arg-Tyr
346
ATA TTT GTT CGG GAG AGA GTC ACG ATA ATC CAT TCA CAT AGT TCT TTT TCT GCT ATG GCC CAT GAT GCT
Ile-Phe-Val-Arg-Glu-Arg-Val-Thr-Ile-Ile-His-Ser-His-Ser-Ser-Phe-Ser-Ala-Met-Ala-His-Asp-Ala
415
CTC TTC CAC GCC AAG ACA ATG GGG CTT CAG ACA GTC TTC ACG GAC CAT TCC CTT TTT GGA TTT GCT GAT
Leu-Phe-His-Ala-Lys-Thr-Met-Gly-Leu-Gln-Thr-Val Phe-Thr-Asp-His-Ser-Leu-Phe-Gly-Phe-Ala-Asp
484
GTC AGC TCG GTG CTT ACA AAC AAG CTT CTA ACC GTG TCT CTT TGT GAT ACA AAC CAC ATC ATT TGT GTG
Val-Ser-Ser-Val-Leu-Thr-Asn-Lys-Leu-Leu-Thr-Val-Ser-Leu Cys-Asp-Thr-Asn-His-Ile-Ile-Cys-Val
553
TCT TAT ACT AGT AAG GAA AAT ACT GTA CTA AGA GCA GCA CTG AAT CCT GAA ATA GTG TCC GTC ATT CCT
Ser-Tyr-Thr-Ser-Lys-Glu-Asn-Thr-Val-Leu-Arg-Ala-Ala-Leu-Asn-Pro Glu-Ile-Val-Ser-Val-Ile-Pro
622
AAT GCT GTA GAT CCT ACT GAC TTC ACT CCA GAC CCA TTT AGA AGG CAT GAT AGT ATA ACT ATT GTT GTT
Asn-Ala-Val-Asp-Pro-Thr-Asp-Phe-Thr-Pro-Asp-Pro-Phe-Arg-Arg-His-Asp-Ser Ile-Thr-Ile-Val-Val
691
GTC AGC AGA CTT GTT TAC AGA AAA GGG ATC GAT TTG CTT AGT GGT ATA ATA CCT GAA CTC TGT CAG AAA
Val-Ser-Arg-Leu-Val-Tyr-Arg-Lys-Gly-Ile-Asp-Leu-Leu-Ser-Gly-Ile-Ile-Pro-Glu-Leu Cys-Gln-Lys
760
TAT CCA GAT TTA AAT TTC ATA ATT GGA GGA GAG GGA CCA AAG AGA ATC ATT TTG GAA GAA GTT CGG GAA
Tyr-Pro-Asp-Leu-Asn-Phe-Ile-Ile-Gly-Gly-Glu-Gly-Pro-Lys-Arg-Ile-Ile-Leu-Glu-Glu-Val-Arg Glu
829
AGA TAC CAG CTG CAT GAC AGG GTG CGT CTT TTG GGA GCT TTA GAA CAC AAG GAT GTT AGA AAT GTC TTA
Arg-Tyr-Gln-Leu-His-Asp-Arg-Val-Arg-Leu-Leu-Gly-Ala-Leu-Glu-His-Lys-Asp-Val-Arg-Asn-Val-Leu
898
GTT CAA GGA CAT ATT TTT CTG AAT ACC TCC CTT ACT GAA GCA TTC TGC ATG GCG ATC GTG GAA GCA GCC
Val Gln-Gly-His-Ile-Phe-Leu-Asn-Thr-Ser-Leu-Thr-Glu-Ala-Phe-Cys-Met-Ala-Ile-Val-Glu-Ala-Ala
967
AGT TGT GGT TTA CAG GTT GTA AGT ACC AGA GTT GGT GGA ATT CCT GAG GTG CTT CCA GAA AAC CTT ATT
Ser-Cys-Gly Leu-Gln-Val-Val-Ser-Thr-Arg-Val-Gly-Gly-Ile-Pro-Glu-Val-Leu-Pro-Glu-Asn-Leu-Ile
1036
ATT TTA TGT GAG CCT TCA GTA AAA TCT TTG TGT GAA GGA TTG GAA AAG GCT ATT TTC CAA CTG AAG TCA
Ile-Leu-Cys-Glu-Pro Ser-Val-Lys-Ser-Leu-Cys-Glu-Gly-Leu-Glu-Lys-Ala-Ile-Phe-Gln-Leu-Lys-Ser
1105
GGG ACA TTG CCA GCT CCA GAA AAC ATC CAT AAC ATA GTA AAG ACT TTC TAC ACC TGG AGG AAT GTT GCA
Gly-Thr-Leu-Pro-Ala-Pro-Glu Asn-Ile-His-Asn-Ile-Val-Lys-Thr-Phe-Tyr-Thr-Trp-Arg-Asn-Val-Ala
1174
GAA AGA ACT GAA AAG GTA TAT GAC CGG GTA TCA GTG GAA GCT GTG TTG CCA ATG GAC AAA CGA CTG GAC
Glu-Arg-Thr-Glu-Lys-Val-Tyr-Asp-Arg-Val-Ser-Val-Glu-Ala-Val-Leu-Pro-Met-Asp-Lys-Arg-Leu-Asp
1243
AGA CTT ATT TCT CAC TGC GGC CCA GTA ACA GGC TAC ATC TTT GCT TTG TTG GCA GTT TTC AAC TTC CTC
Arg-Leu-Ile-Ser-His-Cys-Gly-Pro-Val-Thr-Gly-Tyr-Ile-Phe-Ala-Leu-Leu-Ala-Val-Phe-Asn-Phe-Leu
1312
TTC CTC ATT TTC TTG AGA TGG ATG ACT CCA GAT TCT ATC ATT GAT GTT GCA ATA GAT GCC ACT GGG CCA
Phe-Leu-Ile-Phe-Leu-Arg-Trp-Met-Thr-Pro-Asp-Ser-Ile Ile-Asp-Val-Ala-Ile-Asp-Ala-Thr-Gly-Pro
1381
CGG GGT GCC TGG ACT AAT AAC TAT TCT CAC AGT AAA AGA GGG GGT GAG AAT AAT GAG ATA TCT GAA ACC
Arg-Gly-Ala-Trp-Thr-Asn-Asn-Tyr-Ser-His-Ser-Lys-Arg-Gly-Gly Glu-Asn-Asn-Glu-Ile-Ser-Glu-Thr
1450
AGG TAG
Arg

```

Abb. 1.7: Die kodierende Region der PIG-A-cDNA und die dazugehörige voraussichtliche Aminosäuresequenz. Die Aminosäuresequenz wurde mit dem Computerprogramm „PC/Gene“ nach dem universellen genetischen Code erstellt. Die Position 1 entspricht der Position 86 der gesamten PIG-A-cDNA (Abb. 1.5).

1.5 Zielsetzung

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie zeichnet sich durch das Fehlen GPI-verankerter Oberflächenmoleküle auf hämatopoetischen Zellen des peripheren Blutes aus. Es konnte gezeigt werden, daß die Ursache für diese Defizienz in einem Defekt in der GPI-Ankerbiosynthese liegt, und zwar in der Übertragung von GlcNAc auf PI. An diesem sehr frühen Syntheseschritt ist u. a. das PIG-A-Protein beteiligt, und im Falle der PNH konnten Mutationen im PIG-A-Gen, die die Expression eines funktionstüchtigen Proteins nicht mehr zulassen, als verantwortlich für den Defekt identifiziert werden.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des PIG-A-Proteins. Es sollten grundsätzliche Erkenntnisse zur GPI-Biosynthese und der Rolle des PIG-A-Proteins bei dieser gewonnen werden. Im Vordergrund stand dabei die Konstruktion geeigneter Expressionssysteme für das PIG-A-Protein und die Entwicklung einer Methode zum Nachweis des Proteins. Damit sollte insbesondere die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation gegeben sein. Des weiteren sollten Möglichkeiten einer Aufreinigung und der Isolation des Proteins untersucht werden, die Hinweise auf die Beteiligung an einem bei der GPI-Synthese beteiligten Enzymkomplex liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zelllinien JY und JY5 (PIG-A-defizient) wurden von der Arbeitsgruppe Springer (Harvard Medical School, Boston) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue (Stratagene)

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB laqI^qΔM15 Tn10(Tet^r)*]

E. coli Top10 (Invitrogen) (GRANT *et al.*, 1990)

Genotyp: F⁻, *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7679 galU galK rspL(Str^R) endA1*

E. coli MC1061/P3 (Invitrogen) (CASADABAN und COHEN, 1980; SEED, 1987)

Genotyp: F⁻, *hsdR(r_k⁻, m_k⁺,) araD139 Δ(araABC-leu)7679 galU galK Δ lacX74 rpsL thi mcrB* {P3: Kan^r Amp^r (am) Tet^r (am)}

E. coli JM109 (Invitrogen) (YANISCH-PERRON *et al.*, 1985)

Genotyp: F' {*traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15*} *endA1 recA1 hsdR17 (r_k⁺, m_k⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Δ(lac-proAB)*

2.1.3 Chemikalien

Alle im folgenden nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Merck, Darmstadt und J.T. Baker, Deventer, Holland, in p.A.-Qualität bezogen.

Adenosintriphosphat (ATP)

Pharmacia, Freiburg

Agarose, ultra pure	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)	Pharmacia, Freiburg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylenamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ficoll Separating Solution, Density: 1,077	Seromed, Berlin
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Geneticin (G418)	Boehringer, Mannheim
L-Glutamin	Seromed, Berlin
Guanidiniumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Hygromycin	Calbiochem, La Jolla
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim
LB Broth Base	CIBCO, Paisley
LB Agar	CIBCO, Paisley
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Moviol 4-88	Hoechst,
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	Seromed, Berlin
n-Propyl-Gallat	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg

Rotiphorese Gel 30 und Gel 40	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Seromed, Berlin
Sephadex G-50	Pharmacia, Freiburg
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg

2.1.4 Radioaktiv markierte Chemikalien

[$\alpha^{32}\text{P}$] dATP (3000 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig
[2- ^3H] UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin	NEN, Du Pont, Bad Homburg
Tran ^{35}S -Label (1000 Ci/mmol)	ICN, Meckenheim
[$\alpha^{35}\text{S}$] dATP (1000 Ci/mmol)	ICN, Meckenheim
[2- ^3H] D-Mannose	ICN, Meckenheim

2.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
DNA-Ligase des Phagen T4	Boehringer, Mannheim
DNAseI	GIBCO BRL, Neu-Isenburg
Klenow-Fragment	GIBCO BRL, Neu-Isenburg
Taq Polymerase	Promega, Madison
Lysozym	Serva, Heidelberg
Polynukleotidkinase des Phagen T4	Promega, Madison
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme	GIBCO BRL, Boehringer, Biolabs
Reverse Transkriptase (M-MLV)	GIBCO BRL, Neu-Isenburg
RNaseA	Sigma, Deisenhofen
RNaseH	GIBCO BRL, Neu-Isenburg

T3-RNA-Polymerase

Boehringer, Mannheim

2.1.6 Nukleinsäuren

2.1.6.1 Plasmide

pREP7, pREP4, pEBVHis, pcDNA3.1: eukaryontische Expressionsvektoren (Invitrogen)

pQE-30: prokaryontischer Expressionsvektor (Qiagen)

pFLAG-1 BAP Control Vektor: prokaryontischer Expressionsvektor (Invitrogen)

Die Beschreibung der Expressionsvektoren und der selbst konstruierten Plasmide erfolgt in den entsprechenden Kapiteln im Methoden- und Ergebnisteil.

2.1.6.2 Oligonukleotide

PIG-A spezifische Oligonukleotide (Primer) für PCR und Sequenzierung (A bis G):

	Sequenz (5'-3')	Homologie mit der cDNA an den Positionen (nt)*	Eingeführte Restriktions- schnittstelle
A	GCTCTCTCAGTGCCTGATTGAA	250-271 ^S	--
B	CATGATGCTCTCTTCCACGCCA	491-512 ^S	--
C	AGTGTCCGTCATTCTAATGC	691-711 ^S	--
D	ACCAGCTGCATGACAGGGTGCG	918-939 ^S	--
E	TGTGTGAAGGATTGGAAAAGGC	1149-1170 ^S	--
F	CAGTAACAGGCTACATCTTTGC	1350-1371 ^S	--
G	CTTTCAGAGGCAAGTAATAGAC	371-350 ^a	--
h	GGGGTACCAGAACTGATGTCTAAACCG	60-78 ^S	Kpn I
i	GTACAGGATCCGCCTGTAGAGGAGGAGCT	89-106 ^S	BamH I
j	CAGCGACTCGAGAACTGATGTCTAAACCG	60-78 ^S	Xho I

k	GCTGGGTACCATGGACTACAAGGACGACGA TGACAAGGCCTGTAGAAGGAG	89-101 ^s	Kpn I und „FLAG“- Sequenz
l	CCGTCGCTCGAGTCTTACAATCTAGGCTTCC	1543-1561 ^a	Xho I
m	GACCGGTACCCTAATGATGATGATGATGATG CCTGGTTTCAGATATC	1522-1537 ^a	Kpn I und „His- Tag“

* Die Positionsangaben beziehen sich auf die komplette PIG-A-cDNA (s. Abb. 1.5)

^s *sense* Primer

^a *antisense* Primer

Außerdem wurde das Oligonukleotid T3 (Stratagene), 5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3', zur Sequenzierung in pBluescript (+)KS verwendet.

Die Oligonukleotide A bis G wurden am Institut für Mikrobiologie (MHH) synthetisiert, die übrigen Primer wurden von MWG-BIOTECH, Ebersberg geliefert.

2.1.6.3 Größenstandards

Die Nukleinsäure-Größenstandards 100 bp-Leiter und 1 kb-Leiter wurden von GIBCO/BRL (Neu-Isenburg) bezogen.

2.1.7 Antikörper

5E5:	erkennt ein klonotypisches Epitop eines T-Zellklones mit non-MHC-Spezifität
CD48 MoAk J4.57:	Dianova, Hamburg; erkennt das GPI verankerte weit verbreitete Blast-I Antigen
CD55 MoAk BRIC 110:	IBGRL, Bristol; erkennt den <i>Decay Accelerating Factor</i> , ein auf den Zellen des hämatopoietischen Systems weit verbreitetes GPI verankertes komplementregulatorisches Protein

CD59 MoAk BRIC 229:	IBGRL; Bristol; erkennt den <i>Membrane Inhibitor of Reactive Lysis</i> , ein ebenfalls auf den Zellen des hämatopoietischen Systems weit verbreitetes GPI verankertes Protein
W6/32:	Ein MHC-Klasse I spezifischer Antikörper, dem 4. Internationalen Leukozyten Differenzierungs-Workshop entnommen (KNAPP <i>et al.</i> , 1989)
M5 und M2	Integra Biosciences, Fernwald; erkennen die „Flag“-Sequenz
DIA 900	Dianova, Hamburg; monoklonaler Antikörper gegen Histidin-Tag (ZENTGRAF <i>et al.</i> , 1995)
Ratte anti-Maus und Ziege anti-Maus IgG, Peroxidase gekoppelt	Dianova, Hamburg; Sekundärantikörper gegen Maus-Antikörper zum Nachweis im Western-Blot
Cy3	Dianova, Hamburg; Sekundärantikörper gegen Maus-Antikörper zum Nachweis mit dem Fluoreszenzmikroskop
Ziege anti-Maus IgG, Gold-konjugat	Amersham, Braunschweig; Sekundärantikörper gegen Maus-Antikörper für die Elektronenmikroskopie
Anti-Xpress	Invitrogen; monoklonaler Antikörper gegen Enterokinase-Schnittstelle

2.1.8 Medien, Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Thermostabile Lösungen wurden für 45 Minuten bei 120 °C und 105 Pascal im Dampfdruckautoklaven sterilisiert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden, wenn notwendig, sterilfiltriert.

Lösungen für die Dünnschichtchromatographie

Lyse-Puffer:	1	µg/ml	Leupeptin
	0,1	mM	TLCK in H ₂ O
2x Reaktionspuffer	100	mM	HEPES
	5	mM	EDTA
	2	mM	DTT
	2	µg/ml	Leupeptin
	0,2	mM	TLCK
	0,4	µg/ml	Tunicamycin
Laufmittel:	Chloroform/Methanol/H ₂ O		
	10:10:3		

Lösungen und Medien für die Kultur humaner Lymphozytenzelllinien

PBS-Puffer:	130	mM	NaCl
	7,8	mM	Na ₂ HPO ₄
	pH 7,4		
PBS-BSA-Puffer:	PBS-Puffer		
	0,1	%	Rinderserumalbumin
	0,05%		NaN ₃
	10	% (v/v)	FCS
	10	U/ml	Penicillin (1 % [v/v])
	10	µg/ml	Streptomycin (1 % [v/v])
	1	mM	Na-Pyruvat (1 % [v/v])
	in RPMI 1640		

Medien für die Bakterienkultur

LB Broth Base	1 % (w/v)	SELECT Pepton 140
(LB-Medium)	0,5 % (w/v)	Hefe-Extrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl
	50 µg/ml	Ampicillin
Stammplatten:	1 % (w/v)	SELECT Pepton 140
	0,5 % (w/v)	Hefe-Extrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl
	1,2 %	Agar
	50 µg/ml	Ampicillin
SOB-Medium:	2 % (w/v)	SELECT Pepton 140
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl

Das Medium wurde nach dem Autoklavieren mit einer 2 M Mg^{2+} -Stammlsg. (1 M $MgCl_2$ + 1 M $MgSO_4$, sterilfiltriert) auf 20 mM Mg^{2+} eingestellt

SOC-Medium:		SOB-Medium
	20 mM	Glucose (sterilfiltriert)

Puffer für die Nickelchelatchromatographie

Denaturierende Bedingungen:

Puffer A	6 M	Guanidiniumchlorid
	20 mM	Natriumphosphat
	0,5 M	NaCl

pH 7,8

Puffer B	8 M	Harnstoff
	20 mM	Natriumphosphat
	0,5 M	NaCl
	pH 7,8	
Puffer C	Puffer B	
	pH 6,0	
Puffer D	Puffer B	
	pH 5,3	
Puffer E	Puffer B	
	pH 4,0	

Native Bedingungen:

Puffer A-N	20 mM	Natriumphosphat
	0,5 M	NaCl
	pH 7,8	
Puffer B-N	Puffer A-N	
	pH 6,0	
Puffer C-N	Puffer A-N	
	pH 5,4	
Puffer D-N	Puffer A-N	
	pH 4,0	

Puffer und Lösungen für die Plasmidisolierung mit Affinitätsäulen

P1	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A

P2	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
P3	3 M	K-Acetat
QBT	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7,0
	15 %	Ethanol
	0,15%	Triton X-100
QC	1 M	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7,0
	15 %	Ethanol
QF	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	15 %	Ethanol

Puffer für die Plasmidminipräparation

Lyse-Lösung I	25 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	50 mM	Glucose
Lyse-Lösung II	0,2 N	NaOH
	1 %	SDS
Lyse-Lösung III	Natriumacetatlösung, pH 4,8 (3 M Phosphat und 5 M Acetat)	

Puffer für die Protein-Gelelektrophorese und Westernblotting

Elektrodenpuffer	192 mM	Glycin
(Stammlösung 10 x)	25 mM	Tris-HCl
	1 %	SDS

Acrylamidlösung (30:1)	30 %	Monoacrylamid
	0,75%	Bisacrylamid
Probenpuffer	50 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	100 mM	DTT
	2 %	SDS
	0,1 %	Bromphenolblau
	10 %	Glycerin
Färbelösung für Gele	0,25%	Coomassie-Blau
	10 %	Essigsäure
	50 %	Methanol
Entfärbelösung für Gele	5 %	Methanol
	7,5 %	Essigsäure
Semy-Dry-Blot-Puffer	48 mM	Tris-HCl
	39 mM	Glycin
	20 %	Methanol
	0,037%	SDS
Waschpuffer für NC-Folien	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	0,1 %	Tween-20

Puffer für die Elektronenmikroskopie

Phosphatpuffer	0,1 M	KH_2PO_4
	0,1 M	Na_2HPO_4
Fixierungslösungen	2,5 %	Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer
	3 %	Paraformaldehyd und 0,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

3MM Filterpapier	Whatman, Maidstone
Röhrchen (15 und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Nitrozellulosefilter	Schleicher und Schüll, Dassel
Nylonfilter Hybond N	Amersham, Braunschweig
Petrischalen	Nunc, Sarstedt
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Sartorius, Hamburg
Zellkulturflaschen	Nunc, Sarstedt

2.1.10 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Dot-Blot-Apparatur	GIBCO/BRL, Neu-Isenburg
Elektroporationsapparatur	Eurogentec, Seraing
Fraktionssammler Frac-300 mit peristaltischer Pumpe P-1, Dual Path Monitor UV-2 und Rec-2	Pharmacia, Freiburg
Gel Doc 1000	Bio-Rad, München
Gelelektrophoresekammern	GIBCO/BRL, Neu-Isenburg
	Bio-Rad, München
Gene Assembler	Pharmacia, Freiburg
Heizblock, Modell 5436	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific, Edison
Kesselzentrifuge, Modell J-6B	Beckman, München
Kodak-Autoradiographiekassetten	Integra Biosciences, Fernwald
Kodak-Röntgenfilme XAR-5	Integra Biosciences, Fernwald

MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Netzgerät	Pharmacia, Freiburg
Pipetten	Abimed, Langenfeld Eppendorf, Hamburg
Pipetboy plus	Tecnomara, Fernwald
Fireboy eco	Tecnomara, Fernwald
Polaroid-Kamerasystem	Intas, Göttingen
Sequenzierungsanlage	GIBCO/BRL, Neu-Isenburg
Spannungsgeräte	Pharmacia, Freiburg
Sterilbank	Gelaire, Meckenheim
Thermocycler, Modell Varius V45	Landgraf, Hannover
Tischzentrifuge, Modell Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge, Modell L7-55	Beckman, München
Vakuumofen	Heraeus, Hanau
Vakuumzentrifuge	Savant Instruments, Farmingdale
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge, Modell J2-21	Beckman, München

Alle hier nicht genannten Materialien und Lösungen werden in den Beschreibungen der einzelnen Methoden und Experimente aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Dünnschichtchromatographische Analyse von GPI-Anker-Metaboliten

2.2.1.1 In-Vitro-Markierung von Zellysat

Die Herstellung der Zellysate und ihre radioaktive Markierung wurde modifiziert nach STEVENS und RAETZ (1991) und VIDUGIRIENE (1993).

Vor der Herstellung des Zellysates wurden die Zellen für eine Std. in glucosereduziertem RPMI-Medium (inklusive 1 % L-Glutamin, 10 % FCS, 0,01 % Glucose) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zusätzlich wurde 1 µg/ml Tunicamycin zugegeben, das den Dolichol-Syntheseweg der N-Glycosylierung von Proteinen hemmt (SCHWARZ und DATEMA, 1982). Die Zellen wurden dreimal in PBS-Puffer gewaschen und in Lysepuffer (1x10⁸ Zellen/ml) resuspendiert. Die Ansätze verblieben für mindestens 30 Min. auf Eis. Zwischendurch wurden sie auf dem Vortex-Rührer gemischt.

Pro Ansatz wurden 3 µl (3 µCi) [2-³H] UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin in der Vakuum-Zentrifuge eingetrocknet und mit 100 µl 2x Reaktionspuffer wieder in Lösung gebracht. Dazu wurden 100 µl Zellysat gegeben, gemischt und bei 37°C in der Regel für 30 bis 60 Min. inkubiert. Die Extraktion der markierten Metaboliten erfolgte mit Chloroform/Methanol (Verhältnis im Reaktionsansatz C:M:H₂O = 10:10:3). Nach Zentrifugation (5 Min. bei 12000 Upm) wurde die obere Phase abgenommen und die untere Phase mit 500 µl C:M:H₂O (10:10:3) reextrahiert. Die vereinten Überstände wurden eingetrocknet. Nach Zugabe von 400 µl Buthanol und 200 µl H₂O (Phasen gegenseitig gesättigt) wurde gründlich gemischt, im Ultraschallbad resuspendiert, zentrifugiert und die Buthanol-Phase abgenommen. Mit je 400 µl Buthanol wurde reextrahiert, die vereinten Überstände zweimal mit 300 µl H₂O gewaschen. Nach der Buthanol-Extraktion wurde die Radioaktivität gemessen (je 20 µl in 2 ml Szintillationsflüssigkeit) und die vereinten Buthanol-Phasen eingetrocknet. Zur späteren Verwendung wurden die Reaktionsgefäße bei -20°C verwahrt.

2.2.1.2 Chromatographische Auftrennung

Die durch C/M/H₂O- und Buthanol-Extraktion gewonnenen GPI-Anker-Vorläufer wurden in einer adäquaten Menge C/M (1:2) wieder in Lösung gebracht und auf Dünnschichtchromatographie-Platten (Kieselgel 60C DC Fertigplatten mit Konzentrierungszone) aufgetragen. Der Chromatographietank wurde vor dem Einbringen der Platte mit Whatman-Papier ausgekleidet und eine Stunde mit dem Laufmittel (C:M:H₂O: 10:10:3) vorgesättigt. Vor Gebrauch wurde das Laufmittel erneuert. Die Platte wurde leicht schräg in den Tank gestellt. Nachdem die Laufmittelfront etwa 2 cm unterhalb des oberen Randes angekommen war, wurde die Platte unter dem Abzug getrocknet und mit dem Berthold TLC-Linear Analyser (Programm „Chroma“) analysiert und ausgewertet.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Die *E. coli*-Stämme wurden auf Stammplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden bis zu 6 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

Für Plasmidpräparationen und Proteinisolierungen wurden 3 ml LB-Medium mit 20 µl einer *E. coli* Glycerolkultur oder einer Kolonie von einer Stammplatte beimpft.

2.2.2.2 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation extrachromosomaler DNA in die hier verwendeten *E. coli* - Stämme wurden die Bakterien mit der TSS-Methode (CHUNG *et al.*, 1989) kompetent gemacht.

Herstellung kompetenter Zellen

Als Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit 20 µl einer *E. coli* Glycerolkultur oder einer Kolonie von einer Stammplatte beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 40 ml LB-Medium wurden mit 500 µl der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀=0,4 weiter geschüttelt, dann auf Eis abgekühlt und pelletiert (2000 Upm, 10 Min., 4°C). Das Zellsediment wurde in 4 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert (LB-Medium, 30 mM MgCl₂, 10 % (w/v) Polyethylenglykol 3350, 5 % (w/v) DMSO, pH 6,5 bis 6,8, autoklaviert).

100 bis 200 μ l-Portionen wurden in sterilen Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -75°C aufbewahrt.

Transformation

Etwa 50 ng Plasmid DNA oder 5 bis 10 μ l eines Ligationsansatzes wurden mit 50 bis 100 μ l der kompetenten *E. coli* gemischt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 Sek. wurden die Bakterien für 3 Min. auf Eis abgekühlt und anschließend in 800 μ l SOC-Medium bei 37°C für 45 Min. geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde auf Stammpplatten ausplattiert, die bei 37°C über Nacht inkubiert wurden.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren

Je 2×10^7 Zellen aus der Suspensionskultur wurden 5 Min. bei 1400 Upm zentrifugiert, in einem ml kaltem FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und in vorgekühlte sterile Einfriereröhrchen gefüllt, die sofort in -75°C überführt wurden. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen zur längerfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff gebracht.

Auftauen

Die in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Zellen wurden schnell aufgetaut, in ein Röhrchen mit 10 ml Kulturmedium überführt und 5 Min. bei 1400 Upm zentrifugiert. Um Reste des zelltoxischen DMSOs zu entfernen, wurde das Zellpellet in 15 ml Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann auf 2 bis 4×10^5 Zellen/ml Kulturmedium eingestellt.

2.2.3.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die in Suspensionskultur wachsenden JY5-Zellen wurden in 10 % FCS-Medium mit einer Dichte von 2 bis 4×10^5 Zellen/ml ausgesät und bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 3 bis 4 Tage.

2.2.3.3 Transfektion der Zelllinie JY5

Für die Transfektion der JY5-Zellen mittels Elektroporation wurde die Plasmid-DNA über Affinitätssäulen (Qiagen, Hilden) isoliert und in sterilem Wasser resuspendiert.

4×10^6 bis 5×10^6 Zellen wurden zentrifugiert, in $800 \mu\text{l}$ 10 % FCS-Medium resuspendiert und mit $20 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA gemischt. Die Elektroporation erfolgte in sterilen Küvetten ($0,4 \text{ cm}$ Elektrodenabstand) bei 250 V und $750 \mu\text{F}$. Die Zellen wurden sofort in 10 ml 10 % FCS-Medium überführt und bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

2.2.3.4 Selektion für stabile Expression

Selektion mit Hygromycin B

Die benötigte Konzentration von Hygromycin B (GRITZ und DAVIES, 1983) wurde vor der Transfektion mit Expressionsplasmiden mit nichttransfizierten JY5-Zellen ermittelt. Dafür wurden je 8×10^5 Zellen in 4 ml Kulturmedium auf Sechs-Loch-Kulturplatten ausgesät und mit steigenden Konzentrationen von Hygromycin B versetzt (100 bis $1000 \mu\text{g/ml}$). Bei geeigneter Konzentration sollten nach etwa zehn bis vierzehn Tagen die Zellen abgetötet sein.

Die Elektroporation der JY5-Zellen mit der PIG-A-cDNA in den pREP7-, pREP4-, pEBVHis- oder pEBVCMV-Expressionsvektoren erfolgte wie unter Kap. 2.2.3.3 beschrieben. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und $400 \mu\text{g}$ Hygromycin B/ml zugegeben. Alle 2 bis 3 Tage wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen in frischem 10 % FCS-Medium mit $400 \mu\text{g}$ Hygromycin B/ml aufgenommen. Befanden sich in der Kultur aufgrund der Hygromycin-Zugabe mehr als 40 bis 50 % nicht transfizierte abgestorbene Zellen, wurde eine Ficoll-Separation durchgeführt (s. u.).

Selektion mit G418

Ebenso wie die benötigte Konzentration von Hygromycin B wurde auch die erforderliche Neomycin (G418, siehe SOUTHERN und BERG, 1982) -Konzentration vor der Transfektion mit nichttransfizierten JY5-Zellen bestimmt.

Nach Elektroporation der JY5-Zellen mit der PIG-A-cDNA im pcDNA3.1-Expressionsvektor wurden die Zellen am nächsten Tag auf 3×10^5 Zellen/ml 10 % FCS-Medium eingestellt und $600 \mu\text{g}$ G418/ml zugegeben. Das Medium wurde alle 3 Tage erneuert und bei Bedarf wurde eine Ficoll-Separation durchgeführt.

MACS-Separation

Um erfolgreich transfizierte, CD48-exprimierende Zellen von nicht transfizierten Zellen abzutrennen und anzureichern, wurde eine MACS- (*Magnetic Cell Sorting*, magnetische Zellsortierung) Separation durchgeführt.

4×10^7 Zellen wurden zentrifugiert (1200 Upm) und zweimal mit PBS/0,5 % BSA gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 μ l Blockierungslösung (Miltenyi Biotec) resuspendiert, mit 1 ml Antikörperlösung (CD48 MoAk J4.57, 1:50 in PBS/ 0,5 % BSA verdünnt) gemischt und 20 Min. bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 10 ml PBS/0,5 % BSA gewaschen und mit 100 μ l 1:20 verdünnten FITC-konjugierten Ziegen anti-Maus-Antikörpern 15 Min. bei 4°C inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen wurden die Zellen in 400 μ l PBS/0,5 % BSA aufgerüttelt, mit 30 μ l der Kügelchensuspension (*anti-FITC beads*) vermischt und wieder 15 Min. bei 4°C inkubiert. Eine Minisäule wurde zweimal mit je 500 μ l PBS/BSA equilibriert, in den Magneten gehängt und die Zellen wurden aufgetragen. Um nicht gebundene Zellen zu entfernen, wurde die Säule zweimal mit je 500 μ l PBS/0,5 % BSA gewaschen. Die Elution der gewünschten Zellen erfolgte nach Herausnahme der Säule aus dem Magneten und vorsichtigem Durchpressen von 500 μ l PBS-Puffer mittels eines Stempels. Die Zellen wurden gewaschen und auf eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml mit entsprechendem Selektionsmedium eingestellt. Der Erfolg dieser positiven Selektion konnte mittels FACS-Analyse verfolgt werden. Die gebundenen Antikörper und Eisenkügelchen haben keine negativen Auswirkungen auf die Weiterkultivierung der Zellen (ABTS *et al.*, 1989).

Ficoll-Separation

Durch die Zentrifugation der Zellen auf einem Ficoll-Kissen (Dichte 1,077) können tote von lebenden Zellen abgetrennt werden.

Hierfür wurden in einem Röhrchen 4 ml (in 15 ml Röhrchen) bzw. 12 ml (in 50 ml Röhrchen) Ficoll-Lösung vorgelegt und das die zu separierenden Zellen enthaltende 10 % FCS-Medium vorsichtig überschichtet. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 2000 Upm ohne Bremse konnten die lebenden Zellen von der Interphase abgenommen werden, die toten Zellen befinden sich als Pellet in der Spitze des Röhrchens. Die so gewonnenen Zellen wurden dann zweimal in Hanks gewaschen (1200 Upm mit Bremse), gezählt und mit einer Ausgangsdichte von 2 bis 5×10^5 Zellen/ml Kulturmedium weiterkultiviert.

Limiting Dilution

Weiterin wurde versucht, durch *limiting dilution* (PETERS und BAUMGARTEN, 1990, COLLER und COLLER, 1983) einen stark exprimierenden Zellklon zu isolieren. Hierbei wurden die Zellen so verdünnt, daß nach Aussaat auf eine 96 Lochplatte im Durchschnitt eine Zelle pro Loch vorhanden war. Da die JY5-Zellen andere Zellen für die Versorgung mit lebenswichtigen Stoffen wie Cytokinen brauchen, wurden sie auf sogenannte *feeder* (NIH/3T3-Zellen, 2×10^5 Zellen pro Loch) ausgesät. Da diese Zellen nicht gegen G418 resistent sind, und sie zusätzlich mit 20 Gy sechs Min. bestrahlt wurden, sterben sie nach etwa einer Woche ab. Während dieser Zeit können sich die PIG-A positiven transfizierten JY5-Zellen soweit vermehren, daß sie auch ohne *feeder* wachsen können.

2.2.3.5 Durchflußzytometrische Analysen

Die phänotypische Analyse humaner Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit FITC-konjugierten Ziege anti-Maus-Antikörpern (Dianova, Hamburg) als zweiten Antikörpern durchgeführt (WERFEL *et al.*, 1989). Pro Ansatz wurden 1×10^5 Zellen/Loch in einer 96 Loch Mikrotiterplatte (Rundboden) eingesetzt, 3 Min. bei 1400 Upm und 4°C zentrifugiert, die Überstände entfernt und die Zellsedimente aufgerüttelt. Die Zellen wurden in der Platte dreimal mit PBS-BSA-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl/Loch 1:5 verdünntem Endobulin (Immuno GmbH, Heidelberg) wurden unspezifische Bindungen blockiert. Es folgte die Zugabe von 20 µl (0,2 mg/ml) monoklonalen Antikörpern (gerichtet gegen das zu messende Antigen), 30 Min. Inkubation bei 4°C und zwei Waschschriffe mit PBS-BSA-Puffer. Nach der Zugabe von 20 µl/Loch 1:40 verdünnten FITC-konjugierten Ziege anti-Maus-Antikörpern (GαM-FITC) folgten 30 Min. Inkubation bei 4°C und ein dreifacher Waschschriff in PBS-BSA-Puffer. Die Ansätze wurden nun in dem Durchflußzytometer FACScan (Becton-Dickinson, Heidelberg) analysiert. Die Zellen wurden in einem *Gate* eingegrenzt und 5000 bis 10000 Zellen pro Ansatz ausgewertet. Monoklonale Antikörper gleichen Isotyps, jedoch irrelevanter Spezifität, wurden zur Kontrolle mitgemessen. Zur Bestimmung der Hintergrund- bzw. Autofluoreszenz wurden ebenfalls Medienkontrollen analysiert. Einfarbenhistogramme stellten die Anzahl der gemessenen Zellen auf der Ordinate (linear) und die Fluoreszenzintensität auf der Abszisse (logarithmische Skala) dar. Die Fluoreszenzintensität ist dabei der Anzahl vorhandener Bindungsstellen direkt proportional.

2.2.3.6 Intrazelluläre Immunfluoreszenz

Darstellung für die Durchflußzytometrie

Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und dann 30 Min. mit 0,5 % Glutaraldehyd in PBS bei 4°C fixiert. Die Zellen wurden erneut dreimal gewaschen (PBS mit 5 % BSA) und mit 0,05 % Saponin für 30 Min. bei 4°C permeabilisiert. Nach dem Waschen (dreimal mit PBS mit 1 % BSA) wurden die Zellen in 50 µl/Loch 1:5 verdünntem Endobulin (Immuno GmbH, Heidelberg) zur Blockierung der unspezifischen Bindungen resuspendiert. Es folgte die Zugabe des Primärantikörpers (M2, 1:100 verdünnt in PBS, 0,05 % Saponin, 1 % BSA; 5E5 entsprechend verdünnt) und eine Inkubation für eine Std. bei 4°C. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers (20 µl GαM-FITC, 1:40 verd.) wurde wie oben gewaschen, dann 45 Min. bei 4°C inkubiert. Vor der FACS-Analyse wurden die Zellen noch dreimal mit PBS-BSA-Puffer gewaschen.

Darstellung für die Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden Adhäsionsobjektträger (Bio-Rad) verwendet, die den Vorteil haben, auch Suspensionszellen, wie die hier verwendeten, auf einem Objektträger zu fixieren. Die Adhäsionsobjektträger wurden erst mit Wasser, dann mit PBS gespült, bis die grüne Farbe von den Reaktionsfeldern (RF) vollständig entfernt war. Danach wurden die Objektträger während der Inkubationen in einer feuchten Kammer aufbewahrt, um eine Austrocknung zu vermeiden.

Vor Verwendung wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen, da lösliche Proteine eine Anheftung der Zellen auf dem Objektträger verhindern. Pro RF wurden 3×10^5 Zellen in 10 µl PBS aufgetragen und 10 bis 15 Min. bei Rt inkubiert, bis die Zellen auf dem Objektträger anhaften. Die Zelldichte wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Auf jedes RF wurde zur Fixierung ein großer Tropfen Fixierlösung gegeben und 30 Min. inkubiert.

Fixierlösung: 4 % Paraformaldehyd
 0,54 % Glucose

in PBS auf 75°C unter dem Abzug erhitzen, bis sich das Paraformaldehyd gelöst hat. Aliquots wurden bei -20°C eingefroren.

Auf die Fixierung folgte nach viermaligem Waschen mit PBS die Permeabilisation der Zellen mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 10 Min. bei Rt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde nach erneutem Waschen PBS mit 20 % FCS für 20 Min. auf die RFs gegeben. Die Inkubation mit 20 µl des jeweiligen Primärantikörpers (5E5, CD48 MoAk J4.57, DIA 900, Anti-Xpress, je 1:10 und 1:2 in PBS verdünnt) erfolgte bei 37°C für eine Std. Nach gründlichem Abspülen wurde mit dem Sekundärantikörper (20 µl Cy3, 1:200

verdünnt) 30 Min. 37°C inkubiert. Vor der Kernfärbung wurde nochmals gewaschen. Vom Färbemittel (Hoechst, blaue Kernfärbung, 1:1500 in PBS verdünnt) wurden 25 µl/RF aufgebracht und 4 Min. inkubiert. Vor dem Eindeckeln wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Bis zur Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop konnte das Präparat über Nacht aushärten.

Eindeckmedium: 20 g Moviol 4-88 (Kunstharz von Hoechst) in 40 ml PBS (pH 7,3) über Nacht rühren. 20 ml Glycerin (hochrein) zufügen und über Nacht rühren. Eine Std. zentrifugieren (Sorvall, 15000 Upm). Überstand vorsichtig abnehmen, mit NaN_3 versetzen und bei 4°C aufbewahren.

Bleichschutz: 2,5 g n-Propyl-Gallat in 50 ml PBS lösen, pH neutralisieren, 50 ml Glycerin zufügen, über Nacht rühren und bei 4°C aufbewahren.

Eindeckmedium mit Bleichschutz:

3 Teile Eindeckmedium mit 1 Teil Bleichschutz mischen und über Nacht stehen lassen, damit die Luftblasen verschwinden.

2.2.3.7 Vorbereitung der Zellen für die Elektronenmikroskopie

Hierfür wurden pro Ansatz 2×10^6 Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und zwei Stunden mit 3 % Paraformaldehyd und 0,5 % Glutaraldehyd fixiert. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte JY5-Zellen verwendet. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut gewaschen und dann zur besseren Darstellung der Zellmembranen mit Osmiumtetroxid für 30 Min. inkubiert. Durch eine Alkoholreihe wurden die Zellen entwässert (30 Min. 25 % Ethanol, jeweils 20 Min. 50 %, 75 %, 90 % und Ethanol abs., 10 Min. Toluol für die Einbettung mit Epon; 30 Min. 25 % Ethanol, 20 Min. 50 %, dreimal 10 Min. 75 % für die Einbettung mit LRWhite), bevor sie in LRWhite oder Epon eingebettet wurden.

Von den eingebetteten Zellen wurden Ultradünnschnitte angefertigt, die mit dem Anti-FLAG-Antikörper und mit kolloidalem Gold-konjugierten Ziege anti-Maus-Antikörpern inkubiert wurden.

Die Anfertigung der Ultradünnschnitte und die elektronenmikroskopische Analyse wurde in der Abteilung Zellbiologie und Elektronenmikroskopie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Leitung von Prof. Dr. Reale von Frau Dr. Decker und ihren Mitarbeiterinnen durchgeführt.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

Alle hier nicht explizit aufgeführten Methoden wurden wie von MANIATIS *et al.* (1982), SAMBROOK *et al.* (1989) und von AUSUBEL *et al.* (1991) beschrieben durchgeführt.

2.2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte aus kleinen (1,5 ml) und großen (100 bis 300 ml) Bakterienkulturvolumina im wesentlichen nach einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse von BIRNBOIM und DOLY (1979). Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte aerob bei 37°C.

Plasmidminipräparation:

Einzelkolonien wurden in 3 ml LB-Nährmedium geimpft und über Nacht bis zum Erreichen der stationären Phase bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch 60 Sek. Zentrifugation bei 12000 Upm sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl eiskalter Lyse-Lösung I resuspendiert und 5 Min. bei Rt inkubiert. Dann wurden nach Zugabe von 200 µl Lyse-Lösung II vorsichtig gemischt und 5 Min. auf Eis inkubiert. Nachdem durch Zugabe von 150 µl Lyse-Lösung III chromosomale DNA und Proteine präzipitiert wurden (5 Min. Inkubation auf Eis), wurde 15 Min. bei 12000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI; 25:24:1) - sowie eine Chloroform-Isoamylalkohol (CI; 24:1) - Extraktion durchgeführt. Der wäßrige plasmidhaltige Überstand wurde mit 1 Vol Isopropanol versetzt, zur Präzipitation der DNA 15 Min. auf Eis inkubiert und 15 Min. bei 12000 Upm zentrifugiert. Die DNA wurde in 70 % Ethanol gewaschen, das Pellet bei Rt getrocknet und in 20 µl H₂O mit 0,1 µg/µl RNaseA resuspendiert. Es folgten 15 Min. Inkubation bei 37°C. Die so isolierte Plasmid-DNA eignete sich für Restriktionsanalysen, Klonierungen und Sequenzierungen.

Plasmidmaxipräparation:

Für die Isolierung großer Mengen an Plasmid-DNA insbesondere zur Transfektion wurden 250 ml Bakteriensuspension (24 Std. Schüttelkultur) bei 5000 Upm pelletiert. Die Zellen wurden in 10 ml P1 resuspendiert und 10 Min. bei Rt inkubiert. Die Zellwände wurden durch Zugabe von 10 ml P2 und vorsichtigem Vermischen vollständig aufgeschlossen. Chromosomale DNA und Proteine wurden nach Zugabe von 10 ml P3 und 30 Min. Inkubation auf Eis bei 10000 Upm für 30 Min. bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf bereits equilibrierte Säulen (Qiagen) gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und schließlich mit 15 ml Puffer QF eluiert. Nach Isopropanolfällung der Plasmid-DNA wurde das Pellet in 0,3 bis 0,5 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) aufgenommen. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte im Photometer bei 260 nm.

Die Analyse von Plasmid-DNA sowie von DNA-PCR-Produkten erfolgte durch Elektrophorese in 0,8 % bis 1,5 % Agarose-Flachbettgelen in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA). Die aufgetrennte DNA wurde im Gel in Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml) angefärbt und auf einem Transilluminator (Chroma 43, 302 nm) ausgewertet.

2.2.4.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Strangabbruchmethode von SANGER *et al.* (1977). Für Plasmid-DNA wurde dabei das „Sequenase“-Sequenzierungs-Kit der Firma USB (Bad Homburg), für die Direktsequenzierung von PCR-amplifizierter DNA das „fmol DNA Sequencing System“ von Promega (Madison) nach Herstellerangaben verwendet. Die hier genutzte Dideoxy-Sequenzierungsmethode beruht auf dem Prinzip der Anlagerung spezifischer Starter („Primer“) an DNA-Einzelstränge (Matrize oder „Template“) und deren Verlängerung durch eine DNA-Polymerase. Der Einbau von nicht verlängerbaren Dideoxynukleotiden führt zum Kettenabbruch, der rein statistisch an jeder Base auftritt. Dies führt zu unterschiedlich langen Fragmenten, deren Auftrennung in einem 6 % denaturierenden Polyacrylamidgel das Ablesen der DNA-Sequenz erlaubt.

2.2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wurde die PCR-Technik verwendet. Plasmid-DNA kann hier durch die Anlagerung von zwei synthetischen Oligonukleotiden (Primer), die für die zu amplifizierende Sequenz spezifisch sind, durch Wiederholung der

Schritte Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung der Primer in dieser Reihenfolge (Zyklen) mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase vermehrt werden. Die Amplifikation der DNA erfolgte in 50 µl PCR-Ansätzen in Taq-Puffer (20 mM Tris/HCL pH 8,4; 50 mM KCl) mit MgCl₂ (4 mM), dNTP-Mix (0,2 mM je Nukleotid), *sense*- und *antisense*-Primer (je 20 pmol) und 0,25 U Taq-Polymerase nach Überschichtung mit Paraffinöl. Der Einsatz von Plasmid-DNA betrug 0,1 ng bis 1,0 ng. Die Standard-PCR-Bedingungen waren 1. Denaturierung 3 Min. bei 95°C, 2. Hauptzyklus mit 1 Min. Denaturierung bei 95°C, 1 Min. Annealing bei 55°C, 1 Min. Extension bei 72°C (Wiederholung dieses Zyklus 30 bis 35 mal), 3. Abschlußextension 5 Min. bei 72°C. Die Annealingtemperaturen wurden je nach Primersequenz (zwischen 55°C und 60°C) und die Extensionszeiten je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz (1 Min./1kb) variiert.

2.2.4.4 Enzymatische Modifikation von DNA

Restriktion von DNA

Die endonukleolytische Spaltung von Plasmid-DNA wurde entsprechend den Standardvorschriften (vgl. SAMBROOK *et al*, 1989) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen der verschiedenen Restriktionsenzyme wurden nach den Empfehlungen der Hersteller gewählt. Für analytische Zwecke wurden in der Regel 0,5 bis 1 µg Plasmid-DNA mit 10 U Enzym bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Präparative Spaltungen mit bis zu 20 µg Plasmid-DNA erfolgten mit 20 bis 30 U Enzym bei 37°C über Nacht. Durch elektrophoretische Auftrennung einer geringen Menge des Ansatzes in Agarosegelen wurde die Spaltung auf Vollständigkeit überprüft. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend mit Phenol/Chloroform (24:1)- und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) - Extraktion vom Restriktionsenzym gereinigt. Nach Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 bis 3 Volumina absolutem Ethanol wurden die DNA-Fragmente 10 Min. bei -20°C präzipitiert. Die Präzipitate wurden 15 Min. bei 4°C (10000g) pelletiert, die verbliebenen Salze durch Waschen mit 70 %igem Ethanol entfernt. Nach Trocknung wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen TE oder H₂O gelöst.

Klenow-Reaktion

Das Auffüllen zurückgesetzter 3'-Enden erfolgte mit Hilfe des Klenow-Enzyms direkt nach der Restriktion im Restriktionspuffer. Nach Zugabe von 1 µl 10 mM dNTPs und 0,1 U Enzym wurde der Ansatz 15 Min. bei 30°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch 10minütiges Erhitzen bei 75°C inaktiviert.

T4-Polymerase-Reaktion

Das Abschneiden überhängender 3'-Enden wurde mit der T4-Polymerase nach DNA-Spaltung im Restriktionspuffer durchgeführt. Zum Ansatz wurden 1 µl 10 mM dNTPs und 0,1 U Enzym gegeben, 15 Min. bei 12°C inkubiert und die Polymerase danach 10 Min. bei 75°C inaktiviert.

Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase

Vor der Ligation von Vektor- und Fragment-DNA wurden die 5'-Phosphatreste des Vektors entfernt, wenn dieser nur mit einem Restriktionsenzym geöffnet wurde, oder die Enden aufgefüllt bzw. abgeschnitten waren, um eine Selbstligation zu verhindern. Die Dephosphorylierung erfolgte mit 1 U Alkalischer Phosphatase (CIP oder SAP) pro 50 bis 100 pmol 5'-Phosphatenden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl (50 mM Tris/Cl pH 8,0; 0,1 mM EDTA) für 30 Min. bei 37°C und dann nach erneuter Zugabe von 1 U CIP für 30 Min. bei 56°C. Das Enzym wurde durch Phenol-, Phenol/Chloroform (24:1)- und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion entfernt und die DNA mit 1/10 Volumen NaAcetat und dreifachem Volumen Ethanol präzipitiert.

DNA-Ligation

Die Ligation doppelsträngiger DNA-Moleküle erfolgte mit der T4-DNA-Ligase in Ligationspuffer (66 mM Tris-HCl pH7,5; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,2 mM ATP) in einem Ansatzvolumen von 15 µl. Das molare Verhältnis von *Insert*-DNA zu Vektor-DNA betrug etwa 3:1 bis 5:1. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 14°C inkubiert. 5 bis 10 µl der Ansätze wurden zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet.

2.2.4.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung der gewünschten restringierten DNA-Fragmente und Vektoren wurde die „Freeze and Squeeze“-Methode angewandt. Hierbei wurden die die DNA-Banden enthaltenen ausgeschnittenen Agaroseblöckchen auf ein ausreichend großes Stück Parafilm gelegt und dieser wie eine Tasche um das Blöckchen gefaltet. Das Päckchen wurde bei -75°C eingefroren und unter vorsichtigem Druck zwischen den Fingern wieder aufgetaut. Die hierbei aus dem Gel austretende Flüssigkeit wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, das Gelstückchen erneut eingefroren und die Prozedur wurde wiederholt. Nach

Zugabe von von $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 bis 3 Volumina absolutem Ethanol wurden die DNA-Fragmente 10 Min. bei -20°C präzipitiert. Die Präzipitate wurden 30 Min. bei 4°C (10000g) pelletiert und die verbliebenen Salze durch Waschen mit 70 %igem Ethanol entfernt. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen TE oder H_2O gelöst.

2.2.5 Proteinchemische Methoden

2.2.5.1 Herstellung von *E. coli*-Zellysat

Für die Expression von rekombinantem PIG-A in *E. coli* wurde der Expressionsvektor pQE-30 (QIAGEN) verwendet, in den die PIG-A-cDNA inkloniert wurde. Mit diesem Vektor transformierte Zellen wurden unter Ampicillinselektion ($100 \mu\text{g/ml}$) bei 37°C über Nacht vermehrt. Nach Zugabe von neun Volumina frischem LB-Broth-Medium wurde bis zu einer OD_{600} von etwa 0,3 inkubiert, bevor die Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 2 mM erfolgte. Um die günstigste Stimulationsdauer zu ermitteln, wurden der Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von IPTG 1 ml Aliquots entnommen, die *E. coli*-Zellen pelletiert, in Probenpuffer resuspendiert, 5 Min. gekocht und auf einem SDS-Gel analysiert.

Für die Herstellung von größeren Mengen Bakterienlysat für die Nickelchelatchromatographie wurden jeweils 10 ml Übernachtskultur zum Animpfen von 200 ml LB-Medium verwendet. Die Kulturen wurden bei Rt bis zu einer OD_{600} von etwa 0,3 inkubiert, bevor die Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 2 mM erfolgte und dann weitere 3 bis 4 Std. geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Sedimente in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75°C zur späteren Verwendung aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet.

Um eine Lyse der Zellen zu erzielen, wurden sie schnell bei 37°C aufgetaut und erneut in Stickstoff eingefroren, dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Es wurden 40 ml Puffer A (denaturierende Bedingungen; mit Guanidiniumchlorid) zugegeben und eine Stunde bei Rt inkubiert. Schließlich wurde die Zellsuspension sonifiziert (3x 20 Sek. bei 300 Watt) und ungelöste Partikel durch Zentrifugation (13000 Upm, 15 Min.) pelletiert. Der Überstand wurde für die Nickelchelatchromatographie verwendet.

2.2.5.2 Herstellung von JY5-Zellysat

Sowohl für die Affinitätschromatographie mit Anti-FLAG M2 Affinity Gel (Integra Biosciences) als auch für die Nickelchelatchromatographie wurde Zellysat hergestellt. Für Negativkontrollen wurden nicht transfizierte JY5 Zellen, für die Versuchsansätze wurden mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfizierte Zellen verwendet.

Für die Affinitätschromatographie mit Anti-FLAG M2 Affinity Gel wurden bis zu 5×10^8 Zellen pelletiert und dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml Lysepuffer (10 mM HEPES, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, zusätzlich Proteaseinhibitoren wie PMSF, Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin A, Trypsininhibitor in Konzentrationen von 1 bis 100 mM) resuspendiert, auf Eis 10 Min. inkubiert und im Dounce-Homogenisator homogenisiert. Außerdem wurden verschiedene Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen zur Solubilisation verwendet (SDS, NP40, TritonX-100 in Konzentrationen von 0,1 bis 1 %).

Für die Nickelchelatchromatographie wurden bis zu 8×10^8 Zellen zentrifugiert und zwei- bis dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Wurde das Lysat nicht sofort benötigt, wurden die gewaschenen und pelletierten Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-75^\circ C$ aufbewahrt.

2.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationsbestimmung in Zellysaten wurde mit dem „Bio-Rad DC Protein Assay“ durchgeführt, der auf der von LOWRY *et al.* (1951) entwickelten Quantifizierungsmethode beruht. Die Konzentrationsbestimmung wurden entsprechend des Standardprotokolls des Herstellers durchgeführt, allerdings wurden die verwendeten Mengen den jeweiligen Bedürfnissen angepaßt. Die photometrische Messung erfolgte bei 750 nm.

2.2.5.4 Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation

Um verschieden Zellkompartimente voneinander abzutrennen und deren Proteine anzureichern, wurde eine Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation nach der von VIDUGIRIENE und MENON (1993) beschriebenen Methode durchgeführt. Bis zu 7×10^8 JY5-Zellen, die mit dem pRep4/Flag/PIG-A-Expressionsvektor transfiziert wurden, beziehungsweise als Kontrolle nicht transfizierte JY5-Zellen, wurden mit PBS zweimal

gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Puffer A (0,25 M Sucrose, 10 mM HEPES pH 7,5, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) gewaschen und in 10 Puffer A mit 1µg/ml Leupeptin und 1 mM TLCK aufgenommen. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C und nachfolgender Homogenisation in einem Dounce-Homogenisator wurden die Zellen aufgebrochen. Zelltrümmer wurden durch 15minütige Zentrifugation bei 9000 Upm entfernt, der Überstand wurde auf einen Sucrose-Gradienten aufgetragen (von unten nach oben: 3,6 ml 38 % Sucrose, 1,8 ml 30 % und 1,8 ml 20 % Sucrose). Der Gradient wurde 2 Stunden bei 43000 Upm in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert, die einzelnen Fraktionen abgenommen und auf SDS-Gelen analysiert.

2.2.5.5 Nickelchelatchromatographie

Bis zu 8×10^6 CD48 exprimierende Zellen bzw. eine entsprechende Anzahl von nicht transfizierten JY5-Zellen für die Negativkontrolle wurden für die Zellyse verwendet. Nach zweimaligem Waschen in PBS-Puffer wurden die Zellen in Guanidiniumhydrochloridpuffer lysiert und auf dem Rollinkubator für eine bis vier Stunden belassen. Der nach Zentrifugation der Zellysate gewonnene Überstand wurde auf eine Konzentration von 1 mg/ml Protein eingestellt und über eine zuvor mit H₂O gewaschene und mit Puffer A equilibrierte Nickelchelatsäule (800 µl Ni-NTA-Agarose) mit einer Flußrate von 0,5 ml/Min. gepumpt (Pharmacia). Anschließend wurde die Säule mit 50 ml Puffer B (mit 8 M Harnstoff statt 6 M Guanidiniumchlorid) und mit 50 ml Puffer C gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit Puffer E eluiert und die aufgefangenen Fraktionen auf SDS-Gelen analysiert. Die Waschschritte mit Harnstoffpuffern mit sinkendem pH und die Elution der gebundenen Proteine wurde mit einem Durchfluß-UV-Photometer und Kurvenschreiber (Pharmacia) verfolgt.

2.2.5.6 SDS-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970) bei etwa 10 V/cm. In der Regel wurden 5 %ige Sammelgele und 10 %ige Trenngele verwendet. Nach der Auftrennung wurden die Gele entweder mit Coomassie-Blau-Färbelösung gefärbt oder auf Nitrocellulose-Membranen geblottet (s. 2.2.5.7).

Ansatzbeispiel für Minigele

Trenngel 10 %, 25 ml für 4 Gele

Sammelgel 5 %, 10 ml für 4 Gele

H ₂ O	9,9 ml	H ₂ O	6,8 ml
30 % Acrylamidmix (30:1)	8,3 ml	30 % Acrylamidmix (30:1)	1,7 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	6,3 ml	0,5 M Tris-HCL	1,25 ml
10 % SDS	0,25 ml	10 % SDS	0,1 ml
10 % APS	0,25 ml	10 % APS	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	TEMED	0,01ml

Coomassie-Blau-Färbung

Das Gel wurde für 30 Min. bei Rt und ständigem Schütteln in Färbelösung (0,25 % Coomassie-Blau, 10 % Essigsäure, 50 % Methanol) fixiert und gefärbt. Danach wurde überschüssige Farbe mit Entfärbelösung (5 % Methanol, 7,5 % Essigsäure) bei mehrfachem Wechsel der Lösung entfernt. Vor dem Trocknen wurde das Gel für mindestens 30 Min. in 25 % Methanol belassen. Zur Dokumentation wurde das Gel zwischen einem Whatmanpapier und Cellophanfolie in einem Gelrockner bei 80°C (45 Min.) getrocknet.

2.2.5.7 Westernblotting

Diese Methode dient dem immunologischen Nachweis an Nitrocellulose gebundener Proteine (BURNETTE, 1981). Die Proteine werden zuvor in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die NC-Folie, das Gel und zwei Whatmanpapiere werden 5 Min. in Semi-Dry-Blot-Puffer equilibriert und in folgender Anordnung auf die Anode des Semi-Dry-Blot-Gerätes (Pharmacia) luftblasenfrei aufgelegt: Whatmanpapier, NC-Folie, Gel, Whatmanpapier. Nach Schließen des Deckel (Kathode) wurde der Transfer (30 Min., 440 mA) gestartet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt, um zu überprüfen, ob die Proteine vollständig auf die Nitrocellulose-Membran übertragen wurden. Die Folien wurden zuerst 3x3 Min. in Waschpuffer geschwenkt, um den Blotpuffer zu entfernen, dann mit Waschpuffer mit 0,1 % Tween (BATTEIGER *et al.*, 1982) und 3 % BSA zum Absättigen der freien Bindungsstellen für 30 Min. bei Rt geschüttelt. Die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern (1 bis 5 µg/ml) in Waschpuffer ohne BSA erfolgte entweder für 2 Std. bei Rt oder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttelinkubator. Vor der ein- bis zweistündigen Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und der Entwicklungsreaktion wurden die Folien jeweils 4 bis 5 mal mit Waschpuffer gewaschen.

Entwicklung der NC-Folien

Die Entwicklung der NC-Folien wurde entweder mit dem ECL-System (Amersham) oder dem *SuperSignal Substrate-System* (Pierce) entsprechend den Angaben und Empfehlungen der Hersteller durchgeführt. Danach folgte eine Exposition der Folien auf Kodak Röntgenfilmen XAR-5 in Autoradiographiekassetten (beide von Integra Biosciences GmbH, Fernwald) für die notwendige Zeit (10 Sek. bis 60 Min.).

3 Ergebnisse

Bei der Biosynthese von GPI-Ankern ist das PIG-A-Protein am ersten Syntheseschritt, der Übertragung von GlcNAc vom Donor UDP-GlcNAc auf PI, maßgeblich beteiligt. Bei Patienten mit PNH konnten Mutationen im PIG-A-Gen als Ursache für ein gar nicht oder nur funktionsuntüchtiges exprimiertes PIG-A-Protein nachgewiesen werden (TAKEDA *et al.*, 1993; BESSLER *et al.*, 1994a, b, d; MIYATA *et al.*, 1994; OSTENDORF *et al.*, 1995; WARE *et al.*, 1994). Biochemische Analysen der GPI-Intermediate zeigten bei vom Defekt betroffenen Patientenzellen, daß keine Synthese der ersten Intermediate (GlcNAc-PI und GlcN-PI) stattfindet (Abb. 3.1).

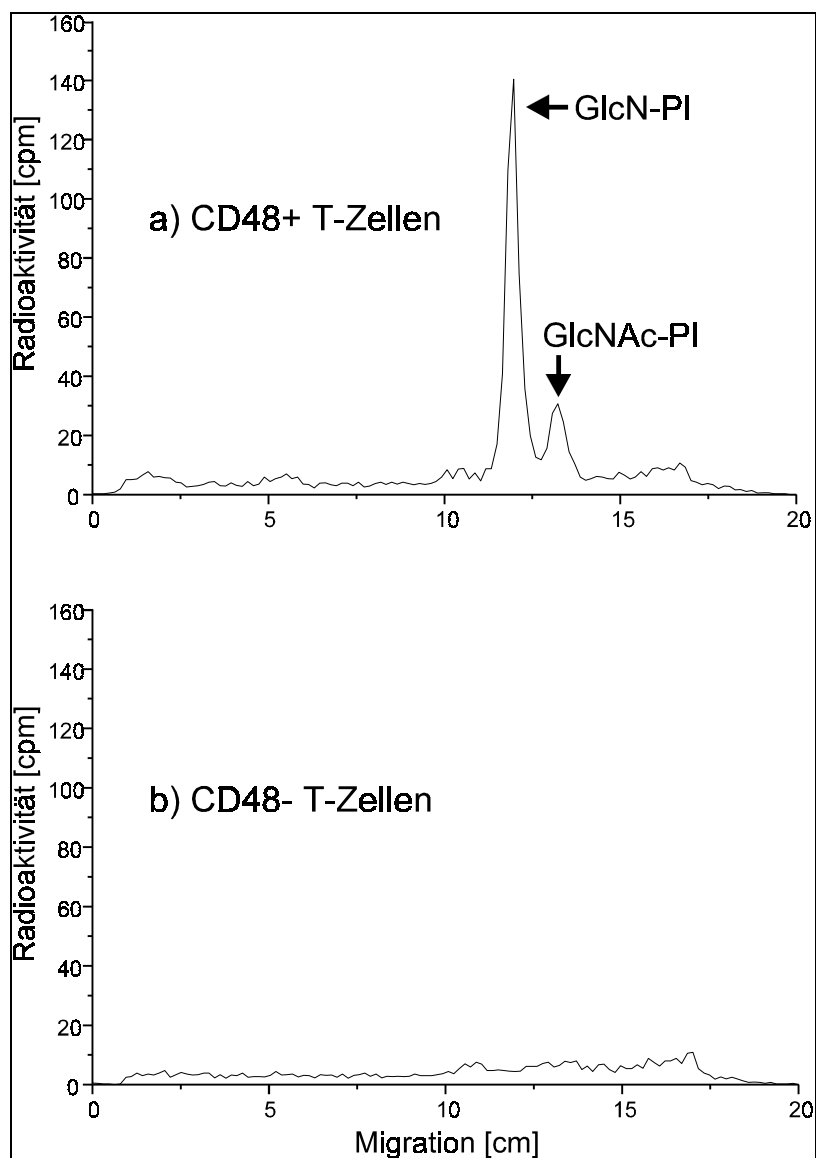


Abb. 3.1: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von GPI-Ankervorläufern. Aus den aus peripherem Blut eines PNH-Patienten isolierten und nach CD48 separierten T-Zellen wurden die GPI-Ankermetaboliten isoliert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (s. Abschn. 2.2.1).

3.1 Expression von PIG-A in JY5-Zellen

Die Expression des PIG-A-Proteins wurde in der humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie JY5 vorgenommen, die nach Behandlung der Wildtyp-Zelllinie JY mit dem Mutagen Äthylmethansulfonat als GPI-defiziente Zelllinie isoliert werden konnte (HOLLANDER *et al.*, 1988) und somit keine GPI-verankerten Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 3.2). MIYATA *et al.* (1993) charakterisierte die Zelllinie durch Komplementationsexperimente mit murinen Thy-1-defizienten T-lymphoiden Zelllinien (HYMAN 1985 und 1988), deren biochemische Defekte bereits gut charakterisiert wurden (SUGIYAMA *et al.*, 1991). Die JY5-Zellen wiesen einen Klasse A-Defekt auf und wurden von MIYATA *et al.* für die Expressionsklonierung von PIG-A (Phosphatidylinositolglykan-Klasse A) verwendet.

Die Verwendung der JY5-Zellen für die Expression von PIG-A bietet folgende Vorteile: Sie lassen sich als in Suspensionskultur wachsende Zellen leicht handhaben und vermehren sich bis zu einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml Kulturmedium. In Anwesenheit des EBV-nukleären Antigens (EBNA-1) können auf EBV-basierende Expressionsvektoren als Episomen extrachromosomal repliziert werden (s. u.), und außerdem lassen sich die Zellen gut durch Elektroporation transfizieren. Eine Wiederherstellung der GPI-Synthese durch ein funktionelles PIG-A-Protein kann indirekt durch das Erscheinen von GPI-verankerten Oberflächenproteinen, wie z. B. dem CD48-Molekül, durch durchflußzytometrische (FACS)-Analyse nachgewiesen werden.

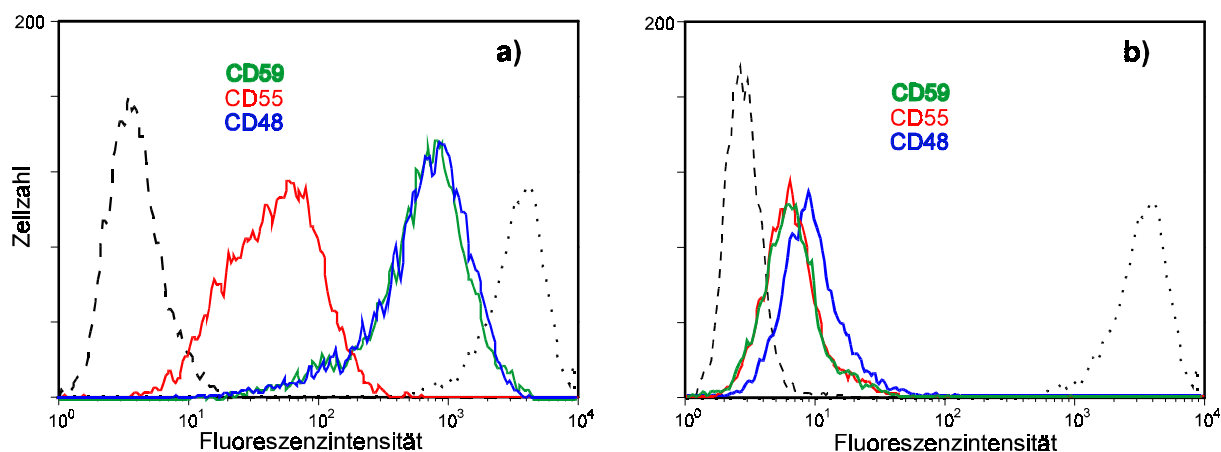


Abb. 3.2: Durchflußzytometrische Analyse der WT-Zelllinie JY (a) und der PIG-A defizienten Zelllinie JY5 (b) (— — Medium, Positivkontrolle W6/32).

3.1.1 Darstellung der Expressionssysteme mit „FLAG“-Sequenz

Zunächst wurde der Expressionsvektor pREP7 (Invitrogen) verwendet, der speziell für die Transfektion EBV-transformierter B-Zellen konstruiert wurde (siehe MARGOLSKEE *et al.*, 1988). Dieser Vektor enthält den Epstein-Barr-Virus-spezifischen Replikationsstartpunkt (*origin of plasmid replication - oriP*) für stabile extrachromosomale Replikation des Plasmids. Das Gen des für die Initiation der Replikation in nicht transformierten Zellen notwendigen EBNA-1-Proteins befindet sich ebenfalls auf dem Vektor, wurde hier jedoch durch gezielte Mutagenese inaktiviert, um toxische Konzentrationen durch Überexpression des Proteins in EBV-Zellen mit hoher endogener EBNA-1 Expression zu vermeiden. Das EBNA-1-Protein ermöglicht durch Transaktivierung des *oriP*s die extrachromosomale Replikation der Plasmide in hoher Kopienzahl. Auf dem Vektor befindet sich außerdem ein Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase) für die Selektion transformierter Bakterien und ein Hygromycin B-Resistenzgen (Hygromycin B-Phosphotransferase, GRITZ und DAVIES, 1983) unter Kontrolle des Thymidin-Kinase- (TK) Promotors zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen. Die für die Selektion erforderliche Hygromycinkonzentration wurde genauso wie die benötigte G418-Konzentration ermittelt (siehe 3.1.6 und Abb. 3.17). Bei einer Konzentration von 400 μ g Hygromycin/ml Kulturmedium und einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen/ml zu Beginn der Behandlung sind bei nichttransfizierten Kontrollen weniger als 1×10^4 Zellen/ml nach 12 Tagen vital.

Das aus acht Aminosäuren bestehende „FLAG“-Peptid soll den Nachweis und die Aufreinigung des PIG-A-Proteins mit monoklonalen Anti-FLAG-Antikörpern ermöglichen, ohne seine Funktion zu beeinträchtigen. Aufgrund der starken Hydrophilität des Octapeptides ist dessen Verfügbarkeit an der Oberfläche des Fusionsproteins für Antikörper gewährleistet (HOPP *et al.*, 1988). In Abb. 3.3 ist das Hydropathie-Profil im Vergleich mit denen der PIG-A-Wildtyp- (WT) und der His-PIG-A-Aminosäuresequenz, (siehe auch 3.1.4) abgebildet. Durch den Nachweis von GPI-verankerten Zelloberflächenproteinen wie hier am Beispiel des CD48-Moleküls, ist es möglich, eine Aussage darüber zu machen, ob das „FLAG“-PIG-A-Protein funktionstüchtig exprimiert wird.

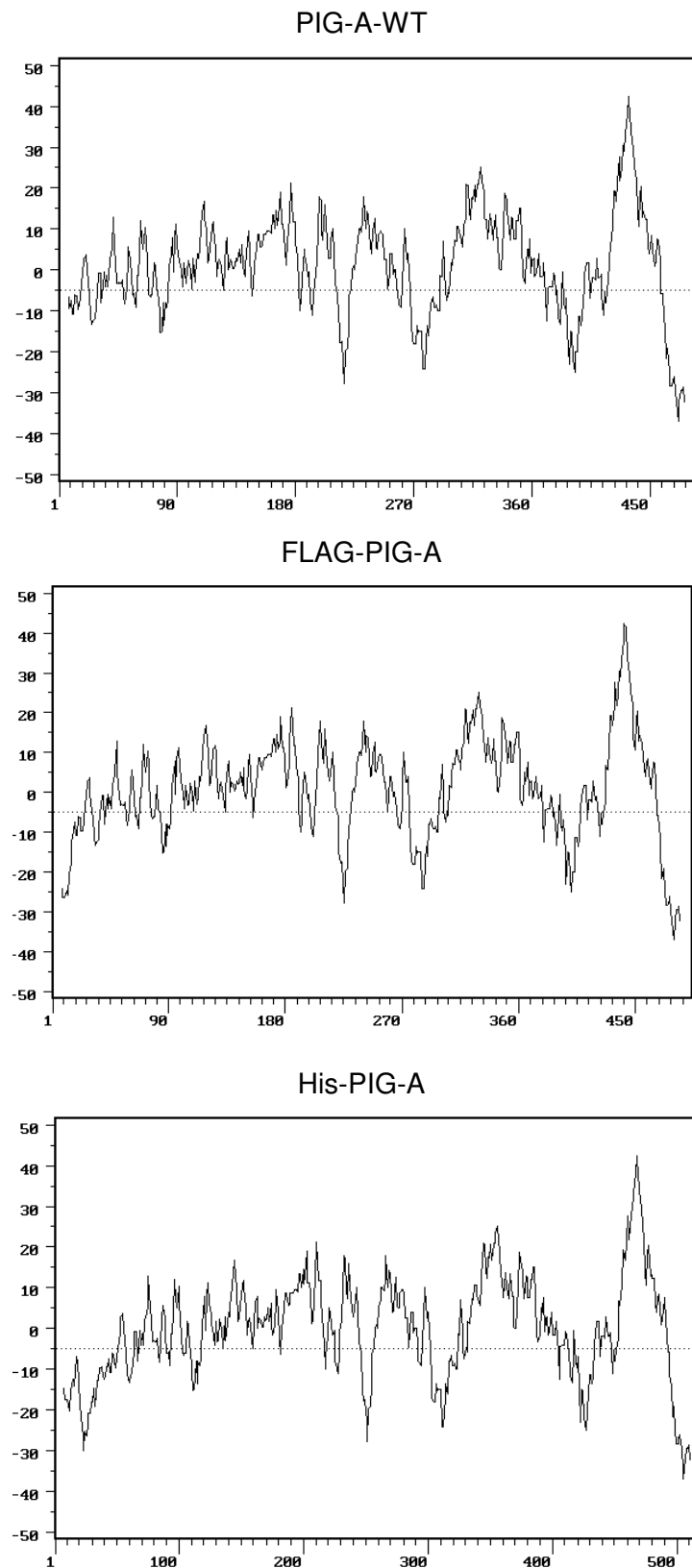


Abb. 3.3: Hydropathie-Plot der Aminosäuresequenzen von PIG-A-WT (Wildtyp), FLAG-PIG-A und His-PIG-A. Die Plots wurden mit dem Computerprogramm „PC/Gene“ (nach Kyte und Doolittle, 1982) erstellt.

Die „FLAG“-Sequenz wurde mit Hilfe der PCR-Technik (s. 2.2.4.3) an den Aminoterminus des Proteins gekoppelt. Hierbei wurden für die Amplifikation der codierenden Region des PIG-A-Gens folgende Oligonukleotide verwendet: der *sense* Primer „k“ mit Kpn I-Restriktionsstelle und „FLAG“-Sequenz und der *antisense* Primer „l“ mit Xho I-Restriktionsstelle. Durch den Primer „k“ wird ein neues Startcodon (ATG) vor der „FLAG“-Sequenz eingefügt und das Startcodon der PIG-A-cDNA entfernt, um auszuschließen, daß das Protein vom ursprünglichen Startcodon translatiert und somit ohne „FLAG“ exprimiert wird. Als Matrize für die Taq-Polymerase diente ein pBlueskript-Vektor, der die 1452bp kodierende Region der Wildtyp-PIG-A-cDNA enthält (pTO5, von T. OSTENDORF, siehe Dissertation 1995). Die durch PCR amplifizierten Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel isoliert, mit Kpn I und Xho I restringiert und in den ebenfalls mit Kpn I und Xho I restringierten pREP7 Expressionsvektor hinter den Promotor des Rous-Sarcoma-Virus (RSV-LTR) ligiert (Abb. 3.4).

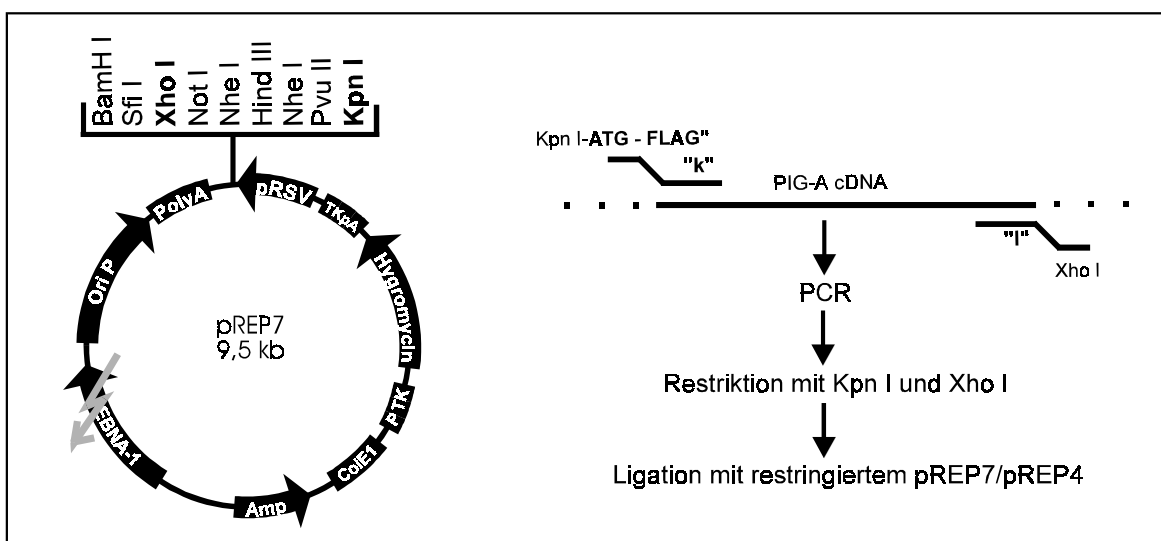


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Konstruktion der pREP7/FLAG-PIG-A und pREP4/FLAG-PIG-A Expressionsvektoren. Der pREP4-Vektor besitzt ein intaktes EBNA-1-Gen und ist 10,2 kb groß.

Durch Sequenzierung des fertiggestellten Konstruktes wurde überprüft, ob die „FLAG“-Sequenz im richtigen Leseraster eingefügt wurde und ob durch die Amplifizierung mit der Taq-Polymerase eventuell Mutationen in der PIG-A-cDNA entstanden sind. In Abb. 3.5 ist der sequenzierte Bereich vom Expressionsplasmid bis zur PIG-A-cDNA dargestellt.

Die Transfektion der JY5-Zellen mit den Expressionsplasmiden erfolgte mittels Elektroporation (Eurogentec-Apparatur, s. 2.2.3.3).

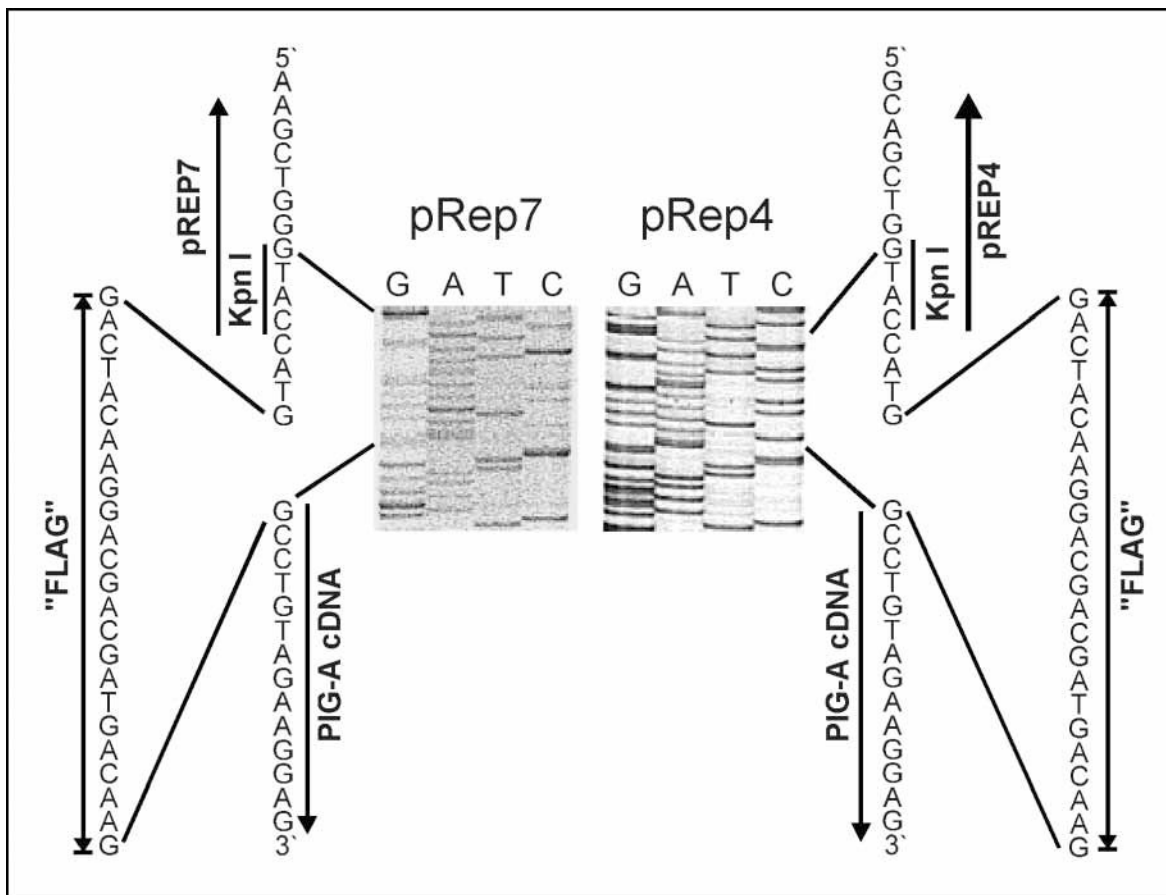


Abb. 3.5: Kontrolle der in den pREP7- bzw. pREP4-Expressionsvektor eingefügten Nukleotidsequenzen. Dargestellt sind die Bereiche der Übergänge von Vektor über „FLAG“ bis in die PIG-A-cDNA.

Bei der Untersuchung der transfizierten Zellen stellte sich heraus, daß nach einiger Zeit der Kultivierung der Anteil der CD48 exprimierenden Zellen trotz Selektionsdruck (400 µg Hygromycin/ml Medium) stetig abnahm (Abb.3.6). Auch hohe Hygromycinkonzentrationen von bis zu 1 mg/ml Kulturmedium führten nicht zu einer Anreicherung der CD48 exprimierenden Zellen.

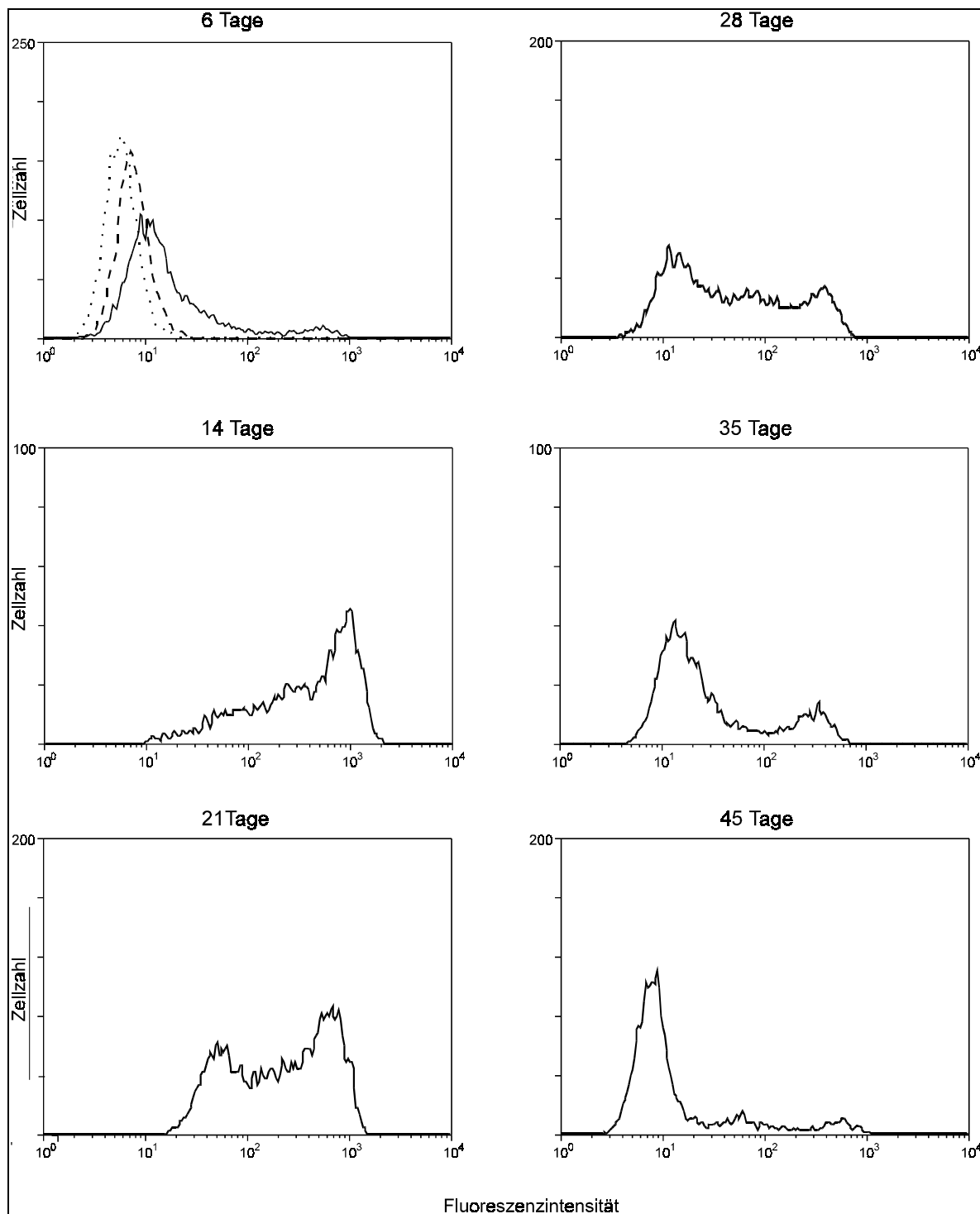


Abb. 3.6: Expression von CD48 auf JY5-Zellen. Die JY5-Zellen wurden mit 20 μg pREP7/FLAG-PIG-A Plasmid-DNA transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Selektion mit 400 μg Hygromycin/ml Kulturmedium (..... Medium, - - - - Positivkontrolle 5E5, ——— CD48 MoAk J4.57).

Da offensichtlich die endogene Menge des EBNA-1-Proteins in den JY5-Zellen nicht ausreichte, um eine genügend starke Replikation des pREP7-Plasmides zu gewährleisten, wurde die „FLAG“-PIG-A-cDNA in den pREP4-Expressionsvektor umkloniert, der im Gegensatz zum pREP7-Vektor für ein aktives EBNA-1-Protein kodiert. Nach der

Transfektion der JY5-Zellen mit pREP4/FLAG-PIG-A Plasmid-DNA wurde eine Abnahme der CD48 exprimierenden Zellen unter Selektionsdruck (400 µg Hygromycin/ml Medium) auch nach Kultivierung über einen Zeitraum von zwei Monaten nicht beobachtet (Abb. 3.7).

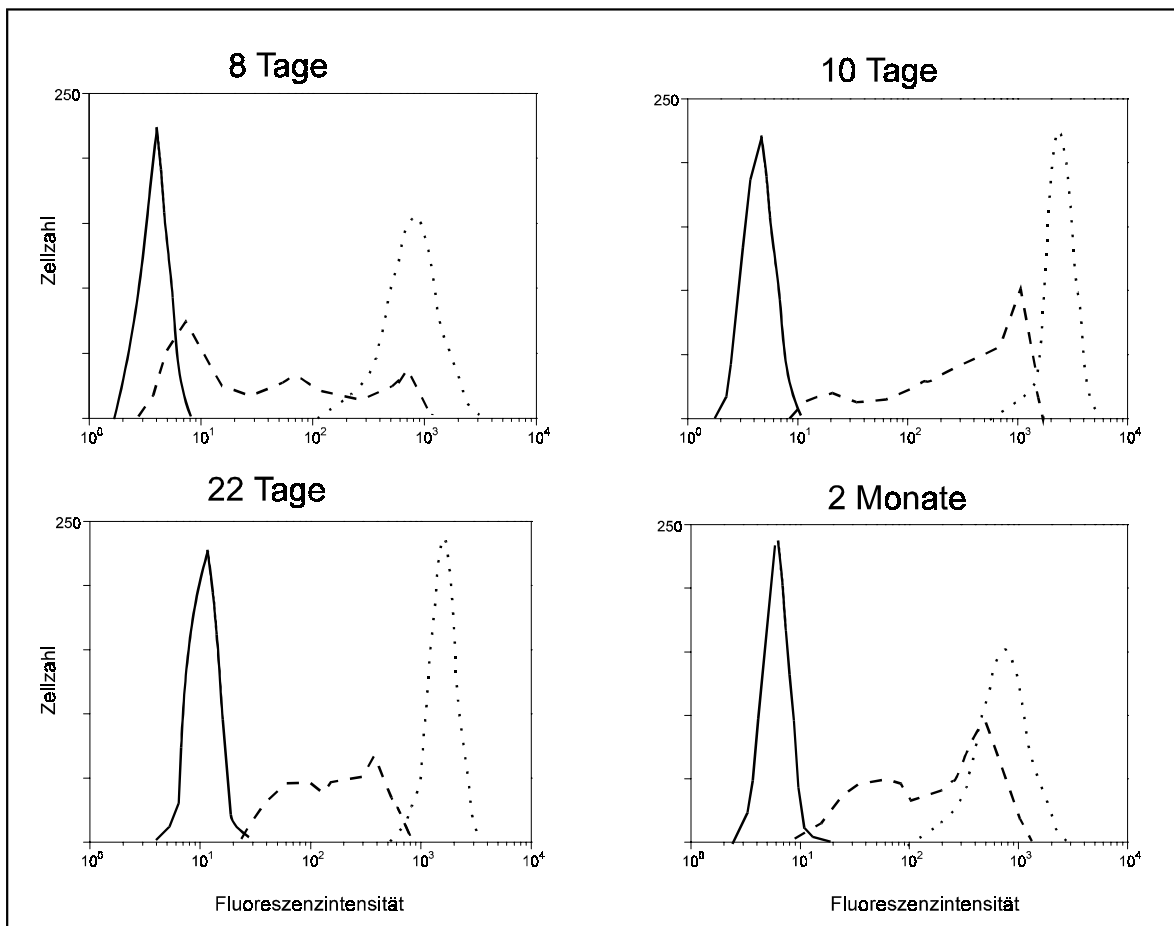


Abb. 3.7: Expression von CD48 auf JY5-Zellen. Die JY5-Zellen wurden mit 20 µg pREP4/FLAG-PIG-A Plasmid-DNA transfiziert. Die Selektion erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion mit 400 µg Hygromycin/ml Kulturmedium (— Medium, Positivkontrolle W6/32, - - - CD48MoAk J4.57).

3.1.2 Intrazellulärer Nachweis und Lokalisation von PIG-A

In den mit der pREP4/FLAG-PIG-A-cDNA transfizierten Zellen konnte die Expression des „FLAG“-PIG-A-Proteins mittels FACS-Analyse direkt intrazellulär mit einem gegen das „FLAG“ gerichteten Antikörper (M2; Integra Biosciences) nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Dafür wurden die transfizierten Zellen mit 0,5 % Glutaraldehyd fixiert und vor und

während der Antikörperinkubation mit 0,05 % Saponin permeabilisiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-gekoppelter Ziege anti-Maus Antikörper verwendet.

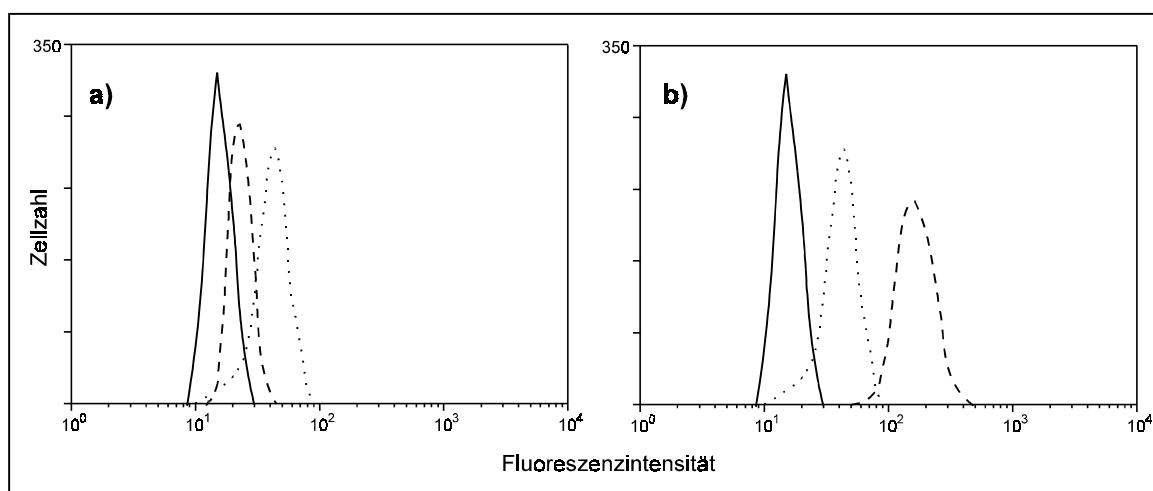


Abb. 3.8: FACS-Analyse nach Saponinbehandlung. Die Zellen wurden vor und während der Inkubation mit dem gegen das „FLAG“ gerichteten M2-Antikörper und dem Sekundärantikörper (FITC-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper) mit 0,5 % Glutaraldehyd fixiert und mit 0,05 % Saponin permeabilisiert. **a)** Untransfizierte JY5-Zellen. **b)** Mit 20 µg pREP4/FLAG-PIG-A Plasmid-DNA transfizierte JY5-Zellen wurden mit 400 µg Hygromycin/ml Kulturmedium selektioniert (— Medium, 5E5, — — M2).

Nach dem direkten Nachweis des „FLAG“-PIG-A-Fusionsproteins mit der Durchflußzytometrie wurden die permeabilisierten und mit Antikörpern inkubierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die relativ schwachen Fluoreszenzsignale waren besonders im perinukleären Bereich sichtbar (nicht gezeigt). Eine etwas stärkere intrazelluläre Fluoreszenz konnte mit dem anti-His-Antikörper in JY5-Zellen, die mit pcDNA3.1HisCPIG-A Plasmid-DNA stabil transfiziert wurden, gezeigt werden (Abb. 3.9, siehe auch Abschnitt 3.1.6). Die Abbildungen zeigen jeweils Photographie bei Durchlicht, Darstellung des Zellkernes nach Hoechst-Färbung und Fluoreszenzfärbung. In Abb. 3.9 a) ist die Positivkontrolle (mit pcDNA3.1HisCPIG-A Plasmid-DNA transfizierte JY5-Zellen) mit einem gegen das CD48-Molekül gerichteten Antikörper dargestellt. In Abb. 3.9. b) ist die Negativkontrolle abgebildet: untransfizierte JY5-Zellen mit einem gegen das His-Tag gerichteten Antikörper (Dia 900) und einem Cy3-konjugiertem Schaf anti-Maus Antikörper. Die Belichtungszeit wurde hier verdoppelt. In Abb. 3.9 c) sind mit pcDNA3.1HisCPIG-A Plasmid-DNA transfizierte JY5-Zellen dargestellt, die mit einem gegen das His-Tag gerichteten Antikörper (Dia 900) und einem Cy3-konjugiertem Schaf anti-Maus Antikörper inkubiert wurden.

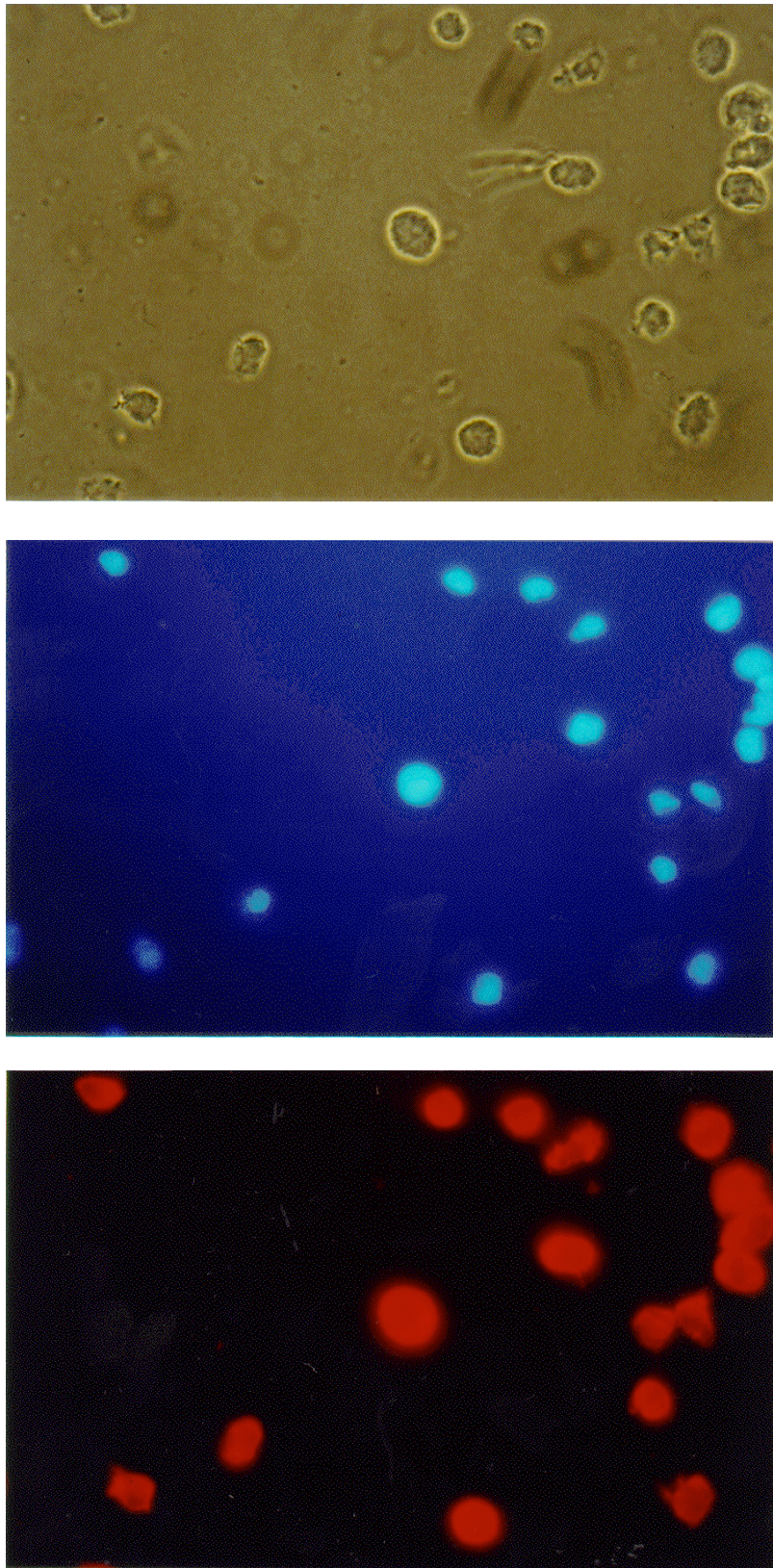
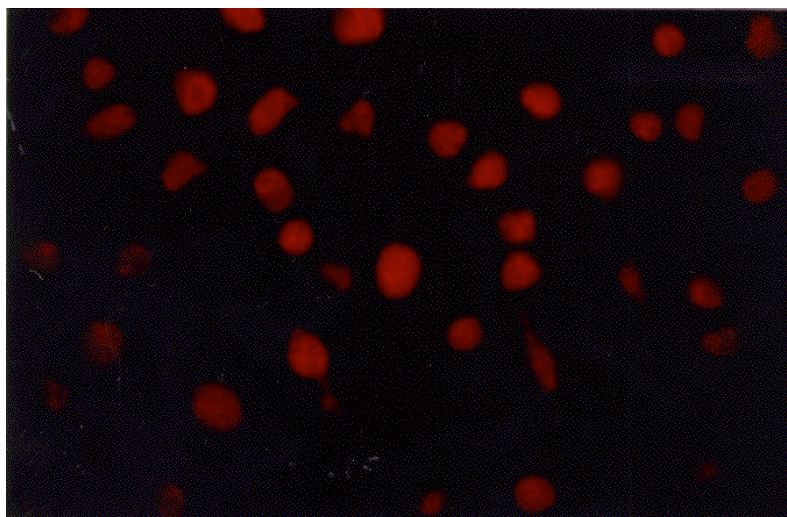
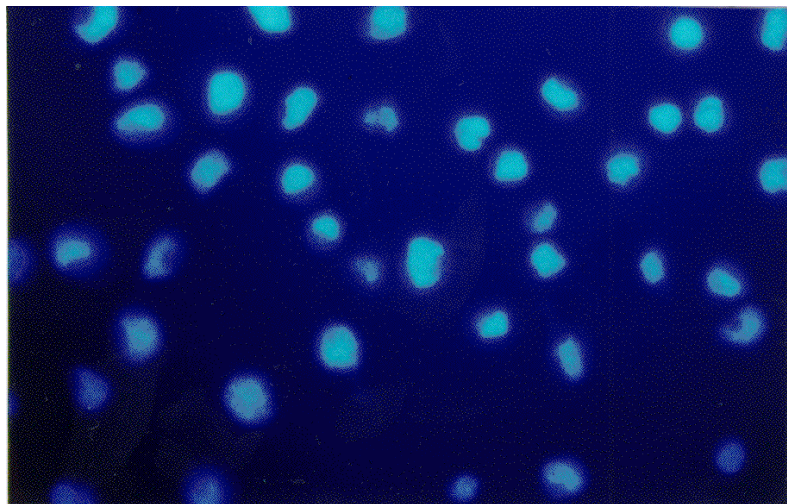
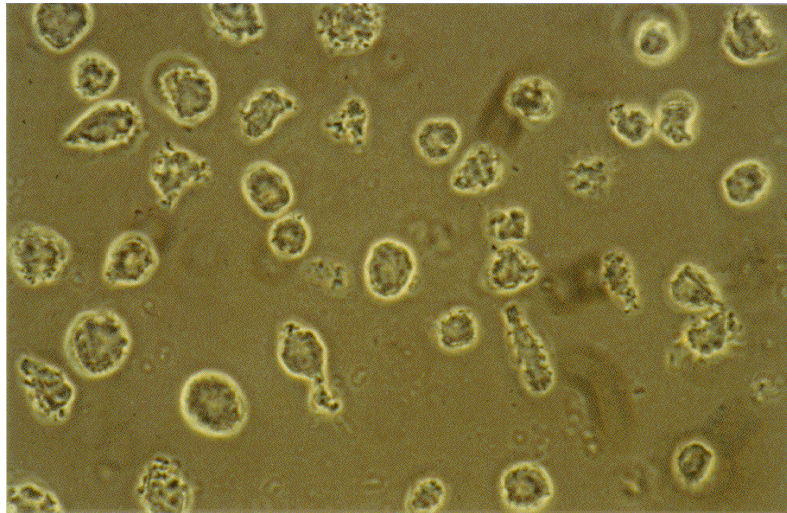
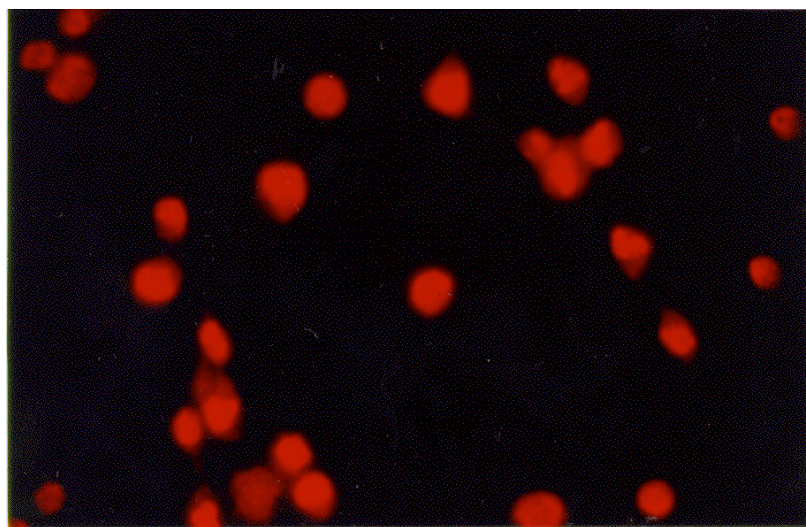
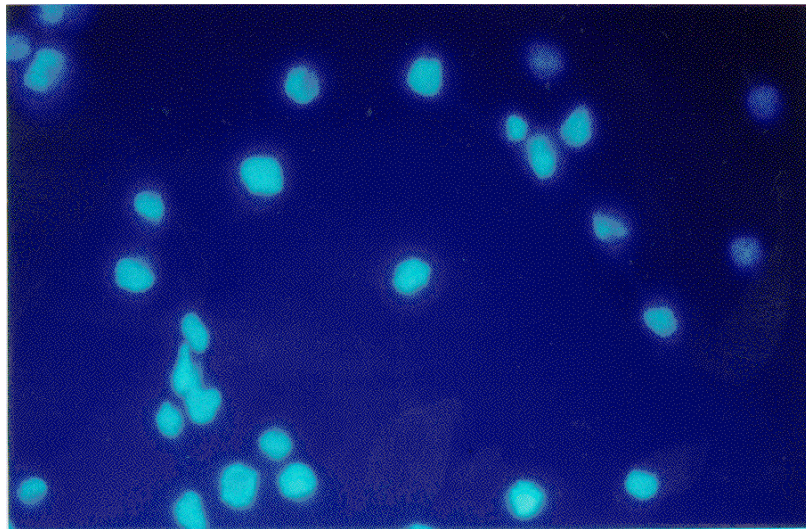
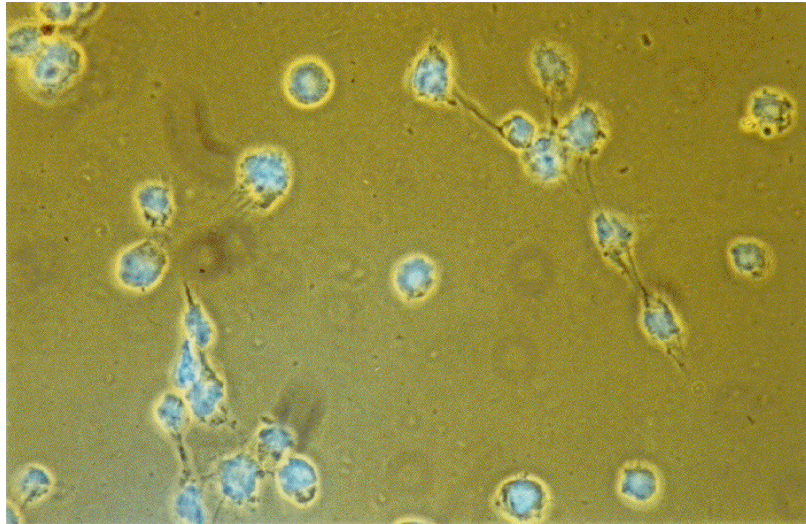


Abb. 3.9: Immunfluoreszenz. a) Positivkontrolle. Mit pcDNA3.1HisCPIG-A Plasmid-DNA transfizierte JY5-Zellen wurden mit einem gegen das CD48-Molekül gerichteten Antikörper (CD48MoAk J4.57) und einem Cy3-konjugiertem Schaf anti-Maus Antikörper gefärbt. Dargestellt sind jeweils Photographie bei Durchlicht, Darstellung des Zellkernes nach Hoechst-Färbung und Fluoreszenzfärbung (Vergrößerung 630fach).



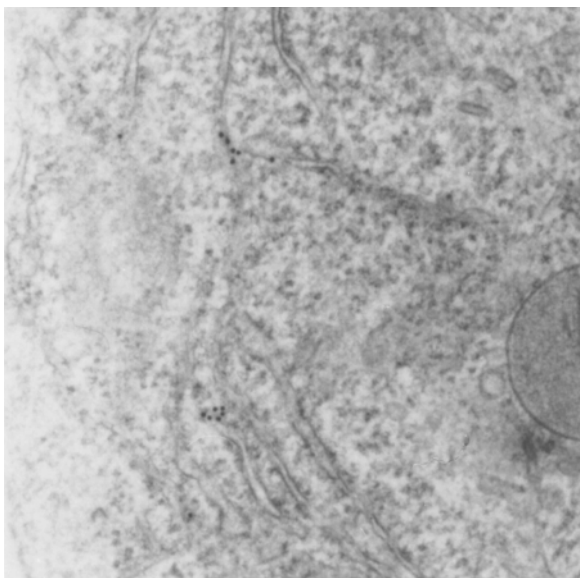
b) Nichttransfizierte JY5-Zellen mit einem gegen das His-Tag gerichteten Antikörper (Dia 900) und einem Cy3-konjugiertem Schaf anti-Maus Antikörper. Die Belichtungszeit wurde hier verdoppelt.



- c) Mit pcDNA3.1HisCPIG-A Plasmid-DNA transfizierte JY5-Zellen wurden mit einem gegen das His-Tag gerichteten Antikörper (Dia 900) und einem Cy3-konjugiertem Schaf anti-Maus Antikörper gefärbt.

Einen deutlicheren Nachweis der Lokalisation des PIG-A-Proteins sollte die elektronenmikroskopische Untersuchung der transfizierten Zellen erbringen. Hierfür wurden pro Ansatz 2×10^6 transfizierte, bzw. untransfizierte JY5-Zellen für die Negativkontrolle verwendet (s. 2.2.3.7). Anhäufungen von Goldpartikeln konnten an den cytoplasmatischen Seiten der Membranen des rauhen endoplasmatischen Retikulums und der äußeren Kernmembran beobachtet werden. In den aus untransfizierten JY5-Zellen hergestellten Ultradünnschnitten, die analog wie die transfizierten Zellen behandelt wurden, konnten nur vereinzelte, unspezifisch gebundene Goldpartikel entdeckt werden (Abb. 3.10).

a)



b)

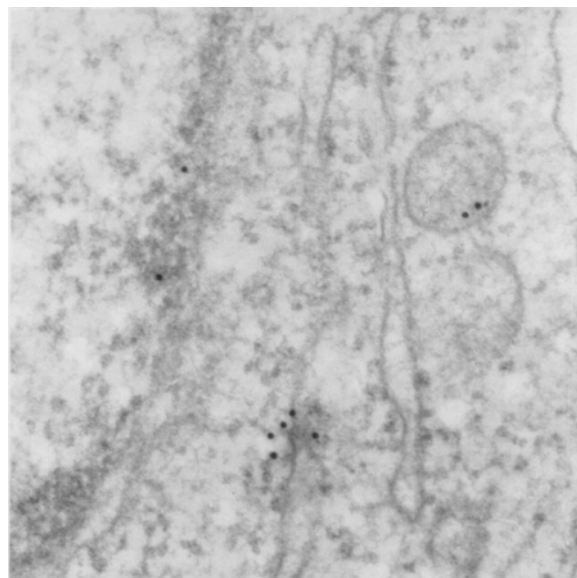
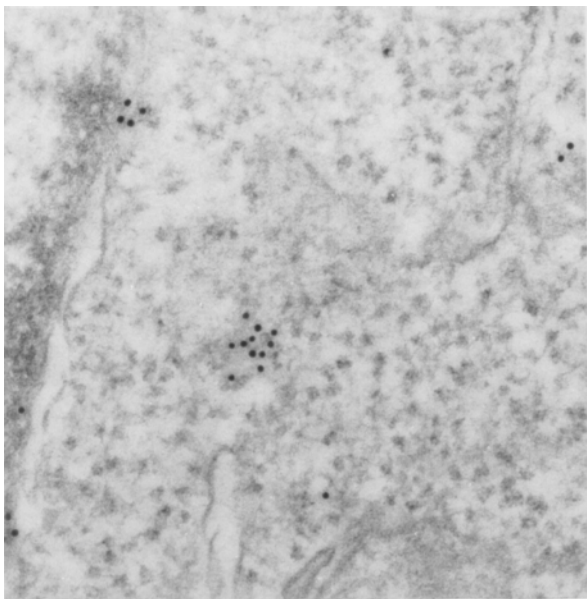


Abb. 3.10 a) und b): Elektronenmikroskopische Darstellung der intrazellulären Lokalisation von PIG-A. JY5-Zellen, die mit pREP4/FLAG-PIG-A Plasmid-DNA transfiziert und mit $400 \mu\text{g}$ Hygromycin/ml Kulturmedium selektioniert wurden. Nach Einbettung in Epon wurden die angefertigten Ultradünnschnitte mit Anti-FLAG-Antikörpern und mit kolloidalem Gold-konjugierten Ziege anti-Maus-Antikörpern angefärbt. (Vergrößerung 25000 bis 40000fach). a) zwei positive Signale am rER (Vergrößerung 25000). b) ein Signal am rER, links im Bild ist der Zellkern angeschnitten.

c)



d)

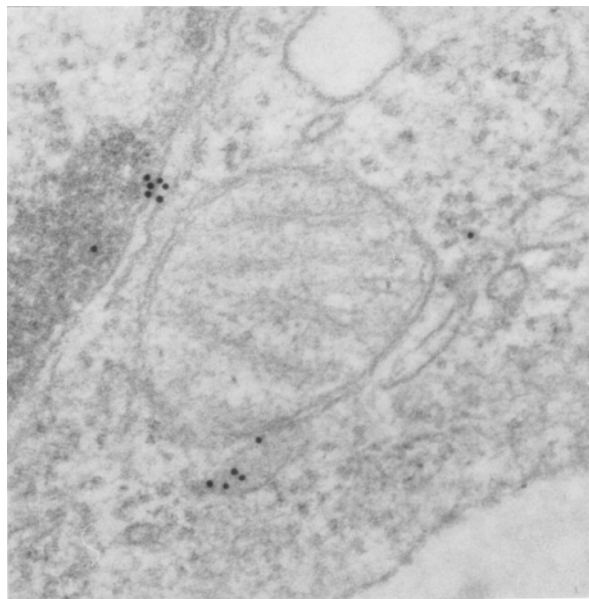
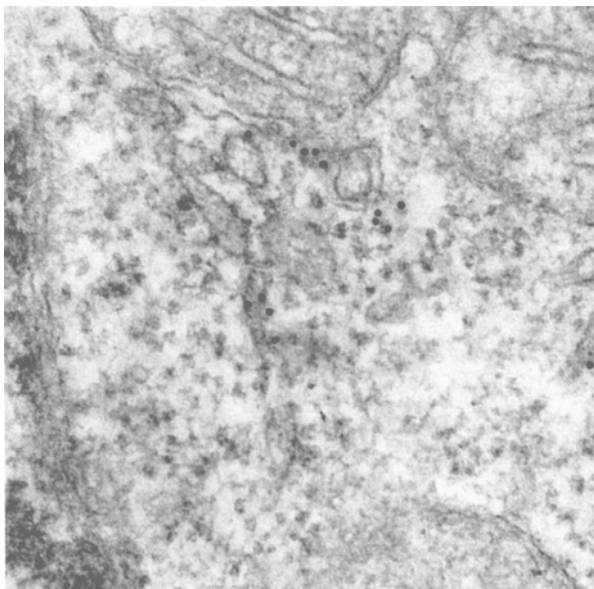


Abb. 3.10 c) und d): Elektronenmikroskopische Darstellung der intrazellulären Lokalisation von PIG-A. JY5-Zellen, die mit pREP4/FLAG-PIG-A Plasmid-DNA transfiziert und mit 400 μg Hygromycin/ml Kulturmedium selektiert wurden. c) in der linken Hälfte des Bildes ist ein Signal an der Kernmembran sichtbar, ein weiteres am angeschnittenen rER. d) links wiederum ein Signal an der Kernmembran und ein anderes unterhalb eines Mitochondrium am rER.

e)



f)

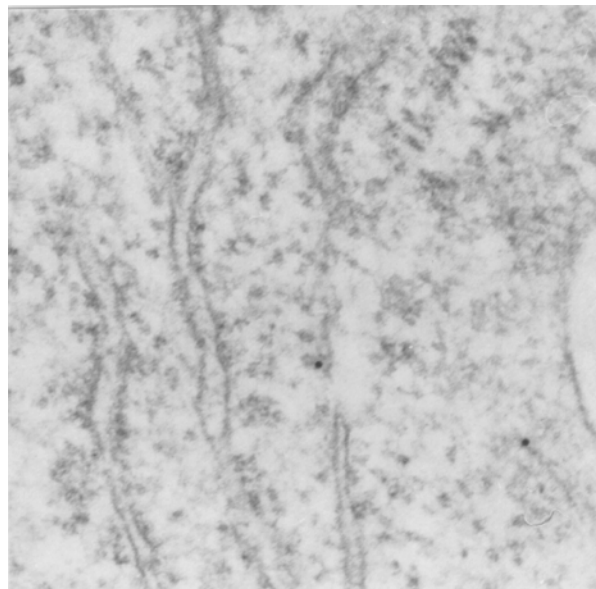


Abb. 3.10 e) und f): Elektronenmikroskopische Darstellung der intrazellulären Lokalisation von PIG-A. JY5-Zellen, die mit pREP4/FLAG-PIG-A Plasmid-DNA transfiziert und mit 400 μg Hygromycin/ml Kulturmedium selektiert wurden. e) drei positive Signale an der Außenseite des rER. Links im Bild ist der Zellkern angeschnitten. f) Negativkontrolle: nicht-transfizierte JY5-Zellen, die äquivalent wie die transfizierten Zellen zur Präparatdarstellung behandelt wurden. Zwei einzelne unspezifisch gebundene Goldkugeln sind zu erkennen.

3.1.3 Isolation von PIG-A mittels Affinitätschromatographie

Nach dem Nachweis des „FLAG“-PIG-A-Fusionsproteins innerhalb der transfizierten Zellen sollte dieses über Affinitätschromatographie isoliert werden. Hierfür wurden Säulen verwendet, die Agarose enthalten, an die gereinigte monoklonale M2-Antikörper kovalent über N-Hydroxysuccinimidbindungen gekoppelt wurden (Anti-FLAG M2 Affinity Gel; Integra Biosciences).

Als Positivkontrolle wurde ein bakterielles „FLAG“-Fusionsprotein verwendet, mit dem sichergestellt werden sollte, daß die Bindung des „FLAG“-Octapeptides an die Affinitätssäule funktioniert. Bei dem 55 kD großen Fusionsprotein handelt es sich um die bakterielle alkalische Phosphatase (BAP), die am Aminoterminus die FLAG-Sequenz enthält (pFLAG-1 BAP Control Vektor). Für die Herstellung des Kontrollproteins wurden Übernachtskulturen 1:10 mit Medium verdünnt und drei Stunden mit IPTG induziert. Die Bakterien wurden gewaschen und durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen sowie durch Zusatz von Lysozym und nachfolgendem Homogenisieren im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Das auf 1 mg Gesamtprotein/ml Lysepuffer verdünnte Lysat wurde auf die Affinitätssäule aufgetragen, die Säule gewaschen und die gebundenen Proteine schließlich mit 0,1 m Glycin-HCl (pH 3) eluiert.

Für die Isolation des „FLAG“-PIG-A-Fusionsprotein wurden bis zu 5×10^8 transfizierte JY5-Zellen verwendet, die zuvor im FACScan auf CD48-Expression hin untersucht wurden. Trotz unterschiedlicher Lysebedingungen, wie Variation der Salzbedingungen des Lysepuffers und verschiedener Aufschlußarten der Zellen, konnte nach Westernblotting mit den gegen das „Flag“ gerichteten Antikörpern M2 und M5 kein Signal festgestellt werden. Auch der Zusatz verschiedener solubilisierender Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen und Zusammensetzungen (0,1 - 2 % TritonX-100; 0,1 - 1 % SDS; 0,1 - 1 % NonidetP40) führte nicht zu einem Signal. Eine Anreicherung durch eine Sucroседichtengradientenzentrifugation und nachfolgender Affinitätssäule und Westernblot erbrachte ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg. Die Aufreinigung des bakteriellen Kontrollproteins über die mit „Anti-FLAG M2 Affinity Gel“ gefüllten Säulen funktionierte hingegen auch unter verschiedenen Bedingungen einwandfrei. In Abb. 3.11 sind jeweils 20 µl der aufeinander folgenden Elutionsfraktionen auf einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Blotten auf Nitrocellulosefolie mit dem M2-Antikörper und dem ECL-Entwicklungsreagenz dargestellt.

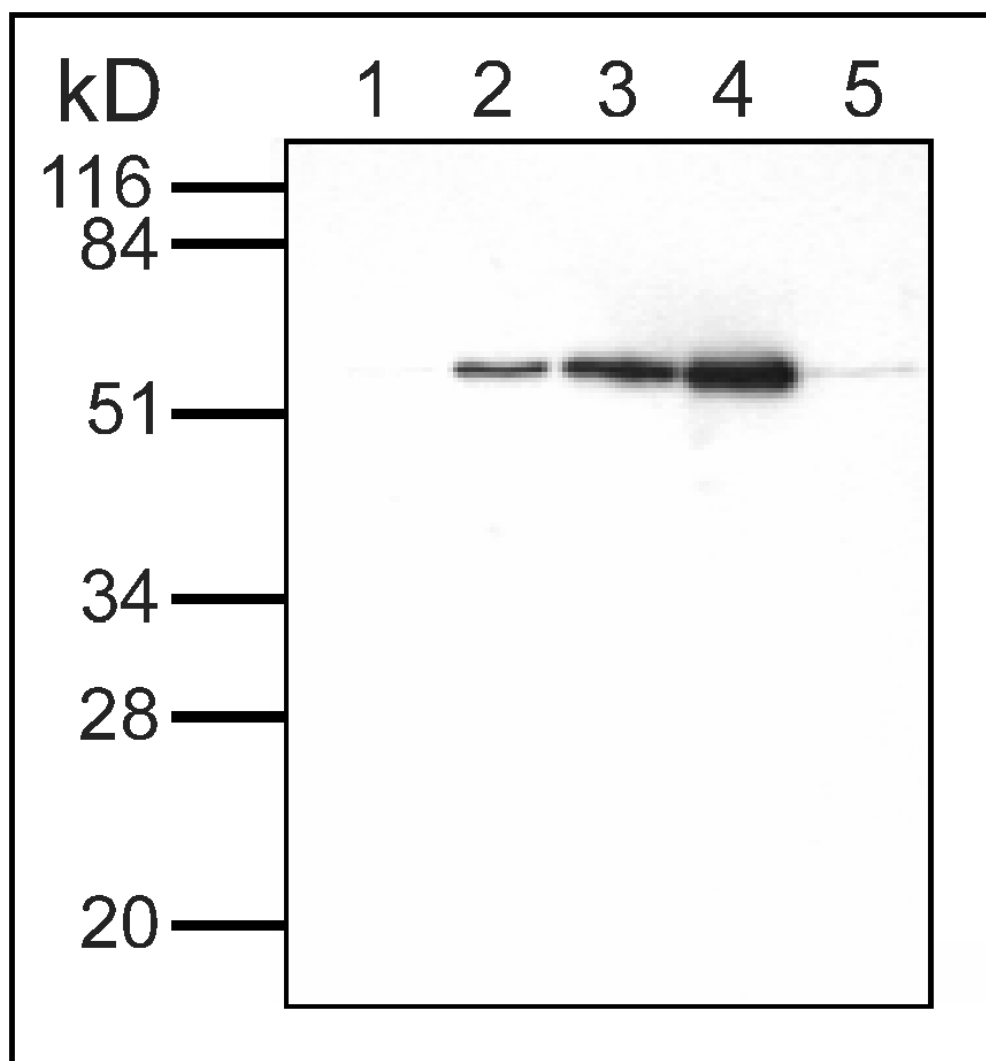


Abb. 3.11: Westernblot und Detektion des bakteriellen „Flag“-BAP-Proteins. Nach Lyse der Bakterien wurde das Protein über „Anti-FLAG M2 Affinity Gel“-Säulen angereichert und gereinigt. Von den aufeinander folgenden Elutionsfraktionen (Spur 1 bis 5) wurden jeweils 20 μ l auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine Nitrocellulosefolie wurde mit dem M2-Antikörper und nachfolgend mit einem Peroxidase-konjugierten Ratte anti-Maus Antikörper inkubiert. Die Entwicklung wurde mit dem ECL-Reagenz durchgeführt.

3.1.4 Darstellung der Expressionssysteme mit „His-Tag“

3.1.4.1 Expression von PIG-A in *E. coli*

Um ausreichende Mengen des Proteins als Positivkontrolle für die Säulenaffinitätschromatographie und Western-Blotting zu erhalten, wurde PIG-A als „His-Tag“ Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert.

Darstellung eines Expressionssystemes

Für die Expression von PIG-A in *E. coli* wurde der Expressionsvektor pQE-30 (QIAGEN 1992) verwendet, der aus der pDS-Serie (BUJARD *et. al.*, 1987) stammt. Diese Vektoren ermöglichen die regulierte Expression von rekombinanten Proteinen, da die entsprechenden Sequenzen unter Kontrolle der lac-Operator-Region stehen (MILLER und REZINIKOFF, 1978). In Anwesenheit des lac-Repressors ist durch dessen Bindung an den lac-Operator die Expression der nachfolgenden Sequenzen blockiert. Eine Induktion der Proteinexpression läßt sich durch Zugabe von IPTG erreichen.

Durch PCR wurde die für PIG-A codierende cDNA mit Restriktionsschnittstellen versehen (der *sense* Primer „i“ mit BamH I-Restriktionsstelle und ohne Startcodon, der *antisense* Primer „m“ mit Kpn I-Restriktionsschnittstelle), vermehrt und gerichtet in den analog aufgeschnittenen Vektor hinter die für das „His-Tag“ codierenden Sequenzen ligiert (Abb. 3.12).

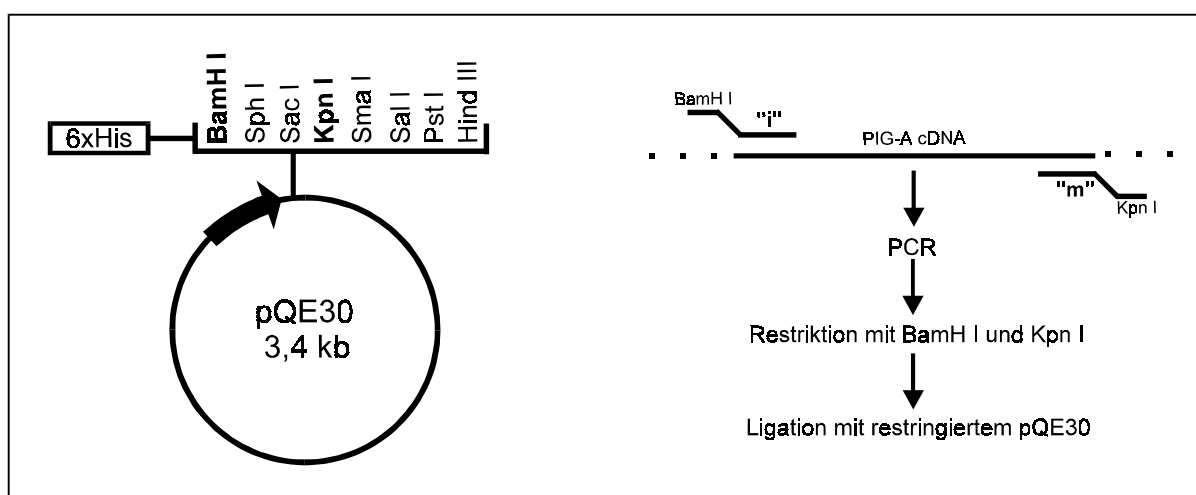


Abb. 3.12: Schematische Darstellung der Vektorkonstruktion für die Expression von PIG-A in *E. coli*. Der pQE30-Expressionsvektor wurde mit den Restriktionsenzymen Kpn I und BamH I aufgeschnitten und mit den analog geschnittenen PCR-Fragmenten ligiert.

Expression von PIG-A in *E. coli*

Die Expression von „His-Tag“-PIG-A-Protein erfolgte im *E. coli*-Stamm JM109, der das *lac^f*-Gen mit einem mutierten Promotor besitzt und damit zehnfach mehr lac-Repressor als der Wildtyp produziert und so die Blockierung der Proteinexpression gewährleistet ist. Zur Feststellung der optimalen Induktionszeit wurden mit dem pQE30/His-PIG-A-Expressionsvektor transformierte Bakterien nach Übernachtskultur 1:10 mit Medium verdünnt und nach einer halben Stunde IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Jede Stunde wurde ein Aliquot entnommen, die Proben auf einem SDS-PAA-

Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit einem Anti-His-Antikörper und Peroxidase-gekoppeltem Ratte anti-Maus Antikörper inkubiert (Abb. 3.13a). Als günstige Induktionszeiten ergaben sich vier bis fünf Stunden.

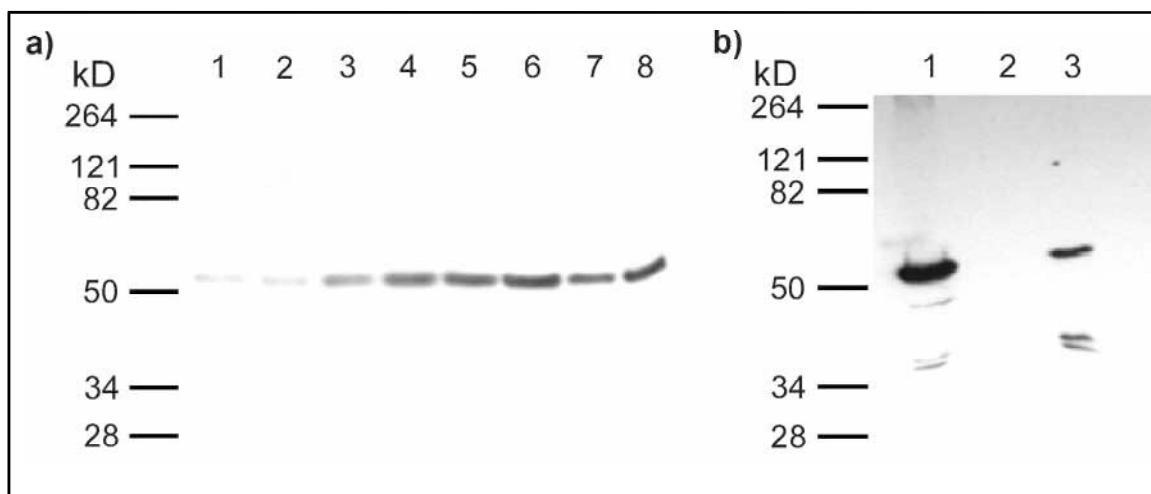


Abb. 3.13: Immunoblot: nach Auftrennung der Proteine im 10 % SDS-PAA-Gel und Übertragung auf Nitrocellulosefolie wurde „His-Tag“-PIG-A mit Anti-His-Antikörper und Peroxidase-gekoppeltem Ratte anti-Maus Antikörper nachgewiesen. a) Expression von „His-Tag“-PIG-A in *E. coli*. 1: ohne Induktion, 2: 15 Min. Induktion mit 2 mM IPTG, 3: 1 Std. Induktion, 4: 2 Std.; 5: 3 Std., 6: 4 Std., 7: 5 Std., 8: 6 Std. b) Lokalisation von „His-Tag“-PIG-A in *E. coli*. 1: 20 µl des mit Guanidiniumchlorid resuspendiertem Pellets; 2: 20 µl des Überstandes (lösliche Proteine); 3: 20 µl Totallysat.

Des weiteren wurde untersucht, ob das Fusionsprotein löslich oder in sogenannten Einschlußkörperchen (*inclusion bodies*) vorliegt. Hierfür wurden 50 ml einer induzierten Kultur pelletiert, in Ultraschallpuffer aufgenommen, mehrfach eingefroren und wieder aufgetaut und schließlich mit einer Ultraschallsonde beschallt (drei Zyklen, je 30 Sek.). Nach Zentrifugation befinden sich im Überstand die in den Bakterien in löslicher Form vorliegenden Proteine. Mit denaturierendem Guanidiniumchloridpuffer wurde das Pellet erneut aufgelöst und auch unlösliche Proteine in Lösung gebracht (Abb. 3.13b). Aufgrund der hydrophoben Domäne am C-Terminus des PIG-A-Proteins konnte erwartet werden, daß sich ein großer Teil des in den Bakterien exprimierten PIG-A-Proteins unlöslich als Einschlußkörperchen befinden würde, was hiermit bestätigt wurde.

3.1.5 Expression von „His-Tag“-PIG-A in JY5

Für die Isolation des PIG-A-Proteins aus JY5-Zellen wurde dieses mit einem „His-Tag“ fusioniert, das aus sechs hintereinander exprimierten Histidinen besteht. Hierfür wurden Expressionsvektoren verwendet, die bereits ein „His-Tag“ mit einer daran anschließenden „Multiple Cloning Site“ (MCS) enthalten, in welche die cDNA für das zu exprimieren gewünschte Protein eingefügt werden kann (Invitrogen). Um das Protein im korrekten Leseraster zu exprimieren, stehen drei Vektoren zur Verfügung (A, B und C), die sich nur durch die MCS unterscheiden.

Zum einen wurde der pEBVHisA-Vektor benutzt, der vom pREP4-Expressionsvektor abgeleitet wurde und ebenfalls extrachromosomal repliziert wird, zum anderen wurde der pcDNA3.1HisC-Vektor verwendet, der in JY5-Zellen nicht extrachromosomal repliziert wird. Mittels PCR und entsprechenden Primern (*sense* Primer „i“ mit BamH I-Restriktionsstelle und *antisense* Primer „j“ mit Xho I-Restriktionsstelle) wurde bei der Amplifikation das Startcodon der PIG-A-cDNA entfernt und nach Restriktion mit den jeweiligen Restriktionsenzymen die PIG-A-cDNA gerichtet in die Vektoren inkloniert (Abb. 3.14).

Der Nachweis der Expression von His-Tag-PIG-A erfolgte indirekt über die Durchflußzytometrie, bei der das Vorhandensein von CD48 auf der Zelloberfläche gemessen wurde. Bereits nach zehn Tagen unter Hygromycinselektion exprimieren mehr als 90 % der mit 20 µg pEBVHisAPIG-A Plasmid-DNA transfizierten Zellen CD48 Moleküle auf ihren Zelloberflächen. Die Expressionsrate blieb über einen Zeitraum von mindestens sechs Wochen konstant, danach nahm sie leicht ab, blieb aber auch noch nach sechs Monaten deutlich sichtbar (Abb. 3.15).

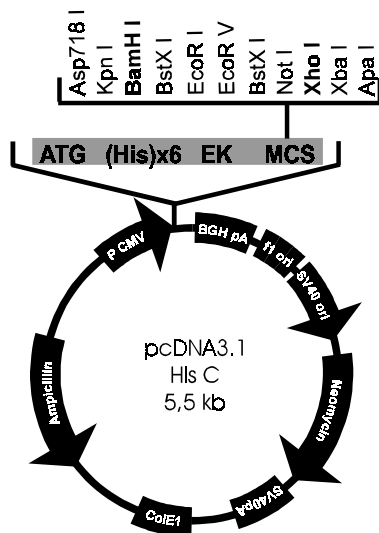
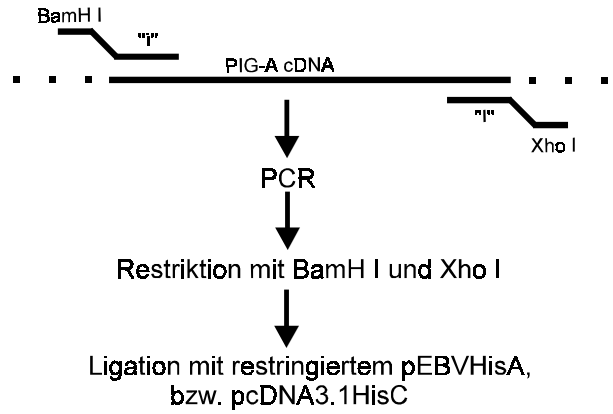
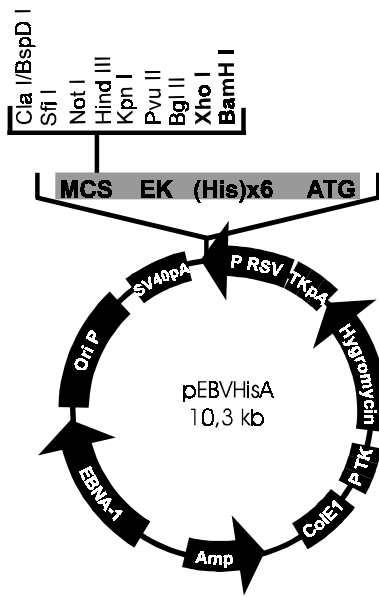


Abb. 3.14: Schematische Darstellung der Konstruktion der Expressionsvektoren mit „His-Tag“. Sowohl die Plasmide pcDNA3.1HisC und pEBVHisA als auch die durch PCR generierten Fragmente wurden mit BamH I und Xho I restringiert. Um zu verhindern, daß eventuell unvollständig restringierte Plasmide religieren, wurden ihre Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

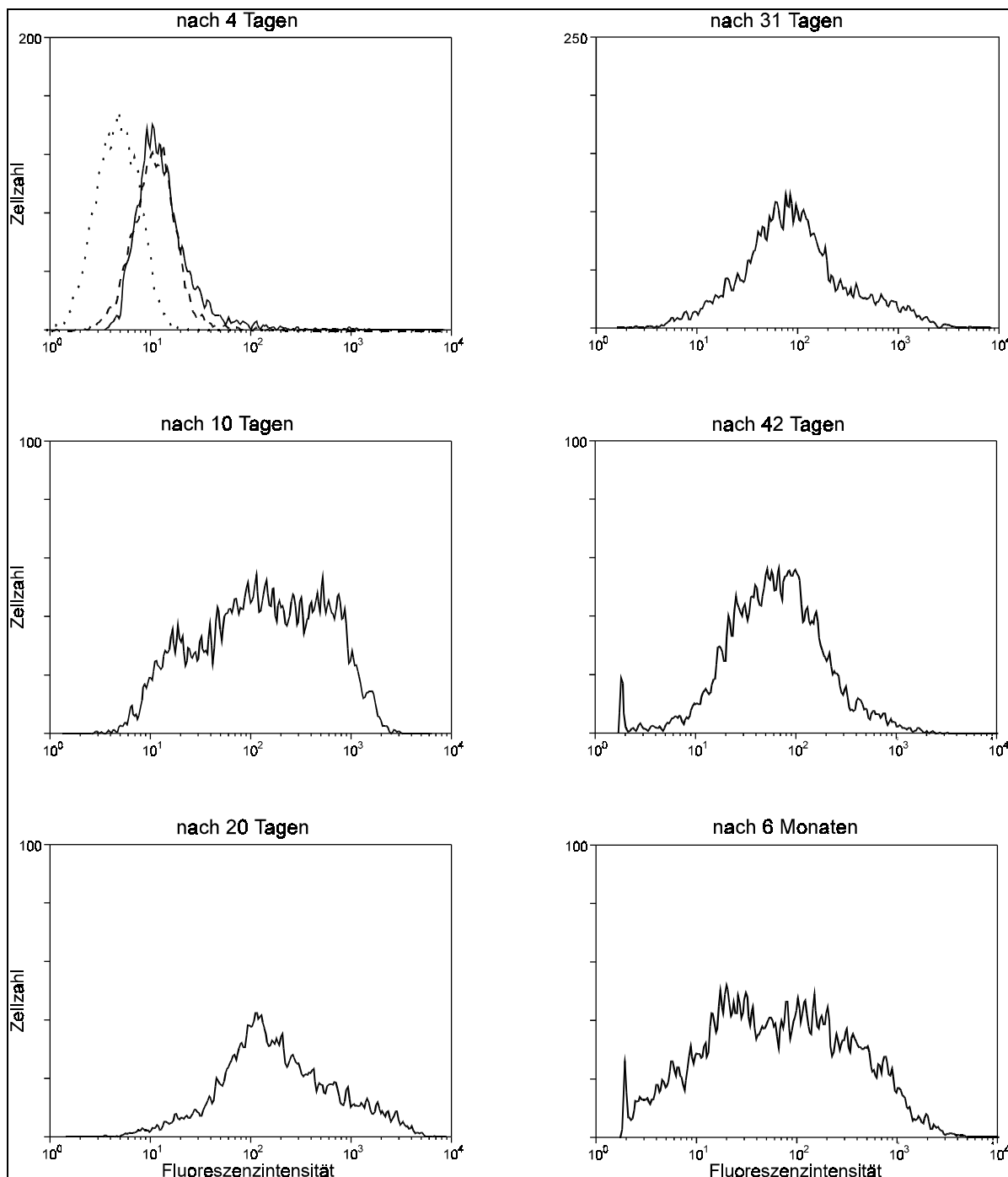


Abb. 3.15: Durchflußzytometrische Analyse von JY5-Zellen, die mit 20 μg pEBVHisAPIG-A Plasmid-DNA transfiziert und mit 400 μg Hygromycin/ml Kulturmedium selektioniert wurden (..... Medium, - - - 5E5, ——— CD48 MoAk J4.57).

Alternativ wurde ein pEBVHisA-Vektor konstruiert, bei dem nicht nur am N-Terminus des PIG-A-Proteins, sondern auch an dessen C-Terminus ein „His-Tag“ angehängt wurde. Dafür wurden in der PCR der *sense* Primer „i“ und der *antisense* Primer „m“ verwendet, der vor dem Stop-Codon ein aus sechs Histidinen bestehendes „His-Tag“ und nach dem Stop-Codon eine Kpn I- Restriktionsstelle für die Klonierung einfügt.

Bei der Beobachtung der Expression des GPI-verankerten CD48-Moleküls konnte im Vergleich der beiden Konstrukte kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 3.16).

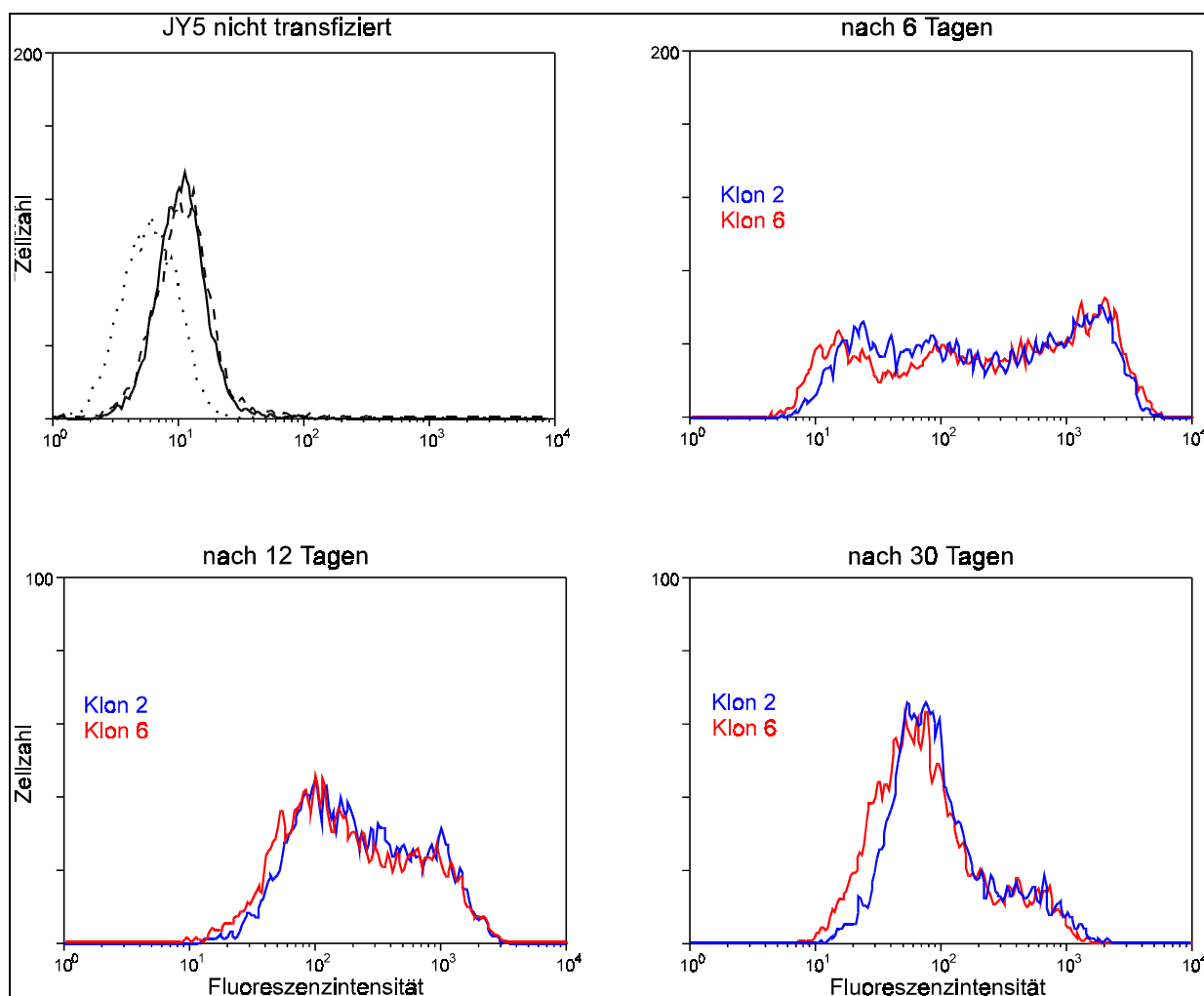


Abb. 3.16: Durchflußzytometrische Analyse von JY5-Zellen, die mit 20 µg pEBVHisAPIG-A Plasmid-DNA transfiziert und mit 400 µg Hygromycin/ml Kulturmedium selektioniert wurden. Klon 2 enthält jeweils am N-Terminus und am C-Terminus des PIG-A-Proteins ein „His-Tag“, Klon 6 nur am N-Terminus (..... Medium, --- 5E5, ——— CD48 MoAk J4.57).

Bei Verwendung des pcDNA3.1HisC-Vektors können Zellen mit stabil in das zelluläre Genom integrierter PIG-A-cDNA durch G418-Selektion isoliert werden. Zur Ermittlung der notwendigen G418-Konzentration wurden untransfizierte JY5-Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml Kulturmedium in Sechslöchplatten ausgesät und mit G418-Konzentrationen von 100 bis 1000 µg/ml behandelt (Abb. 3.17). Die nächstniedrige Konzentration als die, bei der nach zwölf Tagen alle Zellen tot waren, wurde nach den Transfektionen angewendet.

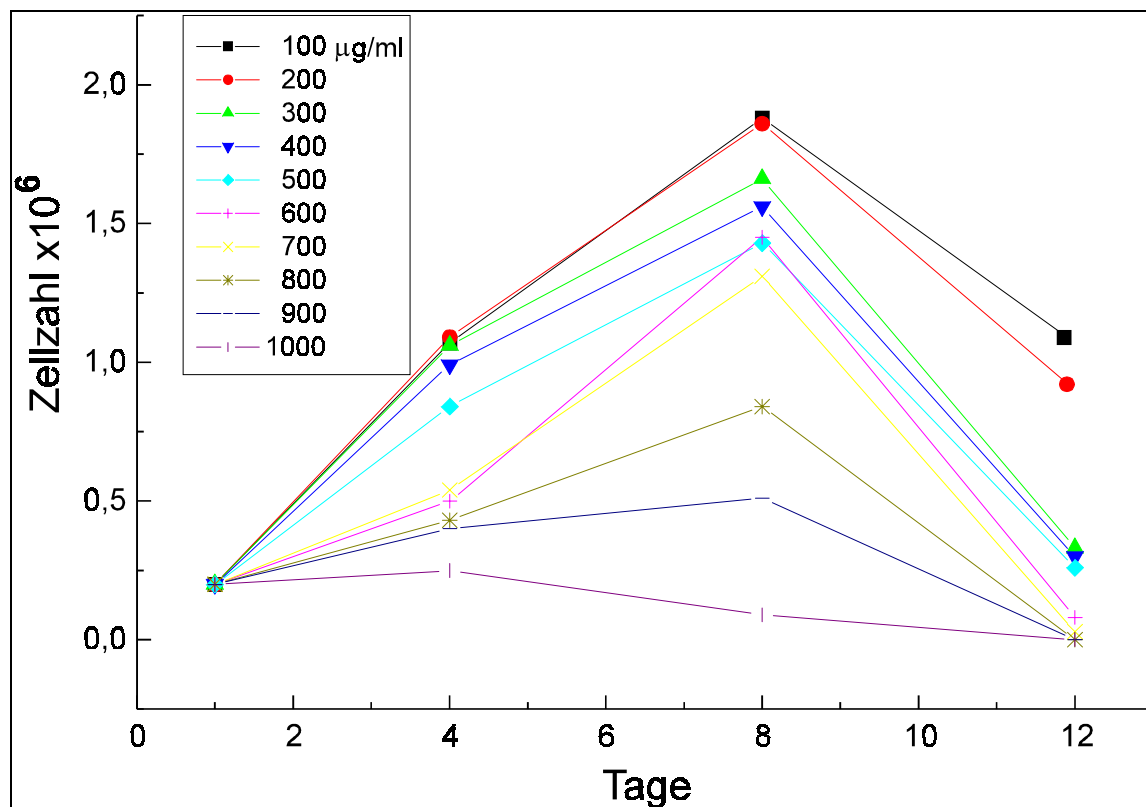


Abb. 3.17: Austestung der für die Selektion erforderlichen G418-Konzentration. Untransfizierte JY5-Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml Kulturmedium in Sechslachplatten ausgesät und mit G418-Konzentrationen von 100 bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ behandelt. Die lebenden Zellen wurden gezählt.

Nach der Transfektion mit pcDNA3.1HisCPIG-A Plasmid-DNA und Selektion mit 600 $\mu\text{g/ml}$ G418 wurde erst nach 20 Tagen eine geringe Anzahl von CD48-exprimierenden Zellen beobachtet. Die Zellen wurden zweimal (nach 26 und 56 Tagen) einer magnetischen Zellseparation (MACS) unterzogen, um PIg-A positive Zellen anzureichern (Abb. 3.18). Hierfür wurden, wie auch schon für den Nachweis der Funktionalität des PIg-A-Proteins, CD48-Antikörper (Maus) als Primärantikörper verwendet und Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus Antikörper), an die die Eisenkügelchen gekoppelt wurden (s. 2.2.3.6). Die an die Zellen gebundenen Antikörper und Eisenkügelchen haben bei der anschließenden Weiterkultivierung der Zellen keine nachteiligen Einflüsse auf diese (ABTS *et al.*, 1989).

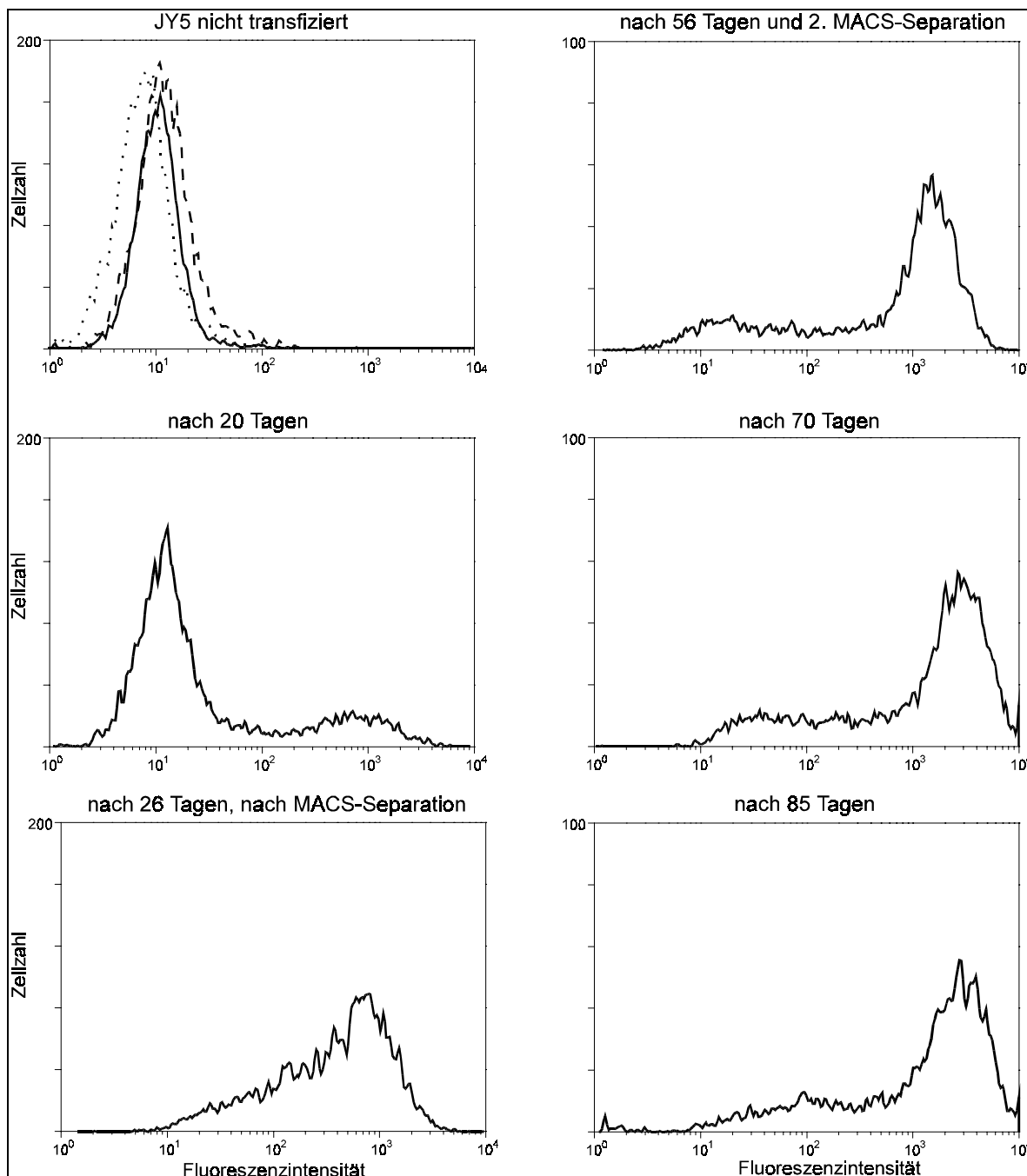


Abb. 3.18: Durchflußzytometrische Analyse von JY5-Zellen, die mit 20 µg pcDNA3.1HisCPIG-A Plasmid-DNA transfiziert wurden (..... Medium, - - - 5E5, ——— CD48 MoAk J4.57). Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit 600 µg G418/ml Medium kultiviert.

Weiterin wurde versucht, durch *limiting dilution* einen stark exprimierenden Zellklon zu isolieren. Hierbei wurden die Zellen so verdünnt, daß nach Aussaat auf eine 96 Lochplatte im Durchschnitt eine Zelle pro Loch vorhanden war. Da die JY5-Zellen andere Zellen für die Versorgung mit lebenswichtigen Stoffen wie Cytokinen brauchen, wurden sie auf sogenannte *feeder* (NIH/3T3-Zellen, 2×10^5 Zellen pro Loch) ausgesät. Da diese

Zellen nicht gegen G418 resistent sind, sterben sie nach etwa einer Woche ab; (zusätzlich wurden die Zellen mit 20 Gy sechs Min. bestrahlt), während dieser Zeit können sich die PIG-A positiven transfizierten JY5-Zellen vermehren. Nach drei Wochen wurden mehrere Klone durchflußzytometrisch auf ihre CD48-Expression hin untersucht. Ein CD48 stark exprimierender Klon konnte isoliert und weiter kultiviert werden. Auch nach sechs Monaten blieb die starke CD48-Expression konstant. Ein Teil der Zellen wurde nach zwei Monaten ohne G418 weiterkultiviert, hier blieb die CD48-Expression über einen beobachteten Zeitraum von sechs Monaten ebenfalls konstant, es konnten auch keine Revertanten beobachtet werden (Abb. 3.19).

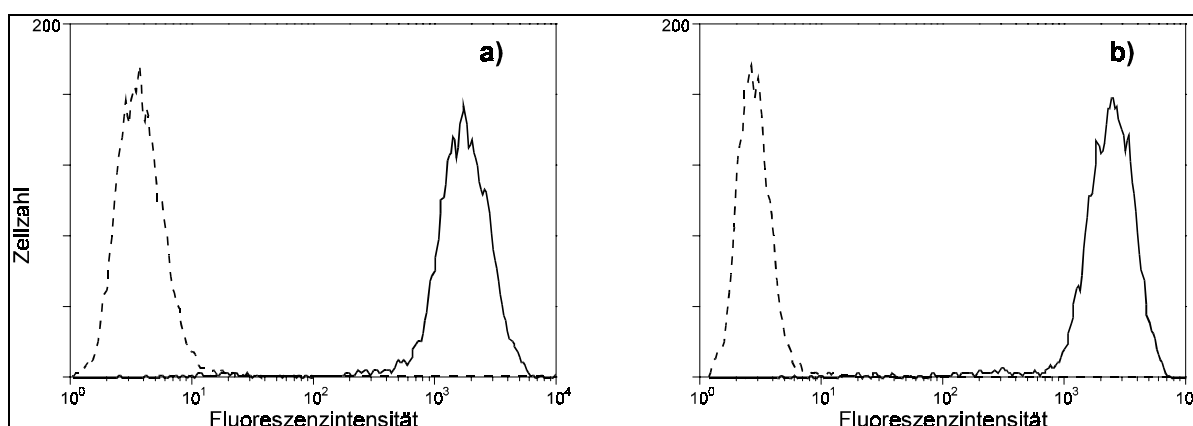


Abb. 3.19: Durchflußzytometrische Analyse von JY5-Zellen, die mit 20 µg pcDNA3.1HisCPIG-A Plasmid-DNA transfiziert wurden. Nach zweimaliger Anreicherung der CD48-positiven Zellen über MACS wurde mittels *Limited Dilution* ein Klon isoliert und weiter kultiviert (— — — Medium, ——— CD48 MoAk J4.57). a) Kultivierung ohne G418. b) Kultivierung mit 600 µg G418/ml Medium über einen Zeitraum von sechs Monaten nach Transfektion.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Vektoren wurde ein selbst konstruierter Expressionsvektor benutzt. Als Ausgangsplasmid wurde pEBVHisA verwendet, in den bereits über die Restriktionsschnittstellen BamH I und Xho I die für PIG-A kodierende cDNA eingefügt wurde (pEBVHisAPIG-A). Über mehrere Klonierungsschritte wurde der vorhandene RSV-Promotor gegen einen CMV-Promotor aus einem retroviralen Expressionsvektor (pLNCX, MILLER und ROSMAN, 1989) ausgetauscht. Die genaue Beschreibung der Vektordarstellung erfolgt in Abb. 3.20.

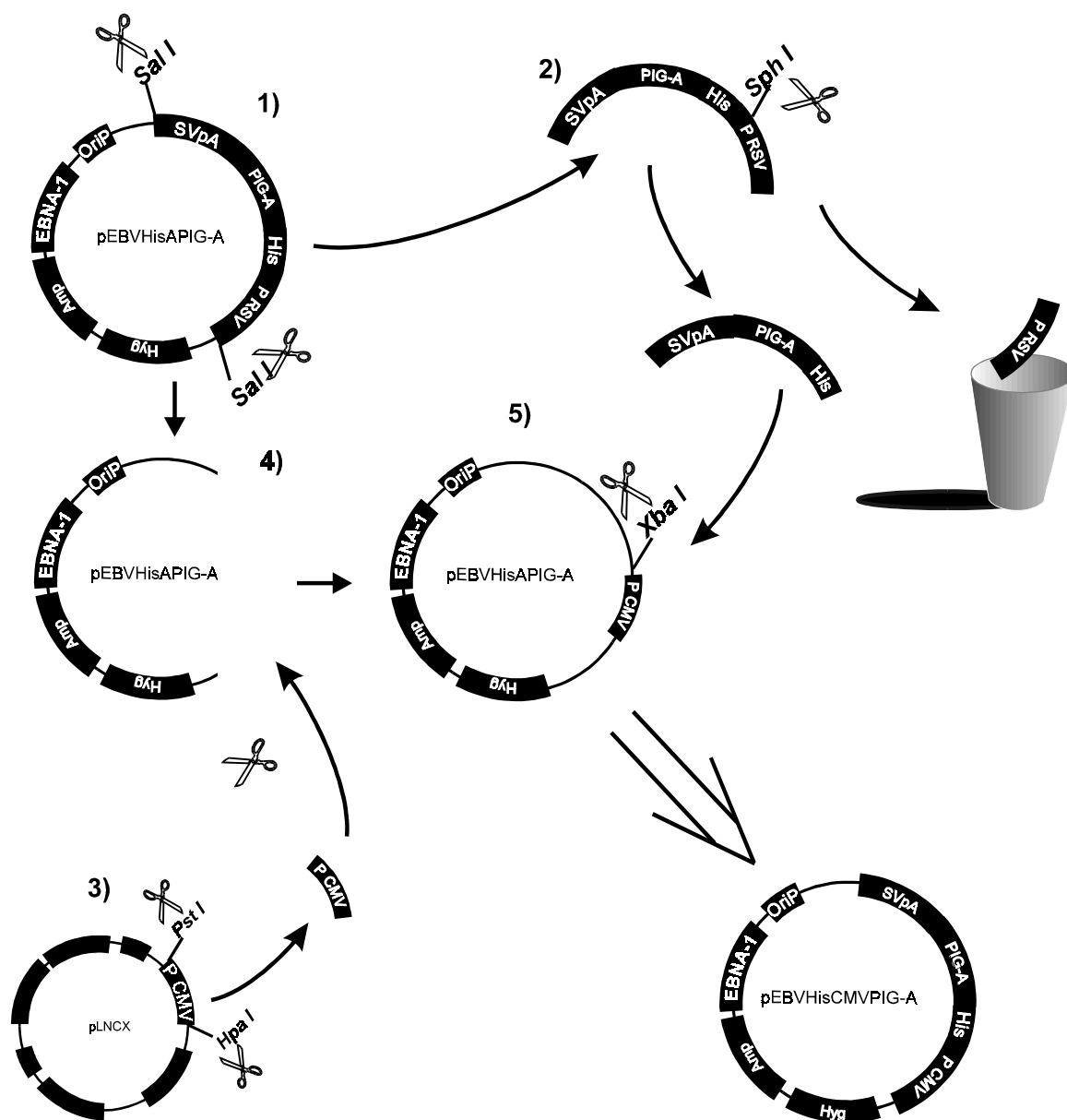


Abb. 3.20: Darstellung der Klonierung des pEBVCMVHisAPIG-A Expressionsvektors. Als Ausgangsplasmid wurde pEBVHisA verwendet, in den bereits über die Restriktionsschnittstellen BamH I und Xho I die für PIG-A kodierende cDNA eingefügt wurde (pEBVHisAPIG-A, siehe Abb. 3.9). **1)** Mit Sal I wurde der Bereich, der SV40pA, His-PIG-A und den RSV-Promotor enthält, herausgeschnitten. Alle Sal I Enden wurden mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt. **2)** Mit Sph I wurde vom herausgetrennten Fragment der RSV-Promotor entfernt, das entstehende überhängende 3'-Ende wurde mit T4-Polymerase entfernt. **3)** Aus dem pLNCX-Vektor wurde mit Pst I und Hpa I der CMV-Promotor herausgeschnitten und das entstehende überhängende 3'-Ende wurde mit T4-Polymerase entfernt. **4)** Der CMV-Promotor wurde mit dem restringierten pEBVHisAPIG-A ligiert. **5)** Der Vektor wurde mit Xba I geöffnet; um Selbstligation zu verhindern, wurden die Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Das aus His-PIG-A und dem SV40pA bestehende Fragment aus Schritt 2) wurde in den geöffneten Vektor eingefügt und auf richtige Orientierung durch Restriktionsverdau mit BamH I überprüft.

Nach der Transfektion von JY5-Zellen mit 20 µg pEBVCMVHisAPIG-A Plasmid-DNA und Selektion mit 400 µg Hygromycin/ml Kulturmedium exprimierten schon nach zwei Tagen mehr als 95 % der Zellen CD48 auf ihren Zelloberflächen (Abb. 3.21). Die Betrachtung der Expressionsstärke (Fluoreszenzintensität = 10^3 - 10^4) zeigt, daß nur mit diesem extrachromosomal replizierenden Expressionsvektor Werte erzielt werden konnten, die denen der Wildtypzelle JY und den mit pcDNA3.1HisCPIG-A stabil transfizierten JY5-Zellen gleichen.

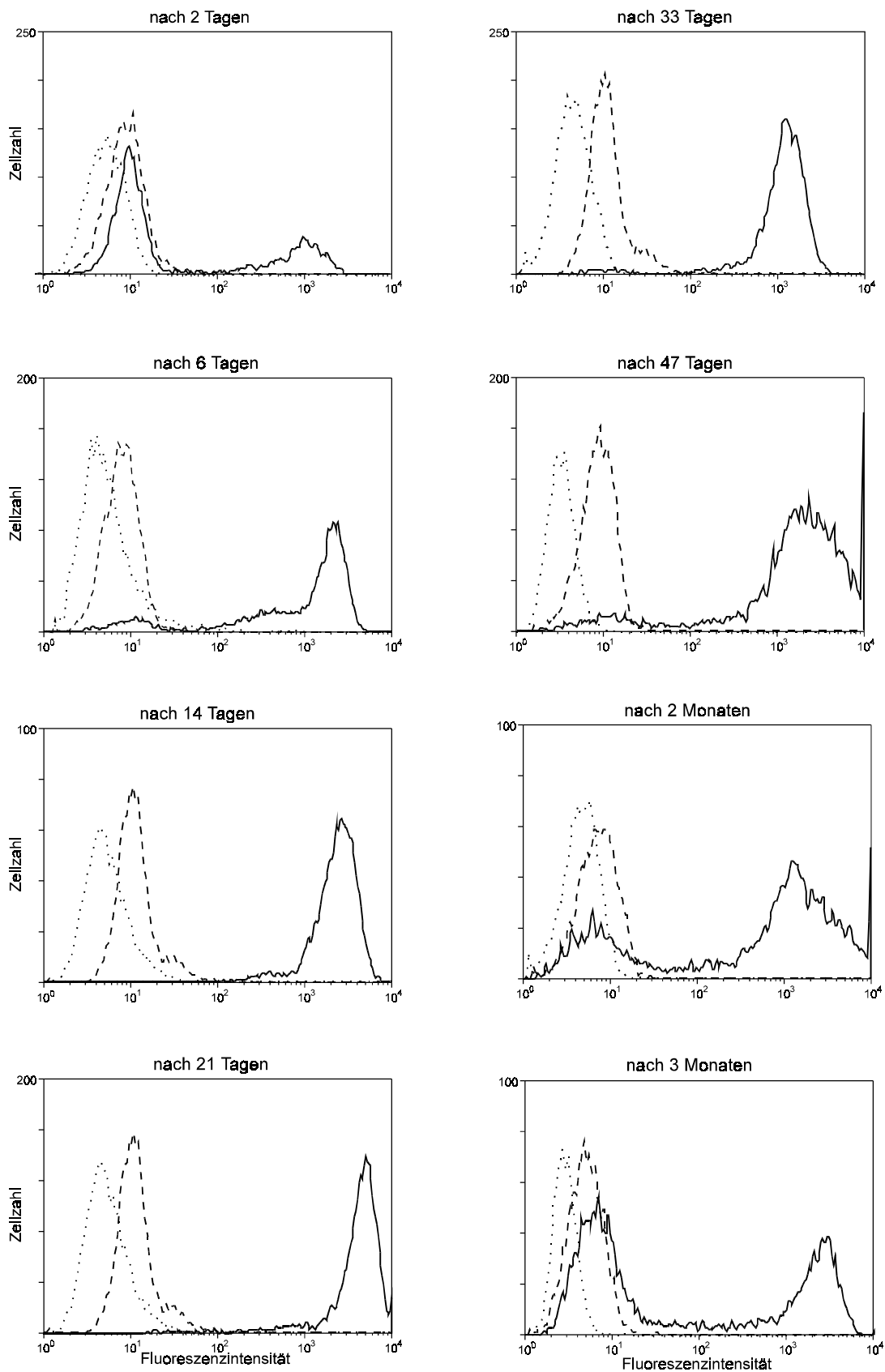


Abb. 3.21: Durchflußzytometrische Analyse von JY5-Zellen, die mit 20 µg pEBVCMVHisAPIG-A Plasmid-DNA transfiziert und mit 400 µg Hygromycin/ml Kulturmedium selektioniert wurden (..... Medium, --- 5E5, — CD48 MoAk J4.57).

3.1.6 Nickelchelate-Affinitätschromatographie

Die hohe Affinität von sechs konsekutiv exprimierten Histidinresten zu Nickelionen soll die Isolation von rekombinanten Proteinen über die Nickelchelate-Affinitätschromatographie ermöglichen (Abb. 3.22). Da die Bindung der Histidine an die immobilisierten Nickelionen sehr spezifisch ist, sollte eine Abtrennung des rekombinanten Proteins von den zelleigenen Proteinen in den meisten Fällen gut möglich sein (HOCHULI *et al.*, 1988). Für einige Transkriptionsfaktoren (JANKNECHT *et al.*, 1991) und verschiedene Enzyme (DÖBELI *et al.*, 1990) konnte bereits gezeigt werden, daß das angehängte Hexapeptid die Eigenschaften des Proteins nicht verändert.

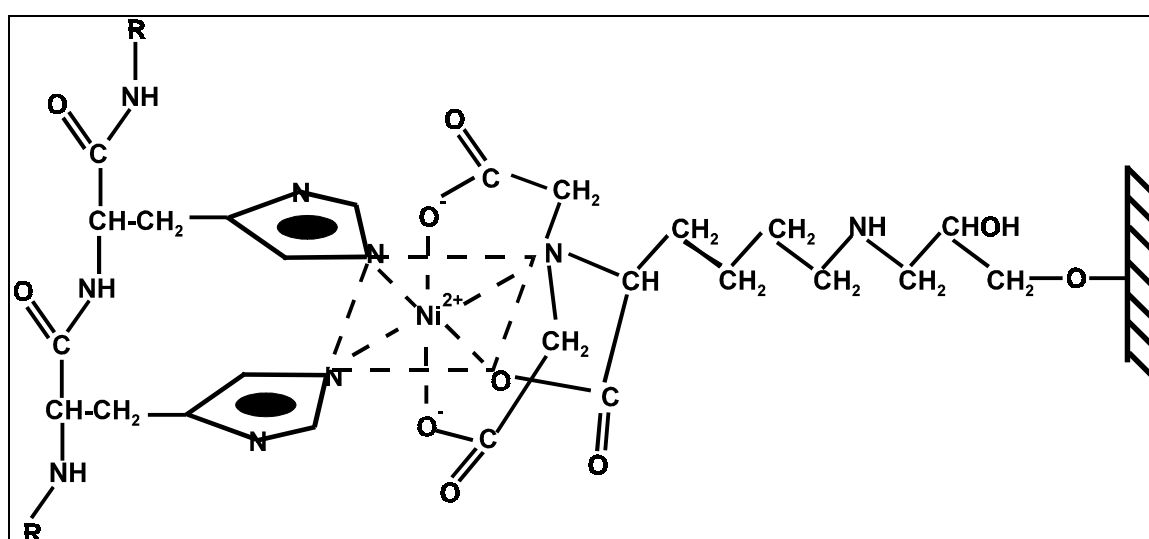


Abb. 3.22: Wechselwirkung von Histidinseitenketten und Nitrilotriessigsäure-Agarose. Die Nitrilotriessigsäure (NTA) hat vier Koordinationsstellen, die zur Komplexierung des Nickelions beitragen. Über das gebundene Nickelion können dann Bindungen mit den Imidazol-Seitenketten von Histidinen eingegangen werden.

Für die Nickelchelate-Affinitätschromatographie wurden JY5-Zellen verwendet, die mit einem der folgenden Expressionsvektoren transfiziert worden waren: pEBVHisAPIG-A, pEBVCMVHisPIG-A oder pcDNA3.1HisCPIG-A. Die funktionelle Expression des „His-Tag“-PIG-A-Fusionsproteins wurde vor Verwendung der Zellen indirekt über den Nachweis von GPI-verankerten CD48-Molekülen auf den Zelloberflächen mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen.

Bis zu 8×10^6 CD48 exprimierende Zellen bzw. eine entsprechende Anzahl von nicht transfizierten JY5-Zellen für die Negativkontrolle wurden für die Zellyse verwendet. Die Waschschrte mit Harnstoffpuffern mit sinkendem pH und die Elution der gebundenen Proteine wurde mit einem Durchfluß-UV-Photometer und Kurvenschreiber (Pharmacia)

verfolgt. Ein Elutionsprofil ist in Abb. 3.23 gezeigt. Der erste Ausschlag gibt den Waschschrift mit einem Puffer mit pH 6 (statt pH 8,0 wie der Auftragepuffer) wieder, bei dem ein Großteil der unspezifisch gebundenen Proteine ausgewaschen wird. Der zweite Ausschlag gibt die Elution bei einem pH von 4,3 wieder.

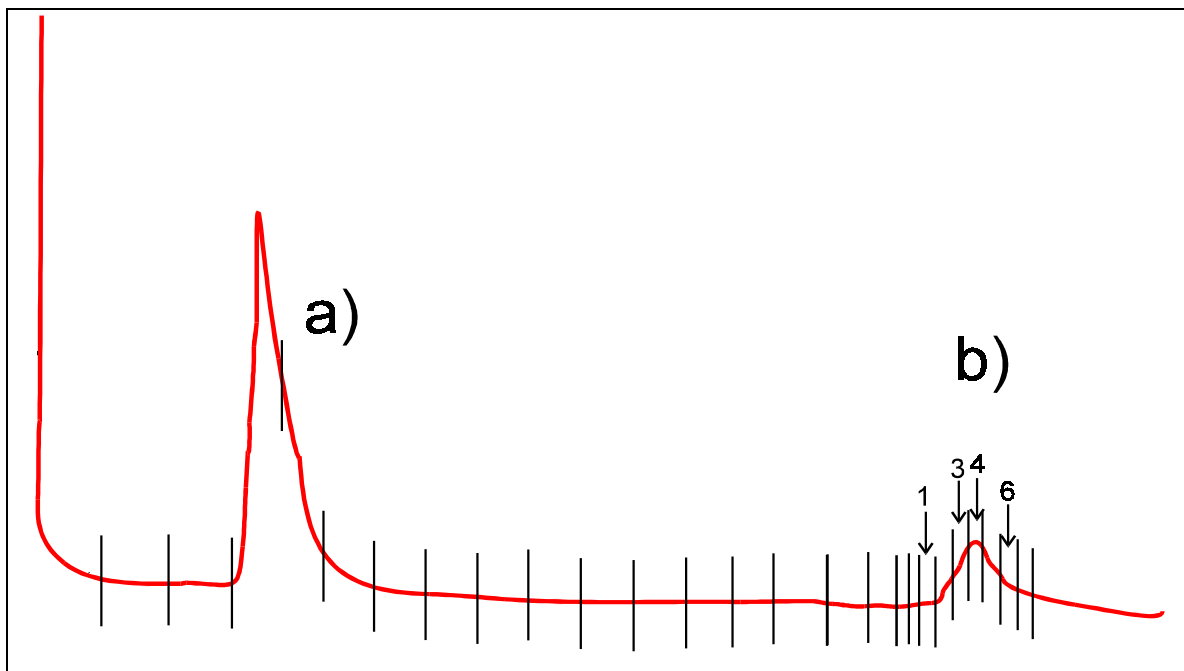


Abb. 3.23: Elutionsprofil einer NTA-Agarose-Säule. Der erste Ausschlag (a) gibt den Waschschrift mit einem Puffer mit pH 6 (statt pH 8,0 wie der Auftragepuffer) wieder, bei dem ein Großteil der unspezifisch gebundenen Proteine ausgewaschen wird. Der zweite Ausschlag (b) gibt die Elution bei einem pH von 4,3 wieder.

Von den Elutionsfraktionen wurden Aliquots auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen und analysiert (Abb. 3.24). Spur 1 und 2 entsprechen den Elutionsfraktionen 3 und 4 in Abb. 3.23. Spur 3 und 4 zeigen die entsprechenden Fraktionen einer Kontrollaufreinigung mit Zellysat aus nicht transfizierten JY5-Zellen. Aus der Aufreinigung des PIG-A-Proteines aus transfizierten JY5-Zellen resultierte im Western-Blot eine einzelne Bande von etwa 58 kD. In den Fraktionen aus der Kontrollaufreinigung konnte hingegen, wie erwartet, nichts detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde in Spur 6 bakteriell exprimiertes PIG-A-Protein aufgetragen.

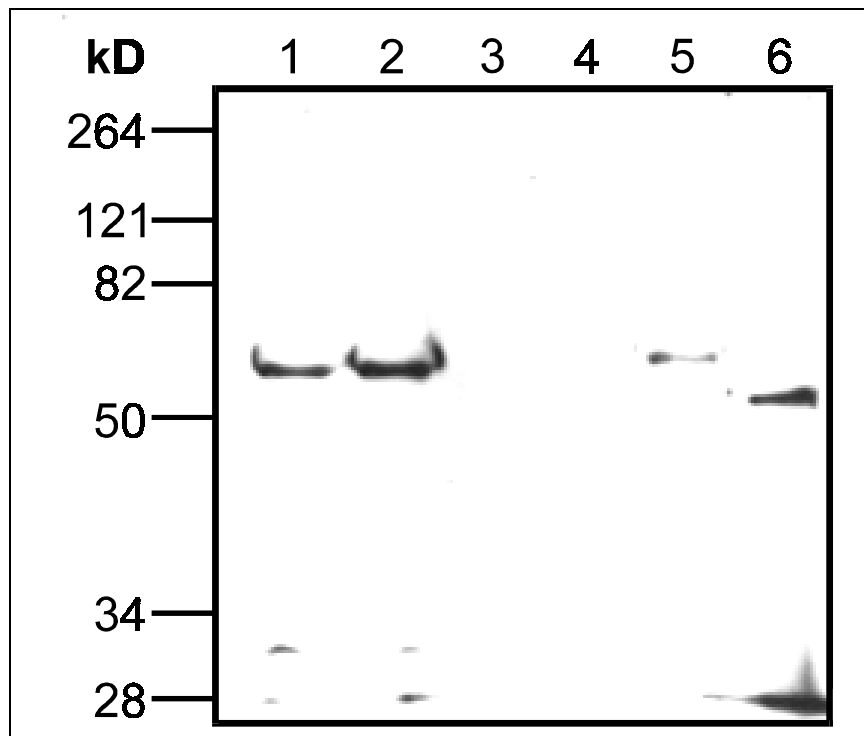


Abb. 3.24: Westernblot und Detektion von PIG-A. Nach Anreicherung über eine Nickelchelatsäule wurden einige Fraktionen auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Der Blot wurde mit anti-His-Tag Antikörper und anti-Maus Antikörper (Peroxidase-gekoppelt) inkubiert und mit ECL-Reagenz (Amersham) entwickelt. Spur 1 und 2: 20 μ l der Elutionsfraktion 3 (Gesamtvolumen der Fraktionen: 500 μ l). Spur 2: 20 μ l der Elutionsfraktion 4. Spur 3 und 4: die entsprechenden Fraktionen einer Kontrollaufreinigung mit Zellysate aus nicht transfizierten JY5-Zellen. Spur 5: 20 μ l der Elutionsfraktion 6. Spur 5: Bakteriell exprimiertes Kontrollprotein.

4 Diskussion

Bei Patienten mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie kommt es zum Auftreten von Zellen im peripheren Blut, die einen besonderen Defekt für GPI-verankerte Oberflächenmoleküle aufweisen. Der Hintergrund dafür ist eine klonale Expansion einer oder mehrerer frühen GPI-defizienten Knochenmarkprogenitorzellen. Der Mechanismus der klonalen Expansion ist bis heute unklar. Die Defizienz der GPI-verankerten CD55- und CD59-Moleküle führt zu einer abnormen Sensitivität vor allem der Erythrozyten gegenüber dem autologen Komplement, was zu einer intravaskulären Hämolyse führt.

Durch biochemische Analyse der GPI-Ankermediate aus Zellen von PNH-Patienten konnte der Defekt in der GPI-Biosynthese bei der PNH für die Übertragung von GlcNAc auf PI festgelegt werden (ARMSTRONG *et al.*, 1992; HIDAKA *et al.*, 1993; HILLMEN *et al.*, 1993; TAKAHASHI *et al.*, 1993; NORRIS *et al.*, 1994). Durch Zellfusionsexperimente von defizienten Zelllinien (aus PNH-Patientenzellen generiert) mit Thy1-Mauslymphommutanten verschiedener Komplementationsklassen konnte gezeigt werden, daß der Defekt bei der Übertragung von GlcNAc von UDP-GlcNAc auf PI liegt. Das für die PNH verantwortliche Gen, PIG-A (für Phosphatidylinositolglykan der Komplementationsklasse A), wurde durch Expressionsklonierung von MIYATA *et al.* (1993) isoliert. Bei allen bisher untersuchten PNH-Patienten konnten Mutationen im PIG-A-Gen als Ursache für ein gar nicht oder nur funktionsuntüchtiges exprimiertes PIG-A-Protein nachgewiesen werden (TAKEDA *et al.*, 1993; BESSLER *et al.*, 1994a, b, d; MIYATA *et al.*, 1994; OSTENDORF *et al.*, 1995; WARE *et al.*, 1994). Die nachgewiesenen somatischen Mutationen im PIG-A-Gen zeigten eine große Heterogenität vom Basenaustausch bis hin zu Deletionen und Insertionen von einem bis mehreren Nukleotiden. Die Lokalisation des Genes an der chromosomalen Position Xp22.1 (TAKEDA *et al.*, 1993) erklärt, warum eine einzige somatische Mutation zu einem veränderten Phänotyp führen kann, da sowohl in männlichen als auch in weiblichen Individuen nur ein einziges X-Chromosom genetisch aktiv ist.

Über die eigentliche Funktion und Lokalisation von PIG-A gab es zu Beginn der Arbeit nur indirekte Hinweise durch die Lokalisation von GPI-Intermediaten (VIDUGIRIENE und MENON, 1993; s. auch Abschnitt 4.2). Im Rahmen dieser Arbeit sollten generelle Erkenntnisse über das PIG-A-Protein und damit über die komplexe Biosynthese von GPI-Ankern gewonnen werden. Mit der Perspektive, andere Komponenten eines putativen Multienzymkomplexes zu identifizieren, ihre Interaktionen zu charakterisieren und ihre Funktionen zu beschreiben, war es essentiell, die Expression des PIG-A-Proteins mit

geeigneten Expressionsvektoren zu etablieren. Die zusätzliche Entwicklung einer geeigneten Detektionsmethode sollte ermöglichen, das PIG-A-Protein subzellulär zu lokalisieren und biochemisch zu identifizieren.

4.1 Expression von „FLAG-PIG-A“ und „His-Tag“-PIG-A

Durch die Konstruktion eines Fusionsproteins aus dem PIG-A-Protein und einer Peptidsequenz, die als Antikörperbindungsstelle fungiert, sollte die direkte Identifizierung und Detektion des rekombinanten PIG-A-Proteins möglich gemacht werden. Diese Methode bietet den Vorteil, kommerziell erhältliche und bereits charakterisierte monoklonale Antikörper zu verwenden. Außerdem sollten so Probleme umgangen werden, die bei der Verwendung von polyklonalen Antisera oder der zeit- und arbeitsaufwendigen Herstellung von monoklonalen Antikörpern auftreten können (PETERS und BAUMGARTEN, 1990).

Bei dieser Technik verwendet man Expressionsvektoren, in welche die cDNA des zu exprimierenden Proteins und die DNA-Sequenzen, die als Peptid exprimiert als Antikörperbindungsstelle dienen, ligiert werden. Letztere müssen im korrekten Leseraster in das zu untersuchende Protein eingefügt werden. Von beiden verwendeten Peptidsequenzen wurde erwartet, daß sie hydrophile Eigenschaften besitzen, um die Zugänglichkeit der Antikörper im exprimierten Fusionsprotein zu gewährleisten. Durch Erstellen der Hydropathieprofile (Abb. 3.3) konnte die Hydrophilität bestätigt werden. Das His-Tag bietet neben der Detektierbarkeit durch monoklonale Antikörper (ZENTGRAF *et al.*, 1995) die Möglichkeit der Aufreinigung durch Nickelchelate-Affinitätschromatographie. Die sehr spezifische Bindung von sechs konsekutiv exprimierten Histidinresten an immobilisierte Nickelionen ermöglicht die Abtrennung von rekombinanten Proteinen von den zelleigenen Proteinen (HOCHULI *et al.*, 1988; DÖBELI *et al.*, 1990; JANKNECHT *et al.*, 1991).

Da für die Funktion eines Proteines nicht nur die Primärstruktur, sondern letztendlich auch die Faltung und die Lokalisation in der Zelle eine entscheidende Rolle spielen, kann nicht vorhergesagt werden, ob ein in der Primärstruktur manipuliertes Protein funktionell aktiv ist. Daher war es wichtig, eine Möglichkeit zu haben, die Funktion des Fusionsproteins überprüfen zu können. Die Verwendung der humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie JY5, die kein detektierbares PIG-A-Transkript besitzt und damit keine GPI-verankerten Proteine auf ihrer Zelloberfläche exprimiert, bot diese Möglichkeit

(HOLLANDER *et al.*, 1988). Mittels durchflußzytometrischer Analyse von GPI-verankerten Zelloberflächenmolekülen wie CD48, CD55 und CD59 auf den transfizierten Zellen im Vergleich mit nicht-transfizierten JY5 und JY (WT)-Zellen gelang es, eine Aussage darüber zu machen, ob das in den transfizierten Zellen exprimierte Fusionsprotein aktiv war.

In den Experimenten mit den pREP-Expressionsvektoren wurde die „FLAG“-Sequenz über die Polymerase-Kettenreaktion an den 5'-Terminus der PIG-A-cDNA angefügt. Die anderen Vektoren (pEBVHisA und pcDNA3.1HisC) enthielten bereits vor ihrer multiplen Klonierungsstelle die „His-Tag“-Sequenz zur N-terminalen Expression. Zum Einfügen des „His-Tags“-am 3'-Ende der PIG-A-cDNA wurde ebenfalls ein entsprechender Starter (*Primer*) in der Polymerase-Kettenreaktion benutzt.

Zu Beginn der Experimente wurde der Expressionsvektor pREP7 gewählt, der schon von T. OSTENDORF (Dissertation 1995) für die Untersuchung von PIG-A-Transkripten aus GPI⁻-Zelllinien von PNH-Patienten verwendet wurde. Dieser Expressionsvektor wurde speziell für die Transfektion EBV-transformierter B-Zellen konstruiert (MARGOLSKEE *et al.*, 1988). Er enthält den Epstein-Barr-Virus-spezifischen *oriP* für stabile extrachromosomale Replikation des Plasmids. Das Gen des für die Initiation der Replikation in nicht transformierten Zellen notwendigen EBNA-1-Proteins befindet sich ebenfalls auf dem Vektor, wurde hier jedoch durch gezielte Mutagenese inaktiviert, um toxische Konzentrationen durch Überexpression des Proteins in EBV-Zellen mit hoher endogener EBNA-1 Expression zu vermeiden. Das EBNA-1-Protein ermöglicht durch Transaktivierung des *oriPs* die extrachromosomale Replikation der Plasmide in hoher Kopienzahl (SUGDEN *et al.*, 1985; YATES *et al.*, 1984, 1985).

Bei der Analyse der transfizierten JY5-Zellen stellte sich heraus, daß auch nach Selektion mit hohen Hygromycinkonzentrationen und Anreicherung der GPI-positiven Zellen keine dauerhafte CD48-Expression festgestellt werden konnte. Nach etwa zwei bis vier Wochen nahm die CD48-Expressionsrate stetig ab. Die Vermutung, daß die endogene Menge an EBNA-1 in den JY5-Zellen zu niedrig sei, um eine ausreichende Replikation und damit Segregation des Expressionsplasmides zu gewährleisten, wurde durch die Verwendung des pREP4-Vektors bestätigt, dessen für das EBNA-1-Protein kodierendes Gen nicht deletiert ist. Hier blieb die nach drei Wochen erreichte CD48-Expressionsrate über einen Zeitraum von mindestens zwei Monaten konstant. Dies spricht für eine ausreichende Replikation und Weitergabe des Expressionsvektors bei Zellteilung (Abb. 3.7). Eine Abhängigkeit der Plasmidanzahl mit EBV-Replicon (*oriP*/EBNA-1) von der EBNA-1-

Konzentration in der Zelle konnte bereits von LUPTON und LEVINE (1985) gezeigt werden. SHIMIZU *et al.* (1986) beobachteten bei ihren Studien mit HLA Klasse I Genen, die mittels EBV-Vektoren in mutierten B-lymphoblastoiden Zellen exprimiert wurden, einen Zusammenhang zwischen der Hygromycinkonzentration und Anzahl der Plasmide: geringe Kopienzahl (1 bis 2 pro Zelle) bei niedriger Hygromycinkonzentration und größere Kopienzahl (5 bis 10 pro Zelle) bei hoher Konzentration. Die Zelloberflächenexpression von HLA war allerdings in diesem Fall unabhängig von der Anzahl der Plasmide in der Zelle. MARGOLSKEE (1992) hingegen beobachtete in einigen Fällen bei hoher Hygromycinkonzentration im Kulturmedium Deletionen der in die EBV-Vektoren eingefügten cDNAs. Neben einer Resistenzbildung wäre das Auftreten von Deletionen auch eine Erklärung für das hier beobachtete Phänomen. Trotz hoher Hygromycinkonzentration starben die Zellen nicht wie untransfizierte Kontrollen, aber dennoch fand keine GPI-Synthese aufgrund einer möglichen Deletion im PIG-A-Gen statt. Zudem schien hier die Expression des PIG-A-Proteins und damit der GPI-verankerten Oberflächenproteine von der Menge der vorhandenen Plasmide in gewisser Weise abhängig zu sein.

KÜNG *et al.* (1997) beobachtete erst kürzlich die Reduktion eines GPI-verankerten Proteins (alkalische Phosphatase) nach Behandlung mit G418 um mehr als 50 %. Die Reduktion wurde sowohl bei stabil mit dem Neomycinresistenzgen transfizierten COS-1-Zellen als auch bei nicht-transfizierten COS-1-Zellen nach Kultivierung mit G418 festgestellt. Bei beiden konnte die GPI-verankerte AP im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Bei den hier verwendeten mit pcDNA3.1HisCPIG-A transfizierten JY5-Zellen wurde eine derartige Reduktion nicht festgestellt. Die stabil transfizierten Zellen zeigten sowohl mit als auch ohne G418-Behandlung identisch hohe Expressionsraten für das CD48-Molekül (Abb. 3.19).

Bei Verwendung des „His-Tags“ anstelle des „FLAGs“ in den Expressionsvektoren war kein Unterschied in der Expressionstärke des CD48-Moleküls zu erkennen. Die maximale Expression liegt bei der Fluoreszenzintensität von 10^3 und ist damit im unteren Bereich der CD48-Expression auf Wildtyp JY-Zellen zu finden. Durch die Verwendung der Expressionssysteme mit CMV-Promotor (pEBVCMVHisAPIG-A und pcDNA3.1HisCPIG-A) konnte eine Expression von 10^3 bis 10^4 erreicht werden. Sowohl für die Konstrukte mit einem FLAG bzw. mit einem His-Tag am N-Terminus als auch für jene mit jeweils einem His-Tag am N-Terminus und am C-Terminus konnte somit eine der Wildtyp-Zelllinie JY entsprechende CD48-Expression in den transfizierten JY5-Zellen nachgewiesen werden.

Damit konnte eine negative Beeinflussung der PIG-A Aktivität durch die angehängten Peptidsequenzen ausgeschlossen werden.

Der Promotor des humanen PIG-A-Gens wurde von IIDA *et al.* (1994) analysiert. Die 583 bp umfassende 5'-flankierende Region enthält keinerlei TATA-ähnliche Sequenzen. Das Fehlen einer TATA-Box ist typisch für Gene von sog. Haushaltsproteinen, die konstitutiv exprimiert und nicht reguliert werden (MANIATIS *et al.*, 1987; JONES *et al.*, 1988, KNIPPERS *et al.*, 1990). Dagegen sind vier CAAT-Boxen an den Positionen -53 bis -57, -97 bis -101, -292 bis -296 und -473 bis -477 vorhanden. Zwei AP-2-Sequenzen befinden sich an den Positionen -72 bis -79 und -147 bis -154 und ein CRE-Element an Position -169 bis -176. Auch diese Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren geben keine konkreten Hinweise auf eine spezielle Regulation des zellulären PIG-A-Gens.

Die Stärke von verschiedenen viralen Promotoren in humanen Zelllinien kann nicht vorhergesagt werden. So verglichen z. B. SUTHERLAND und WILLIAMS (1997) die Stärke von verschiedenen viralen Promotoren in zwei eng verwandten humanen T-lymphoblastoiden (CEM-C7 und Jurkat) Zelllinien miteinander. Sie zeigten eine 10fach stärkere CMV-Promotoraktivität im Vergleich mit dem RSV-Promotor in Jurkat-Zellen, aber eine vergleichbare Aktivität der beiden Promotoren in CEM-C7-Zellen. In unserem Zellsystem wurde bei den Expressionssystemen mit RSV-Promotoren (pREP7/FLAG-PIG-A, pREP4/FLAG-PIG-A und pEBVHisAPIG-A) eine maximale Fluoreszenzintensität von 10^3 bei Analyse der CD48-Expression beobachtet, unabhängig davon, ob das PIG-A-Protein mit FLAG oder His-Tag versehen war. Bei Verwendung der Expressionssysteme mit CMV-Promotoren (pEBVCMVHisAPIG-A und pcDNA3.1HisCPIG-A) konnte eine Fluoreszenzintensität von 10^3 bis 10^4 erreicht werden. Hier wird deutlich, daß auch bei den verwendeten JY5-Zellen verschiedene virale Promotoren unterschiedlich stark aktiv sind.

4.2 Intrazelluläre Lokalisation von PIG-A

Bereits 1993 und 1994 konnten VIDUGIRIENE und MENON indirekt über die subzelluläre Lokalisation der ersten Biosyntheseintermediate den Ort für die frühe GPI-Anker-Biosynthese bestimmen. Durch subzelluläre Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation und nachfolgender biochemischer Charakterisierung der Fraktionen mit entsprechenden Markerenzymen zeigten sie, daß die ersten Syntheseschritte (Übertragung von N-Acetylglucosamin von Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin auf Phosphatidylinositol und die nachfolgende Deacetylierung zu Glucosaminphosphatidylinositol) in den ER enthaltenen Fraktionen stattfinden. Des Weiteren konnten sie durch Behandlung von ER-Mikrosomen mit phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C nachweisen, daß das GlcNAc-PI und GlcN-PI auf der cytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind.

Die aus 484 Aminosäuren bestehende Peptidsequenz des PIG-A-Proteins enthält einen hydrophoben Bereich von 27 Aminosäuren, gefolgt von einem hydrophilen Bereich von 42 Aminosäuren am C-terminalen Ende. Das zusätzliche Fehlen einer Signalsequenz am N-Terminus läßt darauf schließen, daß das Protein mit dem C-Terminus in das ER-Lumen hineinragt und sich der vermutlich katalytisch aktive Bereich auf der zytoplasmatischen Seite befindet. Zusätzliche Hinweise hierfür sind, daß Mutationen im zytoplasmatischen Teil des PIG-A-Proteins bei PNH-Patienten zu einem Funktionsverlust führen (BESSLER *et al.*, 1994a, c).

Durch die intrazelluläre Immunfluoreszenz mit nachfolgender FACS-Analyse wurde gezeigt, daß die verwendeten Antikörper in der Lage waren, das konstruierte PIG-A-Fusionsprotein zu detektieren. Weitere Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop deuteten auf eine Lokalisation des Proteins im perinukleären Bereich und im endoplasmatischen Retikulum hin. Die elektronenmikroskopische Darstellung zeigte deutlich, daß das Protein tatsächlich am rauhen ER und an der Kernmembran lokalisiert ist. Die zur Darstellung verwendeten Goldpartikel kennzeichnen besonders die zytoplasmatischen Bereiche der genannten Kompartimente. Da die Markierung mit den antikörpergekoppelten Goldpartikeln am N-Terminus des PIG-A-Proteins stattfindet, wird die aufgrund der theoretischen Sequenzanalyse vermutete Orientierung (C-Terminus des Proteins im ER-Lumen und N-Terminus im Zytoplasma) bestätigt.

Vor kurzem zeigten WATANABE *et al.* (1996) die intrazelluläre Lokalisation des PIG-A-Proteins mit Hilfe eines an das Protein fusionierten GST-Tags (Glutathion-S-Transferase). Ebenso wie in den vorliegenden elektronenmikroskopischen Darstellungen mit dem FLAG-PIG-A-Protein zeigten sie eine Lokalisation an der äußeren Kernmembran und der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums. Weitergehend konnten sie die Orientierung des Proteins bestätigen. Durch Proteinase K-Behandlung von mikrosomalen Vesikeln konnte ein GST-Tag am N-Terminus des PIG-A-Proteins abgespalten werden. Befand sich das GST-Tag am C-Terminus des PIG-A-Proteins, wurde es durch Proteinase K-Behandlung nicht freigesetzt.

4.3 PIG-A: Teil eines Enzymkomplexes?

Die biochemische Untersuchung der intrazellulären GPI-Intermediate von Thy1-negativen murinen Lymphommutanten (HYMAN, 1985, 1988) ergab, daß die Zellen der Klassen A, C und H weder GlcNAc-PI noch GlcN-PI synthetisieren (STEVENS und RAETZ, 1991; SUGIYAMA *et al.*, 1991). Diese Komplementationgruppen zeigen nach somatischer Zellfusion untereinander in jeder Kombination wieder eine Expression des GPI-verankerten Thy1-Moleküls. Somit besitzen die verschiedenen Komplementationsklassen A, C und H unterschiedliche Defekte, die aber alle zu einer Synthesestörung des GlcNAc-PI führen. Damit wird deutlich, daß an diesem ersten Anker-Syntheseschritt mindestens drei verschiedene Genprodukte beteiligt sein müssen. Bei den Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) sind für diesen ersten Biosyntheseschritt ebenfalls drei Mutanten beschrieben worden: *gpi1*, *gpi2* und *gpi3* (LEIDICH *et al.*, 1994 und 1995). Das *gpi3*-Gen ist identisch mit den unabhängig voneinander charakterisierten Genen SPT14 (LEIDICH *et al.*, 1995) und CWH6 (VOSSEN *et al.*, 1995) und ist homolog zu PIG-A (SCHÖNBÄCHLER *et al.*, 1995). Das *gpi2*-Gen zeigt Homologie mit PIG-C (INOUE *et al.*, 1996). Das *gpi1*-Gen zeigt dagegen keinerlei Homologie zum PIG-H-Gen (KAMITANI *et al.*, 1993), und im gut untersuchten *S. cerevisiae*-Genom wurde kein passendes offenes Leseraster gefunden, das dem des PIG-H-Proteins entsprechen würde. Bedenkt man die Konserviertheit, mit der sich die GPI-Biosynthese durch das Tierreich zieht, liegt die Vermutung nahe, daß ein viertes Genprodukt, sowohl in Hefen als auch in Säugetieren, am ersten Schritt der GPI-Synthese beteiligt ist.

Die Beteiligung von vier Genprodukten an ein und derselben Biosynthesereaktion läßt die Existenz eines Enzymkomplexes vermuten. Die Sequenzhomologie des PIG-A-Gens mit einer Familie von Glycosyltransferasen (BESSLER *et al.*, 1994c; KAWAGOE *et al.*, 1994)

läßt vermuten, daß es sich bei dem PIG-A-Protein um eine GlcNAc-Transferase handelt. So besitzt die Region der Aminosäuren 304 bis 395 Homologie zu der bakteriellen GlcNAc-Transferase RfaK, die an der Synthese von Lipopolysacchariden beteiligt ist (KAWAGOE *et al.*, 1994; VOSSSEN *et al.*, 1995).

Des weiteren konnte A. TIEDE in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe des *blast*-Programmes (*basic local alignment search tool*) auf mehr als 15 weitere, meist prokaryotische, Proteine verweisen, die besonders zum Bereich der Aminosäuren 230 bis 340 der zytoplasmatischen Domäne von PIG-A Homologien zeigen. Die Ähnlichkeiten, besonders in diesem eingegrenzten Bereich, könnten ein Hinweis darauf sein, daß es sich hier um eine katalytisch aktive Domäne des PIG-A-Proteins handelt. Diese Konservierung wird nicht nur in GlcNAc-Transferasen gefunden, sondern auch in etlichen anderen Transferasen, zumeist in bakteriellen Glycosyl-Transferasen. Die konservierten Bereiche könnten somit strukturelle Erfordernisse für generelle enzymatische Eigenschaften dieser Enzyme darstellen wie z. B. den Transfer von nukleotid-aktivierten Zuckermolekülen.

Die Isolation des His-Tag-PIG-A-Proteins mit Hilfe der Nickelchelatchromatographie führte nach Auftrennung durch SDS-Gelelektrophorese im Westernblot zu einer relativ schwachen Bande von 58 kD. Bei Verwendung von äquivalent hergestelltem und behandeltem Zellysat aus nicht-transfizierten JY5-Zellen war diese Bande nicht detektierbar. Das als Positivkontrolle in *E. coli* exprimierte rekombinante PIG-A-Protein wurde durch eine Bande von 54 kD dargestellt, was der theoretisch bestimmten Größe des Proteins entsprach. Das größere Molekulargewicht des in den humanen JY5-Zellen exprimierten Proteins könnte durch eine posttranslationale Modifikation wie z. B. Asparagin (N) -Glycosylierung, die spezifisch für Eukaryonten einschließlich der Hefen ist, bedingt sein. Durch Analyse der Aminosäuresequenz mit dem PC/Gene Programm konnten drei putative N-Glycosylierungsstellen gefunden werden. An den Positionen N⁹⁹ und N³⁰⁷ der zytoplasmatischen Domäne und an Position N⁴⁶⁷ der luminalen Domäne könnte eine Modifikation des PIG-A-Proteins durch Glycosylierung eine Vergrößerung des Molekulargewichtes verursachen. O-Glycosylierungsstellen wurden hingegen nicht gefunden.

Da die Art der Proteindarstellung im Western-Blot mit Antikörpern eine deutliche Verstärkung des Signals bedeutet, war es durch den Nachweis mit anderen Färbemethoden, die das vorhandene Signal nicht derart verstärken, nicht möglich, eventuell assoziierte zelluläre Proteine darzustellen. Eine Erklärung könnte sein, daß der oder die endogenen eventuell assoziierten Proteine in zu geringer Konzentration in der Zelle

vorhanden sind und sie somit, bei der verwendeten Zellzahl von bis zu 5×10^8 , nach elektrophoretischer Auftrennung im Gel unterhalb der Detektionsgrenze liegen.

WATANABE *et al.* (1996) konnten mit einer ähnlichen Methode die Assoziation von PIG-A und PIG-H darstellen. Sie exprimierten neben dem PIG-A-Protein auch das PIG-H-Protein mit Hilfe von Expressionsvektoren in B-lymphoblastoiden Zellen. Beide Proteine wurden so in ausreichender Menge in den Zellen hergestellt. Zusätzlich waren beide Proteine mit einem GST-Tag versehen, was die Detektion beider Proteine im Western-Blot mit Antikörpern ermöglicht. Dies bestätigt die Vermutung, daß die endogene Konzentration des Komplexpartners in unseren Experimenten zu niedrig war, um ihn mit den verwendeten Methoden darzustellen.

Erst kürzlich konnte A. TIEDE (1998) die humane und die murine cDNA klonieren, die sich als homologe Sequenzen zum *Saccharomyces cerevisiae*- und *Schizosaccharomyces pombe-gpi1*-Gen erwiesen. Um den Beweis für ihre Identität zu erbringen, wurden die homologen cDNAs mit entsprechenden Expressionsplasmiden in Hefe-Stämmen exprimiert, deren *gpi1*-Gen zerstört war. In *S. cerevisiae*, mit einem durch die *gpi1*-Gen Inaktivierung resultierenden temperatur-sensitivem Phänotyp ohne GlcNAc-Synthese, konnte durch die Expression der humanen und murinen cDNAs die Wachstumsfähigkeit bei 30°C und die *in vitro* GlcNAc-Synthese-Aktivität wiederhergestellt werden. In *S. pombe*, wo sich die *gpi1*-Gen Inaktivierung als letal erwies, konnte durch *random spore analysis* gezeigt werden, daß die homologen Säugetier-cDNAs das zerstörte Wt *gpi1*-Gen ersetzen konnten. Somit konnte gezeigt werden, daß in der Tat vier verschiedene Genprodukte am ersten Schritt der GPI-Biosynthese beteiligt sind. Die Tatsache, daß die homologen Säugetier *gpi1*- Gene die Hefe-Gene funktionell ersetzen können, ist ein wichtiger Hinweis auf die evolutionäre Konservierung der GPI-Biosynthese.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, rekombinantes PIG-A-Protein mit artifiziellen Antikörperbindungsstellen als aktives und intrazellulär korrekt lokalisiertes Protein zu exprimieren. In weiteren Studien können so die funktionelle Struktur des GlcNAc-Transferase-Komplexes, die Funktionen der beteiligten Komponenten und deren Interaktionen erforscht werden. Dieser erste und sehr komplexe Schritt der GPI-Ankerbiosynthese kann somit weiter analysiert und charakterisiert werden. Möglicherweise ergeben sich durch neue Erkenntnisse auch Ansatzpunkte für eine Behebung des Defektes der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie oder auch Möglichkeiten der Entwicklung von selektiven antimikrobiellen Wirkstoffen.

5 Literaturverzeichnis

ABTS H, EMMERICH M, MILTENYI S, RADBRUCH A, TESCH H (1989): CD20 positive human B lymphocytes separated with the Magnetic Cell Sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. *J. Immunol. Methods* 125:19

AMTHAUER R, KODUKULA K, GERBER L, UDENFRIEND S (1993): Evidence that the putative COOH-terminal signal transamidase involved in glycosylphosphatidylinositol protein synthesis is present in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3973

ARMSTRONG C, SCHUBERT J, UEDA E, KNEZ JJ, GELPERIN D, HIROSE S, SILBER R, HOLLAN S, SCHMIDT RE, MEDOF ME (1992): Affected paroxysmal nocturnal hemoglobinuria T lymphocytes harbor a common defect in assembly of N-acetyl-D-glucosamine inositol phospholipid corresponding to that in class A Thy-1⁻ murine lymphoma mutants. *J. Biol. Chem.* 267:25347

AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA, STAHL K (1991): *Current protocols in molecular biology*. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School

BATTEIGER B, NEWHALL WJ, JONES RB (1982): The use of Tween-20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J. Immunol. Methods* 55:297

BERGER J, HOWARD AD, BRINK L, GERBER L, HAUBER J, CULLEN BR, UDENFRIEND S (1988): COOH-terminal requirements for the correct processing of a phosphatidylinositol-glycan anchored protein. *J. Biol. Chem.* 263:10016

BESSLER M, MASON PJ, HILLMEN P, MIYATA T, YAMADA M, TAKEDA J, LUZZATTO L, KINOSHITA T (1994a): Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J.* 13:110

BESSLER M, MASON P, HILLMEN P, LUZZATTO L (1994b): Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet* 343:951

BESSLER M, HILLMEN P, LONGO L, LUZZATTO L, MASON PJ (1994c): Genomic organization of the X-linked gene (PIG-A) that is mutated in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and of a related autosomal pseudogene mapped to 12q21. *Hum. Mol. Genet.* 3:751

BESSLER M, MASON PJ, HILLMEN P, LUZZATTO L (1994d): Mutations in the PIG-A gene causing partial deficiency of GPI-linked surface proteins (PNH II) in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* 87:863

BIRNBOIM HC, DOLY J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513

BLAAS P, BERGER B, WEBER S, PETER HH, HAENSCH GM (1988): Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: enhanced stimulation of platelets by the terminal complement components is related to the lack of C8bp in the membrane. *J. Immunol.* 140:3045

BORDIER C, ETGES RJ, TURNER MJ, CARDOSO DE ALMEIDA ML (1986): Leishmania and Trypanosoma surface glycoproteins have a common glycopospholipid membrane anchor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:5988

BRAUN-BRETON C, ROSENBERRY TL, PEREIRA DA SILVA (1988): Induction of the proteolytic activity of a membrane protein in Plasmodium falciparum by phosphatidyl inositol-specific phospholipase C. Nature 332:457.

BROWN DA, CRISE B, ROSE JK (1989). Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. Science 245:1499

BUJARD H, GENTZ R, LANZER M, STÜBER D, MÜLLER M, IBRAHIMI I, HÄUPTLE MT, DOBBERSTEIN B (1987): A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins in vivo and in vitro. Meth. Enzym. 155:416

BURNETTE WN (1981): „Western Blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamid gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioionated. Anal. Biochem. 112:195

CASADABAN MJ, COHEN SN (1980): Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 138:179

CASHMAN NR, LOERTSCHER R, NALBANTOGLU J, SHAW I, KASCSAK RJ, BOLTON DC, BENDHEIM PE (1990): Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. Cell 61:185

CHU G, HAYAKAWA H, BERG P (1987): Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA.. Nucleic Acids Res. 15:1311

CHUNG CT, NIEMELA SL, MILLER RH (1989): One-step preparation of competent *E. coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2172

CINEK T and HOREJSI V (1992): The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. J. Immunol. 149:2262

COLLER HA, COLLIER BS (1983): Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. In: Langone JJ, Van Vunakis H (eds): Meths. Enzymol. Academic Press. New York 121:412

COSTELLO LC, ORLEAN P (1992): Inositol acylation of a potential glycosyl phosphoinositol anchor precursor from yeast requires acylcoenzyme A. J. Biol. Chem. 267:8599

CROSS GAM (1984): Release and purification of Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein. J. Cell. Biochem. 24:79

CROSS GAM (1990): Cellular and genetic aspects of antigenic variation in trypanosomes. Annu. Rev. Immunol. 8:83

CROSS GAM (1990): Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. Annu. Rev. Cell Biol. 6:1

DAS S, TRAYNOR KAPLAN A, REINER DS, MENG TC, GILLIN F (1991): A surface

antigen of *Giardia lamblia* with a glycosylphosphatidylinositol anchor. *J. Biol. Chem.* 266:21318

DAVIS S, ALDRICH TH, VALENZUELA DM, WONG VV, FURTH ME, SQUINTO SP, YANCOPOULOS GD (1991): The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253:59

DAVITZ MA, LOW NG, NUSSENZWEIG V (1986): Release of decay accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol specific phospholipase C (PIPLC). Selective modification of a complement regulatory protein. *J. Exp. Med.* 163:1150

DAVITZ MA, HOM J, SCHENKMAN S (1989): Purification of a glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase D from human plasma. *J. Biol. Chem.* 264:13760

DEEG MA, HUMPHREY DR, YANG SH, FERGUSON TR, REINHOLD VN, ROSENBERY TL (1992): Glycan components in the glycoinositol phospholipid anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Novel fragments produced by trifluoroacetic acid. *J. Biol. Chem.* 267:18573

DEGASPERI R, THOMAS LJ, SUGIYAMA E, CHANG HM, BECK PJ, ORLEAN P, ALBRIGHT C, WANECK G, SAMBROOK JF, WARREN CD, YE H ETH (1990): Correction of a defect in mammalian GPI anchor biosynthesis by a transfected yeast gene. *Science* 250:988

DEREGNAUCORT C, KELLER A, CAPDEVILLE Y (1988): A new class of *Paramecium* surface proteins anchored in the plasma membrane by a glycosylinositol phospholipid. *Biochem. J.* 253:395

DEVINE DV, GLUCK WL, ROSSE WF, WEINBERG JE (1987): Acute lymphoblastic leukemia in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Evidence of evolution from the abnormal paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone. *J. Clin. Invest.* 79:314

DOERING TL, MASTERSON WJ, ENGLUND PT, HART GW (1989): Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein: origin of the non-acetylated glucosamine. *J. Biol. Chem.* 264:11168

DÖBELI H, TRZECIAK A, GILLESSEN D, MATILE H, SRIVASTAVA IK, PERRIN LH, JAKOB PE, CERTA U (1990): Expression, purification, biochemical characterization and inhibition of recombinant *Plasmodium falciparum* aldolase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41:259

DUSTIN ML, SELVARAJ P, MATTALIANO RJ, SPRINGER TA (1987): Anchoring mechanisms for LFA-3 cell adhesion glycoprotein at membrane surface. *Nature* 329:846

EARLY A.E, WILLIAMS J G, MEYER HE, POR SB, SMITH E, WILLIAMS KL, GOOLEY AA (1988): Structural characterization of *Dictyostelium discoideum* prespore-specific gene D19 and of its product, cell surface glycoprotein PsA. *Mol. Cell. Biol.* 8:3458

EISENBERG D (1984): Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 53:595

ENGLUND P T (1993): The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 21

FATEMI SH, TARTAKOFF AM (1987): The phenotype of five classes of T lymphoma mutants. Defective glycosphospholipid anchoring, rapid degradation, and secretion of Thy-

1 glycoprotein. J. Biol. Chem. 263:1288

FERGUSON MAJ, HALDAR K, CROSS GAM (1985a): Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein has a sn-1,2-dimyristyl glycerol membrane anchor at his COOH-terminus. J. Biol. Chem. 260:4963

FERGUSON MAJ, LOW MG, CROSS GAM (1985b): Glycosyl-sn-1,2-dimyristyl-phosphatidylinositol is covalently linked to Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein. J. Biol. Chem. 260:14547

FERGUSON MAJ, HOMANS SW, DWEK RA, RADEMACHER TW (1988): Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein to the membrane. Science 239:753

FERGUSON MAJ AND AF WILLIAMS (1988): Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. Annu. Rev. Biochem. 57:285

FERGUSON MA (1992): Site of palmitoylation of a phospholipase C-resistant glycosylphosphatidylinositol membrane anchor. Biochem. J. 284:297

FOUCHIER F, BASTIANI P, BALTZ T, AUNIS D, ROUGON G (1988): Glycosylphosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of proteins in granules of chromaffin cells. Biochem. J. 256:103

GESSNER JE, GRUSSENMEYER T, KOLANUS W, SCHMIDT RE (1995a): The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor III-A and III-B genes. Molecular characterization of the promotor regions. J. Biol. Chem. 270:1350

GESSNER JE, GRUSSENMEYER T, SCHMIDT RE (1995b): Differentially regulated expression of human IgG Fc receptor class III genes. Immunobiol. 193:341

GNAGEY AL, FORTE M, ROSENBERY TL (1987): Isolation and characterization of acetylcholinesterase from Drosophila. J. Biol. Chem. 262:13290

GRANT SGN, JESSEE J, BLOOM FR, HANAHAN D (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs in Escherichia coli methylation restriction mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4645

GRITZ L and DAVIES J (1983): Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae. Gene 25:179

HAM TH (1937): Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: study of the mechanism of hemolysis in relation to acid-base equilibrium. N. Engl. J. Med. 217:915

HÄNSCH GM, HAMMER C, JIJI R, ROTHER U, SHIN ML (1983): Lysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes by acid-activated serum. Immunobiol. 164:118

HÄNSCH GM, SCHÖNERMARK S, ROELKE D (1987): Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria type III: Lack of an erythrocyte membrane protein restricting the lysis by C5b-9. J. Clin. Invest. 80:7

HARLOW E and LANE D (1988): Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press

HARTMANN RC, JENKINS DE Jr (1966): The „sugar-water“ test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* 275:155

HE HT, BARBET J, CHAIX JC, GORIDIS C (1986): Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of NCAM-120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule. *EMBO J.* 5:2489

HEMPERLY JJ, EDELMAN GM, CUNNINGHAM BA (1986): cDNA clones of neural cell adhesion molecule (N-CAM) lacking a membrane-spanning region consistent with evidence for membrane attachment via a phosphatidylinositol intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9822

HIDAKA, M, NAGAKURA S, HORIKAWA K, KAWAGUCHI T, IWAMOTO N, KAGIMOTO T, TAKATSUKI K, NAKAKUMA H (1993): Impaired glycosylation of glycosylphosphatidylinositol-anchor synthesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria leucocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191:571

HILLMEN P, BESSLER M, MASON PJ, WATKINS WM, LUZZATTO L (1993): Specific defect in N-acetylglucosamine incorporation in the biosynthesis of the glycosylphosphatidylinositol anchor in cloned cell lines from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5272

HIROSE S, RAVI L, HAZRA SV, MEDOF ME (1991): Assembly and deacetylation of N-acetylglucosaminyl-plasmanylinositol in normal and affected paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3762.

HIROSE S, RAVI L, PRINCE GM, ROSENFELD GM, SILBER R, ANDRESEN SW, HAZRA SV, MEDOF ME (1992a): Synthesis of mannosylglucosaminylinositol phospholipids in normal but not paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6025.

HIROSE S, PRINCE GM, SEVLEVER D, RAVI L, ROSENBERRY T, MEDOF ME (1992b): Characterization of putative glycoinositol phospholipid anchor precursors in mammalian cells: localization of phosphoethanolamin. *J. Biol. Chem.* 267:16968

HOCHULI E, BANNWARTH W, DÖBELI H, GENTZ R, STÜBER D (1988): Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelat adsorbent. *Biotechnology* 1321

HOLGIUN MH, WILCOX LA, BERNSHAW NJ, ROSSE WF, PARKER CJ (1990): The erythrocyte membrane inhibitor of reactive lysis: Effects of phosphatidylinositol-specific phospholipase C on the isolated and cell-associated protein. *Blood* 75:284

HOLLANDER N, SELVARAJ P, SPRINGER TA (1988): Biosynthesis and function of LFA-3 in human mutant cells deficient in phosphatidylinositol-anchored proteins. *J. Immunol.* 141:4283

HOMANS SW, FERGUSON MA, DWEK RA, RADEMACHER TW, ANAND R, WILLIAMS AF (1988): Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature* 333:269

HOPP TP, PRICKETT KS, PRICE V, LIBBY RT, MARCH CJ, CERRETTI P, URDAL DL, CONLON PJ (1988): A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Biotechnology* 6:1205

HUIZINGA TWJ, VAN DER SCHOOT CE, JOST C, KLAASEN R, KLEIJER M, VON DEM BORNE AEGKr, ROOS D, TETEROO PAT (1988): The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature* 333:667

HYMAN R (1985): Cell-surface-antigen mutants of haematopoietic cells. Tools to study differentiation, biosynthesis and function. *Biochem. J.* 225:27

HYMAN R (1988): Somatic genetic analysis of the expression of cell surface molecules. *Trends Genet.* 4:5

IIDA Y, TAKEDA J, MIYATA T, INOUE N, NISHIMURA J, KITANI T, MAEDA K, KINOSHITA T (1994): Characterization of genomic PIG-A gene: A gene for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 83:3126

IKEZAWA H, YAMANEGI M, TAGUCHI R, MIYASHITA T, OHYABU T (1976): Studies on phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C type) of *Bacillus cereus*. I. purification, properties and phosphatase-releasing activity. *Biochim. Biophys. Acta* 450:154

INOUE N, WATANABE R, TAKEDA J, KINOSHITA T (1996): PIG-C one of the three human genes involved in the first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* GPI2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226:193

ISHIHARA A, HOU Y, JACOBSON K (1987): The Thy-1 antigen exhibits rapid lateral diffusion in the plasma membrane of rodent lymphoid cells and fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1290

JANKNECHT R, DE-MARTYNOFF G, LOU L, HIPSKIND RA, NORDHEIM A, STUNNENBERG HG (1991): Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972

JONES NC, RIGBY PWJ, ZIFF EB (1988): Transacting protein factors and the regulation of eucaryotic transcription: Lessons from studies on DNA tumor viruses, genes and development. *Genes Dev.* 2:267

KAMITANI T, MENON AK, HALLAQ Y, WARREN CD, YEH (1992): Complexity of ethanolamine phosphate addition in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 267:24611

KAMITANI T, CHANG HM, ROLLINS C, WANECK GL, YEH ET (1993): Correction of the class H defect in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in Ltk- cells by a human cDNA clone. *J. Biol. Chem.* 268:20733

KAWAGOE K, TAKEDA J, ENDO Y, KINOSHITA T (1994): Molecular cloning of murine pig-a, a gene for GPI-anchor biosynthesis, and demonstration of interspecies conservation of its structure, function, and genetic locus. *Genomics* 23:566

KNAPP W, DÖRKEN B, GILKS WR, RIEBER EP, SCHMIDT RE, STEIN H, VON DEM BORNE AEG-KR (1989): *Leucocyte typing IV*, Oxford University Press.

KNIPPERS R, PHILIPPSEN P, SCHÄFER KP, FANNING E (1990): *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, 5. Aufl. S 393

KODUKULA K, GERBER LD, AMTHAUER R, BRINK L, UDENFRIEND S (1993): Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins in intact cells: specific amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and GPI attachment. *J. Cell. Biol.* 120:657

KORINEK V, STEFANOVA I, ANGELISOVA P, HILGERT I, HOREJSI V (1991): The human leucocyte antigen CD48 (MEM-102) is closely related to the activation marker Blast-1. *Immunogenetics* 33:108

KRAKOW JL, HERELD D, BANGS JD, HART GW, ENGLUND PT (1986): Identification of a glycolipid precursor of the *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 261:12147

KRANTZ DE, ZIPURSKY SL (1990): *Drosophila* chaoptin, a member of the leucine-rich repeat family, is a photoreceptor cell-specific adhesion molecule. *EMBO J.* 9:1969

KÜNG M, STADELMANN B, BRODBECK U, BÜTIKOFER P (1997). Addition of G418 and other aminoglycoside antibiotics to mammalian cells results in the release of GPI-anchored proteins. *FEBS Lett.* 409:333

KYTE J, DOOLITTLE RF (1982): A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105

LAEMMLI UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680

LeBEL D, BEATTIE M (1988): The major protein of pancreatic zymogen granule membranes (GP-2) is anchored via covalent bonds to phosphatidylinositol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154:818

LEIDICH SD, DRAPP D A, ORLEAN P (1994): A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *J. Biol. Chem.* 269:10193

LEIDICH SD, KOSTOVA Z, LATEK RR, COSTELLO LC, DRAPP DA, GRAY W, FASSLER JS, ORLEAN P (1995): Temperature-sensitive yeast GPI anchoring mutants *gpi2* and *gpi3* are defective in the synthesis of N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol. Cloning of the *GPI2* gene. *J. Biol. Chem.* 270:13029

LEMANSKY P, GUPTA D K, MEYALE S, TUCKER G, TARTAKOFF AM (1991): Atypical mannolipids characterize Thy-1-negative lymphoma mutants. *Mol. Cell. Biol.* 11:3879

LEWIS SM, DACIE JV (1967): The aplastic anaemia-paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. *Br. J. Haematol.* 13:236

LISANTI MP, CARAS IW, DAVITZ MA, RODRIGUEZ BOULAN (1989): A glycosylphospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 109:2145

LISANTI MP, RODRIGUEZ BOULAN E, SALTIEL AR (1990). Emerging functional roles for the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchor. *J. Membr. Biol.* 117:1

LOW MG, FINEAN JB (1977a): Release of alkaline phosphatase from membranes by a

phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem. J.* 167:281

LOW MG, FINEAN JB (1977b): Non-lytic release of acetylcholinesterase from erythrocytes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *FEBS Lett.* 82:143

LOW MG, KINCADE PW (1985): Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of the Thy-1 glycoprotein. *Nature* 318:62

LOW MG (1987). Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem. J.* 244:1

LOW MG (1989). The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 988:427

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951): Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265

LUPTON S, LEVINE AJ (1985): Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 5:2533

MANIATIS T, FRITSCH EF, SAMBROOK J (1982): *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press

MANIATIS T, GOODBOURN S, FISCHER JA (1987): Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236:1237

MARGOLSKEE RF, KAVATHAS P, BERG P (1988): Epstein-Barr Virus shuttle vector for stable episomal replication of cDNA expression libraries in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 8:2837

MARGOLSKEE RF (1992): Epstein-Barr Virus based expression vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158:67

MAYOR S, MENON AK, CROSS GAM, FERGUSON MAJ, DWEK RA, RADEMACHER TW (1990): Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins: I. Glycan structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *J. Biol. Chem.* 265:6164

McALLISTER L, GOODMAN CS, ZINN K (1992): Dynamic expression of the cell adhesion molecule fasciclin I during embryonic development in *Drosophila*. *Development* 115:267

MEDOF ME, WALTER EI, ROBERTS WL, HAAS R, ROSENBERRY TL (1986): Decay accelerating factor of complement is anchored to cells by a C-terminal glycolipid. *Biochem. J.* 25:6740

MENON AK, MAYOR S, FERGUSON MA, DUSZENKO M, CROSS GA. (1988): Candidate glycolipid precursor for the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 263:1970

MENON AK, MAYOR S, SCHWARTZ RT (1990): Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol lipids in *Trypanosoma brucei* : involvement of mannosylphosphoryldolichol as the mannose donor. *EMBO J.* 9:4249

MENON AK, EPPINGER M, MAYOR S, SCHWARTZ RT (1993): Biosynthesis of

glycosylphosphatidylinositol anchors in *Trypanosoma brucei*: the terminal phosphoethanolamine group is derived from phosphatidylethanolamine. *EMBO J.* 12:1907

MIKOL DD, STEFANSSON K (1988): a phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* 106:1273

MILLER AD and ROSMAN GJ (1989): Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques* 7:980

MIYATA T, TAKEDA J, IIDA Y, YAMADA N, INOUE N, TAKAHASHI M, MAEDA K, KITANI T, KINOSHITA T (1993): The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* 259:1318

MIYATA T, YAMADA N, IIDA Y, NISHIMURA J, TAKEDA J, KITANI T, KINOSHITA T (1994): Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* 330:249

NICHOLSON-WELLER A, DOUGLAS MD, SPICE DB, AUSTEN KF (1985): Deficiency of complement regulatory protein „decay accelerating factor“ on membranes of granulocytes, monocytes, and platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* 312:1091

NORRIS J, HALL S, WARE RE, KAMITANI T, CHANG HM, YEH E, ROSSE WF (1994): Glycosyl-phosphatidylinositol anchor synthesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: partial or complete defect in an early step. *Blood* 83:816

OSTENDORF T, NISCHAN C, SCHUBERT J, GRUSSENMEYER T, SCHOLZ C, ZIELINSKA SKOWRONEK M, SCHMIDT RE (1995): Heterogeneous PIG-A mutations in different cell lineages in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 85:1640

OSTENDORF T (Dissertation, 1995): Die molekulargenetische Charakterisierung des Glycosylphosphatidylinositol-Verankerungsdefektes in der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie.

PEARCE E and SHER A (1989): Three major surface antigens of *Schistosoma mansoni* are linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol. *J. Immunol.* 142:979

PETERS JH, BAUMGARTEN H (Herausgeber) (1990): Monoklonale Antikörper. Herstellung und Charakterisierung. 2. Auflage. Springer Verlag. S. 204

PLESNER T, HANSEN NE, CARLSEN K (1990): Estimation of PI-bound proteins on blood cells from PNH patients by quantitative flow cytometry. *Br. J. Haematol.* 75:585

PLOUG M, RONNE E, BEHRENDT N, JENSEN AL, BLASI F (1991). Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 266:1926

PU M, MA L, OHKUSU K, ISOBE KI, TAGUCHI R, IKEZAWA H, HAMAGUCHI M, NAKASHIMA I (1995): Direct evidence of involvement of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the heavy metal-mediated signal delivery into T lymphocytes. *FEBS Lett.* 361:295

PUOTI A, DESPONDS C, FANKHAUSER C, CONZELMANN A (1991): Characterization of glycopospholipid intermediate in the biosynthesis of glycoposphatidylinositol anchors

accumulating in the Thy-1-negative lymphoma line SIA-b. *J. Biol. Chem.* 266:21051

PUOTI A and CONZELMANN A (1992): Structural characterization of free glycolipids which are potential precursors for glycoposphatidylinositol anchors in mouse thymoma cell lines. *J. Biol. Chem.* 267:22673

PUOTI A and CONZELMANN A (1993): Characterization of abnormal free glycoposphatidylinositols accumulating in mutant lymphoma cells of classes B, E, F, and H. *J. Biol. Chem.* 268:7215

Qiagen (1992): The QIAexpressionist

RAVETCH JV, PERUSSIA B (1989): Alternative membrane forms of Fc γ RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils: cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J. Exp. Med.* 170:481

ROBERTS WL, MYHER JJ, KUKSIS A, LOW MG, ROSENBERRY TL (1988): Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase: palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 263:18766

ROSSE WF, PARKER CJ (1985): Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clin. Haematol.* 14:105

ROSSE WF (1990a): Phosphatidylinositol-linked proteins and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 75:1595

ROSSE WF (1990b): Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and decay-accelerating factor. *Annu. Rev. Med.* 41:431

ROTOLO B, LUZZATTO L (1989): Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clin. Haematol.* 3:113

SALVESEN G, PARKES C, ABRAHAMSON M, GRUBB A, BARRETT AJ (1986): Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem. J.* 234:429

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463

SCHNEIDER P, FERGUSON MA, McCONVILLE MJ, MEHLERT A, HOMANS SW, BORDIER C (1990): Structure of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Leishmania major* promastigote surface protease. *J. Biol. Chem.* 265:16955

SCHÖNBÄCHLER M, HORVATH A, FASSLER J, RIEZMAN H (1995): The yeast *spt14* gene is homologous to the human *PIG-A* gene and is required for GPI anchor synthesis. *EMBO J.* 14:1637

SCHUBERT J, UCIECHOWSKI P, DELANY P, TISCHLER HJ, KOLANUS W, SCHMIDT RE (1990): The *PIG*-anchoring defect in NK lymphocytes of PNH patients. *Blood* 76:1181

SCHUBERT J, ALVARADO M, UCIECHOWSKI P, ZIELINSKA-SKOWRONEK M,

FREUND M, VOGT HG, SCHMIDT RE (1991): Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br. J. Haematol.* 79:487

SCHUBERT J, SCHMIDT RE (1992): Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie. Diagnostik mit fluoreszenz-aktivierter Zellanalyse. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 117:985

SCHUBERT J, SCHMIDT RE, MEDOF ME (1993): Regulation of glycoinositol phospholipid assembly in human lymphocytes. Absent mannosyl synthesis in affected T and natural killer cell lines from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients. *J. Biol. Chem.* 268:6281

SCHUBERT J, VOGT HG, ZIELINSKA-SKOWRONEK M, FREUND M, KALTWASSER JP, HOELZER D, SCHMIDT RE (1994): Development of the glycosylphosphatidylinositol-anchoring defect characteristic for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in patients with aplastic anemia. *Blood* 83:2323

SCHUBERT J, OSTENDORF T, SCHMIDT RE (1994): Biology of GPI-anchor structures and pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Immunol. Today* 15:299

SCHUBERT J, OSTENDORF T, NISCHAN C, SCHMIDT RE (1995): Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie-ein erworbener genetischer Defekt der hämatopoietischen Stammzelle. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 120:31

SCHWARZ RT, DATEMA R (1982): The inhibition of the dolichol pathway of proteinglycosylation. *Meth. Enzym.* 83:432

SEED B (1987): An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature* 329:842

SELVARAJ P, DUSTIN ML, SILBER R, LOW MG, SPRINGER TA (1987): Deficiency of lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3) in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Functional correlates and evidence for a phosphatidylinositol membrane anchor. *J. Exp. Med.* 166:1011

SELVARAJ P, ROSSE WF, SILBER R, SPRINGER TA (1988): The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature* 333:565

SHIMIZU Y, KOLLER B, GERAGHTY D, ORR H, SHAW S, KAVATHAS P, DeMARS R (1986): Transfer of cloned human class I major histocompatibility complex genes into HLA mutant human lymphoblastoid cells. *Mol. Cell. Biol.* 6:1074

SIMMONS DL, TAN S, TENEN DG, NICHOLSON-WELLER A, SEED B (1989): Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 73:284

SIPOS G, PUOTI A, CONZELMANN A (1994): Glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: absence of ceramides from complete precursor glycolipids. *EMBO J.* 13:2789

SLEIN MW and LOGAN GF (1960): Mechanism of action of the toxin of *Bacillus anthracis*. I. Effect in vivo on some blood serum components. *J. Bacteriol.* 80:77

SLEIN MW and LOGAN GF (1962): Mechanism of action of the toxin of *Bacillus anthracis*. II. Alkaline phosphatemia produced by culture filtrates of various bacilli. *J.*

Bacteriol. 83:359

SLEIN MW and LOGAN GF (1963): Partial purification and properties of two phospholipases of *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 85:369

SLEIN MW and LOGAN GF (1965): Characterization of the phospholipase of *Bacillus cereus* and their effects on erythrocytes, bone, and kidney cells. J. Bacteriol. 90:69

SOUTHERN PJ und BERG P (1982): Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. J. Mol. Appl. Gen. 1:327

STADLER J, KEENAN TW, BAUER G, GERISCH G (1989): The contact site A glycoprotein of *Dictiostelium discoideum* carries a phospholipid anchor of a novel type. EMBO J. 8:371

STAHL N, BORCHELT DR, HSIAO K, PRUSINER B (1987): Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. Cell 51:229

STAUNTON DE, FISHER RC, LEBEAU MM, LAWRENCE JB, BARTON DE, FRANCKE U, DUSTIN M, THORLEY-LAWSON DA (1989): Blast-1 possesses a glycosylphosphatidylinositol (GPI) membrane anchor, is related to LFA-3 and QX-45, and maps to chromosome 1q21-23. J. Exp. Med. 169:1087

STEFANOVA I, HOREJSI V, ANSOTEGUI IJ, KNAPP W, STOCKINGER H (1991): GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. Science 254:1016

STEVENS VL, RAETZ CRH (1991): Defective glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis in extracts of three Thy-1 negative lymphoma cell mutants. J. Biol. Chem. 266:10039

STEVENS VL (1993): Regulation of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis by GTP. J. Biol. Chem. 268:9718

STEVENS VL (1995): Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. Biochem. J. 310:3361

STRÜBING P (1882): Paroxysmale Hämoglobinurie. Dtsch. Med. Wochenschr. 8:1

SUGDEN B, MARSH K, YATES J (1985): A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus. Mol. Cell. Biol. 5:410

SUGIYAMA, E, DEGASPERI R, URAKAZE M, CHANG HM, THOMAS LJ, HYMAN R, WAREN CD, YEH ET (1991): Identification of defects in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in the Thy-1 expression mutants. J. Biol. Chem. 266:12119

SUTHERLAND LC, WILLIAMS GT (1997): Viral promoter expression in CEM-C7 and Jurkat human T-lymphoid cells. J. Immunol. Methods 207:179

TAKAHASHI M, TAKEDA J, HIROSE S, HYMAN R, INOUE N, MIYATA T, UEDA E, KITANI T, MEDOF ME, KINOSHITA T (1993): Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. J. Exp. Med. 177:51

TAKEDA J, MIYATA T, KAWAGOE K, IIDA Y, ENDO Y, FUJITA T, TAKAHASHI M, KITANI T, KINOSHITA T (1993): Deficiency of the GPI anchor caused by somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 73:703

TAMM A, KISTER A, NOLTE KU, GESSNER JE, SCHMIDT RE (1996): The IgG binding site of human FcγRIIIB receptor involves CC' and FG loops of the membrane-proximal domain. *J. Biol. Chem.* 271:3659

THOMAS J, WEBB W, DAVITZ MA, NUSSENZWEIG V (1987): Decay accelerating factor diffuses rapidly on HeLa cell surfaces. *Biophys. J.* 51:522

TIEDE A, SCHUBERT J, NISCHAN C, JENSEN I, WESTFALL B, TARON CH, ORLEAN P, SCHMIDT RE (1998): Human and mouse Gpi1p homologs that restore GPI membrane anchor biosynthesis in yeast mutants. *Biochem. J.* (*im Druck*)

TOMAVO S, SCHWARZ RT, DUBREMETZ JF (1989). Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol. Cell. Biol.* 9:4576

TSE AGD, BARCLAY AN, WATTS A, WILLIAMS AF (1985): A glycopospholipid tail at the carboxyl terminus of the Thy-1 glycoprotein of neurons and thymocytes. *Science* 230:1003

TUMEN J, KLINE LB, FAY JW, SCULLIN DC, REISNER EG, ROSSE WF, HUANG AT (1980): Complement sensitivity of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria bone marrow cells. *Blood* 55:1040

UDENFRIEND S and KODUKULA K (1995): How glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* 64:563

UNWIN N, HENDERSON R (1984): The structure of proteins in biological membranes. *Sci. Am.* 250:78

URAKAZE M, KAMITANI T, DEGASPERI R, SUGIYAMA E, CHANG HM, WARREN CD, YEY ET (1992): Identification of a missing link in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 267:6459

VAN DER SCHOOT CE, HUIZINGA TWJ, VAN'T VEER KORTHOFF P, WIJMANS R, PINKSTER J, VON DEM BORNE AEGKr (1990): Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. *Blood* 76:1853

VAUGHAN HA, HENNING MM, PURCELL DFJ, MCKENZIE IFC, SANDRIN MS (1991): The isolation of cDNA clones for CD48. *Immunogenetics* 33:113

VEILLETTE A, BOOKMAN MA, HORAK EM, BOLEN JB (1988): The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Cell* 55:301

VERMA RS, GULLAPALLI S, ANTONY AC (1992): Evidence that the hydrophobicity of isolated, in situ, and de novo-synthesized native human placental folate receptors is a function of glycosyl-phosphatidylinositol anchoring to membranes. *J. Biol. Chem.* 267:4119

VIDUGIRIENE J and MENON AK (1993): Early lipid intermediates in glycosyl-

phosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER and located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer. *J. Cell. Biol.* 121:987

VIDUGIRIENE J and MENON AK (1994): The GPI anchor of cell-surface proteins is synthesized on the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 127:333

VIDUGIRIENE J and MENON AK (1995): Soluble constituents of the ER lumen are required for GPI anchoring of a model protein. *EMBO J.* 14:4686

VOSSSEN JH, RAM AF, KLIS FM (1995): Identification of SPT14/CWH6 as the yeast homologue of hPIG-A, a gene involved in the biosynthesis of GPI anchors. *Biochim. Biophys. Acta* 1243:549

WARE RE, ROSSE WF, HOWARD TA (1994): Mutations within the Piga gene in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 83:2418

WATANABE R, KINOSHITA T, MASAKI R, YAMAMOTO A, TAKEDA J, INOUE N (1996): PIG-A and PIG-H, which participate in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, form a protein complex in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 271:26868

WERFEL T, UCIECHOWSKI P, TETTEROO PAT, KURRLE R, DEICHER H, SCHMIDT RE (1989): Activation of cloned human natural killer cells via Fc γ RIII. *J. Immunol.* 142:1102

WICKNER WT, LODISH HF (1985): Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* 230:400

WILLIAMS AF, TSE AG-D, GAGNON J (1988): Squid glycoproteins with structural similarities to Thy-1 and Ly-6 antigens. *Immunogenetics* 27:265

WILLIAMS AF and BARCLAY AN (1988): The immunoglobulin superfamily: domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6:381

WHITLOW M, IIDA K, MARSHALL P, SILBER R, NUSSENZWEIG V (1993): Cells lacking glycan phosphatidylinositol-linked proteins have impaired ability to vesiculate. *Blood* 81:510

YAMASHINA M, UEDA E, KINOSHITA T, TAKAMI T, OJIMA A, ONO H, TANAKA H, KONDO N, ORII T, OKADA N, OKADA H, INOUE K, KITANI, T (1990): Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* 323:1184

YANISCH-PERRON C, VIEIVA J, MESSING J (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103

YATES J, WARREN N, REISSMAN D, SUGDEN B (1984): A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids with latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3806

YATES J, WARREN N, SUGDEN B (1985): Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313:811

YOKOYAMA S, STAUNTON D, FISHER R, AMIOT M, FORTIN JJ, THORLEY-LAWSON DA (1991): Expression of the Blast-1 activation/adhesion molecule and its identification as

CD48. J. Immunol. 146:2192

ZENTGRAF H, FREY M, SCHWINN S, TESSMER C, WILLEMANN B, SAMSTAG Y, VELHAGEN I (1995): Detection of histidine-tagged fusion proteins by using a high-specific mouse monoclonal anti-histidine tag antibody. Nucleic Acids Res. 23:3347

6 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	RNA komplementäre DNA Kopie
Ci	Curie
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
DAF	<i>Decay accelerating factor</i> (CD55)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EBNA	EBV-spezifisches nukleäres Antigen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Farad
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
G	Guanin
GαM	Ziege anti-Maus
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
μ	micro
M	Molar
mg	Milligramm
Min.	Minute
MIRL	<i>Membrane inhibitor of reactive lysis</i> (CD59)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
n	nano

nm	Nanometer
N-CAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (<i>Open reading frame</i>)
p	pico
p.A.	per Analysis
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Phosphatidylinositol
PI-PLC	phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNH	paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
RF	Reaktionsfeld
RNA	Ribonukleinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
RSV	Rous-Sarkoma-Virus
Rt	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u	Unit
UDP	Uracildiphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
VSG	variantes Oberflächenglycoprotein (<i>variant surface glycoprotein</i>)
(v/v)	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
(w/v)	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
WT	Wildtyp

7 Publikationen

MEYER K, NISCHAN C, MÜLLER-BERGHAUS G, VON DER AHE D (1992) (*Abstract*): Gene regulation of thrombomodulin. *Annals of Hematology, Supplement to Vol. 64:12*

VON DER AHE D, NISCHAN C, KUNZ C, OTTE J, KNIES U, ODERWALD H, WASYLIK B (1993): Ets transkription factor binding site is required for positive and TNF alpha-induced negative promotor regulation. *Nucleic Acids Res. 21:5636*

OSTENDORF T, NISCHAN C, SCHUBERT J, GRUSSENMEYER T, SCHOLZ C, ZIELINSKA-SKOWRONEK M, SCHMIDT RE (1995): Heterogeneous PIG-A mutations in different cell lineages in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood 85:1640*

SCHUBERT J, OSTENDORF T, NISCHAN C, SCHMIDT RE (1995): Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie: Ein erworbener genetischer Stammzelldefekt. *Dtsch. Med. Wochenschr. 120:3145*

BASTISCH I, NISCHAN C, DECKERT M, BERNARD A, SCHMIDT RE, SCHUBERT J (1996)(*Abstract*): A GPI-anchor deficient mutant cell line and its use to study gene therapy approaches *in vitro*. *Immunobiol. 196:276*

TIEDE A, SCHUBERT J, NISCHAN C, JENSEN I, WESTFALL B, TARON CH, ORLEAN P, SCHMIDT RE (1998): Human and mouse Gpi1p homologs that restore GPI membrane anchor biosynthesis in yeast mutants. *Biochem. J. (im Druck)*

NISCHAN C, TIEDE A, SCHUBERT J, SCHMIDT RE (1998): Characterization of the enzymatic complex for the first step in glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis. *Biol. Chem. (in Vorbereitung)*

8 Lebenslauf

Name	Claudia Nischan
Geburtsdatum	24.03.1966
Geburtsort	Bremerhaven
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1972 - 1974	Grundschule Gaußschule, Bremerhaven
1974 - 1982	Gymnasium Lessingschule, Bremerhaven
1982 - 1985	Gymnasium Bürgermeister Smidt, Bremerhaven

Hochschulbildung

1985 - 1991	Studium der Biologie mit Schwerpunkten Genetik, Zoologie, Molekularbiologie und Tierphysiologie an der Justus-Liebig-Universität Giessen
Februar - April 1989	Auslandspraktikum im Institut INVEMAR in Santa Marta, Kolumbien
1991 - 1992	Diplomarbeit zum Thema „Regulation des humanen Thrombomodulin-Gens“ am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Kerckhoff-Klinik GmbH, Abteilung Haemostaseologie und Transfusionsmedizin, Bad Nauheim
August 1992	Diplom („sehr gut“) an der Justus-Liebig-Universität Giessen
seit Januar 1993	Anfertigung der vorliegenden Dissertation an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Klinische Immunologie (Leiter: Prof. Dr. R. E. Schmidt)

9 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Dr. Jörg Schubert danke ich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Walter Müller danke ich für die spontane Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Brigitte Decker und ihren Mitarbeiterinnen aus der Abteilung Zellbiologie und Elektronenmikroskopie der Medizinischen Hochschule Hannover für ihre engagierte Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Präparate.

Großen Dank auch an Tammo, Anu, Iska, Ingo, Andreas, Carsten, Frank, Gundi, Regine, Bettina und alle anderen für die vielen Diskussionen, die vielen TGIFs und den Spaß im Labor.

Für technische Unterstützung danke ich Claudia Scholz, Margot Zielinska-Skowronek, Franziska Bode, Sabine Braun, Roland Jacobs, Anja Ziolek und allen, die irgendwie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem Routine-Labor danke ich für ständig verfügbare Kekse.

Claudia Völzke sei gedankt für ihre Treue seit der Schulzeit.

Ein herzliches Dankeschön natürlich auch an meine Eltern, Gerty und Horst Nischan, ohne deren Unterstützung das Studium der Biologie und die Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit verdanke ich meinem Lebenspartner Carsten. Ich danke ihm für das Ertragen meiner schlechten Laune, die ständige Motivation, die Bereitstellung seines Schreibtisches samt Computer, die vielen „Chinamann-Besuche“ und für das „alles wird gut“.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „ Expression und Charakterisierung des PIG-A-Proteins“ selbständig verfaßt sowie alle benutzten Hilfsmittel und Institutionen vollständig angegeben habe. Ferner versichere ich, daß diese Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde. Die Angaben, die ich anderen Untersuchungen dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Teile der Arbeit wurden oder werden in folgenden Veröffentlichungen publiziert:

OSTENDORF T, NISCHAN C, SCHUBERT J, GRUSSENMEYER T, SCHOLZ C, ZIELINSKA-SKOWRONEK M, SCHMIDT RE (1995): Heterogeneous PIG-A mutations in different cell lineages in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 85:1640

TIEDE A, SCHUBERT J, NISCHAN C, JENSEN I, WESTFALL B, TARON CH, ORLEAN P, SCHMIDT RE (1998): Human and mouse Gpi1p homologs that restore GPI membrane anchor biosynthesis in yeast mutants. *Biochem. J.* (*im Druck*)

NISCHAN C, TIEDE A, SCHUBERT J, SCHMIDT RE (1998): Characterization of the enzymatic complex for the first step in glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis. *Biol. Chem.* (*in Vorbereitung*)

Hannover, Mai 1998