

Facharbeit

aus dem Fach

Chemie

Thema: Untersuchung der Proteinglykosylierung am Beispiel des
Eisenstoffwechselproteins Hämojuvelin

Verfasser: Andreas Lang

Leistungskurs: 3C1

Kursleiter: LAss K. Gallenberger

Abgabetermin: 30. Januar 2009

Erzielte Note :

in Worten:

Erzielte Punkte:

in Worten:

Abgabe beim Kollegstufenbetreuer am:

.....

(Unterschrift der Kursleiters)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---|--|--------|
| 1 | ZIELSETZUNG DER FACHARBEIT..... | - 3 - |
| 2 | EINLEITUNG..... | - 4 - |
| | 2.1. Übersicht über den menschlichen Eisenstoffwechsel..... | - 4 - |
| | 2.2. Funktion von Hämojuvelin (HJV) und Heparin..... | - 6 - |
| | 2.3. Struktur von HJV..... | - 8 - |
| | 2.4. Glykosylierung von Membranproteinen..... | - 9 - |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN..... | - 11 - |
| | 3.1. Material..... | - 11 - |
| | 3.2. Methoden..... | - 11 - |
| | 3.2.1. Proteinisolation aus HJV exprimierenden Zellen..... | - 11 - |
| | 3.2.2. Immunzytochemischer Nachweis von HJV mittels FACS Messung | - 14 - |
| | 3.2.3. Enzymatische Deglykosylierung..... | - 15 - |
| | 3.2.4. Untersuchung der Glykosylierung von HJV mittels Western Blot.... | - 16 - |
| 4 | AUSWERTUNG UND ERGEBNISSE..... | - 20 - |
| | 4.1. HJV Nachweis auf lebenden Zellen (FACS)..... | - 20 - |
| | 4.2. Proteinkonzentration von zellulärem HJV..... | - 21 - |
| | 4.3. Protein-/Glykosylierungsanalytik von gereinigtem löslichen HJV..... | - 22 - |
| | 4.4. Protein-/Glykosylierungsanalytik von zellulärem HJV..... | - 24 - |
| 5 | DISKUSSION..... | - 25 - |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS..... | - 27 - |
| 7 | DANKSAGUNG..... | - 29 - |
| 8 | SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG..... | - 30 - |
| 9 | ANHANG..... | - 31 - |

1 Zielsetzung der Facharbeit

Glykoproteine sind aus einer Polypeptidkette und kovalent gebundenen Zuckermolekülen aufgebaut. Die Kohlenhydratseitenketten können als N-Glykane an den Stickstoff von Asparagin oder als O-Glykane an den Sauerstoff der Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin gebunden sein und zeichnen sich aufgrund unterschiedlicher Monosaccharidbausteine durch eine Mikroheterogenität aus. Die Glykosylierung kann je nach Protein verschiedene zelluläre Funktionen erfüllen. Während meines zweiwöchigen Praktikums bei der Firma Roche Diagnostics GmbH erhielt ich einen Einblick in die pharmazeutische Forschung am Eisenstoffwechselprotein Hämojuvelin. Hervorgehend aus mehreren Studien ist bekannt, dass Mutationen dieses Proteins Störungen des Eisenstoffwechsels zur Folge haben, wodurch verschiedene Krankheiten verursacht werden. Außerdem wird angenommen, dass dieses Eiweiß mit unterschiedlichen Glykosylierungen kovalent modifiziert ist.

Ziel dieser Facharbeit war die Untersuchung bzw. der Nachweis von Proteinglykosylierungen am Beispiel des Eisenstoffwechselproteins Hämojuvelin. Hierzu wurden sowohl sezerniertes, lösliches HJV als auch Proteinlysate aus HEK293 Hämojuvelin-transfizierten Zellen verwendet. Diese Proteine wurden einer Deglykosylierungsreaktion mittels N-Glykosidasen unterworfen. Im ersten Teil dieser Arbeit wird zunächst auf den menschlichen Eisenstoffwechsel eingegangen, sowie die Rolle der Peptide Hämojuvelin und Heparin im Eisenhaushalt näher erläutert. Dann wird die Struktur von Hämojuvelin beschrieben und eine Übersicht zur Glykosylierung von Membranproteinen gegeben, mit der sich der praktische Teil auseinandersetzt.

Anschließend werden die beim Praktikum angewandten Methoden erklärt und die erzielten Ergebnisse ausgewertet. Zuletzt werden die gewonnenen Erkenntnisse diskutiert und zusammengefasst.

2 EINLEITUNG

2.1. Übersicht über den menschlichen Eisenstoffwechsel

Das Eisenion ist mit seiner Fähigkeit zwischen seinen Oxidationszuständen +II und +III wechseln zu können für den menschlichen Organismus essentiell. Es ist fundamental für die Funktionstüchtigkeit verschiedenster Proteine bei bedeutenden biochemischen Reaktionen. Durchschnittlich besitzt eine Person 4-5 g des wichtigen Spurenelements. Besonders notwendig ist es für den Sauerstofftransport im Blut, die Sauerstoffspeicherung im Muskel, die Katalyse von Redoxreaktionen und Elektronentransportprozesse. Eisen liegt vorwiegend komplexiert mit einem Porphyrinring als Häm-molekül vor. Dieses Molekül besitzt die Eigenschaft Sauerstoff zu binden und wird für die Funktionsweise des Hämoglobins und des Myoglobins als Sauerstofftransporter bzw. Sauerstoffspeicher genutzt. Entgegen aller Vorteile bringt das Eisen mit seinen besonderen Charakteristika auch seine Gefahr. Eisen II-Ionen setzen im Wasser als Katalysator hochtoxische Hydroxylradikale aus Sauerstoff frei.¹ Eine genaue Kontrolle des Mechanismus der Eisenaufnahme in den Organismus, der zellulären Eisenaufnahme und des Eisentransportes ist daher zwingend erforderlich. Gerät der Eisenhaushalt etwa aufgrund von Entzündungen, Tumoren oder einfach bedingt durch das Alter aus dem Gleichgewicht, kommt es häufig zu der Erkrankung der Anämie. Die Gründe für eine Anämie sind vielfältig, bedeutendste Ursache ist jedoch eine Störung der Blutbildung aufgrund eines Eisenmangels. Der Begriff „Anämie“ bezeichnet den Abfall der Hämoglobinkonzentration oder Verminderung der Erythrozyten im peripheren Blut.² Der Eisenstoffwechsel ist nahezu komplett aufgeklärt, allerdings gilt es nun jene Proteine genauer zu erforschen, welche für die Feinsteuerung des Eisenstoffwechsels verantwortlich sind, um so die verschiedenen Arten der Anämie spezifisch behandeln zu können. Folgende Grafik (siehe Abb. 1) zeigt die Eisenverteilung des menschlichen Körpers. Sie zeigt, dass aufgrund des Absterbens der Erythrozyten täglich ca. 20 mg Eisen für die Neusynthese der Blutkörperchen bereitgestellt werden müssen. Davon wird der Hauptteil durch die Makrophagen gewonnen, indem diese das Hämeisen der gealterten Erythrozyten aufnehmen und wiederaufbereiten. Nur ein kleiner Bruchteil des Eisens von 1-2 mg

¹ vgl. Dassler 2005, Seite 1-2

² vgl. Beutel/Heil/Ganser 2003, Seite 1f

wird durch die Nahrung des Menschen bereitgestellt. In den Zellen wird das Eisen im Proteinkomplex Ferritin gespeichert und kann nur durch das Eisentransportprotein Ferroportin wieder aus der Zelle exportiert werden.

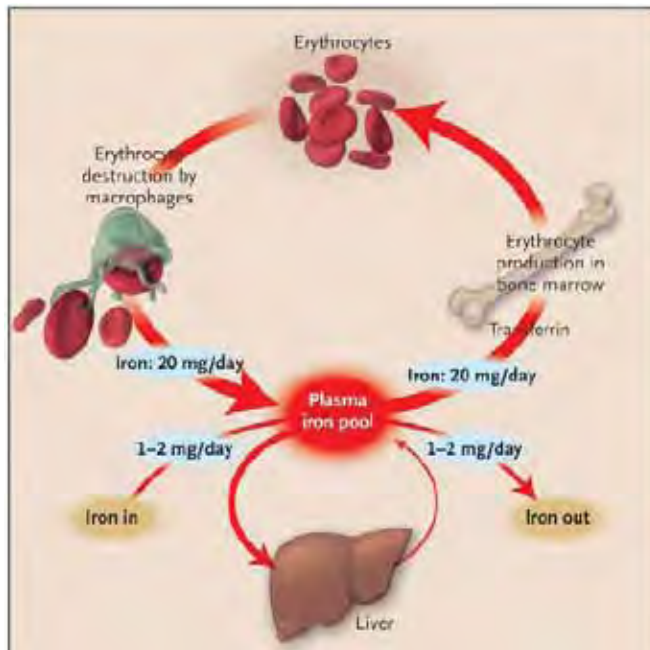


Abb. 1: Eisenverteilung des menschlichen Körpers³

Nachdem das Eisen aus den Enterocyten des Darms in den Blutkreislauf exportiert wurde, wird es sofort an Transferrin gebunden. Lediglich 30% der Eisenbindungsstellen aller Transferrinmoleküle des Organismus sind gesättigt, so dass der größte Teil der Transferrine somit ständig ausreichend als freier Akzeptor zur Verfügung steht. Das mit Fe³⁺ beladene Transferrin zirkuliert im Blut und sorgt so für die Eisenversorgung der Zellen. Die Aufnahme vom Eisen in die Zelle erfolgt über den Transferrinrezeptor (TfR). Das eisenbeladene Transferrin bindet an der Zelloberfläche an den Rezeptor. In der Zelle aufgenommen, wird das Eisen vorwiegend in dem hoch konservierten cytosolischen Protein Ferritin gespeichert⁴ (siehe Abb. 2).

³ vgl. Pietrangelo 2004, Seite 1, Figur 1

⁴ vgl. Dassler 2005, Seite 3

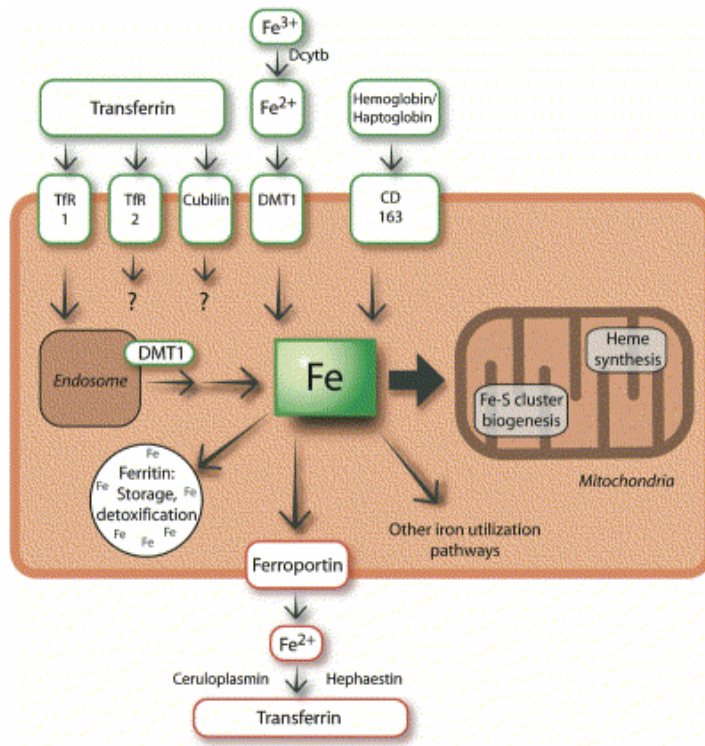


Abb. 2: Übertritt des Eisens vom Blutkreislauf in die Zelle⁵

2.2. Funktion von Hämajuvelin (HJV) und Heparin

Um einen ausgeglichenen Eisenspiegel im Körper regulieren zu können, gibt es eine Informationsübertragung, welche extrazellulär über Proteinsignalmoleküle erfolgt. Heparin übernimmt dabei als zentrales eisenregulierendes Hormon eine entscheidende Rolle. Es ist ein Peptid bestehend aus 25 Aminosäuren, welches in den Hepatozyten der Leber synthetisiert wird. Heparin ist ein negativer Regulator der zellulären Eisenabgabe und entfaltet seine Wirkung, indem es an das Eisentransportprotein Ferroportin bindet und dessen Internalisierung und Degradation verursacht, so dass kein Eisen mehr aus der Zelle exportiert werden kann⁶(siehe Abb. 3). Ein erhöhter Heparin Spiegel hemmt also den Übertritt des im Ferritin gespeicherten Eisens in den Blutkreislauf, indem es den Abfluss von gespeichertem Eisen aus Milz (Makrophagen) und Leber (Hepatozyten), durch Ausschaltung des dafür benötigten Ferroportins unterbindet (siehe Abb. 4).

⁵ vgl. Hentze 2004, Seite 286

⁶ vgl. De Domenico 2007, Seite 76

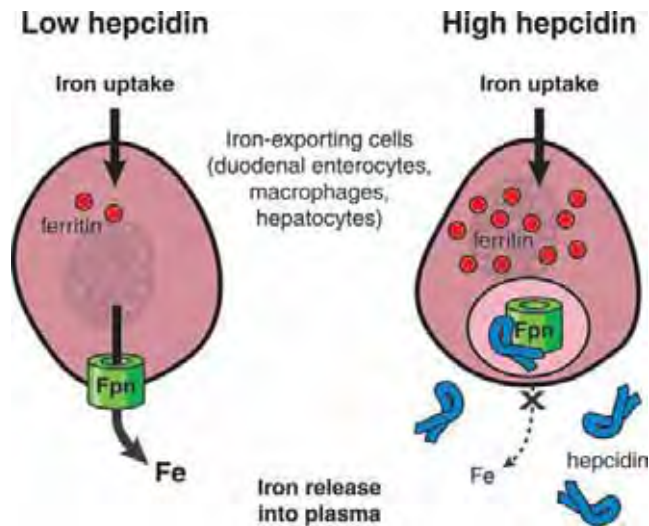


Abb. 3: Wirkungsweise von Hepcidin; Fpn =Ferroportin⁷

Jegliche pathologische Änderung der Hepcidin Regulation verursacht eine Fehlsteuerung des Eisensstoffwechsels, und kann angeborene Hämochromatose und Anämie verursachen.

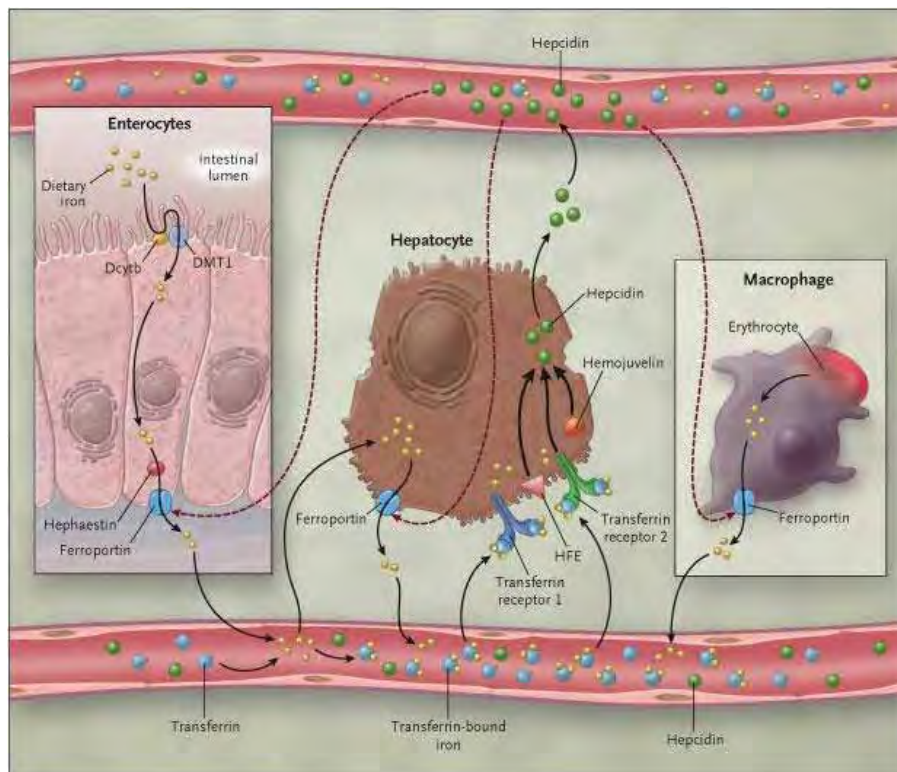


Abb. 4: Funktionsweise der Eisenstoffwechselproteine HJV, Hepcidin und Ferroportin⁸

Die Expression von Hepcidin wird durch das Protein Hämöjuvelin positiv reguliert. Mutationen des Gens für HJV korrelieren mit niedrigen Hepcidin Konzentrationen und

⁷ vgl. Ganz 2007, Seite 396

⁸ vgl. Fleming 2005, Seite 2388

haben erhöhte Eisenspiegel zur Folge. Hämajuvelin gehört zur Familie der **repulsive guidance molecules (RGM)** und ist ein Corezeptor für **bone morphogenetic proteins (BMPs)**, der nach Bindung von BMPs die Expression von Heparin erhöht (siehe Abb.5). Fehlfunktionen von HJV aufgrund von Mutationen unterbrechen die Signalwirkung von BMPs, resultieren in reduzierter Heparin Konzentration, erhöhen damit die Eisenabgabe von Zellen des Darms, den Makrophagen der Milz und den Hepatozyten der Leber in den Blutkreislauf und haben Eisenüberladung (Hämochromatose = Eisenspeicherkrankheit) zur Folge.⁹

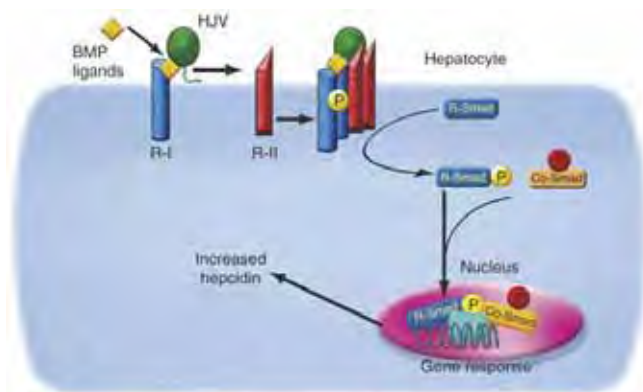


Abb. 5: Signalkaskade von Rezeptoren des Eisenstoffwechsels¹⁰

2.3. Struktur von HJV (nach der Kuninger-Hypothese)

2006 untersuchte David Kuninger das Eisenstoffwechselprotein Hämajuvelin anhand von Skelettmuskelzellen. Die Synthese der Hämajuvelin Moleküle findet in den Myoblasten statt. Die Synthese der Hämajuvelin Moleküle findet in den Myoblasten statt. Dabei werden aus nur einer einzigen mRNA mehrere Isoformen gebildet, welche zwei verschiedene Molekülvarianten aufzeigen. Nach der Addition eines GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-Ankers werden beide Varianten zur Zelloberfläche transportiert. Der Unterschied der beiden Formen liegt einzig in einer proteolytischen Spaltstelle. Die ungespaltene Isoform besteht aus einem Polypeptid voller Länge und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 45 kDa. Das gespaltene Hämajuvelin besteht aus einem N-terminalen (ca. 30 kDa) und einem C-terminalen (ca. 15 kDa) Fragment. C-Terminus und N-Terminus werden jedoch durch Disulfidbrücken zwischen den Molekülketten zusammengehalten (siehe Abb. 6).

⁹ vgl. Anderson 2006, Seite 503

¹⁰ vgl. Babitt 2006, Seite 535

Beide Formen des HJV sind an drei eindeutigen Stellen N-glykosyliert. Die HJV spaltende Protease sowie die Lokalisation des Spaltungsprozesses sind noch nicht gänzlich aufgeklärt. Aufgrund des größeren Vorkommens der gespaltenen Form, ist die proteolytische Aktivität in den Zellen in hohem Maße vorhanden.¹¹

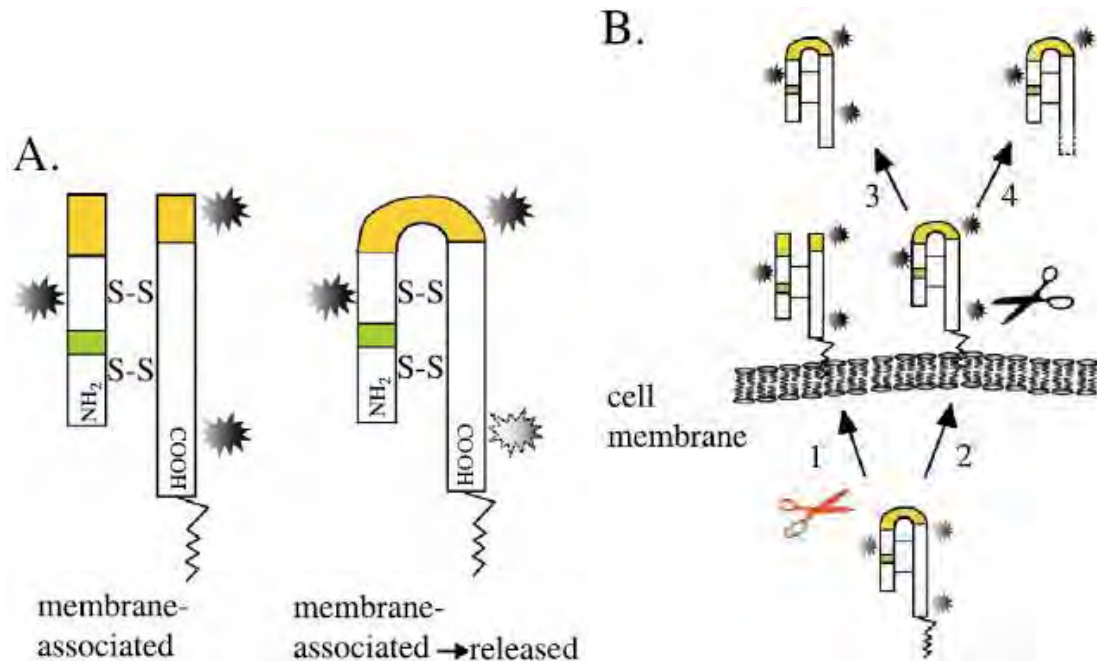


Abb. 6: Isoformen des Hämojuvelin, rechts: nach Behandlung mit einem Spaltenzym¹²

2.4. Glykosylierung von Membranproteinen

Nach Abschluss der Synthese eines Proteins im endoplasmatischen Retikulum, wird das Produkt von der Zelle weiteren Veränderungen unterzogen. Während dieses Vorgangs werden bestimmte Proteine mit Oligosaccharidketten versehen. Glykosyliert sind sowohl viele sezernierte Proteine, aber auch integrale Membranproteine und Proteine, die auf der extrazellulären Seite der Membran sitzen. Länge, Ladung und Sequenz der Zuckerkette bestimmter Proteine sind nicht konstant, sondern diese hängen von Spezies, Gewebe, Alter und Zustand des Organismus ab. Ein glykosyliertes Protein besteht in der Regel aus einer Reihe von unterschiedlichen Glykoformen, d.h. Proteinen mit gleicher Polypeptidsequenz aber verschiedenen Zuckerresten.

¹¹ vgl. Kuninger 2006, Seite 3278-3281

¹² vgl. Kuninger 2006, Seite 3280

Ein bestimmtes Glykoprotein kann N- und/oder O-glykosyliert sein (siehe Abb. 7), jedoch wird nicht jedes Glykosylierungsmotiv eines Proteins auch glykosyliert. Lange Zeit war die Rolle der Proteinglykosylierung im Zellstoffwechsel unbekannt. Erst die Entdeckung von Glykosylierungshemmern und die Verfügbarkeit selektiver, hochgereinigter Glykosidasen brachten Aufschluss darüber, was Glykosylierungen im Organismus bewirken. Bisher bekannt ist, dass die Glykosylierung Proteine vor proteolytischem Verdau bewahrt und die Aktivität bestimmter Hormone, Enzyme und Antikörper beeinflusst. Weiterhin ändert die Glykosylierung die Affinität mancher Rezeptoren zu deren Liganden und umgekehrt. Auch hat die Glykosylierung eines Proteins Signalfunktion für den intrazellulären Transport, indem diese ins extrazelluläre Medium bzw. an die Zellmembran transportiert werden. Außerdem wird die Wanderung und Verteilung bestimmter Zellen im Organismus durch die Wechselwirkung der Zuckerketten von Membranproteinen und extrazellulärem Matrixmaterial mit Lektinen reguliert.¹³

Die Forschungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der Glykoproteine bestehen also zum einen darin, die Sequenz und Zusammensetzung der Zuckerketten eines Proteins aufzuklären. Jedoch viel entscheidender ist die Untersuchung der Beteiligung der Zuckerketten von Zellmembranproteinen an der Steuerung der Zellphysiologie wie zum Beispiel Zellwanderungen oder der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten.

¹³ vgl. Rehm 2006, Seite 339-342

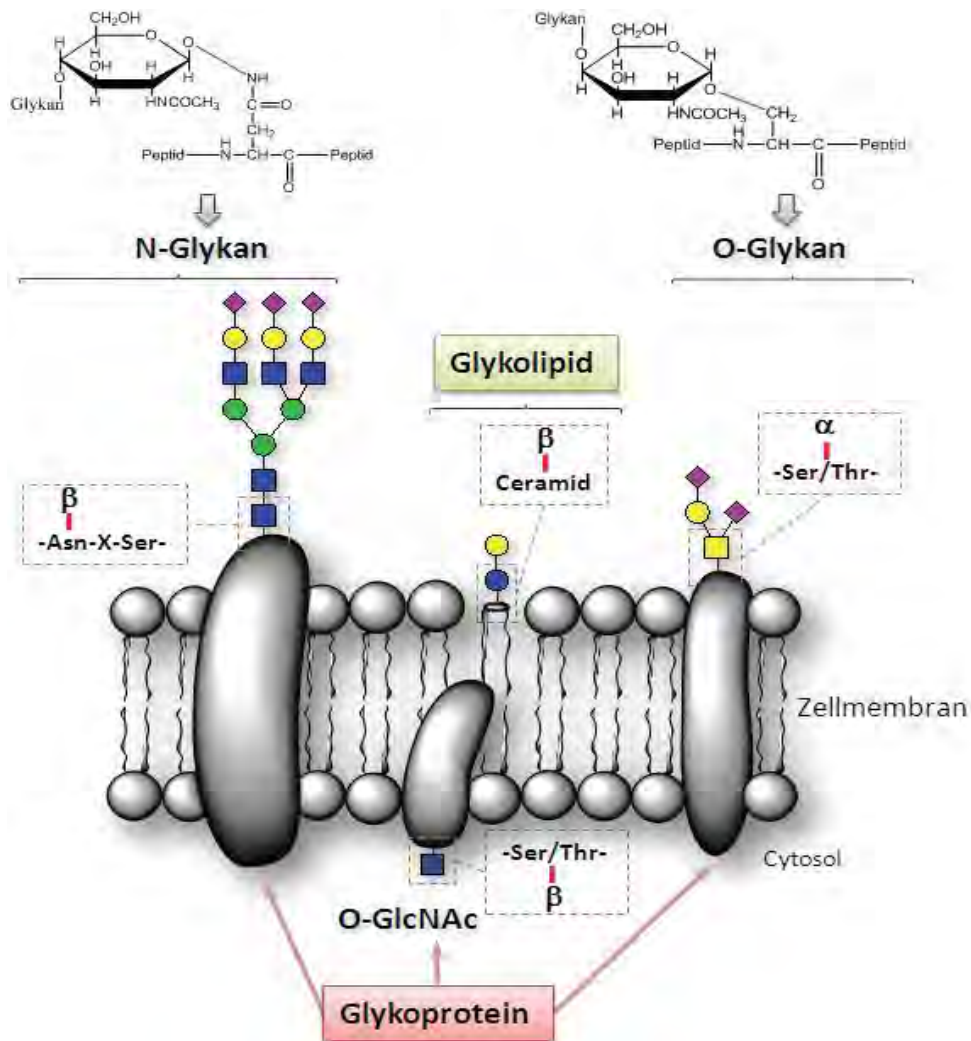


Abb. 7: Strukturen der N-Glykosylierung und O-Glykosylierung¹⁴

3 Material und Methoden

3.1. Material

Eine Auflistung der verwendeten Materialien befindet sich im Anhang.

3.2. Methoden

3.2.1. Proteinisolation aus HJV exprimierenden Zellen

Für die nachfolgenden Experimente wurde Hämajuvelin aus folgenden beiden Quellen benutzt: Gesamtproteinlysate aus der mit membranständigen HJV-transfizierten humanen **HEK293**-Zelllinie (**human embryonic kidney cells 293**;

¹⁴ vgl. Gröbe 2008, Seite 13

menschliche, embryonale Nierenzelle) und aufgereinigtes, lösliches HJV ohne Transmembrandomäne aus dem Zellkulturüberstand der murinen Zelllinie **NSO** von R&D-Systems Inc.

Bei optimalen Wachstumsbedingungen wurden die HEK293 Zellen in DMEM mit 10% FKS (fötale Kälberserum), einem standardisiertem Nährmedium mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 7% CO₂-Begasung im Brutschrank in einer T175 Flasche kultiviert. In regelmäßigen Abständen ist es notwendig die Zellkultur zu passagieren, d.h. ein Teil der Zellen muss in eine andere Kulturflasche überführt werden, damit die Zellen in einem teilungsfähigen Zustand bleiben und nicht durch die ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte sowie durch Mangel an Nährstoffen sterben.

Um die Zellen nach 2 Tagen Inkubationszeit zu ernten wurden die adhärennten Zellen trypsiniert. Adhärennte Zellen wachsen als zusammenhängende einschichtige Zellschicht unter Anheftung auf die Plastikoberfläche des Zellkulturgefäßes. Das Medium der Zellen wurde abpipettiert und durch Zugabe von Trypsin-EDTA die Zellen von der Unterlage gelöst. Hierbei spaltet das Trypsin die extrazellulären Adhäsionsproteine nach den Aminosäuren Arginin und Lysin und die Zellen gehen in Suspension über. Dann wurde die Reaktion, welche 8-12 Minuten im Brutschrank stattfand, durch Zugabe von 10 ml frischen Nährmedium (DMEM + 10% FKS) gestoppt. Allerdings lagen die Zellen im Medium teilweise als Zellklumpen verschiedener Größe vor. Diese wurden durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer Pipette vereinzelt. Da die Experimente mit vorgegebener Zellkonzentration stattfanden, wurde eine Zellzählung mit dem CASY durchgeführt.

Eingesetzt wird hierbei das Widerstandsmessprinzip aus der Partikelmesstechnik, welches mit einer modernen Methode der Signalauswertung, der Pulsflächenanalyse verbunden wurde. Am Anfang der Messung werden die Zellen in einem schwachen Elektrolyten suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt. Im Kapillarkörper befindet sich ein Rubin mit einer Präzisionsmesspore. Während der Messung wird über zwei Platinelektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt. Die elektrolytgefüllte Kapillare dient als definierter elektrischer Widerstand. Beim Durchtritt durch die Kapillare

verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge Elektrolytlösung, weshalb es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke kommt. Diese Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen, wobei als Voraussetzung die Zellen die Messpore einzeln passieren. Abgetastet wird das Messsignal dann von CASY® 1 mit einer Frequenz von 1 MHz. CASY® 1 erfasst nicht nur die Amplitude des Messsignals, sondern den gesamten Signalverlauf. Aus den Einzelmessungen berechnet CASY® 1 das Integral des Messsignals (Pulsflächenanalyse). Über zwei einstellbare Bereichsgrenzen kann der Messbereich in drei Teilbereiche eingeteilt werden, die von CASY® 1 Model DT gleichzeitig gezählt werden. Je nach zu erwartender Größe des zu zählenden Partikels kommt es zur Verwendung unterschiedlicher Kapillardurchmesser.¹⁵ Die bestimmte Zellzahl der Zellsuspension betrug $4,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

Nachdem die Zählung abgeschlossen war, wurde die Zellkultur zentrifugiert (5min bei 300 g), so dass das Zellpellet am Boden des Reaktionsgefäßes sedimentierte und das Medium abgesaugt werden konnte. Anschließend erfolgte die Zelllyse durch RIPA Puffer.

Dabei wurde durch den Puffer die Zellmembran aufgelöst und ein Lysat erhalten. Hierbei waren auch Protease-Inhibitoren enthalten, welche einen wirksamen Schutz vor Serin-, Cystein- und Metalloproteasen in Säuger-, Hefe-, Bakterien- und Pflanzenextrakten bieten. Zelltrümmer wurden mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 12000 g beseitigt. Nach Abschluss des Lyse Vorgangs musste nun der RIPA Puffer durch einen 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,1) ausgetauscht werden, da in diesem die N-Glykosidase eine höhere Aktivität hat. Dazu wurden 400µl Proteinlysat in einer Dialyse-Kassette dialysiert, wobei durch die Membran der Dialyse Kassette Teilchen zurückgehalten werden, die größer als 10 kDa sind (siehe Abb. 8). Aufgrund dessen bleibt auch das ca. 50 kDa große HJV innerhalb der Membran und wird mit dem neuen Puffer versetzt, der sich durch die Membran aufgrund der Übermenge an Natriumphosphat Puffer (200ml) austauscht.

¹⁵ vgl. Bedienungsanleitung CASY 1996, Seite 7-8

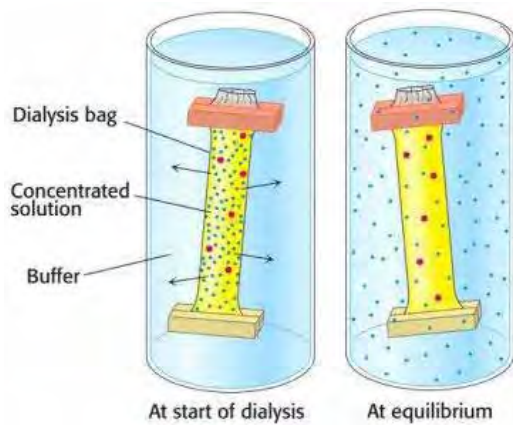


Abb. 8: Prinzip des Dialyseverfahrens¹⁶

Die Proteinkonzentration der gewonnenen Zelllysate wurde nach der BCA-Methode unter Verwendung des BCA™ Protein Assay Kits bestimmt. Dabei detektiert Bicinchoninsäure die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in einem alkalischen Medium, welche sich quantitativ in einem colorimetrischen Farbumschlag bemerkbar macht. Die Proteinlysate wurden hierzu 1:5 bzw. 1:10 in Lysepuffer verdünnt und mit einer BSA-Standardreihe, welche ebenfalls in Lysepuffer verdünnt wurde, in eine 96-Well Platte pipettiert. Für jede Probe wurden Doppelansätze vorbereitet. Das BCA-Reagenz B wurde 1:50 in Reagenz A verdünnt und je 200 μl zu jeder Probe gegeben. Die Platte wurde für 30 min bei 37 °C geschüttelt und die Messung mit einem Photometer bei 542 nm durchgeführt.

3.2.2. Immunzytochemischer Nachweis von HJV mittels FACS Messung

Die **FACS** (=fluorescence activated cell sorting) Messung wurde als Kontrolle zum Nachweis des HJV Proteins auf den noch lebenden HEK293 Zellen durchgeführt. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von Licht seitens der Zelle, wenn diese, versehen mit einem fluoreszierenden Farbstoff, einen Laserstrahl passiert. Die allgemeine Bezeichnung hierfür ist die Durchflusszytometrie. Hierbei wird die zu untersuchende Zellsuspension durch eine Kapillare gesaugt und passiert im Sensormodul einen Laserstrahl. Das Licht erfährt einerseits eine Vorwärtsstreuung **FSC** (forward scatter), zum anderen eine Seitwärtsstreuung **SSC** (side scatter). Das FSC ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das SSC ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die

¹⁶ <http://dbs.umd.edu/courses/fall2006/bioc380/lectures/008/images/dialysis.jpg>

vor allem von der Granularität der Zelle beeinflusst wird. Abbildung 9 verdeutlicht die Messung der SSC- und FSC-Werte in einem FACS-Gerät.

Zugleich mit dem gestreuten Licht ist es möglich Fluoreszenzlicht zu messen, das von Fluorochrommolekülen in oder an der Zelle ausgestrahlt wird. Diese werden durch den Laser angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches durch Lichtverstärker im Gerät gemessen werden kann und anschließend in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Die Gesamtfluoreszenz ist proportional zur Anzahl der fluoreszierenden Farbstoffmoleküle pro Zelle. Ein angeschlossener Computer wertet die gewonnenen Daten mit dem Computerprogramm „FlowJo“ aus und stellte sie zum einen in einem zweiparametrischen Punktdiagramm, oder einem Histogramm dar.¹⁷ (siehe 4.1.)

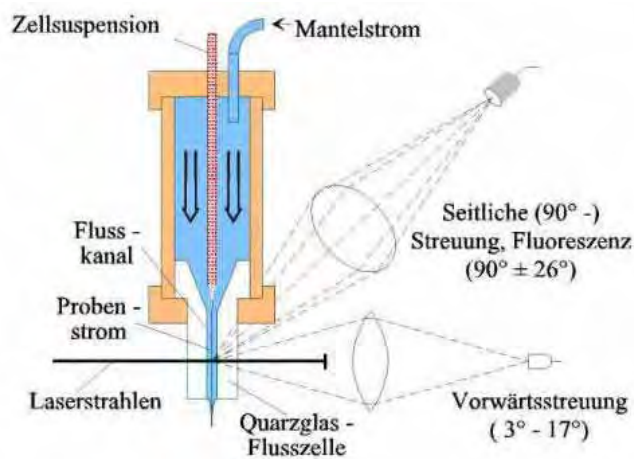


Abb. 9: Messung des SSC- und des FSC-Werts durch ein FACS-Gerät¹⁸

3.2.3. Enzymatische Deglykosylierung

Um die Glykosylierungen des HJV zu untersuchen, wurden von einem Aliquot der Proteine die Zuckerketten abgetrennt, d. h. sie wurden deglykosyliert. Dazu wurden sie mit der Endoglykosidase N-Glykosidase F* der Aktivität 10 U/ml umgesetzt. Endoglykosidasen spalten die endständige Chitobiose-Einheit in bestimmten N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten, so dass

¹⁷ http://content.karger.com/ProdukteDB/Katalogteile/isbn3_8055/_79/_28/Zell_02.pdf

¹⁸ <http://www.berlin.ptb.de/8/83/832/Durchflusszytometrie/Laser-Durchfl-Zytometrie.html>

nur noch ein Monosaccharidrest am Protein verbleibt. Die hier verwendete N-Glykosidase F spaltet alle Typen von N-Glycanketten, die an Asparagin gebunden sind.¹⁹

Vor der Anwendung wurde die N-Glycosidase-Lösung 10-fach verdünnt (5 µl N-Gly + 45 µl H₂O). Es wurde versucht die Reaktionszeiten und die Konzentration der N-Glykosidase so zu optimieren, dass möglichst wenig Inkubationszeit und eine niedrige Konzentration der Glykosidase gebraucht werden. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass bei Bedingungen von weniger als 4 U/ml und einer Einwirkungszeit von unter 16 Stunden keine verwertbaren Ergebnisse zu erzielen sind.

3.2.4. Untersuchung der Glykosylierung von HJV mittels Western Blot

Der Western Blot bezeichnet die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, nachdem diese elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Sobald der Transfer abgeschlossen ist, können die Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (SDS-Page) werden die Proteine nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Beim SDS handelt es sich um ein anionisches Detergens, welches die Eigenladung von Proteinen überdeckt, indem es die auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhenden Bindungen innerhalb des Proteins verhindert und das Protein entsprechend seiner Größe mit negativen Ladungen belädt. Die Proben wurden auf 70°C erhitzt, damit Sekundär- und Tertiärstruktur durch das Strecken der Moleküle und die Unterbrechung der Wasserstoffbrückenbildung aufgebrochen werden. Bei einem Teil der Proben wurde zusätzlich die niedermolekulare Thiolverbindung Dithiothreitol (DTT) zum Probenpuffer zugesetzt, um die Disulfidbrücken in den Polypeptidketten zu spalten und somit eine vollständige Denaturierung zu erreichen. Für die Proben wurde jeweils ein Gesamtansatz von 50µl hergestellt. Die denaturierten Ansätze bestanden aus 5µl Reduktionsmittel, 12,5µl Sample Buffer, 11,2µl Probelösung und 21,3µl H₂O. Bei den nativen Ansätzen wurde das Reduktionsmittel durch auffüllen mit H₂O ersetzt.

¹⁹ vgl. Anleitung N-Glykosidase F*, recombinant von Roche

Die Proteingemische wurden dann elektrophoretisch durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abb. 10). Dieses Gel besteht aus Acrylamidmonomeren, das durch das quervernetzte Reagenz N,N'-Methylenbisacrylamid (Verhältnis: 29-1) ein dreidimensionales Netzwerk bildet. Die engen Maschen des Netzwerks sorgen dafür, dass nach Anlegung der Spannung kleinere Proteinmoleküle schneller durch das Gel wandern, wohingegen die größeren eher zurückbleiben.

Hervorgerufen durch die negative Ladung des SDS entstehen negativ geladene SDS-Protein-komplexe mit einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Masse (pro 1g Protein 1,4g SDS), wodurch die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Nach Anschluss der Kontakte werden die negativ geladenen linearisierten Proteine nur noch in Abhängigkeit von ihrer Molekularmasse im elektrischen Feld aufgetrennt und wandern in Richtung der Anode. Dieser Vorgang wurde in der Gelelektrophorese-Kammer für 1h bei 200V und 120mA durchgeführt.



Abb. 10: Gelelektrophorese-Kammer²⁰

Bei der angewandten diskontinuierlichen Variante passieren die Proteine vor dem Eintritt in das eigentliche Trenngel noch ein Sammelgel, um eine hohe Effizienz der Auftrennung zu erreichen. Dieses fokussiert die Banden, wodurch eine gute Auftrennung und eine hohe Bandenschärfe gewährleistet werden. Zu beachten ist dabei eine ausreichende Menge des auf das Gel geladenen Proteins, um möglichst viel Protein pro Flächeneinheit zu erzielen. Deshalb ist auch die Dicke des Gels auf 2 mm begrenzt. Nach erfolgreicher Gelelektrophorese wurde für die folgende immunologischen Detektion das entstandene Proteinmuster auf eine PVDF-Membran übertragen.

²⁰ <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/88/Gelelektrophoreseapparat.jpg>

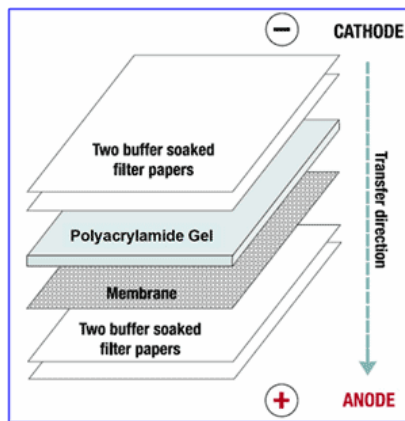


Abb. 11: Transfer der Proteine von einem Protein-Gel auf eine PVDF-Membran²¹

Dieses Verfahren ist der eigentliche Western Blot. Luftblasenfrei wurde dabei zunächst das Gel auf die proteinbindende PVDF-Membran aufgelegt und von jeder Seite von zwei mit Transferpuffer (Trans Blot SD) getränkten Filterpapieren umrahmt (siehe Abb.11). In der Transferapparatur wurde nun ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld für 1h bei 120 mA und 20 V angelegt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf die PVDF Membran, auf deren Oberfläche sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften blieben. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten, ist aber dadurch nun für weitere immunologische Antikörpermethoden zugänglich. Anschließend wurde nun durch die Färbung mit dem Azofarbstoff Ponceau S die Gesamtheit der PVDF membrangebundenen Proteinen nachgewiesen. Ponceau S geht reversible Bindungen mit den positiv geladenen Aminogruppen der Proteine ein und dient so visuell zur Überprüfung, ob Protein erfolgreich auf die Membran übertragen wurde. Anschließend lässt sich die Färbung sehr leicht durch Wasser auswaschen. Für die nachfolgende Visualisierung der Proteine durch die Immundetektion müssen die unspezifischen Antikörper Bindungsstellen der PVDF-Membran blockiert werden. Dieses sogenannte „Blocking“ erfolgte durch 5% Magermilchpulver, welches in TBST gelöst bei Raumtemperatur 1 h auf die Membran einwirkte. Durch diese eiweißhaltige Lösung werden alle Stellen mit Proteinen benetzt.

Nach dem Waschen durch TBST-Pufferlösung (Tris-Buffered Saline Tween-20) ist der Blockierungsschritt abgeschlossen und die Antikörpermarkierung kann erfolgen.²²

²¹ <http://www.fermentas.com/techinfo/electrophoresis/pproteintransfer.htm>

Es handelt sich dabei um einen Zweischnitt-Nachweis (siehe Abb. 12). Zunächst bindet der primäre Anti-HJV-Antikörper an sein Antigen, welches auf der Membran fixiert ist. Der Primäantikörper wurde in einer verdünnten Testkonzentration von 0.1 µg/ml verwendet. Um auch hier unspezifische Bindungen zu vermeiden wurde auch der Antikörper mit Milchpulverlösung vermischt. Über Nacht wurde dann die PVDF-Membran in die Magermilchpulver-Antikörper-TBST-Lösung eingelegt und auf einem Mikrotiterplattenschüttler inkubiert. In dieser Zeit binden die Antikörper an das Hämojuvelin. Vor der Behandlung mit dem Sekundäantikörper (=Detektionsantikörper) wird durch drei Waschschrirte mit jeweils neuer TBST-Pufferlösung gewährleistet, dass nur noch spezifisch gebundene Antikörper an den HJV Molekülen auf der Membran haften bleiben. Als Zweitantikörper wurde ein Rabbit anti-Goat IgG-POD verwendet (1:1000 verdünnt). Dieser ist mit dem aus Meerrettich gewonnenen Enzym HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt, welches die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert, wobei eine Lumineszenz erkennbar wird. Für dieses Experiment wurde eine Testkonzentration des Sekundäantikörpers von 0,2 µg/ml gewählt. Nach der Verdünnung des Sekundäantikörpers mit Milchpulverlösung wurde dieser zur PVDF-Membran in Magermilchpulver-TBST Lösung gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundäantikörper bindet nun an den Primäantikörper, welcher bereits an die HJV Moleküle fixiert ist. Zuletzt wurden noch die beiden Reagenzien Lumi Light Plus Black, welches durch das enthaltene Linol die Lumineszenz erhöht und Lumi Light Plus White, in der sich eine Peroxidlösung befindet, hinzupipettiert. Die Peroxidase des Zweitantikörpers oxidiert dann unter Lumineszenz das in der Lösung enthaltene Luminol (siehe Abb. 12) und kann so die Position des Protein HJV auf der PVDF-Membran aufzeigen.²³

²² vgl. Luttmann 2006, Seite 135-139

²³ vgl. Luttmann 2006, Seite 150f

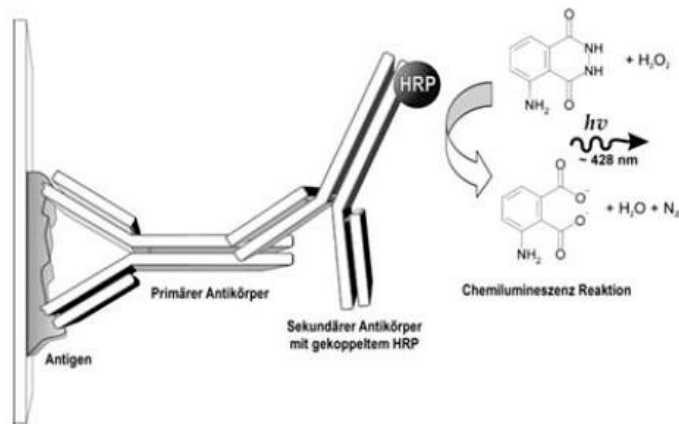


Abb. 12: Bindungsweise der Antikörper und Lumineszenzreaktion²⁴

Für die Auswertung des Proteinmusters wurde die membrangebundene Lumineszenz einerseits im Lumi-Imager F1, zum zweiten im CODAC Filmentwickler untersucht. Der Imager nahm das emittierte Licht in einem bestimmten Zeitraum mit einer Kamera auf und stellte das Blot-Bild im Computer dar. Im CODAC wurde ein Film belichtet. Bei beiden Methoden ist schließlich im Gegensatz zur Gelelektrophorese mit Ponceau S Färbung nur noch das Proteinmuster des HJV zu sehen.

4 Auswertung und Ergebnisse

4.1. HJV Nachweis auf lebenden Zellen (FACS)

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie dienen der Überprüfung, ob die mit Hämöjuvelin transfizierten HEK293 Zellen das Protein noch ausreichend für die bevorstehenden Experimente exprimieren. Dazu wurden zunächst in einem Dot-Plot Diagramm die Beziehung zwischen den Parametern FSC und SSC dargestellt. Diagramm 13 zeigt im eingerahmten Bereich die vitalen Zellen. Da etwa 72 % der gemessenen Partikel vitale Zellen darstellen, konnte die Zellkultur für die biochemischen HJV Experimente verwendet werden. Die restlichen Zellen stellen entweder Zellaggregate (hoher FSC-Wert) oder Zellbruchstücke dar (kleiner FSC-Wert).

In Abb. 14 sind die Messergebnisse der zellulären HJV Expression dargestellt. Bei einer Häufigkeitsverteilung des Histogramms wird hier die Stärke eines Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der gemessenen Ereignisse aufgetragen. Die Grafik zeigt die

²⁴ <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:ECL.jpg&filetimestamp=20050818094645>

Fluoreszenz zweier Zellproben, wobei der rote Graph (c4_untreated) als Negativprobe von HJV-negativen HEK293 Zellen dient. Die mit HJV transfizierten Zellen (c4_HJV_stain) zeigen eine um 2 Dekaden höhere Fluoreszenzintensität auf. Dies bedeutet, dass die HJV-transfizierten Zellen sehr viel HJV Protein auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und damit die Verwendbarkeit der HJV positiven HEK293 Zellen für die biochemischen Untersuchungen bestätigt ist.

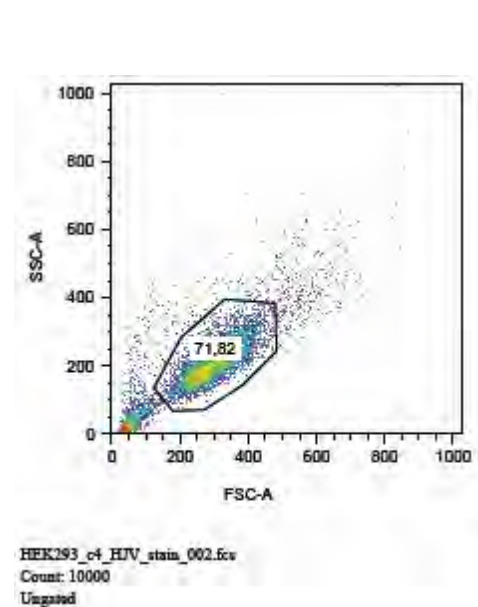


Abb. 13: Abhängigkeit des SSC-A von FSC-A dargestellt in einem Dot-Plot.

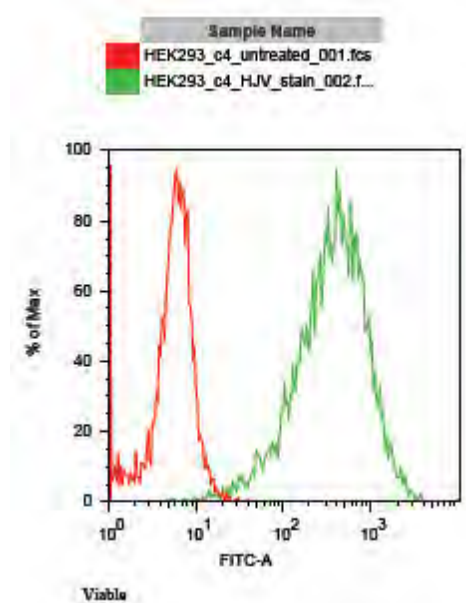


Abb. 14: Vergleich der HJV Expression dargestellt in einem Histogramm

4.2. Proteinkonzentration von zellulärem HJV

Die HEK293 Zellen wurden wie im Methodenteil 3.2.1 beschrieben lysiert. Um die Proteinmenge des Zelllysats zu bestimmen, muss ein Proteinvergleichsstandard hergestellt werden. Dieser besteht aus einer BSA-Konzentrationsstandardreihe, wobei in einem Diagramm die Konzentration im Verhältnis zur Absorption dargestellt wird (Abb. 15). Die mittels der BSA Standardreihe bestimmte Konzentration der Proteine nach der Zellyse betrug 14,48 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und die nach der Dialyse 7,93 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Letztere ist damit die endgültige Konzentration für die Umsetzung der Proteine mit N-Glykosidase. Das Ergebnis zeigt außerdem, dass während der Dialyse nur mäßige Mengen an Protein verloren gegangen sind.

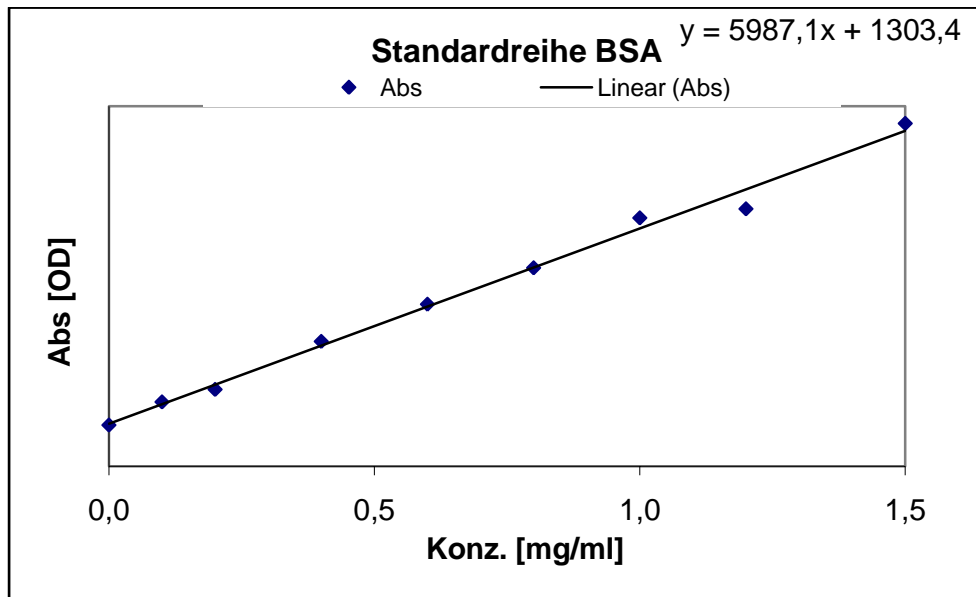


Abb. 15: BSA Standardreihe des BCA-Assays

4.3. Protein-/Glykosylierungsanalytik von gereinigtem löslichen HJV

Die Ergebnisse der beiden Western Blots der verschiedenen Zelllinien sind in den Filmen der Abb. 16 und Abb. 17 dargestellt. Für das leichtere Verständnis ist der Blot in mehrere Bildteile untergliedert, um so nacheinander die Zusammenhänge zu verdeutlichen.

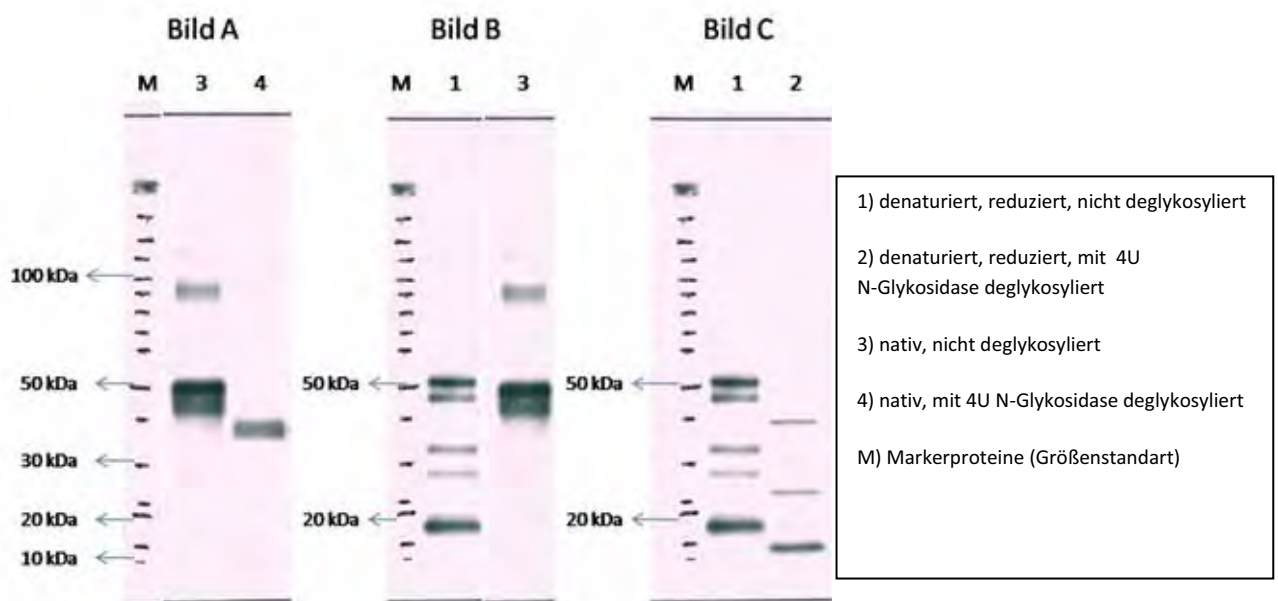


Abb. 16: Proteinbanden des aufgereinigten Hämajuvelins, nativ und nach Behandlung mit N-Glykosidase

Vergleicht man zunächst in Abb. 16 Bild A die Proben 3 und 4, so ist ein Unterschied im Molekulargewicht auszumachen. Obwohl es sich bei beiden Proben um natives HJV handelt, liegt Probe 3 bei etwa 50 kDa und Probe 4 bei 40 kDa. Dieser Sachverhalt lässt sich dadurch erklären, dass Probe 4 mit N-Glykosidase behandelt wurde und damit die Zuckerketten abgespalten wurden. Die Abnahme des Molekulargewichts der deglykosylierten Probe beweist damit also, dass das Membranprotein Hämojuvelin glykosyliert ist. Die zweite Bande unterhalb von 50 kDa in Probe 3 weist auf eine Heterogenität der HJV Glykosylierung hin.

Bild B zeigt die Proben 1 und 3, welche beide nicht deglykosyliert wurden, jedoch Probe 1 durch Zusatz von DTT vollkommen reduziert und denaturiert wurde. In Probe 3 liegt das Hämojuvelin der vollen Länge als Polypeptid vor mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa. Die denaturierte Probe 1 zeigt mehrere Banden auf. Es liegt sowohl HJV der vollen Länge (50kDa) vor, als auch deutlich unterschiedene Fragmente mit ca. 30 kDa und 20 kDa. Hämojuvelin liegt also einerseits als ganzes ohne Spaltstelle vor, weshalb auch die Denaturierung ohne Wirkung bleibt. Andererseits kommt es auch als gespaltene Isoform mit einem C-terminalen und einem N-terminalen Teil vor, welche durch -S-S- Disulfidbrücken zwischen den Molekülketten zusammengehalten werden. In der nativen und auch der denaturierten Probe zeigen sich je zwei Banden bei ca. 50 kDa und bei der denaturierten Probe auch noch bei den ca. 30 kDa großen Banden, was auf proteolytische Fragmente mit heterogener Glykosylierung schließen lässt.

Bild C veranschaulicht die Glykosylierungsvarianten der denaturierten einzelnen Ketten. Probe 1 weist sowohl beim ungespaltenen, ganzen HJV (50kDa), als auch beim N-terminalen Teil (ca. 30 kDa) zwei verschiedene Banden auf. Vergleicht man das Muster mit dem der Probe 2, in der die Proteine deglykosyliert vorliegen, ist zu erkennen, dass die jeweiligen Doppelbanden zu einer gemeinsamen werden und eine geringere Molekülgröße aufweisen. Auch die ca. 20 kDa Bande des C-Terminus verliert an Molekularmasse. Daraus kann man schließen, dass beim N-terminalen Teil zwei verschiedene Glykosylierungsvarianten existieren, und das C-terminale Fragment nur eine Glykosylierungsvariante aufweist.

4.4. Protein-/Glykosylierungsanalytik von zellulärem HJV

HEK293 HuHJV#4

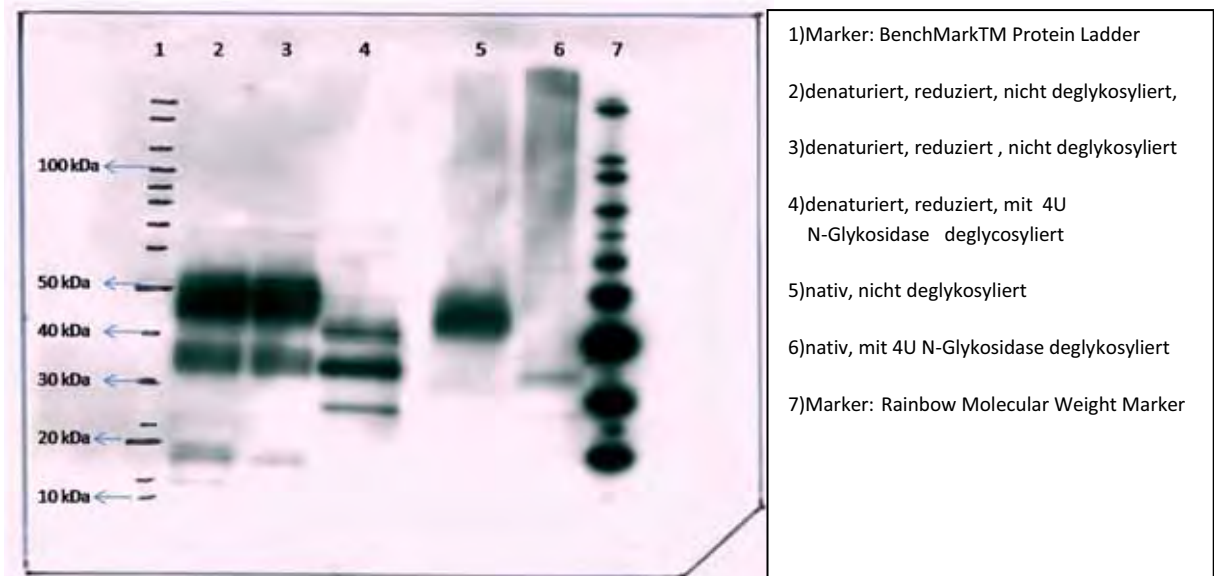


Abb. 17: Proteinbanden des Hämajuvelins der Zelllinie HEK293, nativ und nach Behandlung mit N-Glykosidase

Abbildung 17 zeigt das ausgewertete Proteinmuster des membrangebundenen HJV der HEK293 Zelllinie. Übereinstimmend mit dem aufgereinigtem, löslichen HJV sinkt durch die Deglykosylierung das Molekulargewicht des nativen HJVs von ca. 50 kDa auf etwa 35 kDa ab (siehe Probe 5 und 6). An den denaturierten Proben 2 und 3 ist ein zum löslichen HJV vergleichbares Bandenmuster zu erkennen. Auch hier liegen das vollständige HJV bei 50 kDa, das N-terminale bei ca. 35 kDa sowie das C-terminale Fragment bei ca. 20 kDa. Probe 4 zeigt den deglykosylierten Zustand des denaturierten Proteins in Form von drei Banden. Das Molekulargewicht des intakten, ganzen Proteins (bei ca. 50 kDa) wird zu einer dominanten Bande bei 40 kDa verringert. Das ca. 35 kDa große N-terminale Fragment von Spur 2 und 3 spaltet sich in 2 Banden auf: die größere Menge verringert sich nur geringfügig bzw. nicht und ein kleinerer Teil hat ein reduziertes Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Der deglykosylierte C-Terminus, der in der denaturierten aber nicht deglykosylierten Probe 2 bei ca. 15 kDa liegt, ist auf dem Blot nicht mehr zu erkennen, das Fragment ist hier offensichtlich aus dem Gel hinausgelaufen. Dennoch ist daraus klar zu erschließen, dass auch dieser Teil glykosyliert ist, da er offensichtlich an Molekulargewicht verloren hat.

5 Diskussion

Das Protein Hämojuvelin steuert über die positive Regulierung der Heparin-sulfat-Expression indirekt den Eisenstoffwechsel. Laut den 2006 aufgestellten Hypothesen von David Küniger liegt das Protein in zwei verschiedenen Isoformen mit und ohne autokatalytischer Spaltstelle und in zwei verschiedenen Varianten vor, nämlich einer membrangebundenen mit und einer löslichen, sezernierten Form ohne GPI-Anker. Beide Varianten sind glykosyliert. Im Rahmen dieser Facharbeit wurden diese Aussagen Kunigers bestätigt und zusätzlich neue Erkenntnisse über die Glykosylierung des Proteins gewonnen. Das aus den HJV-rekombinanten Zelllinien NS0 (löslich) und HEK293 (membrangebunden) gewonnene Hämojuvelin liegt sowohl ungespalten, als auch gespalten vor. In beiden Fällen sind die Fragmente durch Disulfidbrücken verbunden. Desweiteren wurde durch eine Deglykosylierungsreaktion mit N-Glykosidase F nachgewiesen, dass das Protein N-glykosyliert ist. Das N-terminale Fragment liegt in Form einer Doppelbande vor, wobei nach der Deglykosylierung sich beide Molekulargrößen verringern und nur noch eine Bande auftritt. D. h. es gibt unterschiedliche HJV Glykosylierungen in ein und derselben Zelle (siehe Abb. 16 und 17). Auffällig hierbei war ein Unterschied zwischen dem löslichen (NS0 Zellen) und dem membrangebundenen (HEK293 Zellen) Hämojuvelin bezüglich der Glykosylierungsvarianten des N-terminalen Fragments des gespaltenen Proteins. Während beim löslichen HJV eine vollständige Deglykosylierung erreicht werden konnte, zeigt sich beim membrangebundenen HJV ein größerer Proteinanteil der seine Molekülgröße nach Deglykosylierung nicht veränderte (Abb. 17 Spur 4). Eine erste Erklärung dafür könnte eine nicht vollständige biochemische Deglykosylierung des HEK293 HJV sein, wenn die N-Glykosidase nicht alle Zuckerketten abspalten konnte. Allerdings waren zumindest die biochemischen Bedingungen für eine vollständige Deglykosylierung des löslichen HJV hinreichend (siehe Abb. 16). Eine zweite Begründung könnte das Vorhandensein von O-glykosidischen Bindungen sein. Dies würde aber mit den bisherigen Forschungsergebnissen im Widerspruch stehen, da diese O-Glykosylierungen bei dem Protein Hämojuvelin ausschließen. Drittens wäre es auch denkbar, dass die N-Glykosidase nicht mehr alle Glykosylierungsstellen erreichen kann. So könnten aufgrund der Spaltstelle beim membrangebundenen HJV die Disulfidbrücken nicht mehr fest fixiert sein und so der N-Glykosidase

Glykosylierungsstellen versperren. Letztlich besteht noch die Möglichkeit des Vorhandenseins zweier verschiedener Variationen des N-Terminus des Proteins, das aus den HEK293 Zellen gewonnen wurde, nämlich einerseits glykosyliert und andererseits unglykosyliert.

Zusammenfassend konnte durch die hier vorliegenden Experimente die von Kuninger für Myoblasten beschriebene posttranslationale Modifikation von Hämöjuvelin erstmals auch für das rekombinante Protein aus HEK293 und NS0 Zellen nachgewiesen werden. Die biologische und biochemische Bedeutung der Glykosylierung des HJV und deren Varianten ist noch unbekannt. Mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten biochemischen Arbeits- und Analyseverfahren steht jedoch ein wichtiges Werkzeug zur weiteren pharmazeutischen Erforschung des HJV zur Verfügung.

4 Literaturverzeichnis

Internet:

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

http://content.karger.com/ProdukteDB/Katalogteile/isbn3_8055/_79/_28/Zell_02.pdf

Dissertation Dassler K. 2005: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000001626/01_Kap1_Einleitung.pdf;jsessionid=D4B6DCF86DD8E0F4997F3AB133E329F9?hosts=

Dissertation Gröbe D. 2008: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000004467/03_Einleitung.pdf;jsessionid=6D094179A42DCEBCCAF0D20DB2B3884C?hosts=

<http://dbs.umt.edu/courses/fall2006/bioc380/lectures/008/images/dialysis.jpg>

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

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/88/Gelelektrophoreseapparatur.jpg>

<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:ECL.jpg&filetimestamp=20050818094645>

Bücher und Zeitschriften:

Anderson G. J., Frazer D. M., Iron Metabolism meets signal transduction, *Nature Genetics*, 38:503-504, 2006

Babitt J. L., Huang F. W., Wrighting D. M., Xia Yin, Sidis Y., Samad T. A., Campagna J., Chung R. T., Schneyer A. L., Woolf C. J., Andrews N. C., Lin H. Y., Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression, *Nature Genetics*, 38:531-539, 2006

Beutel G., Heil G., Ganser A., Anämie auf einen Blick, Berlin, Blackwell Verlag, 2003¹

CASY®1 Cell Counter + Analyser System, Model TTC; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Stand März 1996; Seiten 7 und 8

De Domenico I., McVey Ward D., Kaplan J., Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders, *Nature Rev Mol Cell Biol* 15:22-29, 2006

Fleming R.E., Bacon B.R., Orchestration of iron homeostasis, *N Engl J Med*. 352:1741-1744, 2005

Ganz T., Molecular Control of Iron Transport, *J Am Soc Nephrol*, 38: 394 – 400, 2007

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

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

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

Roche Diagnostics GmbH, N-Glykosidase F*, recombinant, Anleitung

Pietrangelo A, Hereditary hemochromatosis – a new look at an old disease, N Engl J Med
350:2383-2397, 2004

Rehm H., Der Experimentator: Proteinchemie/Proteomics, München, Spektrum
Akademischer Verlag, 2006⁵

7 Danksagung

Ich danke der Firma Roche Diagnostics GmbH, die mir die Durchführung eines Fachpraktikums vom 04.08.2008 – 14.08.2008 in Penzberg ermöglicht hat.

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

Desweiteren möchte ich mich ganz besonders bei Herrn G. Werner in der Arbeitsgruppe von Prof. Kubbies für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung bedanken.

8 Selbstständigkeitserklärung

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

....., den

Ort

Datum

.....

Unterschrift des Schülers

9 Anhang

Materialliste:

| | |
|-----------------------|---|
| Antioxidant | v. Invitrogen |
| BCA-Platten | Microtest 96-Well Assay Plate (BD Falcon) |
| BCA-Reagenzien | BCA Protein Assay A und B (Pierce Biotechnology) |
| Blot Gerät | Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell (Bio-Rad) |
| Brutschrank | v. Heraeus |
| Dialyse Kassette | Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Extra Strength) 50mM pH 7,1 Natriumphosphatpuffer (Pierce Biotechnology) |
| Elektrophorese Kammer | XCell SureLock (Invitrogen) |
| Ethanol | v. Merck KGaA, Darmstadt |
| FACS Gerät | FACS LSR II (BR Biosciences) |
| Film | Amersham Hyperfilm TM MP (GE Healthcare) |
| Filter | Blotting Filter Paper LC2010 (Invitrogen) |
| Glykosidase | N-Glykosidase F (Roche) |
| H ₂ O | PCR Grade (Roche) |
| Imager | Lumi-Imager F ₁ (Roche) |
| LDS Puffer | LDS Sample Buffer NuPAGE (Invitrogen) |
| Lösliches HJV | Recombinant Human RGM-c (R&D Systems) |
| Magnetrührer | MR2002 (Heidolph) |
| Medium | DMEM (GIBCO) mit 10% FKS |
| Methanol | v. Merck KGaA, Darmstadt |
| Mikroskop | LABOVERT (Leitz) |
| MOPS | MOPS SDS Running Buffer (20fach) (Invitrogen) |
| Photometer | TECAN Spectrometer (Tecan Deutschland GmbH) |
| Pipetten | Cellstar Pipetten (Greiner bio-one) |
| Ponceau Farbstoff | Ponceau S (Fluka) |
| Primärer Antikörper | Anti-human RGM-c Antibody (R&D Systems) |
| Protease Inhibitor | Protease Inhibitor Cocktail Tablets: Complete (Roche) |
| Proteinmarker | MagicMark™ XP Western Protein Standard (Invitrogen) BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen) Amersham High-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare) |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf Tubes (steril), Polystyrene Conical Tubes (BD Falcon) |
| Reducing Agent | Sample Reducing Agent DTT (10fach) (Invitrogen) |
| Schüttler | DRS-12 Shaker (Neolab) |
| Sekundärer Antikörper | Rabbit anti Goat IgG, Horseradish Peroxidase conjugated Affinity Purified Antibody (CHEMICON International) |
| Spannungsquelle | Power Ease 500 (Novex) |
| Stepper | Multipette plus (Eppendorf) |
| Thermomixer | Thermomixer Comfort (Eppendorf) |
| Trypsin EDTA | v. PAN Biotech |

| | |
|-----------------------|---|
| Waschpuffer | PBS (Roche) |
| Western Blot Membran | Invitrolon TM PVDF and 2µm PDF Membranes (Invitrogen) |
| Western Blot Substrat | Lumilight Western Blotting Substrate (<i>stable Peroxide Solutiol</i>) Lumilight Luminol 12015200 und H ₂ O ₂ 12015200 (Roche) |
| Vortexer | Reax 2000 (Heidolph) |
| Zellen | HEK293 huHJV (Roche) |
| Zellysereagenz | RIPA Lysis Buffer (Roche) |
| Zellzahlmessgerät | CASY (Schärfle) |
| Zentrifugen | Centrifuge 5415D (Eppendorf) und Z513K (Hermle) |