

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
(Leiter Abteilung Transfusionsmedizin Univ.- Prof. Dr. Andreas Greinacher)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Nachweis von Plättchenfaktor 4 und Plättchenfaktor 4 Variante 1 nach in vitro Produktion

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2011

vorgelegt von:
Marie-Luise Gaus
geb. am: 30.10.1983
in: Worms

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Greinacher

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Hermann Eichler

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum (Alte Bibliothek), Klinik für Innere Medizin A

Tag der Disputation: 14.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Plättchenfaktor 4.....	9
1.1.1	Struktur von PF4.....	10
1.1.2	Tertiär-/Quartärstruktur des Proteins	11
1.1.3	Funktion von PF4.....	11
1.2	Plättchenfaktor 4 Variante 1	13
1.2.1	Struktur von PF4var1	13
1.2.2	Differenzen zwischen PF4 und PF4var1	14
1.2.3	Funktion von PF4var1	14
1.3	Pathogenese der HIT	15
1.3.1	Bedeutung von PF4 bei der HIT	15
1.3.2	Die antigene Bindungsstelle des HIT-Antikörpers.....	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Chemikalien, Geräte und Zubehör.....	19
2.1.1	Medien und Medienzusätze	19
2.1.2	Reagenzien zur Zellkultur.....	19
2.1.3	Dialysematerialien	19
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	20
2.1.5	Antikörper	21
2.1.6	Vektoren.....	21
2.1.7	Restriktionsenzyme.....	21
2.1.8	Kits.....	21
2.1.9	Geräte und Zubehör	21
2.1.10	Software und Datenbank.....	22
2.2	Biologisches Material	22
2.2.1	Zelllinien	22
2.2.2	<i>E. coli</i>	23
2.3	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen	23
2.3.1	Nährmedien der Zellkultur.....	23
2.3.2	Nährmedien der <i>E. coli</i>	23
2.3.3	Selektionsantibiotika.....	24

2.3.4	Laufpuffer der Agarosegelelektrophorese	24
2.3.5	Puffer zur Reinigung der Proteine PF4 bzw. PF4var1 mittels Chromatographie	24
2.3.6	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.3.7	Affinitätschromatographie mittels NHS-aktivierter Säule	25
2.4	Zellbiologische Methoden	26
2.4.1	Kultivierung der EBNA 293-Zelllinien	26
2.4.2	Nährmedien.....	29
2.4.3	Einsatz der Dialyse	29
2.4.4	Überprüfung der Zellvitalität	30
2.5	Produktion von PF4 unter Verwendung von <i>E. coli</i>	31
2.5.1	Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	31
2.5.2	Vorversuch mit 19 C-terminalen Aminosäuren.....	31
2.5.3	Isolation des Gens von PF4 bzw. PF4var1 und Einsatz in der PCR.....	32
2.5.4	Gelelektrophorese als Erfolgskontrolle der PCR.....	33
2.5.5	Abtrennung der Primer	33
2.5.6	Verdau der PCR-Produkte und des Vektors	33
2.5.7	Ligation des Plasmids	34
2.5.8	Transformation der rekombinanten DNA in <i>E. coli</i>	34
2.5.9	Herstellung von Miniscreens	34
2.5.10	Überprüfung des Transformationserfolgs mittels Restriktionsverdau..	35
2.5.11	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> DH5 α	35
2.5.12	Transformation eines <i>E. coli</i> Überexpressionsstamms	36
2.5.13	Proteinsynthese in <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RP	36
2.6	Methoden zum Nachweis der PF4-Produktion und Sekretion	37
2.6.1	Durchflusszytometrie (FACS)	37
2.6.2	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	38
2.6.3	Proteinbestimmung nach Bradford	40
2.6.4	Sequenzierung des Proteins PF4var1	40
2.6.5	Sequenzierung des Genoms für PF4 bzw. PF4var1	40
2.6.6	Massenspektrometrie	40
2.7	Reinigung von PF4 und PF4var1.....	41
2.7.1	<i>Fast-protein liquid chromatography</i> (FPLC)	41
2.7.2	SDS-PAGE	42
2.7.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung von PF4var1 mittels NHS- Säule.....	43

3	Ergebnisse	45
3.1	Nachweis der Proteinvarianten	45
3.1.1	Sequenzierung des Proteins und der DNA von PF4	45
3.1.2	Massenspektrometrie	46
3.2	Zellkultur	46
3.2.1	Kultivierung der EBNA 293-Zelllinien	46
3.2.2	Vergleich der eingesetzten Nährmedien	47
3.2.3	Zellmorphologie der EBNA 293-Zelllinien	47
3.2.4	Hochdichtezellkultur	47
3.3	Nachweis der PF4-Produktion in EBNA-Zellen	49
3.3.1	Durchflusszytometrie zum Nachweis der PF4-Expression auf der Zelloberfläche	49
3.3.2	ELISA zum Nachweis der PF4-Sekretion	53
3.4	<i>E. coli</i>	61
3.4.1	Gelelektrophorese zur Kontrolle der PCR	61
3.4.2	ELISA als Kontrolle der Sekretion von PF4 durch <i>E. coli</i>	63
3.5	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford	66
3.6	Affinitätschromatographische Aufreinigung von PF4var1 unter Verwendung einer NHS-aktivierten Säule	66
4	Diskussion	67
5	Zusammenfassung	73

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
APS	Ammoniumpersulfat
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefacius</i> HI
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> – Rinderserum-Albumin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBNA	Epstein-Barr-Nuclear Antigen-Zelllinie
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESI-ToF	Electrospray ionization-time of flight – Elektronengasionisierung-Flugzeit
et al.	<i>Et alii</i> – und andere
FACS	<i>Fluoreszenz activated cell sorting</i> – Durchflusszytometrie
FCS	Fetal calf serum – Fetales Kälber Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FPLC	<i>Fast-protein liquid chromatography</i>
GAG	Glykosaminoglykane
GST-Tag	Glutathion-S-Transferase-Tag
HEK	Humane embryonale Nieren-Zelllinie
Hind	<i>Haemophilus influenzae</i>
HIT	Heparin-Induzierte Thrombozytopenie
HLA	Humanes Leukozytenantigen-System
HPLC	<i>High-pressure liquid chromatography</i> – Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IU	<i>International Unit</i> – Internationale Einheit
IL-8	Interleukin-8
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilo Dalton
KÜ	Kulturüberstand
LB-Medium	<i>Lysogeny broth-Medium</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i> - Flüssigkeitschromatographie
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>

MALDI-Tof	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization-Time of flight</i> - Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie-Flugzeit
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i> - Molekulargewichtsausschlussgrenze
NdeI	<i>Neisseria dentrificans I</i>
NheI	<i>Neisseria mucosa heidelbergensis I</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Polymerasekettenreaktion
PF4	Plättchenfaktor 4
PF4 _{alt}	Plättchenfaktor 4 <i>alternative</i>
PF4classic	Plättchenfaktor 4 klassische Form
PF4var1	Plättchenfaktor 4 Variante 1
PWO	<i>Pyrococcus woesei</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ribonukleinsäure
RP	<i>Reverse phase</i> – Umkehrphase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
tRNA	<i>Transfer ribonucleic acid</i> – Transfer-Ribonukleinsäure
ULC	<i>Ultralarge complex</i>
YTG-Medium	<i>Yeast</i> (Hefe)-Trypton-Glukose-Medium

Kurzschreibweise der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 Einleitung

In der klinischen Praxis wird die Blutgerinnung von Patienten durch Heparin-gaben gehemmt, um die Gefahr von Thrombosen zu verringern. Andererseits kann gerade Heparin eine schwere Erkrankung, die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT), auslösen. Diese Erkrankung beruht auf einer Komplexbildung zwischen Heparin und Plättchenfaktor 4 (PF4) und der Bildung von Antikörpern gegen diesen PF4/Heparin-Komplex (1). HIT ist eine prothrombotische Störung (2). Die HIT tritt bei bis zu 1 – 5 % der mit Heparin behandelten Patienten auf. 25 – 50 % dieser Patienten entwickeln Thrombosen (3). Bei der HIT kommt es charakteristischerweise zu einem Abfall der Thrombozytenzahl um mehr als 50 % und gleichzeitigem Anstieg schwerer thrombotischer Komplikationen am 5.-14. Tag nach Beginn der Heparinapplikation (4), (1). Allerdings sind diese beiden Charakteristika der HIT nicht pathognomonisch (1).

Der Plättchenfaktor 4 tritt in zwei verschiedenen Varianten auf, PF4 und PF4 Variante 1 (PF4var1) (5). Bei PF4var1 handelt es sich um eine non-allele Variante von PF4 (6).

In der vorliegenden Arbeit soll auf die in vitro Produktion, Expression und Sekretion von Plättchenfaktor 4, sowie Plättchenfaktor 4 Variante 1 in transformierten Zellen der Zelllinie EBNA 293 (Epstein-Barr-Nuclear Antigen) und bei *E. coli* eingegangen werden. PF4var1 ist deshalb von großem Interesse, zumal seine vollständige biologische Bedeutung bislang ungeklärt ist.

1.1 Plättchenfaktor 4

Plättchenfaktor 4 (PF4) ist ein CXC-Chemokin. Diese Chemokine zeichnen sich durch eine Aminosäuresequenz aus, in der zwei Cystein-Moleküle eine weitere Aminosäure umschließen. PF4 wird auch als CXCL4 bezeichnet. Es ist ein aus 70 Aminosäuren bestehendes Protein. Das Protein kommt in Thrombozyten und in Megakaryozyten vor (7). Die Synthese von PF4 findet fast ausschließlich in Megakaryozyten statt, zu einem geringen Teil aber auch in aktivierten Monozyten (8). Nachdem sich Monozyten in Makrophagen umgewandelt haben, verlieren sie ihre Fähigkeit PF4 zu produzieren (9). In Thrombozyten wird PF4 in den α -Granula an Chondroitin-4-Sulfat-Proteoglykan gespeichert (10). Thrombozyten enthalten etwa $20 \mu\text{g PF4}/10^9$ Zellen (11). Bei Thrombozytenaggregation wird,

induziert durch Kollagen, Thrombin, Adenosindiphosphat und Adrenalin, PF4 aktiv freigesetzt (12), (13), (14), (15). Nach Thrombozytenaktivierung beträgt die Konzentration an PF4 in Serum 0,4 – 2 μM . Diese Konzentration ist tausendfach höher, als in Plasma. Nach der Aktivierung von Plättchen wurde von Kowalska et al. die Konzentration an PF4-Tetrameren in einem Gerinnsel mit 280 μM bestimmt (8). Nach seiner Freisetzung wird PF4 an der Thrombozytenoberfläche durch Polysaccharide gebunden, die mehr Sulfatgruppen enthalten als Chondroitin-4-Sulfat-Proteoglykan, z.B. Heparansulfat (10). Bisher gibt es keine Hinweise darauf, dass PF4, nachdem es einmal freigesetzt wurde, wieder in α -Granula aufgenommen wird (4).

1.1.1 Struktur von PF4

Als Monomer hat PF4 eine Größe von 7,8 kDa (7). Eine lineare Sequenz der Aminosäuren (siehe Abb. 1-1) des kationischen Proteins PF4 zeigt deutliche, lokale Häufungen positiver und negativer Ladung (14). Ein interessantes Strukturmerkmal von PF4 sind drei Regionen mit einer Häufung basischer Aminosäuren (7).

Der N-terminale Bereich des Proteins PF4 ist stark sauer. Dort kommen überwiegend Glutamin- und Asparaginsäure (16) und Arginin (7) vor. Zwischen den in den Positionen 10 und 36, sowie 12 und 52, befindlichen Cysteinresten kommt es zur Ausbildung von Disulfidbrücken (7), welche für die Bildung von Di- und Tetrameren von Bedeutung sind.

In der Mitte des Moleküls befindet sich an Position 49 Arginin, an Position 50 Lysin. Diese sind für die Ausbildung der Tertiärstruktur wichtig (7).

Am C-terminalen Ende des Proteins finden sich überwiegend Leucin und Isoleucin (16), sowie Lysin (7). Dieser stark positive und hydrophobe Bereich (16), ist für die Bindung von

MSSAAGFCAS RPGLLFLGLL LLPLVAFAS AEAEEDGDLQ CLCVKTTSQV
RPRHITSLEV IKAGPHCPTA QLIATLKNR KICLDLQAPL YKKIIKKLLE S

Abb. 1-1 Aminosäuresequenz von PF4, nach SwissProt. Die 70 Aminosäuren, die das Protein bilden, sind unterstrichen. Davor befindet sich das Signalpeptid (17).

PF4 an Heparin bedeutsam. Dabei scheint explizit das Vorliegen von Lysin (an den Positionen 61, 62, 65 und 66) für die Bindung mit Heparin wichtig zu sein. Die Bedeutung beruht nicht nur auf der dadurch entstehenden positiven Ladung von PF4, sondern vor allem auf der Struktur von Lysin (18). Die Aminosäuren 61 bis 70 bilden eine α -Helix (7). Diese amphiphile α -Helix wird durch im Wechsel vorkommende basische und hydrophobe Reste gebildet (19). Die C-terminale Region enthält keine Cysteinreste, daher ist eine Bildung von durch Disulfidbrücken stabilisierten Dimeren in diesem Bereich nicht möglich (20).

1.1.2 Tertiär-/Quartärstruktur des Proteins

PF4-Moleküle liegen immer sowohl als Monomer, als auch als Dimer und Tetramer vor (20). Die häufigste Form ist das Tetramer, das aus vier nicht kovalent gebundenen Untereinheiten besteht (7), (21). PF4 weist als Tetramer eine zylindrische Struktur auf (11). In einem Tetramer bilden die 4 α -Helices mit den vorhandenen Arginin- und den Lysinresten (mit Ausnahme von Lysin-14 und -50) einen zur Oberfläche gerichteten positiv geladenen Ring (7). Die positiv geladenen Aminosäuren der C-terminalen α -Helices jedes Monomers und die innen befindlichen kationischen Aminosäuren bilden dabei diesen Ring (11). Der Kern des Tetramers besteht aus einem Stapel zweier β -Faltblattstrukturen (7). Der Ring bindet Heparinmoleküle, welche sich um den Zylinder des Tetramers winden (11).

1.1.3 Funktion von PF4

Forschungen an PF4 weisen auf vielfältige Einflussnahmen des Proteins hin. In vivo und in vitro Untersuchungen an unterschiedlichen Zelltypen zeigen dabei zum Teil gegensätzliche Eigenschaften auf.

Der amphiphilen α -Helix kommt eine große Bedeutung für die Bindung von Peptiden an Oberflächen zu (19).

1981 wurde von Deuel et al. gezeigt, dass PF4 chemotaktische Einflüsse auf Neutrophile und Monozyten besitzt. Bereits durch 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konnten inflammatorische Zellen angelockt werden (22). In Untersuchungen von Deuel et al. sowie Senior et al. konnten die 13 C-terminalen Aminosäuren als der chemotaktisch aktive Bereich des PF4 bestimmt werden (19), (23). Spätere Untersuchungen führen die chemotaktischen Eigenschaften von PF4 gegenüber

Neutrophilen auf eine Verunreinigung mit anderen Chemokinen zurück. Für die Verunreinigungen wird vor allem β -Thromboglobulin verantwortlich gemacht (24).

In Untersuchungen von Lebeurier et al. scheint die dimere Struktur von PF4 für die inhibitorische Aktivität auf Megakaryozyten verantwortlich zu sein. Für die Ausbildung der dimeren Struktur sind die im PF4 vorliegenden Cysteinreste notwendig. Die 13 C-terminalen Aminosäuren haben keinen chemotaktischen Einfluss auf Megakaryozyten (20).

Neutrophile werden von PF4 dahingehend beeinflusst, dass es deren Bindung an Plasmaeiweiße in Anwesenheit von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) steigert (24).

PF4 hat auch antithrombotische Eigenschaften, indem es eine Bildung von einem prokoagulatorischen Komplex aus Prothrombin, Faktor Xa und anderen Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren verhindert. Darüber hinaus wird die Aktivierungsrate des antikoagulatorisch wirkenden Protein C erhöht (25).

Auf Grund der geschilderten gegensätzlichen Eigenschaften beeinflusst PF4 nur in einem engen Konzentrationsbereich die Gerinnelbildung. Die PF4-Konzentration ist abhängig von dem PF4-Gehalt der Plättchen und der Menge, die während der Thrombozytenaktivierung freigesetzt wird (25).

Bei einzelnen Patienten konnten im Serum Antikörper gegen PF4 nachgewiesen werden, deren klinische Bedeutung unklar ist. Diese binden sowohl an „freies“ PF4, als auch an in einem PF4/Heparin-Komplex gebundenes PF4. Ein vermehrtes Vorkommen von Antikörpern gegen den PF4/Heparin-Komplex ist bei Patienten, die an Anti-Phospholipid-Syndrom leiden, beschrieben worden. Hohe Heparindosen sättigen die Heparinbindungsstellen der PF4-Moleküle und zerstören somit den PF4/Heparin-Komplex (1).

Die inhibitorischen Einflüsse von PF4 auf Endothelzellen verhindern neoplastisches Wachstum und Angiogenese (26), (27). PF4 hemmt in vitro die Zellteilung, da es verhindert, dass Endothelzellen von der G-Phase in die S-Phase übergehen. Zellen, die sich bereits in der

S-Phase befinden, werden an der DNA-Synthese gehindert. Auf das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen scheint PF4 keinen Einfluss zu haben (26).

PF4 ist auch an immunologischen Prozessen beteiligt. T-Zellen speichern PF4 und können PF4 freisetzen. Dies bewirkt eine Hemmung der Produktion von Th1-Zytokinen, wohingegen Th2-Zytokine vermehrt gebildet werden (27).

1.2 Plättchenfaktor 4 Variante 1

1.2.1 Struktur von PF4var1

1989 beschrieben Green et al. eine Variante des Gens für PF4, das Gen für PF4var1 (5). Diese Untersuchungen ergaben, dass das Gen von PF4var1 zwei Introne enthält. Das erste Intron trennt eine möglicherweise für das Signalpeptid kodierende Region von der Region, die den Beginn des reifen Proteins darstellt. Das zweite Intron trennt die Exone 2 (Aminosäure 1-41) und 3 (Aminosäure 42-70). Die Exone 2 und 3 des PF4var1 enthalten, neben den Nukleotid-austauschen, die zu drei geänderten Aminosäuren führen, vier stumme Nukleotidveränderungen (5).

Eisman et al. konnten zeigen, dass es sich bei PF4 und PF4var1 um non-allele Gene handelt (6). Die Gene unterscheiden sich an drei Stellen, welches zur Insertion von drei unterschiedlichen Aminosäuren und somit zu einer geänderten Aminosäuresequenz des Proteins PF4var1 führt, Abb. 1-2.

Die Aminosäure Prolin-58 im PF4 ist im PF4var1 durch Leucin ersetzt. Weitere Veränderungen betreffen die Positionen 66 und 67, an denen Lysin und Leucin im PF4, jedoch Glutaminsäure und Histidin im PF4var1 vorliegen, Tab. 1-1. Durch die veränderte

MSSAARSRLT RATRQEMFLF ALLLLPVVVA FARAEAEEDG DLQCLCVKTT
SQVRPRHITS LEVIKAGPHC PTAQLIATLK NGRKICLDLQ ALLYKKIIE HLES

Abb. 1-2 Aminosäuresequenz von PF4var1, nach SwissProt. Die 70 Aminosäuren, die das Protein bilden sind unterstrichen. Davor befindet sich das Signalpeptid. Die 3 Aminosäuren, die in PF4var1 ausgetauscht sind, sind hervorgehoben (28).

Tab. 1-1 Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen Plättchenfaktor 4 und Plättchenfaktor 4 Variante 1, die Positionen der Aminosäuren sind ohne das Signalpeptid gezählt.

Aminosäureposition	PF4	PF4var1
58	Prolin	Leucin
66	Lysin	Glutaminsäure
67	Leucin	Histidin

Aminosäuresequenz des C-terminalen Endes im PF4var1 verringert sich die positive Ladung (5), sowie der basisch/hydrophobe Abschnitt (6) des Moleküls. Die veränderte Aminosäuresequenz von PF4var1 führt zur einer anderen Struktur und Ladung des Moleküls. Diese Veränderung ist von Bedeutung für die unterschiedliche Stärke der Bindung zwischen Heparin und PF4 bzw. PF4var1 (5), (6).

1.2.2 Differenzen zwischen PF4 und PF4var1

Im reifen Protein liegt der Unterschied zwischen PF4 und PF4var1 bei 2,6 % für die DNA, bzw. 4,3 % für die Aminosäuresequenz (6). Weitere Differenzen finden sich in den Signalpeptiden. Die Länge des Signalpeptides von PF4 beträgt 31 Aminosäuren, die Länge des Signalpeptides von PF4var1 beträgt 34 Aminosäuren. Die DNA-Abweichung zwischen den Signalpeptiden von PF4 und PF4var1 beträgt 14 %, die Abweichung der Aminosäuresequenz in diesem Bereich liegt bei 38 % (6). Abgesehen von einem Austausch von 15 Aminosäuren, weist das Signalpeptid von PF4var1 eine um 3 Aminosäuren längere Sequenz auf. Auf Grund dieser Veränderungen ist das Signalpeptid von PF4var1 stärker positiv geladen. Dies könnte dafür sprechen, dass PF4var1 entweder in anderen Zellen vorkommt als PF4 oder, dass der Sekretionsmechanismus von PF4var1 ein anderer ist (5).

1.2.3 Funktion von PF4var1

Die Translation des Gens von PF4var1 in ein biologisch aktives Protein konnte durch Struyf et al. gezeigt werden (29). Beide Proteine (PF4 und PF4var1) werden in Plättchen exprimiert, wobei die Expression von PF4var1 geringer ist als die von PF4 (6). Außerdem werden beide Proteine in den α -Granula der Plättchen gespeichert. Eine Degranulation der Plättchen findet an geschädigten Gefäßen oder bei Thrombosen statt. Die lokale Angiogenese wird durch die Ausschüttung von PF4 bzw. PF4var1 beeinflusst. Außerdem konnten Struyf et al. zeigen, dass

PF4var1 in vitro stärker inhibitorisch auf die Chemotaxis von Endothelzellen wirkt und in vivo ein stärkerer Inhibitor der Angiogenese ist als PF4 (29).

Lasagni et al. vermuten eine unterschiedliche Rolle von PF4 bzw. PF4var1 bei inflammatorischen oder hämostatischen Prozessen anhand der Bildung, Speicherung und Abgabe der Proteine (27). Bei den von Lasagni et al. durchgeführten in vitro-Untersuchungen wurde PF4var1 im Golgi-Apparat gebildet und kontinuierlich von den verwendeten Zellen sezerniert. Von den verwendeten Zellen zeigten lediglich Zellen der glatten Gefäßmuskulatur ein Überwiegen der Produktion von PF4var1 im Vergleich zu PF4. Des Weiteren konnten Lasagni et al. sehr hohe PF4var1-Werte in glatten Herzmuskelzellen nachweisen. Das Überwiegen von PF4var1 erklärt die stärkere, durch PF4var1 induzierte Antiangiogenese und auch seinen Einfluss auf die Endothelzellproliferation (27).

Auf Grund der großen Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz von PF4 und PF4var1 gehen Lasagni et al. davon aus, dass es unmöglich ist Antikörper, die spezifisch eines der beiden Proteine erkennen, zu gewinnen (27).

PF4var1 zeigt hochpotente antitumorale Eigenschaften. In vitro-Tierversuche von Struyf et al. zeigten einen hemmenden Einfluss von PF4var1 auf das Tumorstadium und die Metastasierung von Tumoren (30). PF4var1 wirkt dabei über die Hemmung der Angiogenese, die bei PF4var1 stärker ausgeprägt ist als bei PF4. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch ungeklärt. Vermutlich liegt sowohl eine Bindung von Glykosaminoglykanen, als auch eine Bindung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren vor.

1.3 Pathogenese der HIT

1.3.1 Bedeutung von PF4 bei der HIT

Poncz et al. vermuten den Grund für das Vorliegen von Thrombosen bei der HIT in der höheren Affinität von Heparan- und Dermatansulfat für PF4 (3). PF4 hat eine hohe Affinität zu Heparin und anderen negativ geladenen Glykosaminoglykanen (GAG), wie z.B. Heparansulfat, Dermatansulfat und Chondroitinsulfat (8). 10 µg PF4 können 1 µg Heparin neutralisieren (31). Die Bindung von Heparin an PF4 beruht auf einer elektrostatischen Interaktion, welche mit der Größe des Oligosaccharides, der Ladung und dem Grad der

Sulfatierung zusammenhängt (32). Damit gegen PF4/Heparin-Komplexe gerichtete Antikörper den Komplex aus PF4 und Heparin erkennen können, ist ein relatives molares Verhältnis von 1:1 erforderlich. In diesem Verhältnis bilden PF4 und Heparin *ultralarge complexes* (ULCs), die als Antigene dienen. An der Entstehung einer HIT kann aber auch PF4 gebunden an Zelloberflächen eine Rolle spielen (3). Nachdem PF4 durch Plättchenaktivierung freigesetzt wurde, bindet es an Zelloberflächen und ist somit als Antigen für HIT-Antikörper erkennbar (4). Auf Zelloberflächen befinden sich GAG mit denen PF4 eine Bindung eingehen kann. Für unterschiedliche GAG weist PF4 unterschiedliche Affinitäten auf. Auf der Oberfläche von Endothelzellen und Monozyten präsentierte GAG bestehen vorwiegend aus Heparansulfat und Dermatansulfat. Diese bilden mit PF4 einen antigenen Komplex. Heparan- und Dermatansulfat haben eine höhere Affinität zu PF4 als Chondroitinsulfat, welches sich auf der Oberfläche von Thrombozyten befindet und dort PF4 bindet. Auf Grund dieser Oberflächenstruktur reichen geringe Mengen von Endothelzellen oder Monozyten aus, um PF4 von der Thrombozytenoberfläche zu lösen (3).

Prechel et al. beschreiben, dass auf Grund der höheren Affinität von PF4 für GAG im Vergleich zu Chondroitinsulfat PF4 nach der Degranulation an GAG und nicht mehr an Chondroitinsulfat gebunden wird (4). Daher können HIT-Antikörper auch an PF4 auf der Oberfläche von Endothelzellen, Neutrophilen und aktivierten Monozyten binden (4).

Die Bindung von PF4 an GAG des Gefäßsystems bedeutet auch, dass PF4 durch Gabe von Heparin wieder in den Kreislauf zurückgegeben werden kann. Daher ist die Menge an PF4, die in einem Kreislauf zirkuliert, abhängig von der Thrombozytenaktivierung und der Effektivität der Endothelzellen, da diese PF4 abbauen. Krankheiten, die mit einer erhöhten Thrombozytenaktivierung und/oder endothelialen Dysfunktionen einhergehen, können somit ein höheres Risiko für die Entstehung von HIT-Antikörpern darstellen. Chronisch hohe PF4-Spiegel können dazu beitragen, dass die Entstehung einer HIT begünstigt wird. Eine kontinuierliche Gabe von Heparin ist zur Entstehung der HIT nicht notwendig. Die Bedeutung von Heparin bei der HIT liegt darin, dass Heparin in dem PF4/Heparin-Komplex als Antigen wirksam ist und zur Entstehung von Antikörpern notwendig ist. Daher können HIT-Antikörper auch in Abwesenheit von Heparin durch endogen vorkommende PF4-Epitope gebunden werden. In vitro Untersuchungen zeigten, dass die antigenen Konformation von PF4

unabhängig zur Anwesenheit von Heparin ist (4). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PF4/Heparin-Antikörper häufiger nachweisbar sind, als die Diagnose HIT gestellt wird (1).

In einem weiteren, noch umstrittenen Erklärungsmodell zur Pathogenese der HIT postuliert Thachil, dass PF4 der alleinige Verursacher der Erkrankung ist (25). Gewebeverletzungen bewirken eine erhöhte Thrombozyten-Monozyten-Interaktion. Dabei wird PF4 vermehrt freigesetzt. Das prothrombotische Potential von PF4 könnte durch die Neutralisation der negativ geladenen Oberfläche von Thrombozyten und Endothelzellen durch PF4 erklärt werden. Dadurch ist eine Annäherung der Thrombozyten aneinander und zum Endothel erhöht, wodurch die Thrombusformierung begünstigt und die Thromboseentstehung erleichtert wird. PF4 hemmt auch die Aktivierung von Antithrombin durch Heparin und verhindert den Verbrauch von Plasmafaktor V in der Gerinnungskaskade. Zusätzlich kommt es zu einem Anlocken von Monozyten, welche am Ort der Verletzung Gewebefaktor freisetzen und somit die Blutgerinnung zusätzlich initiieren. Unfraktioniertes Heparin aktiviert Plättchen, verstärkt daneben aber auch die Adhäsion von Thrombozyten an Monozyten und stellt somit einen wichtigen Faktor bei der HIT dar (25).

1.3.2 Die antigene Bindungsstelle des HIT-Antikörpers

HIT-Antikörper binden an Komplexe aus PF4 und Heparin. Der multimolekulare PF4/Heparin-Komplex weist mehrere, ähnliche Epitope auf. Somit besteht die Möglichkeit mehrere Antikörper zu binden und Immunkomplexe zu bilden (33).

Die von den HIT-Antikörpern erkannten PF4/Heparin-Komplexe bestehen dabei vermutlich aus nicht mehr als 2 PF4-Tetrameren. Die Annäherung zweier PF4-Tetramere erfolgt unter Mithilfe von polyanionischen Verbindungen. Die positiv geladenen PF4-Moleküle lagern sich dabei unter Bildung von gebirgskammartigen Strukturen aneinander an. Die Moleküle rücken näher aneinander heran, es erfolgt eine elektrostatische Neutralisierung, die zur Bildung der antigenen Stelle im PF4/Heparin-Komplex wichtig ist. Durch einen Austausch von Aminosäuren, in den für die Bindung zwischen PF4-Tetrameren und Heparin relevanten Bereichen, kann es zu einer Störung in der Bildung dieser kammartigen Strukturen kommen (2).

Zur Erkennung von HIT-Antikörpern ist das Vorkommen von polyanionischen Verbindungen wichtig. Daraus schließt Visentin, das für die Bindung von HIT-Antikörpern vor allem die Konformation des Antigens entscheidend ist. HIT-Antikörper erkennen Veränderungen auf dem PF4, welche durch die elektrostatische Bindung eines linearen Polyanions zu Stande kommt. Dieses Polyanion hat etwa eine Länge von 42 Å und umspannt ein Drittel des PF4-Tetramers. Die wichtigste antigene Stelle für den HIT-Antikörper liegt zwischen dem dritten und vierten Cystein, aber vor allem an Prolin-37 (32), (34). Ein Austausch von Prolin-37 verhindert die Bindung von HIT-Antikörpern durch Störung der antigenen Stelle. Die Heparinbindung findet im C-terminalen Bereich des Proteins statt. Die Lysinreste in diesem Bereich des Proteins, beeinflussen die Bindung von HIT-Antikörpern nur dann, wenn Lysin-61 gegen Alanin ausgetauscht wird. Die Bindung von HIT-Antikörpern wird durch Bindung von polyklonalen Antikörpern gegen den C-terminalen Bereich von PF4 nicht gestört. Auch Veränderungen im N-terminalen Proteinbereich haben keinen Einfluss auf die Bindung der HIT-Antikörper (34).

PF4 weist nach Bindung an Heparin drei Bindungsstellen für HIT-Antikörper auf. Dabei kommen Antikörper aller Immunglobuline (IgG, IgM und IgA) vor, so dass von einer Beteiligung der T-Helfer-Zellen ausgegangen wird (32). Bei der HIT ist vor allem Immunglobulin G (IgG) von Bedeutung. Anti-PF4/Heparin-Antikörper binden PF4 über dessen F(ab)-Domäne. Durch die Bindung mehrerer PF4-Moleküle mit mehreren IgG-Molekülen entstehen große Immunkomplexe. Diese binden an thrombozytäre Fc γ -Rezeptoren und lösen dadurch die Freisetzung prokoagulatorischer Mikropartikel aus Thrombozyten, die Aktivierung von Monozyten und Endothelzellen und letztlich die Aktivierung des Gerinnungssystems aus (1).

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör

2.1.1 Medien und Medienzusätze

DMEM high Glucose	Invitrogen
HEK 293 Express	PAA Laboratories
Penicillin / Streptomycin	Biochrom
Gentamycin	Biochrom
Natriumpyruvat	Biochrom
<i>N</i> -Acetyl-L-alanyl-L-glutamin	Biochrom
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Hygromycin	Sigma-Aldrich
Geneticin	Invitrogen
Ampicillin	Roth
Chloramphenicol	Roth

2.1.2 Reagenzien zur Zellkultur

Trypsin/EDTA	Biochrom
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS, w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺) 1x	Biochrom
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich

2.1.3 Dialysematerialien

Dialysepuffer: Suprapur [®] , Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Dialyseschlauch: Spectrapor	Serva Electrophoresis

2.1.4 Puffer und Lösungen

Borat	Roth
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth
Ethanolamin	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
NaHCO ₃	Merck
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	Merck
Na ₂ HPO ₄ • H ₂ O	Merck
NaCl	Sigma-Aldrich
Na-Acetat	Sigma-Aldrich
Glycin	Riedel-de-Haen
Isopropanol	Roth
Tris-HCl (Trizma-Base), bzw. Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich, bzw. Roth
Trypton	Roth
Glukose	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Coomassie-Blau	Roth
Probenpuffer Rotiload	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA) 22 %	Ortho-Clinical Diagnostics
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth

2.1.5 Antikörper

Kaninchen-anti-humanes PF4	Dianova (Auftragsimmunisierung)
Schwein-anti-Kaninchen IgFITC	Dako

2.1.6 Vektoren

pGex-SSEB (Derivat von pGex-2TK)	GE Healthcare
pET11a	Stratagene

2.1.7 Restriktionsenzyme

<i>Bam</i> HI	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	New England Biolabs
<i>Nde</i> I	New England Biolabs

2.1.8 Kits

Qiaquick PCR Purification Kit [®]	Qiagen
Qiaprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen
Asserachrom [®] PF4	Roche Diagnostics
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce

2.1.9 Geräte und Zubehör

Laminarbox	Gelaire [®] Flow Laboratories BSB 6A
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Durchflusszytometer	FACScan, Becton, Dickinson
Photometer, Spectra II	SLT Labinstruments, Austria
Heraeus Instruments RA40	
Produktionsmodul: 3,5 kD	Invitro Systems & Services GmbH
Ultrazentrifugationsröhrchen, 3 kDa	Millipore

HiTrap™ <i>N</i> -hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte Säule	GE Healthcare
<i>Reverse-phase high performance liquid chromatography</i> (RP-HPLC) mit C 18-Säule	Äkta, GE Healthcare
<i>Matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight</i> (MALDI-ToF)	Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer 7000
<i>Electrosprayionization – time-of-flight- 7-Tesla-</i> LTQ-FTICR-Massenspektrometer	Thermo Electron

2.1.10 Software und Datenbank

WinMDI2.8	Copyright 1993-2000 Joseph Trotter
SwissProt (Proteindatenbank), Rel. 49, 10.11.2005	Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), European Bioinformatics Institute (EBI)

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Zelllinien

Als Ausgangsmaterial der Versuche wurden drei transfizierte Epstein-Barr-Nuclear-Antigen (EBNA) 293-Zellklone verwendet:

- EBNA 293-PF4 C-1D
- EBNA 293-PF4 V1-B4
- EBNA 293-Mock

Der Zellklon EBNA 293-PF4 C-1D ist mit dem Gen des klassischen Plättchenfaktors 4 (PF4classic, PF4), der Zellklon EBNA 293-PF4 V1-B4 mit der Variante 1 des Plättchenfaktors 4 (PF4variante1, PF4var1) transfiziert. Die dritte Zelllinie enthält keines der Gene und diente als Kontrolllinie (Mock).

Die Zellklone wurden von Professor Paola Romagnani von der Universität Florenz, Interdepartmental Laboratory of Cellular and Molecular Nephrology, zur Verfügung gestellt. EBNA 293 ist die Tochterzelllinie der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-293

(*human embryonic kidney*), die 1977 erstmals beschrieben wurde (35). Die EBNA 293-Zelllinie enthält zusätzlich das Epstein-Barr-Virus (EBV) EBNA-1-Gen (Epstein-Barr-Nuclear-Antigen) (36). In der vorliegenden Arbeit wird lediglich auf die PF4-Produktion der Zellklone eingegangen.

2.2.2 *E. coli*

<i>E. coli</i> DH5a	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RP	Stratagene

2.3 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

2.3.1 Nährmedien der Zellkultur

Die Medien DMEM high Glucose bzw. HEK293 Express wurden mit den folgenden Zusätzen verwendet:

1 % Penicillin (10000 U/mL) / Streptomycin (10 mg/mL)

0,5 % Gentamycin (10 mg/mL)

1 % Natriumpyruvat (100 mM)

1 % *N*-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin (200 mM)

10 % Fetales Kälberserum (FCS)

0,6 % Hygromycin (50 mg/L)

0,5 % Geneticin (50 mg/mL)

2.3.2 Nährmedien der *E. coli*

LB-Medium	1 % Trypton (10 g/L)
	0,5 % NaCl (5 g/L)
	0,7 % Hefeextrakt (7 g/L)
	pH 7,5

2xYT-G-Medium	1,6 % Trypton (16 g/L)
	1 % Hefeextrakt (10 g/L)
	0,5 % NaCl (5 g/L)
	2 % Glukose
	pH 7,0

2.3.3 Selektionsantibiotika

Ampicillin	50 mg/mL
Chloramphenicol	25 mg/mL

2.3.4 Laufpuffer der Agarosegelelektrophorese

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	89 mM Tris
	89 mM Borat
	2,5 mM EDTA
	pH 8,3

2.3.5 Puffer zur Reinigung der Proteine PF4 bzw. PF4var1 mittels Chromatographie

Für die Reinigung von PF4 kamen die Puffer A und B zur Anwendung. Diese setzen sich aus unterschiedlichen Salzen zusammen und finden ihren Einsatz in der Aufarbeitung von PF4 durch die Firma ChromaTec GmbH, Greifswald. Zur Reinigung von PF4var1 wurden die Puffer C und D entwickelt. Diese unterschieden sich sowohl durch die eingesetzten Salze als auch durch den pH-Wert von den Puffern A und B. Die genaue Zusammensetzung der Puffer, sowie der Ablauf der Chromatographie werden aus patentrechtlichen Gründen nicht genannt.

2.3.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

<i>Lower</i> Tris (4x)	1,5 M Tris/HCl
	0,4 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
	pH 8,8

<i>Upper</i> Tris (4x)	0,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS pH 8,8
Trenngel	1620 μ L destilliertes Wasser 1760 μ L <i>Lower</i> Tris 3500 μ L Acrylamidlösung (30 %) 80 μ L Ammoniumpersulfat (APS) 4 μ L Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)
Sammelgel	1140 μ L destilliertes Wasser 450 μ L <i>Upper</i> Tris 180 μ L Acrylamidlösung (30 %) 30 μ L APS 3 μ L TEMED
Tris-Glycin-Laufpuffer (4x)	0,1 M Tris 0,76 M Glycin 0,4 % SDS pH 8,8

2.3.7 Affinitätschromatographie mittels NHS-aktivierter Säule

Kopplungspuffer	0,2 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl pH 8,3
Äquilibrierungs-/Bindungspuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 0,15 M NaCl pH 7,4

Elutionspuffer	100 mM Glycin-HCl 0,5 M NaCl pH 2,7
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl pH 9,0
Lagerungspuffer	0,05 mM Na ₂ HPO ₄ 0,1 % NaN ₃ pH 7,0
Blockierungspuffer A	0,5 M Ethanolamin 0,5 M NaCl pH 8,3
Blockierungspuffer B	0,1 M Natriumacetat 0,5 M NaCl pH 4,0

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung der EBNA 293-Zelllinien

2.4.1.1 Kultivierung in Kulturflaschen

Alle Arbeiten erfolgten an einer Laminarbank unter sterilen Bedingungen. Die EBNA 293-Transfektanten wurden im Brutschrank bei 37° C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zusammensetzung des Nährmediums ist unter 2.3.1 beschrieben. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Sobald sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen in neue Zellkulturflaschen überführt. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Medium mit den darin enthaltenen toten Zellen dekantiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 2 x 10 mL Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (*Phosphate Buffered Saline* – PBS; ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen, um überschüssiges Medium und Stoffwechselendprodukte zu entfernen.

2.4.1.2 Passagierung der Zellkultur

Um eine Passagierung der Zellen vornehmen zu können wurde zunächst das alte Medium dekantiert und die Zellen zwei Mal mit je 10 mL PBS gewaschen. Um nun die adhären wachsenden Zellen von der Flaschenwand zu lösen, wurde den Zellkulturflaschen 1 mL Trypsin/EDTA-Lösung zugesetzt, wobei das proteolytische Enzym Trypsin der Ablösung der Zellen von der Flaschenwand dient. Zur Ansäuerung der Trypsin-Lösung und Beschleunigung des Ablösevorgangs wurde der Komplexbildner EDTA eingesetzt. Nach etwa 1 Minute konnten die Zellen durch vorsichtiges Klopfen an die Flaschenwand von der Oberfläche entfernt werden. Mit Hilfe von 10 mL PBS wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt und die Zellen aus den Zellflaschen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 10 min Zentrifugation bei 500 x g wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und nach Auszählen der Zellzahl in neue Kulturflaschen überführt.

2.4.1.3 Kryokonservierung der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde ein Einfriermedium aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und fetalem Kälberserum (FCS) im Verhältnis 1:9 hergestellt. Die Zellen wurden stufenweise zunächst bei -20°C , dann bei -80°C eingefroren. Für eine längere Konservierung mussten die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

2.4.1.4 Auftauen von Zellen

Zellen in kryokonservierter Form wurden nach der Entnahme aus flüssigen Stickstoff unter fließendem warmen Wasser aufgetaut, zügig in Zentrifugenröhrchen überführt und mit DMEM 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 1 mL Medium resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität, und die Zellen wurden in Zellkulturflaschen überführt.

2.4.1.5 Kultivierung von Zellen in hoher Dichte

Zur Kultivierung von Zellen in großen Mengen wurde ein Bioreaktor (Minifermenter) eingesetzt. Der Bioreaktor besteht aus einem Produktionsmodul und einem Versorgungsmodul (Abb. 2-1) und ermöglicht somit die Kultivierung von Zellen in hoher Dichte und die Produktion großer Proteinmengen. Im Produktionsmodul wurden 370×10^6 Zellen und 35 mL serumfreies Nährmedium eingesetzt. Im Versorgungsmodul befanden sich 350 mL serumfreies Nährmedium. Zwischen den beiden Modulen befindet sich eine Dialysemembran mit einer Ausschlussgröße von 3,5 kDa (das PF4-Protein hat als Monomer eine Größe von 7,8 kDa). Die Rollvorrichtung ermöglicht einen gleichmäßigen Nährstoffaustausch zwischen

Versorgungs- und Produktionsmodul und somit eine gleichmäßige Benetzung der Zellen mit Medium. Der Mediumwechsel nach 4 Tagen muss somit auch nur im Versorgungsmodul vorgenommen werden. Stichproben der in der Produktionseinheit wachsenden Zellen wurden entnommen, um Zellzahl und –vitalität zu kontrollieren. Das von diesen Zellen gebildete Protein PF4 kann die semipermeable Membran nicht passieren und wird dort angereichert. Das Medium und die sonstigen Kultivierungsbedingungen entsprachen denen für Kulturen in Zellkulturflaschen, Abschnitt 2.4.1.1.

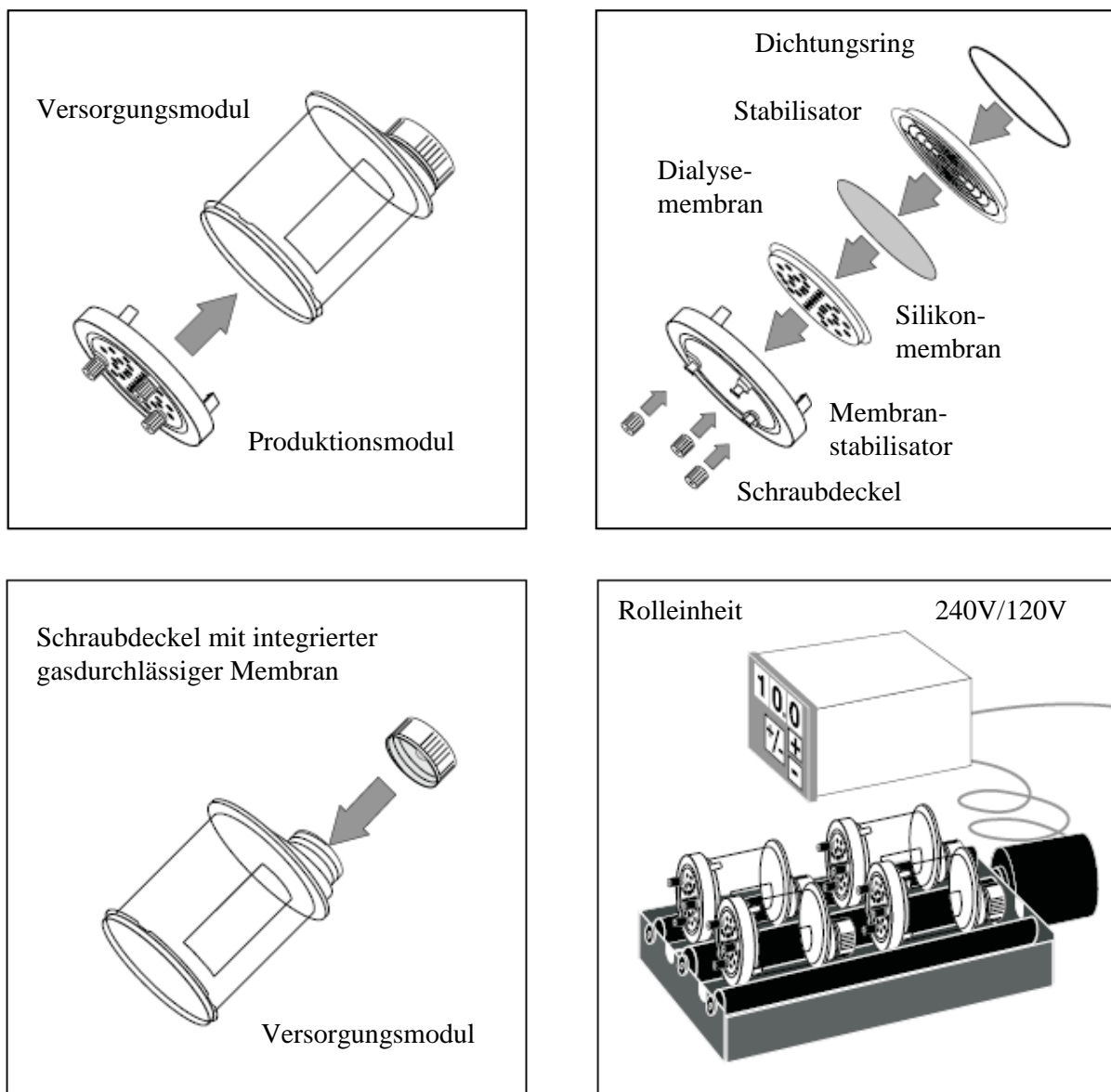


Abb. 2-1 Schema des verwendeten Minifermenters (aus miniPERM-Manual (37)).

2.4.2 Nährmedien

Die Klone der EBNA 293-Zelllinien wurden mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bzw. HEK-293-Express-Medium versorgt. Als Selektionsantibiotika wurden Hygromycin B und Geneticin zugegeben.

2.4.2.1 Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM

Das verwendete DMEM enthält neben Glucose und L-Glutamin fetales Kälberserum. Es handelt sich somit um ein serumhaltiges Nährmedium. Zusätzlich wurde DMEM mit den in 2.3.1 aufgeführten Substanzen supplementiert. Die Zusätze wurden jeweils mittels eines 0,2 µm-Filters vor Zusatz zum Medium sterilfiltriert.

2.4.2.2 HEK-293-Express-Medium

Das HEK-293-Express-Medium (HEK-Medium) ermöglicht eine serumfreie Kultur von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen), da es im Vergleich zu Standard-Kulturmedien ohne fetales Kälberserum verwendet werden kann. Dieses Medium kam zum Einsatz, um auszuschließen, dass es sich bei dem nachgewiesenen PF4 bzw. PF4var1 um eine Kontamination von PF4 aus dem Kälberserum handelte.

2.4.2.3 Adaptation an serumfreies Medium

FCS enthält Proteine und vor allem Wachstumsfaktoren, die für die Entwicklung der Zellen und für ihre Anheftung an die Zellflaschenwand benötigt werden. Daher wurden zunächst alle Zellen in DMEM angezüchtet, dann dieses schrittweise (1:1 bzw. 1:4) gegen HEK-Medium ausgetauscht. Somit erfolgten eine langsame Reduktion des FCS und eine Adaptation der Zellen an die serumfreie Kultur. Eine 1:1-Mischung der Medien wurde für etwa 5 Tage eingesetzt, bevor eine Umstellung auf eine 1:4-Mischung (DMEM:HEK) erfolgte. Nach 7 Tagen wurde lediglich HEK-Medium verwendet.

2.4.3 Einsatz der Dialyse

Nach Beenden der Zellkultivierung mittels Minifermenter wurde der Kulturüberstand der einzelnen Zelllinien dialysiert. Dazu wurden die Dialyseschläuche entsprechend den Angaben des Herstellers vorbereitet. Die Dialyse erfolgte mittels eines 30 cm langen Dialyseschlauches (Molekulargewichtsausschlussgrenze (MWCO – *molecular weight cut-off*) 3500 Da; Durchmesser 29 mm) gegen 1 Liter 0,05 M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydratlösung

($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), pH 7,5 bei 4 °C über Nacht auf einem Magnetrührer. Das Dialysat wurde aliquotiert und eingefroren und für die unter 2.6.2 beschriebenen ELISA-Versuche eingesetzt.

2.4.4 Überprüfung der Zellvitalität

Zur Zellzählung wurden die toten Zellen von 50 μL Zellsuspension mit 0,5 %iger Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 angefärbt. Ein Eindringen des Farbstoffs in lebende Zellen ist nicht möglich, da der Farbstoff die Zellmembran nicht passieren kann. Es wurden sowohl die Gesamtzahl der Zellen, als auch das Verhältnis zwischen vitalen und avitalen Zellen bestimmt. Ausgezählt wurde in einer Neubauer-Zählkammer (siehe Abb. 2-2) unter dem Durchlichtmikroskop. Nach dem Auszählen eines Großquadrates, welches ein Volumen von 10^{-4} mL besitzt, wurde die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzahl der Zellen/mL} = Z \times 2 \times V \times 10^4,$$

mit

- Z = Mittelwert der gezählten Zellen aus vier Großquadraten
- 2 = Verdünnungsfaktor, der auf der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau beruht
- V = Volumen, in dem die zu zählende Zellsuspension resuspendiert wurde in mL
- 10^4 = Kammerfaktor der Neubauer-Zählkammer.

Die Vitalität der Zellen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Vitalität (\%)} = (\text{Anzahl der ungefärbten Zellen} : \text{Gesamtzahl der Zellen}) \times 100\%.$$

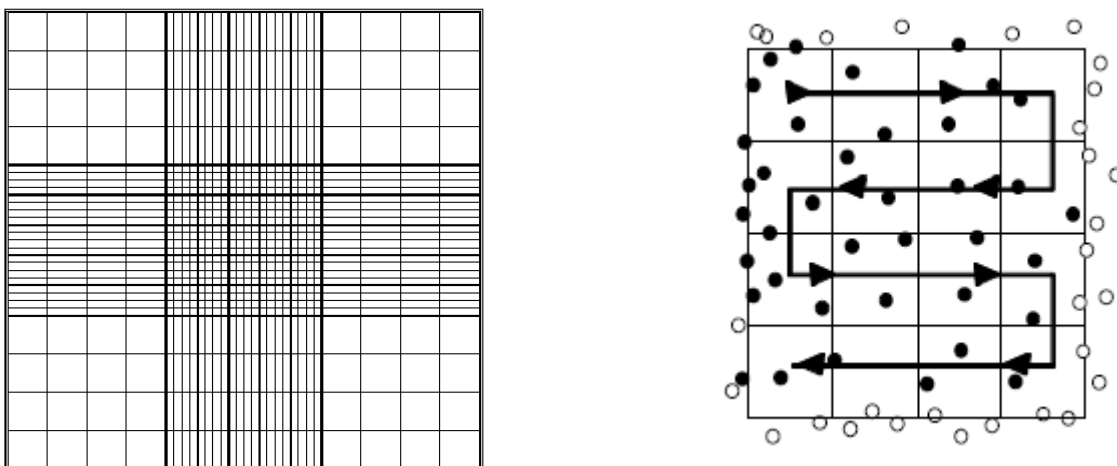


Abb. 2-2 Aufbau einer Neubauer-Zählkammer und Art der Auszählung.

2.5 Produktion von PF4 unter Verwendung von *E. coli*

Die verwendeten EBNA-Zellen entstammen einer menschlichen Zelllinie. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen neben dem gewünschten molekularbiologisch eingebrachten PF4 auch noch PF4 produzieren, der im nativen Genom der Zelle codiert ist. Um sicherzustellen, dass nur das erwünschte Protein erhalten wird, wurde das Protein heterolog in *E. coli* exprimiert. Die Arbeiten mit *E. coli* erfolgten bei der Firma ChromaTec GmbH, Greifswald.

Zum Einbau der vollständigen Gene für PF4 und PF4var1 in *E. coli* wurde pET11a als Vektor verwendet. Die für PF4 kodierenden DNA-Abschnitte wurden dazu aus den EBNA-Zellen amplifiziert und nach Insertion in den Vektor in *E. coli* DH5 α eingefügt. Nach der Selektion auf korrekte Klone und entsprechender Plasmidisolierung wurde im weiteren Verlauf zur Proteinproduktion der Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP verwendet. Dieser Stamm trägt ein Plasmid, das für einige, bei Prokaryoten seltene, tRNAs kodiert. Dies ermöglichte eine höhere Proteinexpression von eukaryotischen Proteinen in diesem Stamm. Zur Selektion der *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP kam neben Ampicillin auch Chloramphenicol als zweites Selektionsantibiotikum zum Einsatz.

2.5.1 Nährmedien zur Anzucht von *E. coli*

Zur Anzucht von *E. coli* wurden zwei verschiedene Nährmedien verwendet, LB-Medium (*lysogeny broth*) und YTG-Medium (Hefe-Trypton-Glukose-Medium). LB-Medium wurde für die Vorkulturen von *E. coli* bzw. für Anzuchten verwendet, mit denen DNA produziert werden sollte. YTG-Medium wurde dagegen für Anzuchten zur Proteinproduktion verwendet. Beide Medien wurden im Autoklaven für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Festmedien wurde zusätzlich 2% Agar-Agar zugesetzt. Sowohl Glukose als auch die Selektionsantibiotika Ampicillin bzw. Chloramphenicol wurden den Medien nach dem Autoklavieren zugesetzt.

2.5.2 Vorversuch mit 19 C-terminalen Aminosäuren

Der Vorversuch wurde in Zusammenarbeit mit Jens Hoppen, Firma ChromaTec GmbH, Greifswald durchgeführt. Dabei wurde *E. coli* DH5 α mit einem verkürzten Gen für PF4var1 transformiert. Das Gen kodiert für die neunzehn C-terminalen Aminosäuren des PF4-Gens und diente ursprünglich der Sequenzierung des PF4var1. Für den Vorversuch wurde ein

pGex-SSEB-Vektor verwendet. Die verwendeten Restriktionsenzyme waren *BamHI* bzw. *HindIII*. Der Einbau erfolgte analog der in 2.5.8 für den Einbau der vollständigen Gensequenzen beschriebenen Vorgehensweise. Durch die Insertion in den Vektor wurde die Sequenz mit einem Glutathion-S-Transferase-Tag (GST-Tag) fusioniert. Dieser 26 kDa große GST-Tag ermöglicht eine affinitätschromatographische Vorreinigung des Fragments mittels FPLC (*fast protein liquid chromatography*) über eine Glutathion-Sepharose-Säule. Nach Elution des 29 kDa Fusionsproteins GST-PF4var85-104 durch reduziertes Glutathion (GSH) erfolgte die proteolytische Spaltung in PF4var85-104 und GST durch Zugabe von Thrombin-Protease. Die Trennung des Fragmentes PF4var85-104 von GST und Thrombin-Protease erfolgte mittels RP-HPLC. Die Größe der fraktionierten Peptide wurde mittels MALDI-ToF überprüft. In Frage kommende Peptide wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Hippe, ChromaTec GmbH, Greifswald N-terminal sequenziert.

2.5.3 Isolation des Gens von PF4 bzw. PF4var1 und Einsatz in der PCR

Um das Gen für PF4 bzw. PF4var1 in *E. coli* einzubringen wurde zunächst eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Als Vorlage in der PCR diente aus den EBNA-Zelllinien isolierte PF4 bzw. PF4var1 kodierende DNA.

Für die PCR wurden 5 µL des isolierten Templates mit 79 µL Wasser, 10 µL *PWO*-Puffer, 1 µL Primer (Invitrogen), 2 µL desoxy-Nukleotid-Tri-Phosphat (dNTP) und 2 µL *PWO*-Polymerase versetzt. Der 5'-Primer von PF4 und PF4var1 trug eine *NdeI*-Schnittstelle, der 3'-Primer war mit einer *BamHI*-Schnittstelle gekoppelt. Da sich die Gensequenzen für PF4 und PF4var1 im 3'-Bereich unterscheiden, wurden Primer verwendet, die dies berücksichtigen (Tab. 2-1).

Tab. 2-1 Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme. Die Unterschiede in den 3'-Sequenzen sind hervorgehoben.

Primer	Sequenz
PF4 5A <i>NdeI</i>	AGTCCATATGGAAGCTGAAGAAGATGGGGACCTGC
PF4CL 3A 102 <i>BamHI</i>	AGTCGGATCCCTAACTCTCCAAA AGTTTCTTAATT
PF4V1 3A 105 <i>BamHI</i>	AGTCGGATCCCTAACTCTCCAAAT TGTTCTTAATG

Die PCR erfolgte in 36 Zyklen. Ein Zyklus bestand aus der Auftrennung des Mutterstranges bei 94° C, dem *Annealing* der Primer bei 56° C und dem Ablauf der Elongation bei 68° C.

Die neu entstandenen Plasmide erhielten die Bezeichnung JHC07, das für PF4 kodierende Plasmid, und JHC08, das für PF4var1 kodierende Plasmid.

2.5.4 Gelelektrophorese als Erfolgskontrolle der PCR

Zur Erfolgskontrolle der PCR und zum Nachweis der erwünschten Genfragmente erfolgte eine Gelelektrophorese. Je nach Größe des Genfragmentes wurden Gele mit 1 %, 2 %, 2,5 % oder 3 % Agarose verwendet. Als Laufpuffer wurde 1x Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer verwendet. Es erfolgte außerdem die Auftragung eines Standards. Die Auftrennung erfolgte bei 150 V. Zum Nachweis der Genfragmente erfolgte eine Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid. Unter UV-Licht konnten die verschiedenen Banden sichtbar gemacht werden. Aufgrund des mitgeführten Standards und bei bekannter Größe des Fragmentes war eine Zuordnung der sichtbaren Bande möglich.

2.5.5 Abtrennung der Primer

Zur weiteren Verarbeitung erfolgte nach der PCR eine Abtrennung der Primer mittels des Qiaquick PCR Purification Kit[®] von Qiagen. Die Vorgehensweise erfolgte analog der Anweisungen des Kits.

2.5.6 Verdau der PCR-Produkte und des Vektors

Vor dem Einbau der für PF4 bzw. PF4var1 kodierenden DNA in einen geeigneten Vektor erfolgte ein Verdau der benötigten PCR-Produkte und des vorgesehenen Vektors. Hierfür wurden Enzyme der Firma New England Biolabs verwendet. Der Verdau der PCR-Produkte erfolgte in 50 µL Wasser, 8 µL NEB2-Puffer aus dem Testkit, 0,8 µL BSA und je 1 µL der Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI*. Der Verdau des Vektors pET11a erfolgte in 40 µL Wasser, 5 µL Puffer und 0,5 µL BSA, sowie je 1 µL der Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI*. Durch diesen Restriktionsverdau wurde die DNA an den durch die PCR eingebauten Stellen geschnitten, so dass im Anschluss eine Verknüpfung der Fremd-DNA mit dem Vektor möglich war. Die Zugabe der Puffer gewährleistete optimale Reaktionsbedingungen. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Stunden wurde das verdaute Produkt mit einem Ladepuffer vermischt und zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen, wie unter 2.5.4 beschrieben.

2.5.7 Ligation des Plasmids

Für die Ligation wurden zunächst 3-5 μL verdauter Vektor und 20 μL verdautes PCR-Produkt mittels 1 mL kalten Ethanols (96 %) gefällt. Das Gemisch wurde für 15 min bei -20°C aufbewahrt und im Anschluss 15 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert. Das Ethanol wurde verworfen und das übrig gebliebene Produkt auf einem Heizblock getrocknet. Den so aufgereinigten DNA-Abschnitten wurde 15 μL Wasser, 2 μL 10 mM ATP, 2 μL Ligationspuffer und 1 μL T4-DNA-Ligase zugegeben. Dieser Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.5.8 Transformation der rekombinanten DNA in *E. coli*

Zur Transformation wurden 100 μL transformationskompetente *E. coli* mit dem Ligationsprodukt vermennt und 30 Minuten auf Eis gekühlt. Damit die DNA in die Bakterien eindringen konnte, wurde das Reagiergefäß anschließend für 2 Minuten auf 42°C erwärmt. Die kurzfristig erhöhte Permeabilität der Zellwand und der Zellmembranen erleichterte das Eindringen der DNA in die Bakterien. Im Anschluss wurde das Produkt wieder auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 mL LB-Medium erfolgte eine 1-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C . Das Medium wurde abzentrifugiert (30 Sekunden, $16000 \times g$), die Bakterien resuspendiert und auf Agar-Agar-Platten, die mit LB-Medium beschickt waren, ausgesät. Neben LB-Medium enthielten die Platten auch 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin als Selektionsantibiotikum. Die Platten wurden über Nacht in den Brutschrank (37°C) gestellt.

2.5.9 Herstellung von Miniscreens

Mit einigen der nach 2.5.8 transformierten Bakterienkolonien wurden Röhrrchen beimpft, die 3 mL LB-Medium und 6 μL Ampicillin-Stammlösung enthielten. Zur optimalen Versorgung der Bakterien mit Nährstoffen und Sauerstoff wurden die Röhrrchen bei 37°C und 170 rpm über Nacht auf einen Schüttler gestellt.

Zur analytischen Isolation von Plasmid-DNA (Miniscreen-Analyse) wurden 1,5 mL der *E. coli*-Lösung aus den beimpften Röhrrchen in 1,5 mL Reagenzgefäße überführt und 30 Sekunden bei $16000 \times g$ zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte in 100 μL 5x Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer), pH 8,0. Eine Zellwandlyse wurde durch Zugabe von 200 μL 0,2 M NaOH und 1 % SDS erreicht. Zur Fällung der Proteine wurden 150 μL 3 M Kaliumacetat pH 4,8 zugefügt. Um das Fällungsprodukt vom Überstand zu trennen erfolgte eine 10-

minütige Zentrifugation bei 16000 x g. Der Überstand wurde in neue Reagenzgefäße überführt und durch erneute Zentrifugation bei 16000 x g für 10 min mit 400 µL Isopropanol gewaschen. Dadurch erfolgte die Fällung der DNA, die sodann in 500 µL kaltem 70 %igen Ethanol bei 16000 x g für 3 min erneut gewaschen wurde. Nach Trocknen des Pellets erfolgte eine Resuspension in 30 µL Wasser.

2.5.10 Überprüfung des Transformationserfolgs mittels Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau der Miniscreens diente dem Nachweis, dass die gewünschten DNA-Fragmente in die *E. coli* Vektoren eingebaut wurden. Dazu wurde ein ad 10 µL-Gemisch aus Wasser, 1 µL Restriktionspuffer (NEB2-Puffer), sowie je 0,3 µL der Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* hergestellt. Nach Zugabe dieses Gemischs zu je 2–5 µL der Miniscreens erfolgte eine 2-stündige Inkubation bei 37 °C. Die durch die Restriktionsenzyme geschnittenen DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese, 2.5.4, untersucht. Bei erfolgreicher Klonierung konnten die gewünschten DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Diese *E. coli* wurden in größeren Mengen angezüchtet und zur Gewinnung (siehe 2.5.13) und Aufreinigung (siehe 2.7) des Proteins eingesetzt.

2.5.11 Plasmidisolierung aus *E. coli* DH5a

Zur Isolierung der Plasmide wurde das QIAprep[®] Spin Miniprep Kit von Qiagen verwendet. Nach Abzentrifugieren der in 50 mL-LB-Medium gewachsenen Bakterien (11000 x g, 10 min) wurde das entstandene Pellet mit 1 mL P1-Puffer aus dem Kit resuspendiert. 350 µL der Resuspension wurden mit 250 µL P2 versetzt und durchmischt. Nach Zugabe von 350 µL N3 und erneuter Durchmischung erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 16000 x g. Der flüssige Überstand wurde in die im Kit enthaltenen Zentrifugationssäulchen mit Silica-Membran zur DNA-Bindung überführt. Es erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 16000 x g. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule 30 s bei 16000 x g mit 750 µL Ethanol gewaschen. Eine erneute Zentrifugation bei 16000 x g für 1 Minute diente dem Trocknen der Membran. Zur Elution der Plasmide wurde ein im Kit enthaltener Elutionspuffer bzw. Wasser verwendet. Nach Zugabe von 50 µL Elutionspuffer und einer Wartezeit von 1 min erfolgte die Elution des Plasmids in ein neues 1,5 mL Reagiergefäß mittels Zentrifugation.

2.5.12 Transformation eines *E. coli* Überexpressionsstamms

In einem zweiten Schritt wurde der *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RP verwendet. Dieser Stamm enthält einen Überexpressionsvektor für bei Prokaryoten seltene tRNAs, wodurch eine gesteigerte Expression eukaryotischer Proteine möglich ist. Als Selektionsantibiotika wurden jeweils 100 µL Ampicillin (Stammlösung: 50 mg/mL) und 100 µL Chloramphenicol (Stammlösung: 25 mg/mL) zu 50 mL LB-Medium zugegeben. Die Transformation erfolgte analog der unter 2.5.8 beschriebenen Methode.

2.5.13 Proteinsynthese in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP

Nach erfolgter Anzucht über Nacht in 50 mL Nährmedium wurden vier 1 L-Erlenmeyerkolben mit je 4 mL der erhaltenen Bakteriensuspension versetzt. In jedem der Erlenmeyerkolben befanden sich 400 mL Hefe-Trypton-Glukose-Medium, sowie 40 mg/mL Ampicillin und 20 mg/mL Chloramphenicol.

Zur Induktion der Proteinsynthese wurde 4 mL Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) aus einer 100 mM-Stammlösung zugesetzt, wenn ausreichend Zellen vorhanden waren. Dieser Zeitpunkt wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1 bei 600 nm entspricht einer Zelldichte von ca. 3×10^8 Zellen bei *E. coli*. Die Proteinsynthese wurde bei einer optischen Dichte zwischen 0,6 und 0,7 induziert.

Nach 1½ Stunden erfolgte die Ernte der *E. coli*. Die Bakteriensuspension wurde in Zentrifugenbecher überführt und 5 min bei 11000 x g zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in 100 mL geeignetem Puffer resuspendiert und alle vier Ansätze vereinigt. Dabei wurde für PF4 Puffer A und für PF4var1 Puffer C verwendet. Es erfolgte eine erneute 5-minütige Zentrifugation bei 11000 x g und eine Resuspension in 25 mL des gewünschten Aufschlusspuffers, Puffer A oder Puffer C. Diese Suspension wurde für die weitere Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

Zur Proteingewinnung wurden die Bakterien mit Hilfe einer *French Press* aufgeschlossen, dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Jens Hoppen, ChromaTec GmbH, Greifswald. Dabei wurden die Zellsuspensionen einem Druck von 1000 bar ausgesetzt und langsam über eine Nadel entlassen, so dass es durch die Druckabnahme zu einem Platzen der Zellen kam. Im

Anschluss erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 18000 x g zur Entfernung des Zelldetritus, der sich im Gegensatz zu den Proteinen als Pellet absetzt. Zur weiteren Aufreinigung erfolgte eine Filtration des proteinhaltigen Überstandes durch einen 0,22 µm großen Filter. Das erhaltene Proteingemisch wurde dann durch chromatographische Verfahren weiter aufgereinigt, wie unter 2.7 beschrieben.

2.6 Methoden zum Nachweis der PF4-Produktion und Sekretion

2.6.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse, *Fluoreszenz activated cell sorting*) ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung von Zellen anhand ihrer Oberflächenantigene. Dabei werden fluoreszenzmarkierte Zellen einer homogenen Zellsuspension in einer Kapillare durch hydrodynamische Fokussierung so verlangsamt, dass einzelne Zellen einen Laserstrahl passieren. Photodetektoren registrieren das emittierte Vorwärtsstreulicht entsprechend der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht entsprechend der Granularität der untersuchten Zellen. Mit Hilfe fluoreszenz-konjugierter Antikörper ist es möglich gezielt Oberflächenepitope zu erkennen bzw. die dazugehörige Zelle zu zählen, sowie auf ihre biologischen und biochemischen Eigenschaften und spezifische Expressionsmuster zu untersuchen. Beispielsweise unterscheiden sich abgestorbene Zellen unter anderem in ihrer Größe von lebenden Zellen, was sich in einem geringeren Vorwärtsstreulicht und einem höheren Seitwärtsstreulicht bemerkbar macht.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression von PF4 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Dies wurde durch einen Immunfluoreszenznachweis mittels FACS-Analyse erreicht, wie in Abb. 2-3 dargestellt.

Das auf der Zelloberfläche lokalisierte PF4 wurde zunächst durch einen spezifisch gegen PF4 gerichteten Antikörper aus Kaninchen (Kaninchen-anti-humanes PF4) gebunden. Gegen diesen Kaninchen-Antikörper wurde ein zweiter Antikörper eingesetzt, der aus Schweinen stammt und mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) fluoreszenzmarkiert ist. Das Absorptionsspektrum des FITC weist ein Maximum bei 490 nm auf, was gut mit der Anregungswellenlänge des im Durchflusszytometer verwendeten Argonlasers (488 nm) übereinstimmt.



Abb. 2-3 Schematische Darstellung, der bei der FACS-Analyse eingesetzten Konjugate. Gegen das auf der Zelle präsentierte PF4-Epitop wurde Kaninchen-anti-humanes PF4-Antikörper eingesetzt. Zum Nachweis der Bindung erfolgte die Zugabe eines Sekundärantikörpers, der einen Fluoreszenzfarbstoff enthielt (Schwein-anti-Kaninchen IgFITC).

Für die Analyse wurde zunächst eine 50 μL Zellsuspension aus 4×10^6 Zellen/mL PBS + 2 % BSA erstellt, wobei BSA der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen dient. Zu dieser Zellsuspension wurde 1 μL Kaninchen-anti-humanes PF4-Antikörper (Vorverdünnung 1:20) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 37°C folgte ein Waschschrift mit 3 mL PBS + 2 % BSA, durch den nicht gebundene Antikörper entfernt wurden. Als Sekundärkonjugat wurden 25 μL Schwein-anti-Kaninchen-IgFITC (Vorverdünnung 1:25) zugegeben. Danach erfolgte erneut eine 30-minütige Inkubation (37°C) mit einem anschließenden Waschschrift. Zum Schluss wurde mit 150 μL PBS + 2 % BSA resuspendiert. Die Analyse der Probe erfolgte direkt im Anschluss. Standardmäßig wurden 15000 Zellen gezählt.

2.6.2 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Um einen Nachweis über die Sekretion des Proteins Plättchenfaktor 4 aus den EBNA 293-Zellen zu erhalten, wurde ein *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* durchgeführt. Die im ELISA eingesetzten Proben wurden entweder dem Zellkulturüberstand entnommen oder stammten aus der Anzucht in transformierten *E. coli*. Darüber hinaus wurde auch aufgereinigtes Protein eingesetzt, welches entweder aus dem Kulturüberstand der EBNA-

Zellen oder aus *E. coli* gewonnen wurde. Vor der Analyse wurden die Zellreste aus dem Kulturüberstand durch Zentrifugation entfernt.

Zur Durchführung des ELISA wurde das Testsystem Asserachrom[®] PF4 der Firma Roche Diagnostics GmbH verwendet. Dieser Sandwich-ELISA enthält auf dem Mikrotitrationsstreifen fixierte, spezifisch gegen PF4 gerichtete Antikörper. Eine schematische Zeichnung des Funktionsprinzips ist in Abb. 2-4 dargestellt. Das PF4 aus der Probe (200 µL) bindet an diesen Antikörper und nach Zugabe von Peroxidase-markierten Antikörpern (200 µL) entstehen Sandwich-Komplexe. Nun wurden 200 µL einer Substratlösung aus 8,1 mM Harnstoffperoxid und 4,6 mM o-Phenylendiamin zugegeben. Nach dreiminütiger Wartezeit wurde die Peroxidasereaktion mit 50 µL 3 M Schwefelsäure abgestoppt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit erfolgte die Messung der Absorption mit Hilfe eines Photometers bei 492 nm. Die Menge der gebundenen Komplexe war proportional dem PF4-Gehalt der Probe. Durch eine mitgeführte Standardreihe und die im Testsystem angegebene PF4-Menge des Standards konnte die Menge (IU/mL) des PF4 in der Probe mit Hilfe der erstellten Eichkurve ermittelt werden. Als Nachweis, dass keine unspezifische Bindung vorlag, wurde Kulturüberstand der

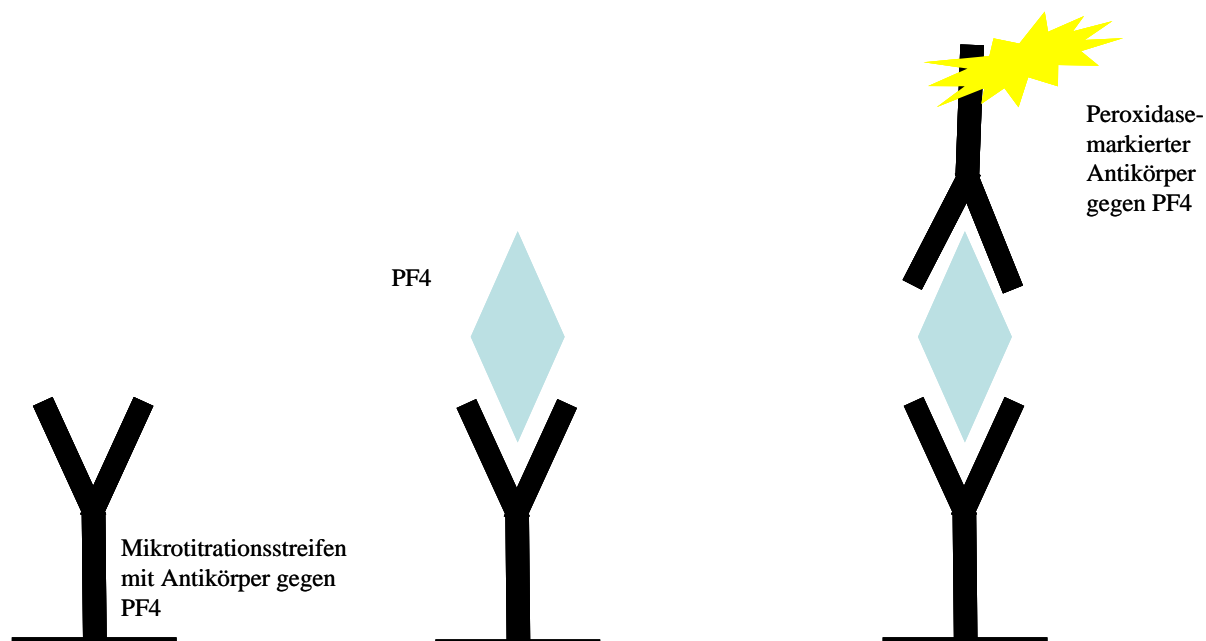


Abb. 2-4 Schematische Zeichnung des Anti-PF4-ELISA. Bei diesem Sandwich-ELISA befand sich auf dem Mikrotitrationsstreifen ein spezifisch gegen PF4 gerichteter Antikörper. Nach Zugabe eines spezifischen, Peroxidase-markierten Antikörpers und Bindung von PF4 konnte der Sandwich-Komplex photometrisch detektiert werden.

Zellen EBNA 293-Mock verwendet. Als weitere Kontrolle diente die Kontrolllösung des Testkits.

2.6.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (38) erfolgte in Zusammenarbeit mit Dorothee Zeh-Bürger, ChromaTec GmbH, Greifswald. Die Proteinbestimmung kam zum Einsatz, um die durch *E. coli* produzierte PF4-Menge zu bestimmen. Dazu wurde der Micro BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Bei der Methode nach Bradford wird die Gesamtproteinkonzentration einer Probe kolorimetrisch bestimmt. Coomassie *blue* bindet an basische Seitenketten von Aminosäuren und färbt die Proteine blau. Der Vergleich der Blaufärbung der Probe mit einer Eichkurve erlaubt die Bestimmung der Proteinkonzentration. Die verwendeten Lösungen, sowie das Coomassie sind Bestandteil des Kits.

2.6.4 Sequenzierung des Proteins PF4var1

Zur Bestätigung, dass es sich bei dem von den transfizierten Zellklonen produzierten Protein um PF4var1 handelt, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma ChromaTec GmbH, Greifswald, eine Proteinsequenzierung durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte durch Dr. Hippe mittels Edman-Abbau. Es wurden sowohl die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins, als auch die 19 C-terminalen Aminosäuren von PF4var1 sequenziert.

2.6.5 Sequenzierung des Genoms für PF4 bzw. PF4var1

Zusätzlich wurde eine Sequenzierung des Genoms vorgenommen. Auch diese erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma ChromaTec GmbH, Greifswald, wurde jedoch von der Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mit einem Kapillarsequenzer nach der Sanger-Methode.

2.6.6 Massenspektrometrie

2.6.6.1 MALDI-ToF

Die *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight* (MALDI-ToF)-Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Firma ChromaTec GmbH, Greifswald vorgenommen.

Mit Hilfe des Massenspektrometers (MS) sollte eine Unterscheidung zwischen PF4 und PF4var1 ermöglicht werden. Dafür wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe 2.7.2). Aus dem Gel wurde die PF4 bzw. PF4var1 enthaltende Bande ausgeschnitten. Mittels tryptischen Verdaus wurde das Protein in Peptide zerlegt und konnte aus dem Gel extrahiert werden. Anschließend erfolgte eine Messung im MALDI-ToF. Die gemessenen Fragmente wurden mit einer Datenbank (SwissProt, rel. 49, 10.11.2005) verglichen und erlaubten somit Rückschlüsse auf das vorliegende Protein.

2.6.6.2 ESI-ToF

Zum Nachweis der Proteine PF4 und PF4var1 wurde neben MALDI-ToF die Elektronengas-ionisierung-Flugzeit (*electrospray ionization-time of flight*; ESI-ToF) angewandt, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Völker von der Arbeitsgruppe Funktionelle Genomforschung der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald durchgeführt wurde. Die Detektion erfolgte wie beim MALDI-ToF anhand der Flugzeit der Ionen, wobei der Vorteil der Ionisierung mittels ESI-ToF darin besteht, dass mehrfach geladene Ionen auftreten können und somit eine Erfassung höherer Molmassen möglich ist.

2.7 Reinigung von PF4 und PF4var1

2.7.1 Fast-protein liquid chromatography (FPLC)

Sämtliche Arbeiten an der FPLC erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Hippe, ChromaTec GmbH, Greifswald. Zur Gewinnung des Proteins PF4 wurde eine Heparinsäule über eine FPLC mit der Proteinlösung beschickt. Zur Elution des an die Säule gebundenen PF4 wurden die Puffer A und B in verschiedenen Verhältnissen zueinander eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung der Puffer A und B unterliegt dem Betriebsgeheimnis der Firma ChromaTec GmbH, Greifswald, die diese Puffer zur Aufarbeitung von PF4 einsetzt. Zur Überprüfung der Eluatfraktionen (je 8 mL) erfolgte ein Auftragen in einem SDS-Gel analog der unter 2.7.2 beschriebenen Vorgehensweise. Um einen Hinweis auf die Höhe der PF4-Konzentration in den Eluaten zu gewinnen, wurde mit diesen ein ELISA durchgeführt, wie unter 2.6.2 beschrieben. Die Proteinmenge von PF4 wurde zusätzlich mit der Bestimmungsmethode nach Bradford bestimmt, siehe 2.6.3.

Zur Gewinnung von PF4var1 wurden im Verlauf der Arbeit die Puffer C und D entwickelt. Diese unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Salze von den Puffern A und B,

unterliegen aber ebenso dem Betriebsgeheimnis der Firma ChromaTec GmbH, Greifswald. Die weitere Aufreinigung erfolgte analog der Aufreinigung von PF4.

2.7.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE erlaubt die Auftrennung von Proteinen für weitere Analysen nach ihrer Molekülmasse. Nach der Trennung kann ein Nachweis der gesuchten Proteine durch Färbung erfolgen. Zur Auftrennung der Proben wurden ein 15% Trenn- und ein 3% Sammelgel verwendet, deren Zusammensetzung ebenso wie die Zusammensetzung der verwendeten Puffer in 2.3.6 beschrieben ist. Zunächst wurden Trenn- und Sammelgel gegossen, wobei nach jedem Schritt eine 20-minütige Polymerisationszeit eingehalten wurde, siehe Abb. 2-5. Nach Einbringen des Gels in die Elektrophoresekammer erfolgte die Zugabe von Laufpuffer. Die Probe wurde in eine Probentasche gegeben und mit Probenpuffer (4x Probenpuffer Rotiload) versetzt. Eine der Probentaschen wurde mit einem Standard besetzt, um eine Aussage über die Größe der aufgetrennten Banden anhand des Molekulargewichtes (kDa) zu erhalten. Im Anschluss wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt, überschüssige Farbe wurde mit Ethanol entfernt. Das so aufgetrennte und angefärbte Proteingemisch ermöglichte nun eine gezielte Weiterverwendung des gewünschten Proteins, beispielsweise in den unter 2.6.6 beschriebenen massenspektrometrischen Analysen.

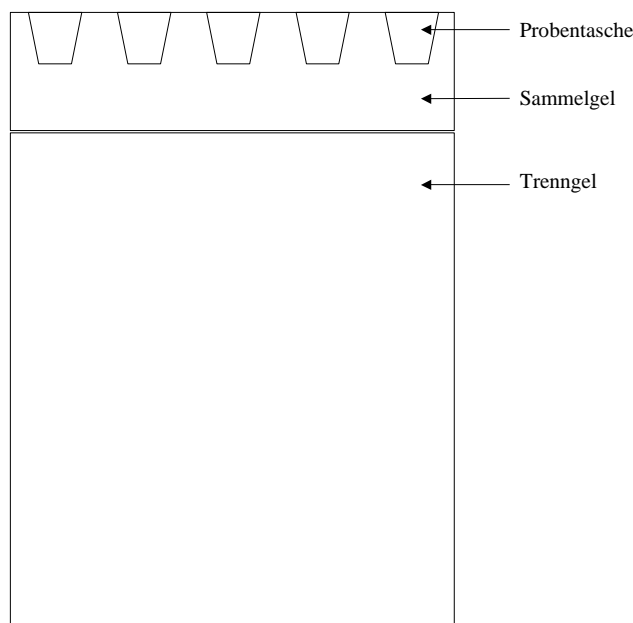


Abb. 2-5 Schemazeichnung eines SDS-Gels.

2.7.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung von PF4var1 mittels NHS-Säule

Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von PF4var1 wurde eine HiTrapTM N-Hydroxysuccinimid-aktivierte High Performance-Säule (NHS-Säule) der Firma GE Healthcare verwendet. Diese ermöglicht die kovalente Bindung von Liganden mit primären Aminogruppen und wurde mit Kaninchen-anti-humanem PF4, einem polyklonalen Antikörper zur Erkennung von PF4 und PF4var1, beschickt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist unter 2.3.7 beschrieben.

2.7.3.1 Herstellung der Säule

Die Herstellung der Säule erfolgte in Zusammenarbeit mit Birgitt Fürll, Transfusionsmedizin Greifswald. Die Säule wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-humanem PF4 Antikörper (Firma: Dianova) gekoppelt. Dazu wurde der Antikörper zunächst in einer Konzentration von 6 mg/mL im Kopplungspuffer gelöst. Um die freien NHS-Gruppen vor einer Deaktivierung zu schützen, war die Säule in ihrer Originalverpackung mit Isopropanol gefüllt, das erst unmittelbar vor der Kopplung mit 6 mL 1 mM HCl entfernt wurde. Im Anschluss daran wurde 1 mL der Antikörper-Kopplungslösung auf die Säule aufgetragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssige, nicht gebundene Gruppen zu deaktivieren und um überschüssigen Liganden zu entfernen wurde je einmal mit 6 mL Puffer A und B und im Anschluss nochmals mit 6 mL Puffer A gewaschen. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde nochmals mit je 6 mL Puffer B und A und anschließend 6 mL Puffer B gewaschen. Zum Schluss wurde der pH-Wert mit 6 mL PBS neutralisiert. Zur Lagerung der Säule bei 4-8° C wurde diese mit 0,05 M Na₂HPO₄ und 0,1 % NaN₃, pH 7 versetzt.

2.7.3.2 Reinigung von PF4var1

Zur Reinigung von PF4var1 mittels Affinitätschromatographie wurde der Kulturüberstand einer Zellkultur von EBNA 293-PF4 V1-B4 verwendet, welches unter serumfreien Bedingungen hergestellt wurde. Der Kulturüberstand wurde bei 15000 U/min 20 min zentrifugiert und anschließend über Nacht bei 4 °C gegen Äquilibrierungs-/Bindungspuffer dialysiert und durch einen Spitzenfiltervorsatz (0,45 µm) filtriert.

Die Antikörper-beschichtete NHS-Säule wurde zunächst mit 3 mL Äquibrierungs-/Bindungspuffer äquilibriert und im Anschluss mit 3 mL Elutions- und 10 mL Äquibrierungs-/Bindungspuffer gespült. In einem Reinigungsschritt wurden ca. 50 mL des vorbereiteten Kulturüberstandes aufgebracht und die Säule mit 8 mL Äquibrierungs-/ Bindungspuffer gewaschen. Das Protein wurde mit 8 mL Elutionspuffer bei einer Flussrate von 0,6 mL/min eluiert und in 1 mL Fraktionen in Eppendorfbechern gesammelt, die 250 µL Neutralisationspuffer enthielten. Die Hauptfraktion des Proteins wurde unter Verwendung von Ultra-Zentrifugations-Röhrchen eingengt und einer Dialyse gegen PBS unterzogen.

Im Anschluss an die Reinigung erfolgte eine Reäquilibrierung der Säule mit 16 mL Äquibrierungs-/Bindungspuffer. Zur längerfristigen Lagerung wurde die Säule mit Lagerungspuffer gewaschen und bei 4° C aufbewahrt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Proteinvarianten

In Zellkulturen und Bakterienanzuchten wurde zunächst untersucht, ob die gewünschten Proteine PF4 bzw. PF4var1 produziert werden konnten. Dazu wurden Protein- und DNA-Sequenzierung sowie massenspektrometrische Methoden eingesetzt.

3.1.1 Sequenzierung des Proteins und der DNA von PF4

Es erfolgte die Aminosäuresequenzierung der Proteine PF4 und PF4var1 nach Gewinnung in EBNA 293-Zellen und *E. coli*. Die Aminosäuresequenzierung von PF4var1 erwies sich als schwierig. Das Protein PF4var1 konnte nur bis zur Aminosäure 53 sequenziert werden. Somit konnte anhand der Aminosäuresequenzierung nicht definitiv bestimmt werden, dass PF4var1 vorliegt.

Durch die Transformierung von *E. coli* mit dem Gen für die neunzehn C-terminalen Aminosäuren des Proteins PF4var1 (JHC05) sollte die Aminosäuresequenzierung für PF4var1 durchgeführt werden. Durch das Anhängen eines 26 kDa großen GST-Tags war eine Reinigung möglich. Die Sequenzierung der 19 C-terminalen Aminosäuren erfolgte nach Thrombinabspaltung des GST-Tags. Die N-terminale Sequenzierung belegte die Bildung des Fragmentes (Aminosäure 86-104) von PF4var1 in *E. coli*. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass durch Transformierung von *E. coli* mit dem vollständigen Gen für PF4var1 das entsprechende Protein gebildet wurde.

Es erfolgte auch die Sequenzierung der DNA-Abschnitte, die die genetischen Informationen der beiden Proteine tragen. Dazu wurde sowohl die DNA der EBNA-Zelllinien als auch die in *E. coli* eingebaute DNA überprüft. Die DNA-Sequenzierung zeigte, dass die Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 die genetische Information für das Protein PF4var1 besitzt, während die Zelllinie EBNA 293-PF4 C-1D die genetische Information für das Protein PF4 enthält. Der Nachweis in *E. coli* gelang ebenfalls (persönliche Kommunikation mit Firma Seqlab in Göttingen).

3.1.2 Massenspektrometrie

3.1.2.1 MALDI-ToF

Die Untersuchungen mit Hilfe des MALDI-ToF zeigten an, dass es sich bei dem nachzuweisenden Protein um PF4 handelt. Dieses PF4 entstammte der Anzucht in *E coli*. Allerdings wurden sowohl bei PF4, als auch bei PF4var1 die PF4-typischen Peaks gefunden, so dass keine sichere Unterscheidung zwischen PF4 und PF4var1 möglich war.

3.1.2.2 ESI-ToF

Mit Hilfe des ESI-ToF konnte in einem SDS-Gel der Nachweis der Proteine PF4 und PF4var1, nach Produktion in *E coli* getroffen werden. Das SDS-Gel wurde mit einem Proteingemisch beschickt (siehe 2.7.2), die darin enthaltenen Proteine wurden aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte eine massenspektrometrische Untersuchung. Die massenspektrometrische Analyse zeigte eindeutig unterschiedliche Sequenzen. Somit konnte gezeigt werden, dass die Proben unterschiedliche PF4-Varianten enthalten. Für beide Proteine wurde die spezifische Sequenz (siehe Tab. 3-1) nachgewiesen. Die Bestätigung erfolgte über SwissProt.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung der EBNA 293-Zelllinien

Voraussetzung für die Bearbeitung des Themas war die erfolgreiche Kultivierung der transfizierten EBNA 293-Zellklone. Nach 4-5 Tagen hatten die Transfektanten einen konfluenten Zellrasen gebildet und konnten umgesetzt werden. Die Vitalität der Zellen lag dabei stets über 90%, die Zellmorphologie war gut. Auf Unterschiede zwischen den verwendeten Zelllinien und Medien wird im Folgenden genauer eingegangen.

Tab. 3-1 Mittels ESI erhaltene Peptidsequenzen aus PF4 bzw. PF4var1, die eindeutig den jeweiligen Proteinen zugeordnet werden konnten. Die geänderten Aminosäuren sind fett gedruckt.

Untersuchtes Protein	Peptidsequenz
PF4:	RKICLDLQ A PLYKK
PF4var1:	RKICLDLQ A L L YKK
	KIIK E HLES

3.2.2 Vergleich der eingesetzten Nährmedien

Bei der Verwendung der Medien DMEM und HEK konnte beobachtet werden, dass die EBNA 293-Zelllinien in DMEM ein besseres Wachstum zeigten als in HEK-Medium. DMEM ist ein serumhaltiges Medium, HEK dagegen ein serumfreies Medium. In letzterem Medium setzten sich die adhärent wachsenden Zellen erst nach einiger Zeit an der Zellflasche an. Durch die allmähliche Adaptation der Zellen unter Reduktion des Fetalen Kälber Serums (FCS) war es jedoch möglich, eine Zellkultur unter serumfreien Bedingungen zu erstellen, wenngleich die Zellen in HEK-Medium zu einem langsameren Wachstum neigten. Eine Bildung von Zellaggregaten wurde unter HEK-Medium selten beobachtet. Insbesondere die Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 zeigte sich einem Fehlen des FCS gegenüber sehr sensibel.

3.2.3 Zellmorphologie der EBNA 293-Zelllinien

Wurden die EBNA 293-Zellen in DMEM kultiviert, so wiesen sie eine rundliche Zellform auf. Die adhärent wachsenden Zellen bildeten einen Zellrasen, der den Flaschenboden bedeckte. Erst ab einer hohen Zelldichte begannen die Zellen, übereinander zu wachsen und sich teilweise von der Flasche zu lösen, so dass im Medium flottierende Kolonien beobachtet werden konnten. Unter Zugabe von HEK-Medium änderte sich die Zellmorphologie. Die Zellen waren zunächst schlanker, wurden jedoch im Verlauf der Kultivierung runder. Die Adhäsion der Zellen an die Flaschenwand war bei Zellen, die in HEK-Medium wuchsen, weniger stark, da auch die Ausbildung der Podozyten eingeschränkt war. Daher wurde bei diesen Zellen vermehrt eine Ablösung von der Flaschenwand beobachtet, in deren Folge Zellsuspensionen mit im Nährmedium schwimmenden Kolonien auftraten. Die Bildung von Kolonien hatte eine schlechtere Versorgung vor allem der Zellen zur Folge, die im Inneren der Kolonie wuchsen, so dass insbesondere diese Zellen eine geringere Vitalität aufwiesen. In der Regel konnten die Zellen für etwa eine Woche in den Zellkulturflaschen gehalten werden, bevor eine Passage in neues Medium erfolgen musste. Die genaue Dauer wurde jedoch von der Zelldichte und dem Wachstum der Zellen bestimmt.

3.2.4 Hochdichtezellkultur

Zur Produktion großer Proteinmengen wurde eine Hochdichtezellkultur eingesetzt. Die Verwendung eines Minifermenters mit serumfreiem Medium (HEK-Medium) zeigte sich nur bedingt erfolgreich. Die Zellen neigten ab dem dritten Tag zur Aggregatbildung, was eine Langzeitkultivierung erschwerte. Durch die Aggregatbildung sank die Nährstoffversorgung

der Zellen im Inneren der Zellaggregate, Zellzahl (Abb. 3-1) und –vitalität (Abb. 3-2) nahmen ab. Darüber hinaus erschwerte die Aggregatbildung eine genaue Bestimmung der Zellzahl

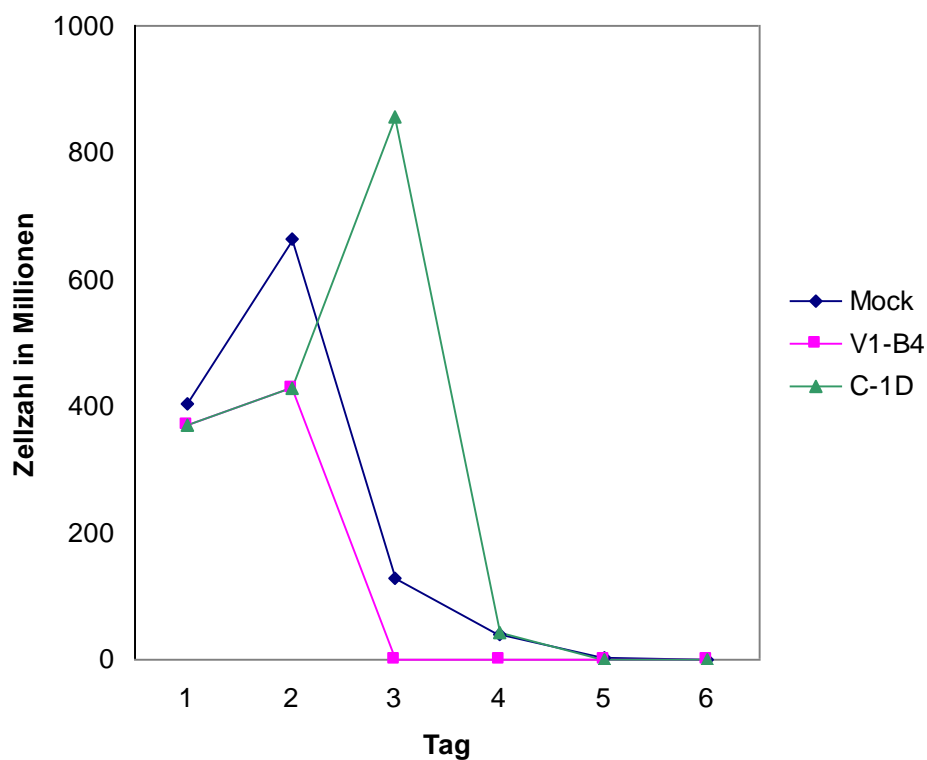


Abb. 3-1 Vergleich der mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten Zellzahlen der einzelnen Zelllinien nach Verwendung eines Minifermenters.

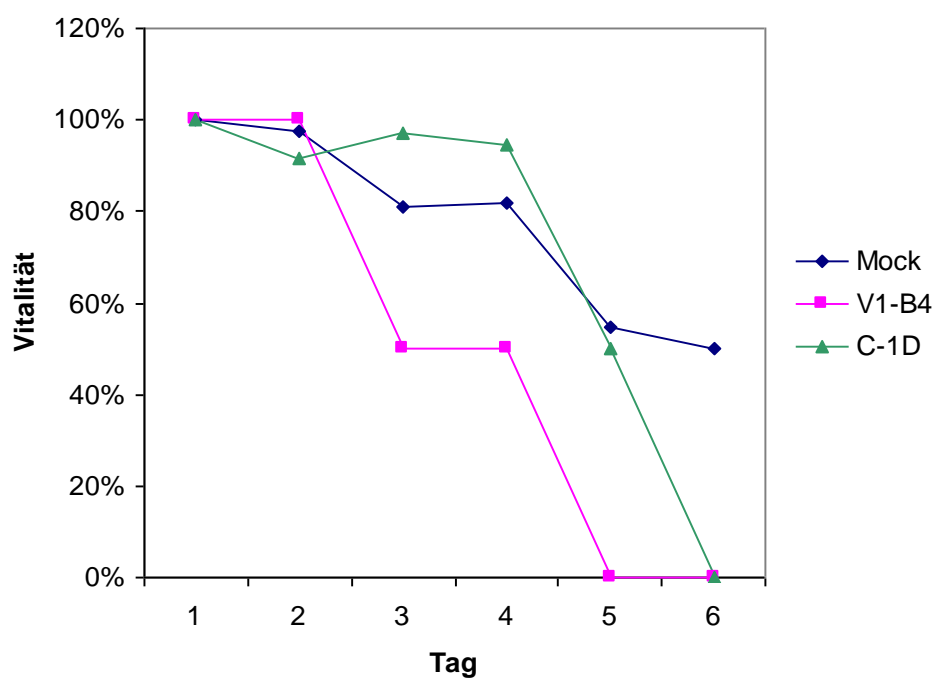


Abb. 3-2 Vergleich der Vitalität der einzelnen Zelllinien nach Verwendung eines Minifermenters.

und -vitalität, da bei der Zellentnahme meist Aggregate entnommen wurden. Nach 5 Tagen waren fast keine lebenden Zellen und somit nur noch geringe Zellvitalität nachweisbar. Dies war besonders deutlich bei EBNA 293-PF4 V1-B4 zu erkennen. Dennoch wird anhand der unter 3.3.2 dargestellten Ergebnisse ersichtlich, dass eine Anreicherung von PF4 im Minifermenter möglich war. Somit konnte eine PF4-Produktion in ausreichendem Maßstab erreicht werden. Die Zelllinie EBNA 293-Mock wurde als Kontrolle mitgeführt. Im Gegensatz zu den Zelllinien EBNA 293-PF4 V1-B4 und C-1D besitzt Mock keine genetische Information zur Produktion von PF4 oder PF4var1.

3.3 Nachweis der PF4-Produktion in EBNA-Zellen

Zum Nachweis der PF4-Produktion wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von Versuchen durchgeführt, eine Übersicht ist in Tab. 3-2 dargestellt. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche werden im weiteren Verlauf ausführlich beschrieben.

3.3.1 Durchflusszytometrie zum Nachweis der PF4-Expression auf der Zelloberfläche

Um die Antigenexpression auf der Zelloberfläche nachzuweisen wurde die Durchflusszytometrie angewandt. Das verwendete Protokoll wurde unter 2.6.1 beschrieben. Die Zahl der

Tab. 3-2 Schema der mit EBNA-Zellen EBNA 293-PF4 C-1D (Classic, C-1D), EBNA 293-PF4 V1-B4 (Variante, V1-B4) und Kontrollzellen EBNA 293-Mock (Mock) durchgeführten Versuche.

Medium	Nachweis von PF4	Zahl der Experimente			
		C-1D	V1-B4	Mock	
DMEM	FACS	14	15	14	
	ELISA	Eluate	3	5	0
		Kulturüberstand	4	4	4
DMEM/HEK 1:1	FACS	1	1	1	
	FACS	0	0	0	
HEK	ELISA	0	0	0	
	Kulturüberstand	5	6	2	

detektierten Zellen (Ereignisse) wurde in einem Histogramm gegen den dekadischen Logarithmus der Fluoreszenzintensität aufgetragen.

Die regelmäßige Wiederholung dieses Versuches (n=15) diente im Verlauf dieser Arbeit der Expressionskontrolle von PF4 bzw. PF4var1 auf der Zelloberfläche, Tab. 3-2. Dafür wurden Zellen aller drei Zelllinien verwendet. In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die Verwendung einer 1:1-Mischung der Medien DMEM und HEK Einfluss auf die Zellen und ihre PF4-Expression hat.

Eine Unterscheidung zwischen den Proteinen PF4 und PF4var1 ist mit diesem Versuch nicht möglich, da der gegen PF4 gerichtete polyklonale Antikörper auch an PF4var1 bindet. Ob der Unterschied, der zwischen den Aminosäuresequenzen der beiden Proteine besteht, einen Einfluss auf das Bindungsverhalten des Antikörpers hat, ist mit dieser Untersuchung ebenfalls nicht zu ermitteln. Allerdings konnte der Nachweis von PF4 oder einem PF4-ähnlichem Epitop auf der Oberfläche der EBNA 293-PF4 V1-B4-Zelllinie gestellt werden.

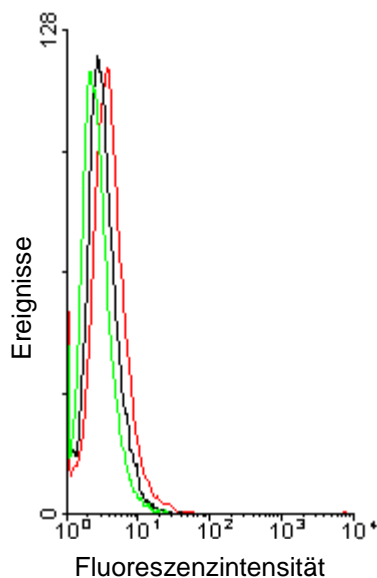


Abb. 3-3 FACS-Analyse der EBNA 293-Mock Zellen nach Kultivierung in DMEM.
Grün: EBNA 293-Mock
Schwarz: EBNA 293-Mock + anti-rabbit-IgFITC
Rot: EBNA 293-Mock + rabbit-anti-human-PF4 Antikörper + anti-rabbit-IgFITC.

Zunächst wurde die Mock-Zelllinie verwendet, um das Verhalten von Zellen ohne spezifische Bindung zu untersuchen. Die im Histogramm Abb. 3-3 rot dargestellte Linie repräsentiert hierbei Zellen der Zelllinie EBNA 293-Mock, die mit rabbit-anti-human-PF4-Antikörper und anti-rabbit-IgFITC behandelt wurden. Die schwarze Linie entspricht EBNA 293-Mock-Zellen, die nur mit anti-rabbit-IgFITC behandelt wurden. Die grüne Linie steht für EBNA 293-Mock-Zellen, die keiner weiteren Behandlung unterzogen wurden, jedoch den gleichen Inkubationszeiten bzw. Waschschritten unterworfen waren, wie die anderen Proben. An diesem Histogramm ist ersichtlich, dass keine Bindung zwischen Antikörpern und den Zellen vorliegt, die kein PF4 auf ihrer Oberfläche tragen.

Im Vergleich dazu sind in Abb. 3-4 die Zelllinien EBNA 293-PF4 V1-B4 bzw. C-1D mit ihren Kontrollen aufgetragen. Hier liegt ein Bindungsnachweis zwischen beiden Antikörpern und den Zellen, die das Antigen tragen, vor (rot). Bei den Proben, die nur mit dem Sekundärkonjugat (anti-rabbit-IgFITC) (schwarz) bzw. weder mit Antikörper noch Sekundärkonjugat (grün) behandelt wurden, liegt keine Bindung vor.

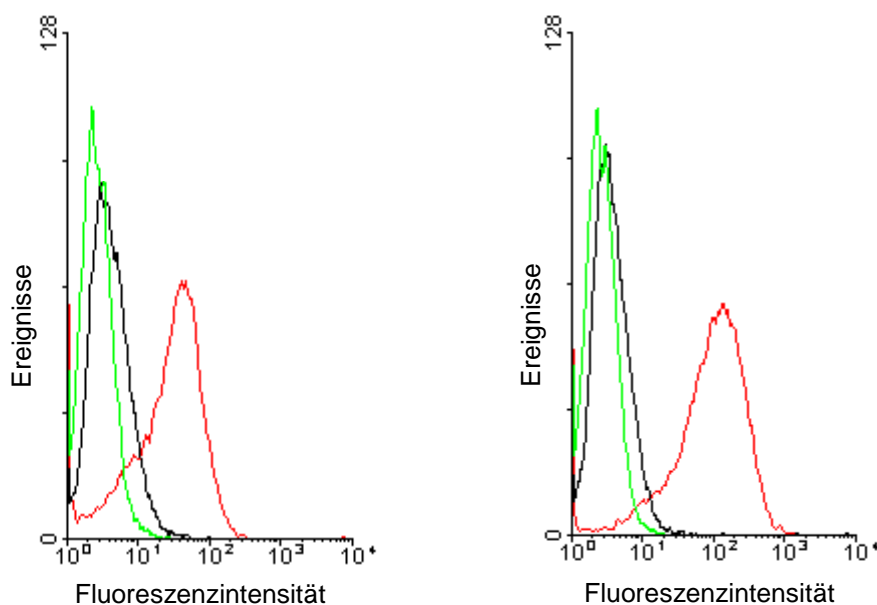


Abb. 3-4 FACS-Analyse der Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 (links) und EBNA 293-PF4 C-1D (rechts) nach Kultivierung in DMEM

Grün: EBNA 293-PF4 V1-B4 bzw. EBNA 293-PF4 C-1D

Schwarz: EBNA 293-PF4 V1-B4 bzw. EBNA 293-PF4 C-1D + anti-rabbit-IgFITC.

Rot: EBNA 293-PF4 V1-B4 bzw. EBNA 293-PF4 C-1D + rabbit-anti-human-PF4 + anti-rabbit-IgFITC.

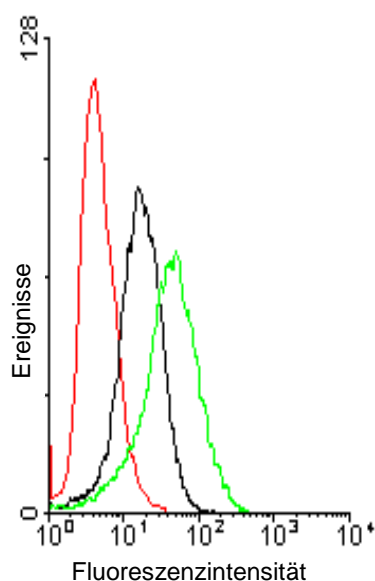


Abb. 3-5 FACS-Analyse der Zelllinien EBNA 293-Mock (rot), EBNA 293-PF4 V1-B4 (schwarz), EBNA 293-PF4 C-1D (grün). Jede der drei Zelllinien wurde mit rabbit-anti-human-PF4 und anti-rabbit-IgFITC markiert.

Wie in Abb. 3-5 zu erkennen, exprimierte EBNA 293-PF4 C-1D (grün) mehr PF4 auf seiner Oberfläche als EBNA 293-PF4 V1-B4 (schwarz). EBNA 293-Mock (rot) diente als Kontrolle, dass keine unspezifische Bindung zwischen den Antikörpern und den Zellen vorlag. Auf Grund der deutlich geringeren Fluoreszenzintensität, die bei den Mock-Zellen beobachtet wurde, kann von spezifischer Bindung bei EBNA 293-PF4 V1-B4 bzw. C-1D ausgegangen werden. Darüber hinaus ist die Fluoreszenzintensität von PF4 auf der Zelloberfläche von EBNA 293-PF4 C-1D im Vergleich zu EBNA 293-PF4 V1-B4 erhöht.

In Abb. 3-6 lässt sich ein Unterschied in der Expression von PF4 auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit von den verwendeten Nährmedien erkennen. Sowohl die Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4, als auch die Zelllinie EBNA 293-PF4 C-1D zeigten bei der Verwendung der Medien DMEM und HEK in einem Verhältnis von 1:1 eine etwas höhere Proteinexpression, im Vergleich zu den Zellen, die lediglich in DMEM kultiviert wurden. Auch hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Zelllinien EBNA 293-PF4 V1-B4 bzw. C-1D, wobei die Zelllinie EBNA 293-PF4 C-1D in beiden Medien eine höhere Expressionsrate aufweist.

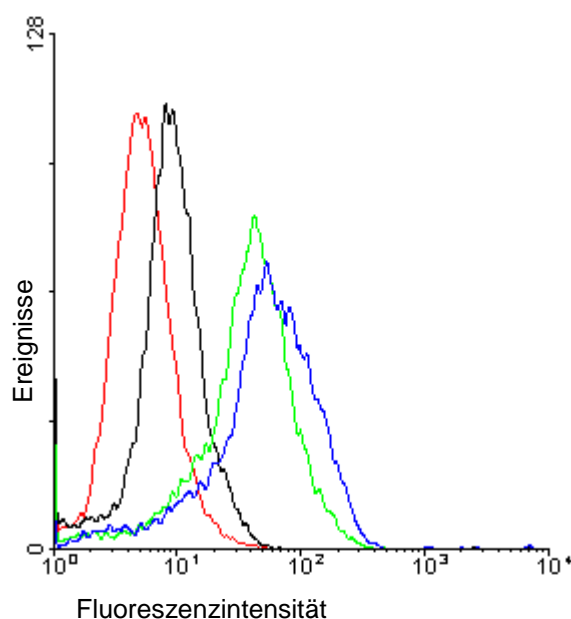


Abb. 3-6 Vergleich der Zellkulturen in unterschiedlichen Medien. EBNA 293-PF4 V1-B4 in DMEM (rot), EBNA 293-PF4 V1-B4 in DMEM/HEK (schwarz), EBNA 293-PF4 C-1D in DMEM (grün) und EBNA 293-PF4 C-1D in DMEM/HEK (blau).

3.3.2 ELISA zum Nachweis der PF4-Sekretion

Um die Produktion und Sekretion von PF4 durch die EBNA 293-Zellen in das Kulturmedium nachzuweisen, wurde ein ELISA verwendet. Die dafür verwendete Versuchsmethode ist unter 2.6.2 beschrieben.

Mit dem PF4-ELISA konnten nicht nur die einzelnen Transfektanten verglichen werden, sondern auch der Einfluss der verschiedenen Medien auf die PF4-Produktion. Allerdings konnte auch hier, wie bei der Durchflusszytometrie, keine Unterscheidung zwischen den Proteinen PF4 und PF4var1 getroffen werden, da der im Kit enthaltene Antikörper gegen PF4 gerichtet ist. Es wurde davon ausgegangen, dass dennoch ein ausreichendes Bindungsverhältnis zwischen dem PF4-Antikörper und PF4var1 vorliegt. Der PF4-ELISA bestätigte die Sekretion von PF4 bzw. PF4var1 in das Kulturmedium.

Der ELISA wurde mehrfach durchgeführt, Tab. 3-2. Dabei wurden die beiden eingesetzten Medien und ihr Einfluss auf die Zelllinien untersucht. Ein Vergleich der Proteinproduktion im Verlauf einer Kultur erfolgte durch Entnahme des Kulturüberstandes an unterschiedlichen

Tagen. Daneben wurde die Proteinproduktion des Minifermenters nach Dialyse, sowie die mittels Säulenchromatographie (siehe 2.7.1) gewonnenen Fraktionen der Zelllinien EBNA 293-PF4 V1-B4 bzw. C-1D untersucht. Der ELISA wurde auch zum Nachweis der PF4-Produktion in *E. coli* verwendet. Näheres dazu ist in Abschnitt 3.4.2 beschrieben. Für alle Versuche wurden drei Mal ein Standard, sowie vier Mal ein käuflich erworbenes PF4 mitgeführt. Um die produzierte PF4-Menge zu bestimmen wurde eine Eichkurve anhand des im Versuch mitgeführten Standards bekannter Konzentration erstellt (39), Abb. 3-7.

Aus Abb. 3-8 wird ersichtlich, dass die PF4-Produktion der Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 etwas geringer war, als die der Zelllinie EBNA 293-PF4 C-1D. Die bei der Zelllinie EBNA 293-Mock gemessene geringe PF4-Menge ist vermutlich auf unspezifische Bindungen zurückzuführen. Durch den aus dem Testkit mitgeführten Kalibrator besteht die Möglichkeit über eine Eichkurve (siehe Abb. 3-7) die PF4-Produktion in IU/mL anzugeben (39). Der jeweils in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzte Kulturüberstand ergab für EBNA 293-Mock eine PF4-Menge von 1 IU/mL. Für EBNA 293-PF4 V1-B4 ergaben sich für die

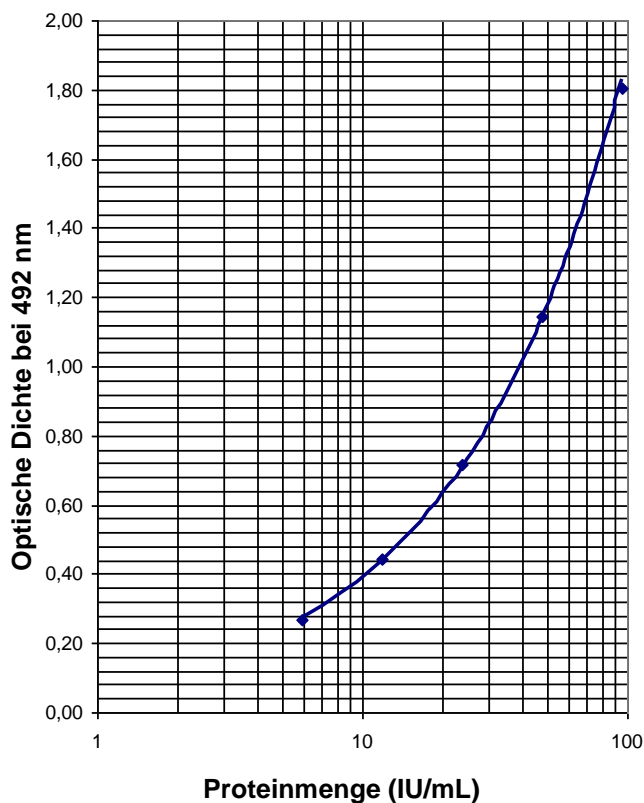


Abb. 3-7 Eichkurve zur Messung der PF4-Menge im Anti-PF4-ELISA. Die Eichkurve wurde durch Verwendung des im Testkit enthaltenen Standards erhalten (39).

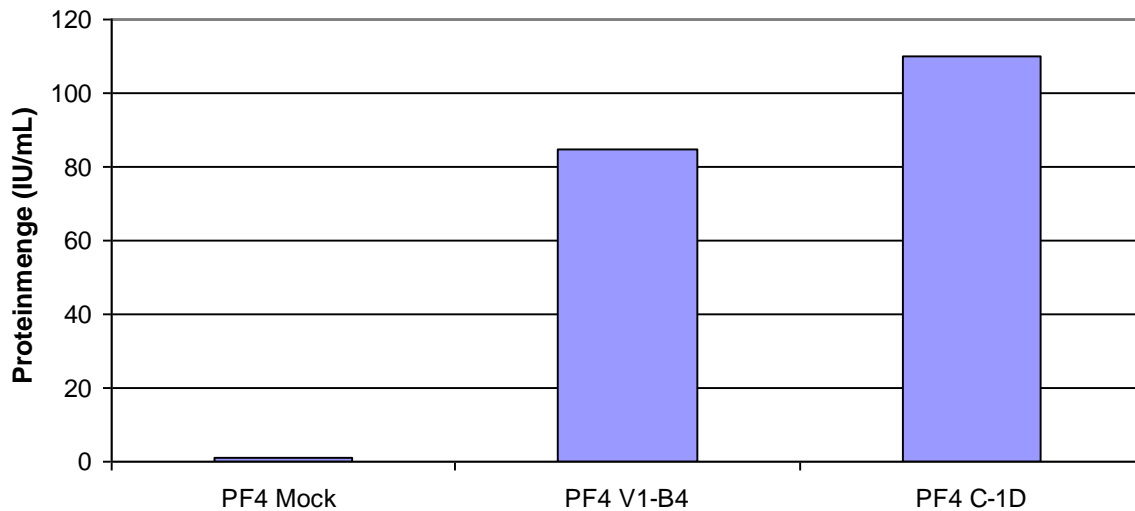


Abb. 3-8 PF4-Produktionsmenge der Transfektanten nach Kultivierung in DMEM. Die Kulturüberstände von EBNA 293-PF4 Mock, V1-B4 und C-1D wurden in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt.

eingesetzte Verdünnung 85 IU/mL und für EBNA 293-PF4 C-1D 110 IU/mL. Somit produzierte EBNA 293-PF4 V1-B4 etwa 850 IU PF4/mL und EBNA 293-PF4 C-1D etwa 1100 IU/mL.

Anhand Abb. 3-9 wird deutlich, dass die Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 bei beiden verwendeten Medien weniger PF4 produzierte, als die Zelllinie EBNA 293 PF4 C-1D.

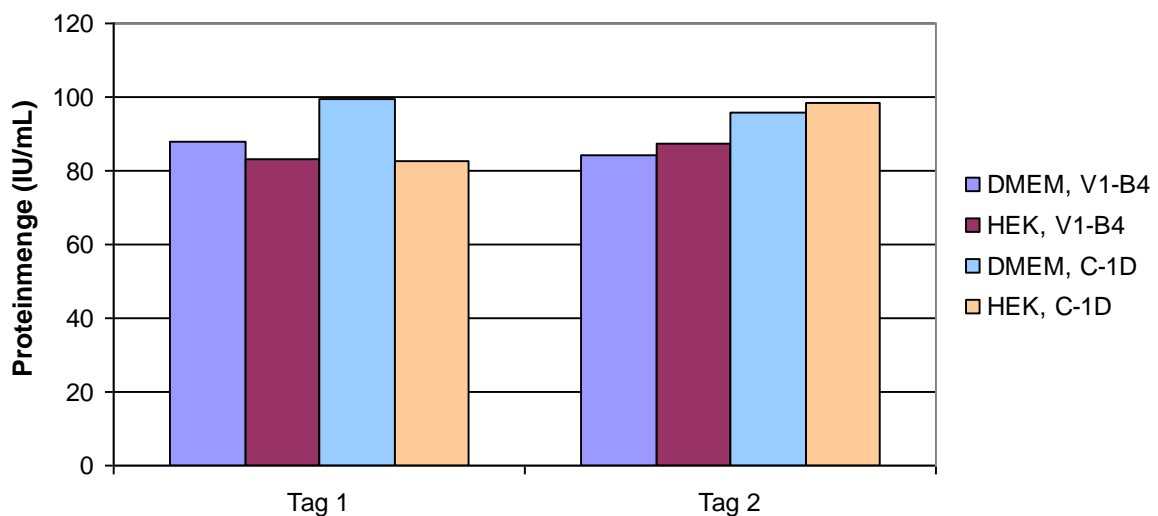


Abb. 3-9 Vergleich der Produktionsmenge der Zelllinien EBNA 293-PF4 V1-B4 und EBNA 293-PF4 C-1D an zwei aufeinanderfolgenden Tagen unter Berücksichtigung des Einflusses der beiden Medien DMEM und HEK.

Allerdings stieg bei beiden Zelllinien die PF4-Produktion nach Gabe des serumfreien Mediums (HEK-Medium) an. Bei serumhaltigem Medium (DMEM) war bei den beiden Zelllinien EBNA 293-PF4 V1-B4 und EBNA 293-PF4 C-1D ein Nachlassen der PF4-Produktion zu beobachten. Tag 1 bezeichnet hierbei den ersten Tag, an dem Kulturüberstand entnommen wurde, nachdem die Zelllinien an HEK adaptiert waren.

Anhand des Mittelwertes der für EBNA 293-PF4 V1-B4 bzw. C-1D erhaltenen Extinktionen bei Vergleich der unterschiedlichen Medien lässt sich eine höhere Proteinexpression von EBNA 293-PF4 C-1D feststellen, Abb. 3-10. Die Proteinmenge von EBNA 293-PF4 V1-B4 beträgt bei Verwendung des Mediums DMEM etwa 62 IU/mL, bei Verwendung des HEK-Mediums etwa 58 IU/mL. Im Vergleich dazu beträgt die Proteinmenge von EBNA 293-PF4 C-1D bei DMEM etwa 65 IU/mL, bei HEK-Medium etwa 88 IU/mL. Der Einsatz des Mediums DMEM scheint bei beiden Zelllinien für eine annähernd gleich hohe Proteinkonzentration zu sorgen. Unter Verwendung des HEK-Mediums stieg die Produktion von PF4 bei EBNA 293-PF4 C-1D dagegen leicht an.

In Abb. 3-11 ist ein Vergleich der Kulturüberstände der Zelllinien EBNA 293-PF4 V1-B4, C-1D bzw. Mock, die mit Hilfe verschiedener Nährmedien angezchtet wurden, dargestellt.

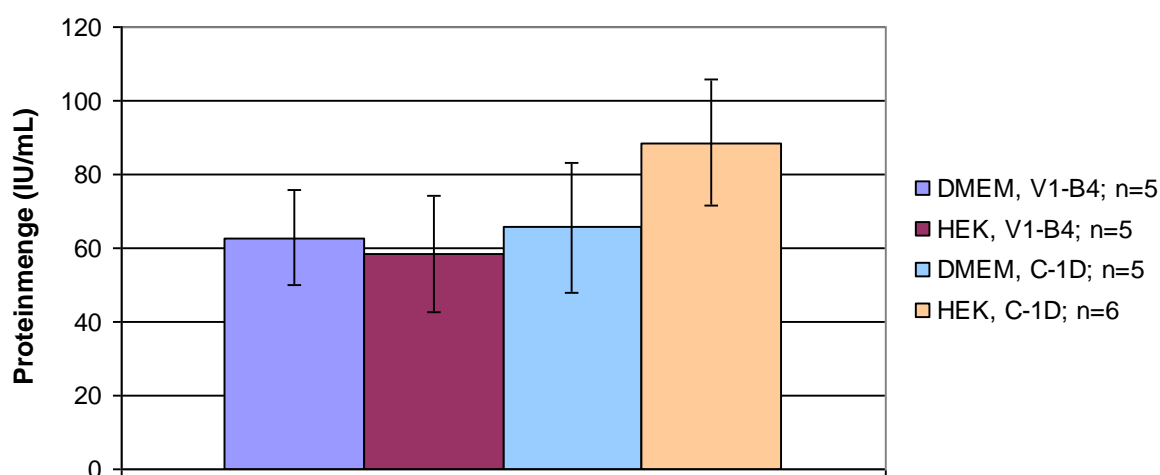


Abb. 3-10 Vergleich der Mittelwerte der Produktionsmengen der Zelllinien EBNA 293-PF4 V1-B4 und C-1D nach Verwendung der Medien DMEM und HEK. Hierfür wurden je 5 Messungen von EBNA 293-PF4 V1-B4 und C-1D in DMEM-Medium, 5 Messungen von EBNA 293-PF4 V1-B4 in HEK-Medium und 6 Messungen von EBNA 293-PF4 C-1D in HEK-Medium gemittelt. Zusätzlich wurde die Standardabweichung eingetragen.

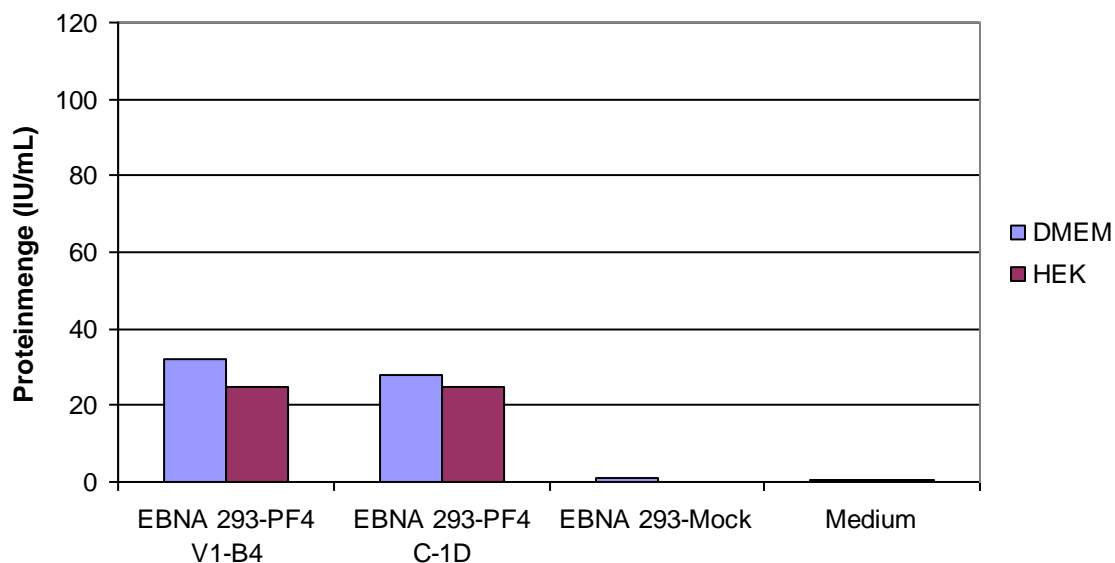


Abb. 3-11 Vergleich der PF4-Produktionsmenge bei Verwendung verschiedener Medien und Kontroll-experimente.

Zusätzlich wurden auch die eingesetzten Nährmedien einer Kontrolle unterzogen. Somit sollte ausgeschlossen werden, dass diese PF4 enthalten. Als positive Kontrolle diente die Kontrolllösung des Testkits. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass zwischen den Medien und den eingesetzten Testsubstanzen eine geringe unspezifische Bindung besteht. Da diese für beide Medien annähernd gleich ist, kann davon ausgegangen werden, dass in dem serumhaltigen Medium DMEM keine nennenswerte PF4-Menge vorliegt. Der Kulturüberstand der Zelllinie EBNA 293-PF4 Mock weist ebenfalls eine geringe unspezifische Bindung auf.

In Abb. 3-12 ist ein Vergleich der Produktion von PF4var1 durch die Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 an verschiedenen Tagen in HEK-Medium dargestellt. Die Zellen wurden zunächst in Zellkulturflaschen mit DMEM angezüchtet, erhielten jedoch, sobald sie sich an der Zellflasche angeheftet hatten, HEK-Medium. Die gezählten Tage beziehen sich auf den Tag der Kultur, ab dem die Zellen nur mit HEK-Medium versorgt wurden. Dabei wurden die Zellen nur einmal mit HEK-Medium versorgt. Danach erfolgte kein weiterer Wechsel des Mediums, auch eine Trypsinierung fand nicht statt. Die Zellen sollten möglichst lange in Kultur bleiben und dadurch möglichst viel PF4var1 anreichern. Die Abbildung zeigt, dass mit HEK-Medium durchaus eine gute Proteinanreicherung möglich ist. Allerdings veränderte sich die Morphologie der Zellen zusehends, so dass der Versuch am zwölften Tag abgebrochen

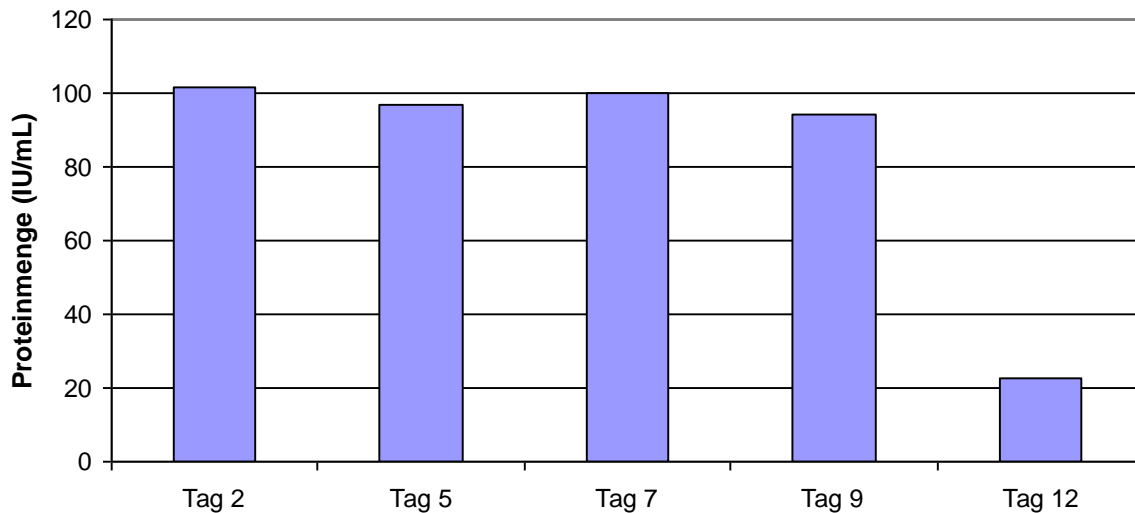


Abb. 3-12 Vergleich der PF4var1-Produktionsmenge unter Verwendung des Kulturüberstandes bei HEK-Medium durch die Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 an verschiedenen Kulturtagen.

werden musste. Es hafteten kaum noch Zellen an der Flaschenwand an, die meisten Zellen waren in Suspension übergegangen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war die Vitalität noch gut.

Der Kulturüberstand der Zelllinien EBNA 293-PF4 V1-B4 bzw. C-1D nach der Verwendung eines Minifermenters und anschließender Dialyse wurde mit Puffer des Testkits (siehe 2.6.2) versetzt. Abb. 3-13 zeigt die Proteinmenge in Abhängigkeit der Verdünnung. Die Dialyse

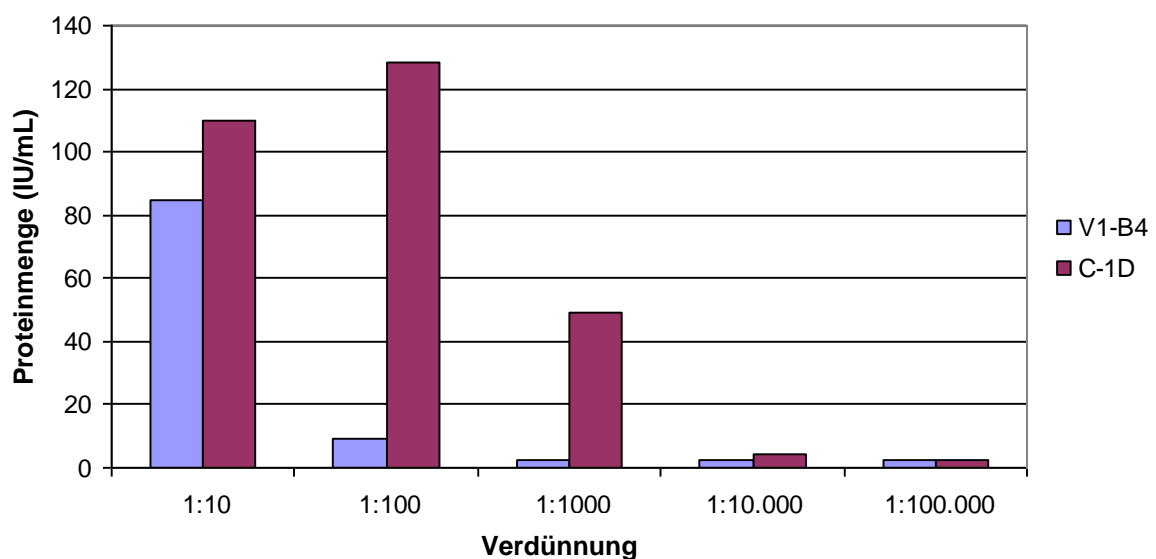


Abb. 3-13 Produktionsmenge der Zelllinien EBNA 293-PF4 V1-B4 und C-1D nach Verwendung eines Minifermenters bei unterschiedlichen Verdünnungen im PF4-ELISA.

erfolgte zur Einstellung des pH-Wertes. Anhand der in Abb. 3-7 dargestellten Eichkurve konnte die Menge an PF4 für den Kulturüberstand aus dem Minifermenter und nach Dialyse bestimmt werden. Für die Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 beträgt die PF4-Menge bei einer 1:10-Verdünnung etwa 85 IU/mL. Bei höheren Verdünnungen sinkt die PF4-Menge deutlich ab. Bei einer Verdünnung von 1:100 beträgt sie lediglich etwa 9 IU/mL, danach etwa 2 IU/mL. Die Produktion von PF4 durch die Zelllinie EBNA 293-PF4 C-1D dagegen weist deutlich höhere Werte auf. Bei einer Verdünnung von 1:10 liegt eine PF4-Menge von etwa 110 IU/mL vor. Bei 1:100 konnten etwa 130 IU/mL nachgewiesen werden. Die folgenden Verdünnungen zeigen eine geringere PF4-Menge. Bei den Verdünnungen 1:1000 liegen noch etwa 49 IU/mL vor, bei 1:10000 etwa 5 IU/mL und bei 1:100000 etwa 2 IU/mL.

Die mittels FPLC (siehe 2.7.1) gewonnenen Eluate wurden ebenfalls im ELISA auf ihre PF4-Konzentration überprüft. Die verwendeten Eluate des PF4-Proteinextrakts wurden bei unterschiedlichen Zusammensetzungen der Puffer A und B in Vierfachbestimmung untersucht (20 %, 40 %, 60 % und 80 % Puffer B), wobei in einem der Tests ein Vergleich der Eluate von zwei verschiedenen Tagen der Zellisolierung erfolgte. Bei dem Tagesvergleich fällt auf, dass die am ersten Tag isolierten Proteine in den Eluaten schlechter zu differenzieren waren als die später isolierten. Dies trifft sowohl auf Proteine aus der Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 (Abb. 3-14) als auch auf Proteine aus der Zelllinie EBNA 293-PF4 C-1D (Abb. 3-15) zu. Bei Proteinen, die am zweiten Tag aus den Zellen isoliert wurden, lag das Maximum der optischen Dichte für die Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 bei 60 %, für die Zelllinie EBNA 293-PF4 C-1D bei 40 %.

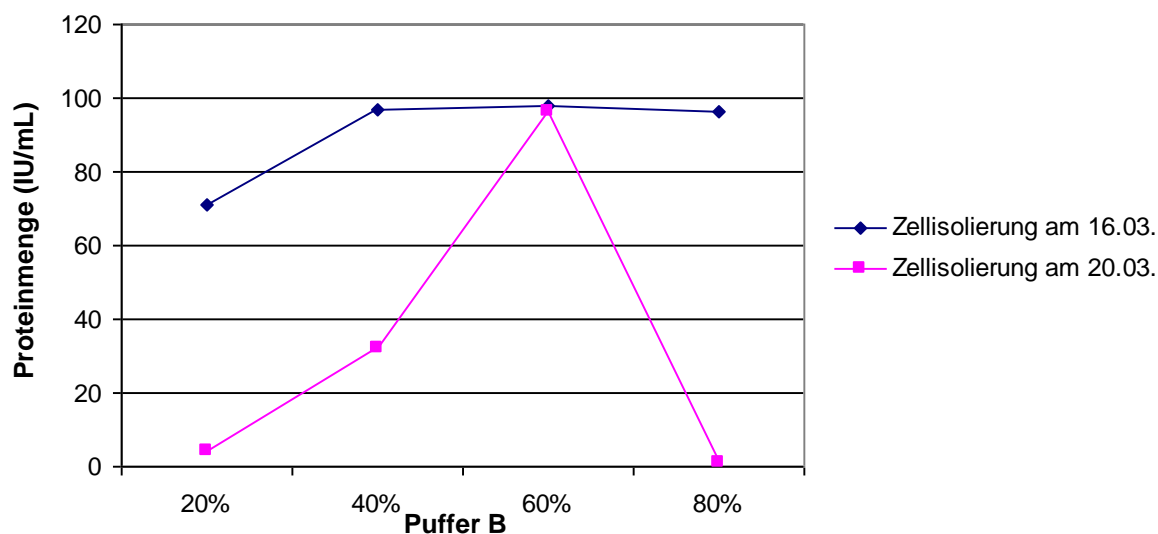


Abb. 3-14 Proteinmenge bei Eluaten der Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 bei unterschiedlichen Pufferverhältnissen im Anti-PF4-ELISA.

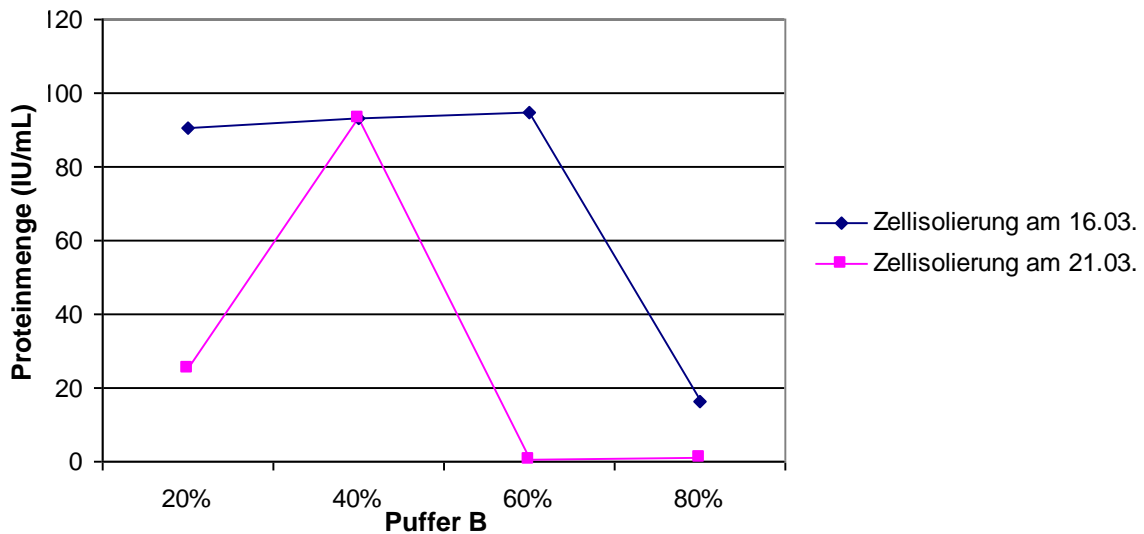


Abb. 3-15 Proteinmenge bei Eluaten der Zelllinie EBNA 293-PF4 C-1D bei unterschiedlichen Pufferverhältnissen im Anti-PF4-ELISA.

Für den in Abb. 3-16 gezeigten Vergleich der Auswertungen wurden 3 Versuche der Protein-elution in verschiedenen Fraktionen zusammengefügt. Bei der Elution des Zellextrakts der Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 konnte bei 60 % Puffer B am meisten PF4 gewonnen werden. Für die Zelllinie EBNA 293-PF4 C-1D liegt das Maximum bei 40 % Puffer B.

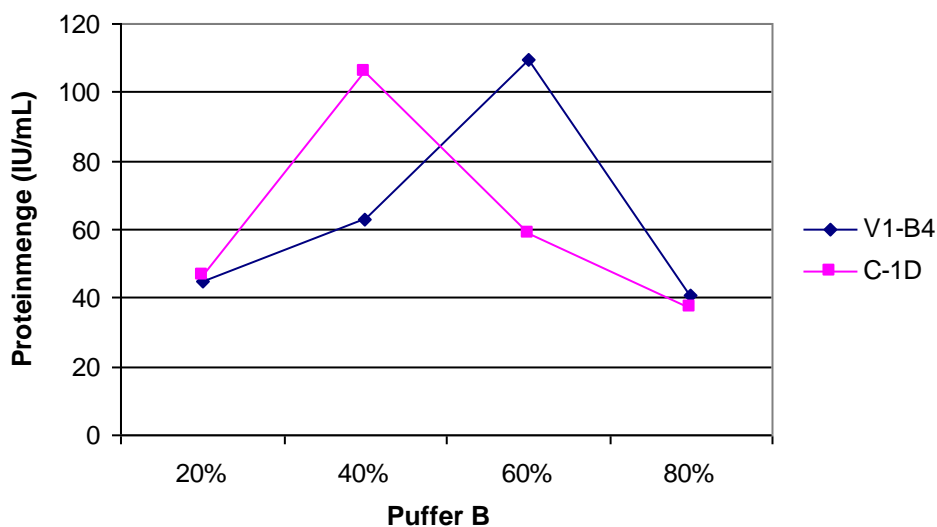


Abb. 3-16 Mittelwerte der isolierten Proteinmengen aus 3 Eluaten der Zelllinien EBNA 293-PF4 V1-B4 und C-1D bei verschiedenen Pufferverhältnissen.

3.4 *E. coli*

In Tab. 3-3 sind die mit *E. coli* durchgeführten Versuche zusammengefasst.

Tab. 3-3 Schema der mit *E. coli* durchgeführten Versuche.

Bakterium	Plasmid	DNA-Nachweis	Gennachweis	Aminosäurenachweis	Proteinachweis
<i>E. coli</i> DH5 α	Variante-Fragment (pJHC05)	DNA-Sequenzierung	Gelelektrophorese		
	Classic (pJHC07)	DNA-Sequenzierung	Gelelektrophorese		
	Variante (pJHC08)	DNA-Sequenzierung	Gelelektrophorese		
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RP	Variante-Fragment (pJHC05)			Edman-Abbau	ELISA
	Classic (pJHC07)				SDS-PAGE, Maldi-ToF, ESI, ELISA
	Variante (pJHC08)				SDS-PAGE, Maldi-ToF, ESI, ELISA

3.4.1 Gelelektrophorese zur Kontrolle der PCR

Zur Kontrolle der erfolgreichen PCR wurde jeweils eine Gelelektrophorese durchgeführt. Abb. 3-17 zeigt JHC08 (PF4var1), welches als 220 Basenpaare großes Stück neben der DNA-Leiter gut zu erkennen ist. Abb. 3-18 zeigt JHC07 (PF4), welches als 220 Basenpaare großes Stück neben der DNA-Leiter gut zu erkennen ist.

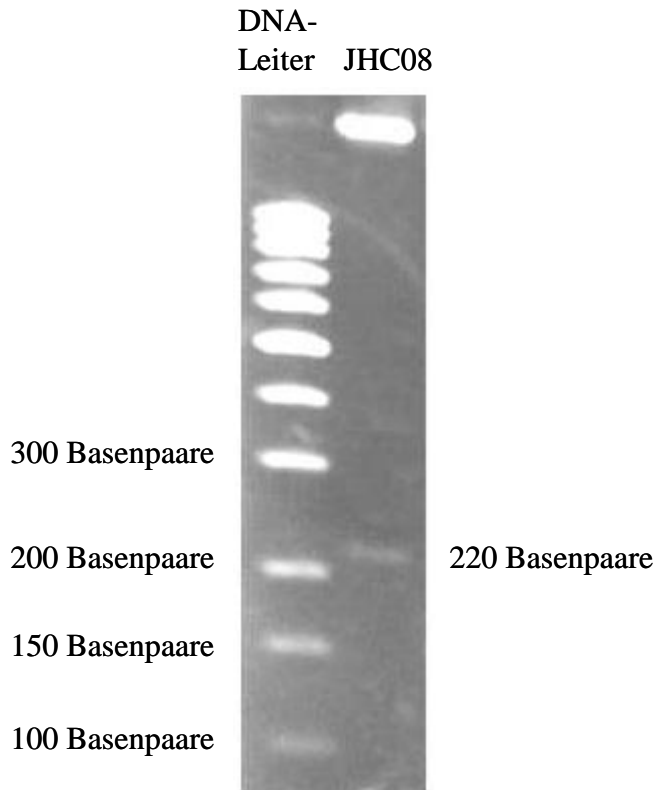


Abb. 3-17 Gelelektrophorese von JHC08 (PF4var1). Das 220 Basenpaare große Stück ist in der rechten Spur gut zu sehen.

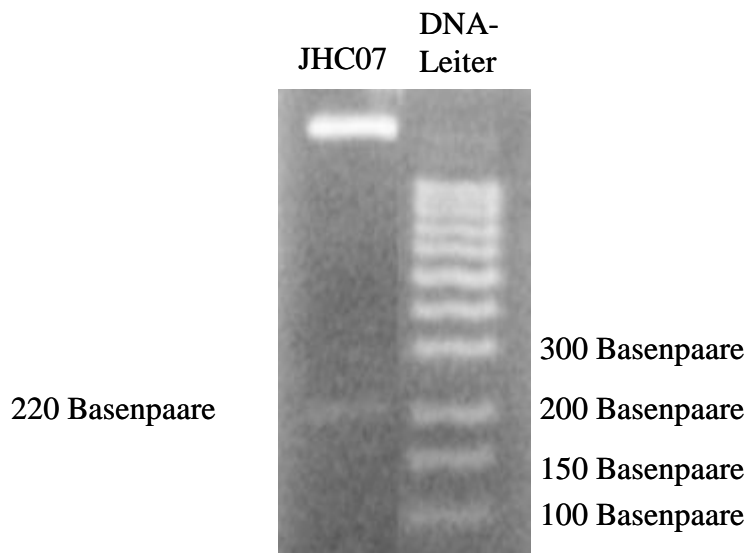


Abb. 3-18 Gelelektrophorese von JHC07 (PF4). Das 220 Basenpaare große Stück ist in der linken Spur gut zu erkennen.

3.4.2 ELISA als Kontrolle der Sekretion von PF4 durch *E. coli*

Tab. 3-4 Schema der bei *E. coli* durchgeführten ELISA.

Untersuchte Bakterien / Vektoren	Verwendetes Material	Anzahl der Versuche
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RP pJHC05 (Variante Fragment)	Rohextrakt	1
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RP pJHC08 (Variante)	Fraktionen	2
	Rohextrakt	3
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RP pJHC07 (Classic)	Fraktionen	1
	Rohextrakt	3
Vektor pET11a	Rohextrakt	3

Auch von dem durch *E. coli* produzierten PF4 wurden ELISA durchgeführt (siehe Tab. 3-4). Dies diente dem Nachweis, ob die Bakterien überhaupt PF4 produzieren. Es wurden die verschiedenen Fraktionen der Säulenchromatographie der Proteine aus *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP pJHC08 (Variante) bzw. aus *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP pJHC07 (Classic) verwendet. Auch PF4 aus *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP pJHC05 (Variante Fragment) wurde im ELISA getestet. Dabei konnte sowohl bei JHC07 (PF4Classic) als auch bei JHC08 (PF4Variante) eine Proteinproduktion und -sekretion nachgewiesen werden. Auch bei JHC05, dem für die 19 C-terminalen Aminosäuren des PF4var1 kodierenden Gens, konnte eine Bindung im ELISA nachgewiesen werden. Wie in Abb. 3-19 ersichtlich ist die Anti-PF4-Bindung für JHC05 jedoch nicht so hoch wie für JHC07 bzw. JHC08. Zum Einsatz kam hier jeweils der Rohextrakt ohne vorherige Aufreinigung.

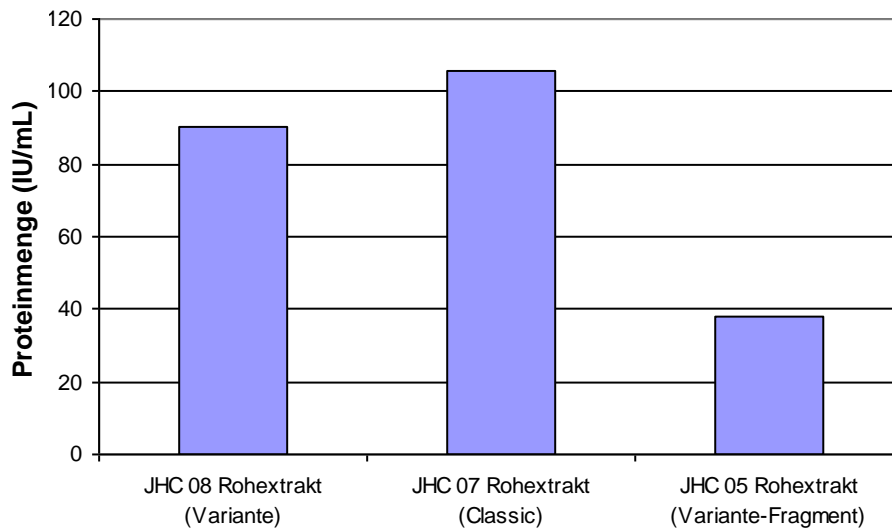


Abb. 3-19 Nachgewiesene Menge des produzierten Proteins von *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP im Anti-PF4-ELISA. Zum Einsatz kamen die Plasmide JHC08 (PFvar1), JHC07 (PF4), JHC05 (19 C-terminalen Aminosäuren des PF4var1).

In Abb. 3-20 ist ein Vergleich zwischen den Rohextrakten von *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP mit dem Leervektor pET11a, sowie den Plasmiden, die für PF4classic bzw. PF4var1 kodieren (JHC07 und JHC08), dargestellt. Aus der Abbildung wird deutlich, dass der rohe Proteinextrakt aus *E. coli* mit dem Leervektor kaum Bindung an die gegen PF4 gerichteten Antikörper aufwies. Auch für das Medium war nur eine unspezifische Bindung nachweisbar. Entsprechend des Testkits wurden die beiliegende positive Kontrolle und der Verdünnungspuffer als Negativkontrolle verwendet.

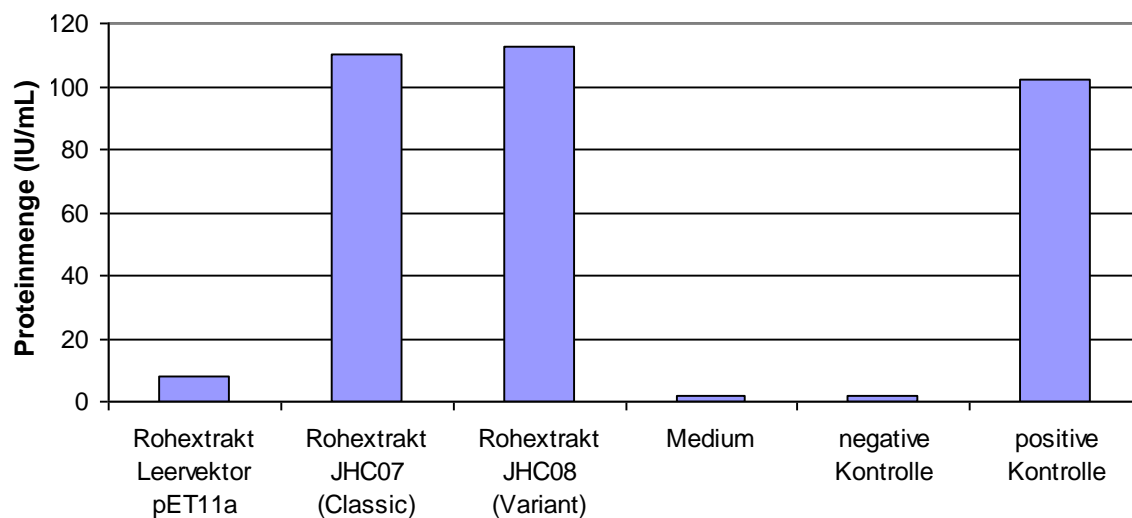


Abb. 3-20 Anti-PF4 ELISA zum Nachweis der Bindungskapazität aus den Rohextrakten von *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP, die den Leervektor pET11a, bzw. die Vektoren für PF4classic (JHC07) oder PF4var1 (JHC08) kodieren.

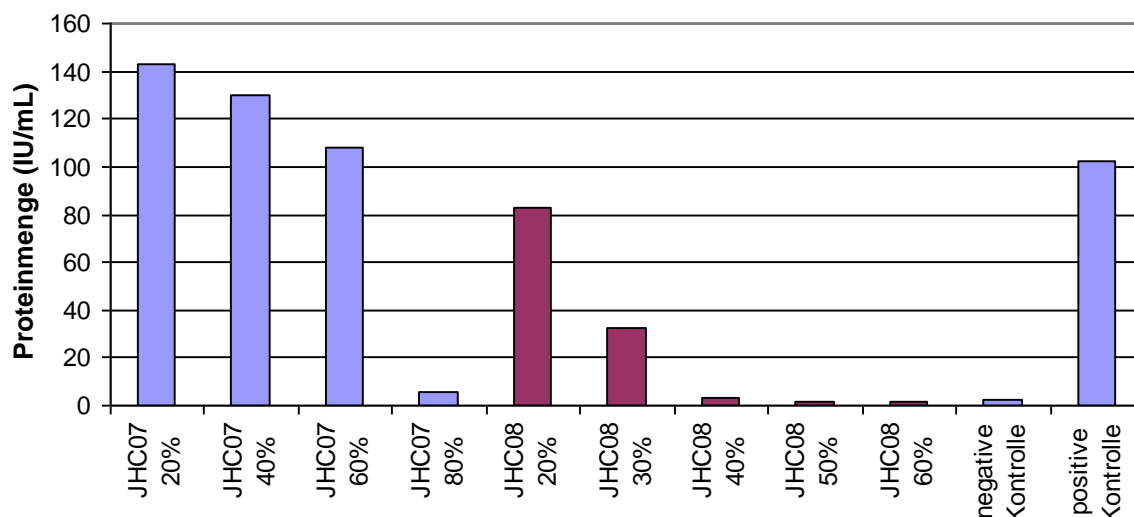


Abb. 3-21 Anti-PF4 ELISA unter Verwendung der Eluate von JHC 07 (Classic) und JHC08 (Variante) bei verschiedenen Pufferkonzentrationen. Als Kontrolle dienten die negative und positive Kontrolle des Testkits.

Für *E. coli* mit den Vektoren JHC07 (PF4Classic) und JHC08 (PF4Variante) wurden außerdem Proteineluate, die mit unterschiedlichen Pufferkonzentrationen erhalten wurden, aufgetragen, Abb. 3-21. Dabei zeigte sich eine hohe Proteinkonzentration bei niedrigen Konzentrationen von Puffer B. Für JHC07 liegt die höchste PF4-Konzentration bei 20 % Puffer B. Bei 40 %, bzw. 60 % liegt aber immer noch eine hohe PF4-Konzentration vor. JHC08 weist ebenfalls eine hohe Proteinkonzentration bei 20 % auf. Danach nimmt die PF4-Konzentration jedoch schnell ab. Ab 50 % ist keine nennenswerte Proteinkonzentration mehr nachweisbar. Die negative und die positive Kontrolle entstammten dem verwendeten Testkit, vgl. 2.6.2.

Die Elution von PF4var1 mit Hilfe der Puffer C und D ist in Abb. 3-22 dargestellt. Die Puffer C und D wurden speziell für die Aufreinigung des Proteins PF4var1 entwickelt. Es zeigt sich eine Elution vor allem in dem Bereich, in dem Puffer D zu 15 % vorliegt. Aber auch bei den Pufferkonzentrationen von 20 % - 45 % erfolgt eine Elution des Proteins in hohen Konzentrationen.

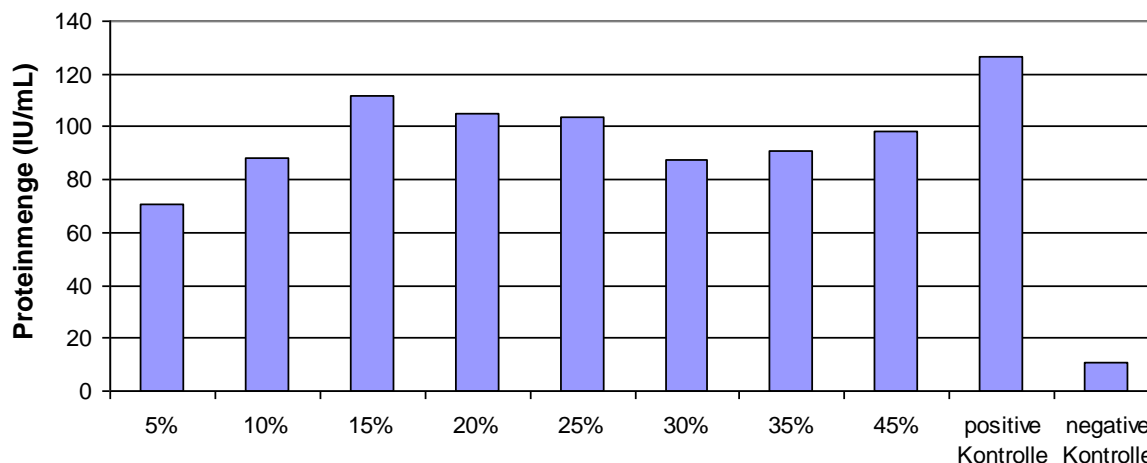


Abb. 3-22 Anti-PF4 ELISA von JHC08 (Variante) unter Verwendung der Puffer C und D.

3.5 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Die Messung des Proteingehalts von PF4 aus JHC07, *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP, ergab eine Produktion von 0,45 mg aus 0,8 L Kulturmedium. Für die Produktion von PF4Classic ergibt sich ein Proteingehalt von 0,56 mg/L.

3.6 Affinitätschromatographische Aufreinigung von PF4var1 unter Verwendung einer NHS-aktivierten Säule

Eine NHS-aktivierte Säule wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-human-PF4-Antikörper gekoppelt. Dies diente der affinitätschromatographischen Aufreinigung von PF4var1 aus EBNA 293-PF4 V1-B4. Allerdings konnte mit dieser Methode nur eine geringe Menge an PF4var1 aufgereinigt werden. Das mittels Säule aufgereinigte PF4var1 reichte lediglich zum Proteinnachweis mittels ESI aus.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von transformierten EBNA 293-Zelllinien im Hinblick auf Produktion, Expression und Sekretion von PF4 bzw. PF4var1 mittels diverser Nachweismethoden. Zusätzlich wurden Möglichkeiten zur Proteinaufreinigung untersucht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zelllinien EBNA 293-PF4 C-1D und V1-B4 die Gene für PF4 bzw. PF4var1 tragen und die entsprechenden Proteine produzieren. Auch die Transformierung von *E. coli* war erfolgreich, wie DNA-Sequenzierung und massenspektrometrische Untersuchungen der isolierten Proteine belegen. Somit liegen nun sowohl humane Zelllinien als auch Bakterien vor, die PF4 bzw. PF4var1 produzieren.

Die Kultivierung der EBNA 293-Zelllinien erwies sich als erfolgreich. Die Produktion von PF4 bzw. PF4var1 durch die Zelllinien EBNA 293-PF4 C-1D bzw. V1-B4 gelang, wenn auch nicht in gewünschter Menge. Die Expression der Proteine und ihre Präsentation auf der Zelloberfläche konnte nachgewiesen werden. Mit Hilfe der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Zelllinien EBNA 293-PF4 C-1D und V1-B4 ein Epitop exprimieren, welches durch einen PF4-Antikörper erkannt wird (Abb. 3-4). Wie erwartet war für die Zelllinie ohne PF4-Gen, EBNA 293-Mock, keine Bindung nachweisbar (Abb. 3-5). Die unterschiedlichen Bindungskapazitäten von EBNA 293-PF4 C-1D und V1-B4 lassen zwei verschiedene Erklärungsmöglichkeiten zu. Zum einen weist die Zelllinie EBNA 293-PF4 V1-B4 eine niedrigere Expression als die Zelllinie EBNA 293-PF4 C-1D auf, was die geringere Präsentation von PF4var1 auf der Zelloberfläche von EBNA 293-PF4 V1-B4 erklärt, im Vergleich zur Präsentation von PF4 auf der Zelloberfläche von EBNA 293-PF4 C-1D. Dies könnte an der längeren Aminosäurekette von PF4var1 und damit einer verlängerten Produktionsdauer liegen. Zum anderen ist auch eine unspezifischere Bindung des gegen PF4 gerichteten Antikörpers bei PF4var1 möglich. Dies rührt daher, dass sich PF4 und PF4var1 in drei Aminosäuren unterscheiden und somit eine geringere positive Ladung im Carboxy-terminalen Ende bei PF4var1 vorliegt (5). Daneben kommt es durch den Aminosäureaustausch auch zu einer Veränderung der Proteinstruktur.

Die Kultivierung der Zelllinien wurde in unterschiedlichen Zellmedien untersucht. Dabei kamen die Medien DMEM und HEK zum Einsatz. Die EBNA 293-Zelllinien wurden zunächst in DMEM kultiviert. Es zeigte sich ein gutes Zellwachstum. Der Nachweis der Produktion bzw. Expression von PF4 bzw. PF4var1 konnte sowohl im ELISA als auch im FACS erbracht werden. Neben ausreichendem Nährstoffangebot war auch auf ausreichend Raum für die Zellen zu achten. Bei zu hohen Zellzahlen wuchsen die Zellen übereinander, woraus sich eine sinkende Vitalität ergab. Neben dem üblichen serumhaltigen Medium DMEM kam auch noch das serumfreie Medium HEK-293-Express zum Einsatz. Hier hatten die Zellen zunächst Anpassungsschwierigkeiten. Dies äußerte sich in verzögerter Anheftung der Zellen an der Zellkulturflaschenwand und langsamerem Wachstum der Zellen. Nach mehreren Kulturtagen erhöhte sich dann die Proteinproduktion, Abb. 3-9. Dies kann daran liegen, dass die Zellen am zweiten Tag der Probenentnahme unter HEK-Medium ausreichend angewachsen waren, während sie unter DMEM bereits am ersten Tag angewachsen waren und sofort mit der Proteinproduktion begonnen hatten. Ein Vergleich der Proteinproduktion anhand der optischen Dichte bei Einsatz der verschiedenen Medien (Abb. 3-10) unterstützt diese Annahme, da bei Einsatz des Mediums DMEM eine höhere optische Dichte vorliegt. Die in Abb. 3-6 aufgezeigten höheren Expressionsraten von PF4 bzw. PF4var1 bei Verwendung der Medien DMEM/HEK im Vergleich zu lediglich DMEM ist auf eine bessere Adaptation der Zellen aller Zelllinien unter DMEM/HEK zurückzuführen.

Dem Medium DMEM ist fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Es wurde überprüft, ob auf Grund dieses Zusatzes bereits PF4 im Medium enthalten ist. Die im ELISA (Abb. 3-11) gemessene optische Dichte zeigt, dass bei DMEM kein PF4 in relevanter Menge vorhanden ist. Auch für das HEK-Medium und die Zelllinie EBNA 293-Mock ist keine PF4 nachweisbar.

Da das HEK-Medium für den Einsatz bei EBNA-Zellen optimiert ist, wurden Zellwachstum und Proteinproduktion auch in diesem Medium untersucht. Es zeigt sich, dass die Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum möglich ist, hier bis neun Tage (Abb. 3-12). Allerdings wurde nicht geklärt, ob die nachgewiesene hohe Proteinkonzentration auf Grund einer kontinuierlichen Produktion oder der Stabilität des Proteins im Medium besteht. Spätestens am zwölften Tag findet jedoch keine hohe Proteinproduktion mehr statt. Dafür ist unter anderem die Entstehung von Zellaggregaten bei Verwendung des serumfreien Mediums

und langer Kulturdauer verantwortlich. Der Nachteil bei Verwendung des HEK-Mediums ist das langsamere Zellwachstum.

Zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen wurden die Zellen zunächst in DMEM angezüchtet und anschließend mit HEK-Medium weiter kultiviert. Diese Kombination zeigte jedoch keinen Vorteil gegenüber der ausschließlichen Verwendung von DMEM.

Um eine Steigerung der Proteinproduktion zu erzielen wurde eine Hochdichtezellkultur im Minifermenter eingesetzt. Proteinanreicherung und Kultivierung der Zellen gelangen zwar, allerdings musste der Versuch nach sechs Tagen beendet werden, da es zur Bildung von Zellaggregaten kam. Zellzahl und Vitalität sanken zu stark ab, um eine weiterhin erfolgreiche Proteinproduktion aufrecht zu erhalten (Abb. 3-1 und Abb. 3-2). Damit zeigte sich, dass auch im Minifermenter eine Proteinproduktion im großen Maßstab über einen längeren Zeitraum nicht praktikabel ist. Eine Verbesserung der Kultivierungsbedingungen wurde durch Belin et al. beschrieben (40). Zur Vermeidung der Bildung von Zellaggregaten wurde der Einsatz von cellPROTECT™ verwendet. Belin et al. setzten diesen Zusatz in Kombination mit HEK-293-Zellen, sowie einem Minimum an FCS zur erfolgreichen Proteinproduktion ein (40). Ein Einfluss von cellPROTECT™ auf die Zelllinien EBNA 293-PF4 C-1D bzw. V1-B4 wurde noch nicht untersucht.

Nach Kultivierung der Zelllinien EBNA 293-PF4 C-1D und V1-B4 im Minifermenter wurde der Kulturüberstand hinsichtlich der PF4- / PF4var1-Sekretion überprüft (Abb. 3-13). Dabei wurde der Kulturüberstand mit einem Puffer verdünnt (siehe 2.6.2). Bei PF4var1 liegt, wie zu erwarten, bei größerer Verdünnung eine Abnahme der PF4var1-Konzentration vor. Im Gegensatz dazu stellte sich heraus, dass bei einer 1:100-Verdünnung des Kulturüberstands von EBNA 293-PF4 C-1D mehr PF4 nachgewiesen werden konnte, als bei einer 1:10-Verdünnung. Eine mögliche Interpretation ist eine Konformationsänderung des Proteins bei hoher Konzentration, wodurch eine Bindung von PF4 an den Antikörper Anti-human PF4 F(ab')₂ vermindert wird. Demnach kann das hierbei beobachtete unterschiedliche Verhalten der Proteine PF4 und PF4var1 durch zwei Faktoren erklärt werden, die Konzentration des Proteins im Kulturüberstand (PF4var1 zeigte eine niedrigere Konzentration) und die unterschiedliche Aminosäuresequenz.

In einem weiteren Ansatz zur Optimierung der Proteinproduktion wurden transformierte *E. coli* verwendet. PF4 und PF4var1 konnten erfolgreich in *E. coli* produziert werden. Daher ist zu überlegen für weitere Versuche die Proteinproduktion in *E. coli* vorzunehmen. Allerdings wurde bislang nicht überprüft, in wie weit posttranskriptionale oder auch posttranslationale Modifikationen Einfluss auf Konformation und Konstitution des Proteins nehmen. Sollte es für die Struktur von PF4 keinen Unterschied darstellen, ob das Protein einer menschlichen Zelle oder einem Bakterium entstammt, so ist sicherlich die Produktion in *E. coli* zu empfehlen. Dadurch ist eine größere Produktion des Proteins in kürzerer Zeit möglich.

Der Einsatz einer Hochdichtezellkultur sollte nicht ausgeschlossen werden. Durch *E. coli* ist zwar eine gute Proteinproduktion möglich, bislang liegen aber, wie bereits erwähnt, noch keine Daten hinsichtlich einer Veränderung der Proteinstruktur vor. Dies könnte im Hinblick auf eine mögliche Verwendung bei der Suche nach PF4 bzw. PF4var1 in Patientenseren von Bedeutung sein, da sich posttranskriptionale und posttranslationale Veränderungen in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen unterscheiden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Nachweismethoden (FACS und ELISA) sind nur für den Nachweis von PF4, nicht aber PF4var1, optimiert. Da sich die beiden Proteine jedoch nur in 3 Aminosäuren unterscheiden, sollte PF4var1 mit den angewandten Methoden ebenfalls nachweisbar sein. Die quantitative Bestimmung der Proteinproduktion beruht auf der Bindung von Antikörpern an PF4, daher muss diese Vorgehensweise bei der Verwendung von PF4var1 mit Vorsicht betrachtet werden. Für PF4var1 liegt kein spezifischer Antikörper vor. In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass der PF4-Antikörper auch an PF4var1 bindet. Zur genaueren Bestimmung müssten Versuche mit gezielt gegen PF4var1 gerichteten Antikörpern durchgeführt werden. Anhand der aufgeführten Nachweismethoden FACS und ELISA ist eine Differenzierung zwischen PF4 und PF4var1 nicht möglich.

Eine Untersuchung mittels Bradford-Test (38) zur Bestimmung der Proteinkonzentration von PF4var1 ist bislang wenig Erfolg versprechend. Da bei dieser Methode Gesamtproteinkonzentrationen gemessen werden, muss eine ausreichende Reinheit von PF4 bzw. PF4var1 vorliegen, bevor verlässliche quantitative Aussagen getroffen werden können.

Der Zellkulturüberstand der EBNA 293-Zelllinien enthält ein Proteingemisch. Gleiches gilt für die Proteinproduktion in *E. coli*. Diese Gemische wurden entsprechend dem Standard zur Aufreinigung von PF4 durch die Firma ChromaTec GmbH, Greifswald aufgereinigt. Die Aufreinigung von PF4 aus Zellkulturüberstand bzw. nach der Produktion in *E. coli* gestaltete sich problemlos. Schwieriger war allerdings die Aufreinigung von PF4var1. Bei PF4var1 ändert sich die Ladung im Protein, wodurch eine Anpassung der Aufreinigungsmethode notwendig wurde. Durch die Entwicklung der Puffer C und D für die Aufreinigung von PF4var1 ist nun eine Möglichkeit gegeben PF4var1 anzureichern (siehe 2.3.5). Allerdings ist es noch nicht möglich PF4var1 in ausreichender Reinheit darzustellen. Sobald dies erfolgt ist, kann mit den genannten Möglichkeiten PF4var1 in ausreichend großen Mengen produziert und aufgereinigt werden. Damit wird die Entwicklung weiterer Testsysteme zur Erforschung des PF4var1 z.B. in Patientenserum ermöglicht.

Um Patientenmaterialien auf PF4var1 zu testen erwies sich die Herstellung einer NHS-aktivierten Säule nicht als erfolgversprechend, da die gewonnene Proteinmenge sehr gering war. Diese Art der Aufreinigung lohnt sich nicht für große Routineuntersuchungen. Wünschenswert wäre die Erstellung eines ELISA ähnlich dem, der in dieser Arbeit zur Bestimmung der Proteinmenge von PF4 zur Anwendung kam. Wenn PF4var1 in ausreichender Reinheit vorliegt, dann ist die Immunisierung eines Kaninchens möglich. Der dann im Kaninchen erzeugte Antikörper muss an eine Mikrotitrationsplatte gekoppelt werden. Ein photometrisch markierter Sekundärantikörper gegen PF4var1 müsste ebenfalls noch erstellt werden. Unabhängig davon muss noch überprüft werden ob die Menge an PF4var1, die bei Patienten vorliegt, auch ausreichend ist, um ohne Aufreinigung nachgewiesen werden zu können, bzw. welche Aufreinigungsschritte sinnvoll sind, um einen Nachweis von PF4var1 zu erbringen. Versuche von Lasagni et al. zeigten allerdings die Schwierigkeit einen Antikörper zur Differenzierung zwischen PF4 und PF4var1 zu erstellen (27). Dies wird mit der großen Ähnlichkeit zwischen den Aminosäuresequenzen der beiden Proteine begründet.

Zum Nachweis von PF4 und PF4var1 erwies sich die Verwendung des MALDI-ToF als ungeeignet, da die Differenzen zwischen den Proteinen gering sind. Mit Hilfe des ESI-ToF war allerdings eine Zuordnung und Bestätigung der Proteine möglich. Über den Nachweis der Proteine konnte gezeigt werden, dass nicht nur die genetische Information für die Proteine vorliegt, sondern dass auch eine Expression stattfindet.

Oberstes Ziel weiterer Arbeiten sollte die Aufreinigung und Gewinnung größerer Mengen PF4var1 sein. Zum einen wären dann Studien über das Bindungsverhalten von Heparin und PF4var1 möglich. Dies ist insofern interessant, da sich die drei Aminosäuren, die PF4 und PF4var1 voneinander unterscheiden, in einem Bereich des Proteins befinden, der für die Bindung von Heparin von Bedeutung ist. PF4var1 ist weniger positiv geladen als PF4 (5) und dies wird einen Einfluss auf die Bindung zwischen PF4var1 und Heparin haben. Zum anderen könnte dann der Einfluss von PF4var1 auf Angiogenese und Tumorwachstum untersucht werden. Auch der Einfluss von PF4var1 auf die HIT ist von Interesse, da in neueren Untersuchungen PF4 allein als Verursacher dieser Erkrankung verantwortlich gemacht wird (25). Daher ist durchaus denkbar, dass auch PF4var1 in den Mechanismus der HIT-Entstehung eingreift. Durch ein PF4- bzw. PF4var1-Screening könnte es möglich sein HIT-gefährdete Patienten vor dem Auftreten einer HIT zu erkennen.

5 Zusammenfassung

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) ist eine schwerwiegende Komplikation der Heparintherapie. Dabei erfolgt zwischen dem Protein Plättchenfaktor 4 (PF4) und Heparin eine Komplexbildung, welche wichtig für die krankheitsauslösende Bildung des Antigens ist. Von PF4 existiert eine beim Menschen vorkommende Variante, Plättchenfaktor 4 Variante 1 (PF4var1). Bei PF4 und PF4var1 handelt es sich um Proteine non-alleler Gene. Die Proteine unterscheiden sich an 3 Stellen ihrer Aminosäuresequenz. PF4var1 ist weniger positiv geladen, wodurch die Wechselwirkung mit Heparin beeinflusst wird. Die veränderte Sequenz beeinflusst die Eigenschaften der Proteine. So weist PF4var1 stärkere chemotaktische und anti-angiogenetische Eigenschaften auf als PF4. Auch bei den Signalpeptiden der beiden Proteine liegt eine Änderung vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst mit PF4 bzw. PF4var1 kodierendem Gen transformierte humane embryonale Nierenzellen in unterschiedlichen Nährmedien kultiviert. Die Zelllinien wurden hinsichtlich der Produktion, Expression und Sekretion der Proteine PF4 bzw. PF4var1 untersucht. Die angewendeten Untersuchungsmethoden zur Expression (FACS) bzw. zur Sekretion (ELISA) ermöglichten den Nachweis der Proteine. Eine Differenzierung zwischen PF4 und PF4var1 ist hiermit nicht möglich. Allerdings zeigte die Sequenzierung der Aminosäurestrukturen und der DNA das spezifische Vorliegen von entweder PF4 oder PF4var1.

Zur Herstellung von Antikörpern gegen PF4var1 werden große Mengen an PFvar1 benötigt. Da, auch nach Einsatz des Minifermenters, durch die humanen Zellen keine ausreichende Proteinproduktion möglich war, wurde *E. coli* mit der genetischen Information für PF4 transformiert. Gleiches wurde mit PF4var1 durchgeführt. Hierdurch ist eine Proteinproduktion in größerem Maßstab möglich. Zur Aufreinigung der Proteine mussten spezielle Pufferlösungen eingesetzt werden. Für PF4var1 wurden neu entwickelte Puffer eingesetzt. Derart aufgereinigte Proteine konnten in ESI-ToF-Experimenten erfolgreich unterschieden werden.

Durch die hier vorgestellten methodischen Fortschritte dürfte es in nächster Zeit möglich sein neue Erkenntnisse des Zusammenspiels zwischen PF4var1 und HIT zu erlangen.

Literaturverzeichnis

1. **Greinacher, Andreas; Althaus, Karina; Krauel, Krystin; Selleng, Sixten** Heparin-induced thrombocytopenia. *Hämostaseologie*. 2010, 30, 17-28.
2. **Greinacher, Andreas; Gopinadhan, Manesh; Günther, Jens-Uwe; Omer-Adam, Mahmoud A.; Strobel, Ulrike; Warkentin, Theodore E.; Papastavrou, Georg; Weitschies, Werner; Helm, Christiane A.** Close Approximation of Two Platelet Factor 4 Tetramers by Charge Neutralization Forms the Antigens Recognized by HIT Antibodies. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006, 26, 2386-2393.
3. **Poncz, Mortimer; Rauova, Lubica; Cines, Douglas B.** The Role of Surface PF4:Glycosaminoglycan Complexes in the Pathogenesis of Heparin-Induced Thrombocytopenia (HIT). *Journal of Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2006, 35 (1-2), 46-49.
4. **Prechel, M. Margaret; Jeske, Walter P.; Walenga, Jeanine M.** Physiological changes in membrane-expressed platelet factor 4: Implications in heparin-induced thrombocytopenia. *Thrombosis Research*. 2010, 125, 4, e143-e148.
5. **Green, Christopher J.; Charles, Robert St.; Edwards, Brian F.P.; Johnson, Paul H.** Identification and Characterization of PF4var1, a Human Gene Variant fo Platelet Factor 4. *Molecular and Cellular Biology*. 1989, 9 (4), 1445-1451.
6. **Eisman, Robin; Surrey, Saul; Ramachandran, Banumathi; Schwartz, Elias; Poncz, Mortimer** Structural and Functional Comparison of the Genes for Human Platelet Factor 4 and PF4alt. *Blood*. 1990, 76 (2), 336-344.
7. **Bikfalvi, Andreas** Platelet Factor 4: An Inhibitor of Angiogenesis. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*. 2004, 30 (3), 379-385.
8. **Kowalska, M. Anna; Rauova, Lubica; Poncz, Mortimer.** Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thrombosis Research*. 2010, 125, 292-296.
9. **Vandercappellen, Jo; Noppen, Samuel; Verbeke, Hannelien; Put, Willy; Conings, René; Gouwy, Mieke; Schutyser, Evemie; Proost, Paul; Sciot, Raf; Geboes, Karel; Opdenaker, Ghislain; Van Damme, Jo; Struyf, Sofie** Stimulation of angiostatic platelet factor-4 variant (CXCL4L1/PF-4var) versus inhibition of angiogenic granulocyte chemotactic protein-2 (CXCL6/GCP-2) in normal and tumoral mesenchymal cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007, 82, 1519-1530.
10. **Fiore, Martine M.; Kakkar, Vijay V.** Platelet factor 4 neutralizes heparan sulfate-enhanced antithrombin inactivation of factor Xa by preventing interaction(s) of enzyme with polysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003, 311, 71-76.
11. **Slungaard, Arne** Platelet factor 4: a chemokine enigma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005, 37, 1162-1167.
12. **Youssef, A.; Barkhan, P.** Release of Platelet Factor 4 by Adenosine Diphosphate and other Platelet-aggregating Agents. *British Medical Journal*. 1968, 1, 746-747.
13. **Niewiarowski, Stefan; Thomas, Duncan P.** Platelet Factor 4 and Adenosine Diphosphate Release during Human Platelet Aggregation. *Nature*. 1969, 222, 1269-1270.
14. **Hermodson, Mark; Schmer, Gottfried; Kurachi, Kotoku.** Isolation, Crystallization, and Primary Amino Acid Sequene of Human Platelet Factor 4. *The Journal of Biological Chemistry*. 1977, 252 (18), 6276-6279.

15. **Katz, I.R.; Thorbecke, G.J.; Bell, M.K.; Yin, J.-Z.; Clarke, D.; Zucker, M.B.** Protease-induced immunoregulatory activity of platelet factor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1986, 83, 3491-3495.
16. **Deuel, Thomas F.; Keim, Pamela S.; Farmer, Martha; Heinrikson, Robert L.** Amino acid sequence of human platelet factor 4. 1977, 74 (6), 2256-2258.
17. UniProtKB/SwissProt. [Online] 109, 2. März 2010. [Zitat vom: 11. April 2010.] <http://www.uniprot.org/uniprot/P02776>.
18. **Handin, Robert I.; Cohen, Howard J.** Purification and Binding Properties of Human Platelet Factor Four. *The Journal of Biological Chemistry*. 1976, 251 (14), 4273-4282.
19. **Osterman, David G.; Griffin, Gail L.; Senior, Robert M.; Kaiser, Emil Thomas; Deuel, Thomas F.** The carboxyl-terminal tridecapeptide of Platelet Factor 4 is a potent chemotactic agent for monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1982, 107 (1), 130-135.
20. **Lebeurier, Isabelle; Basara, Nada; Aïdoudi, Sallouha; Amrial, Jean; Caen, Jacques P.; Han, Zhong Chao** Carboxy-terminal peptides (C1-24 and C13-24 but not C1-13) of platelet factor 4 inhibit murine megakaryocytopoiesis, an activity which is neutralized by heparin. *British Journal of Haematology*. 1996, 92, 29-34.
21. **Morgan, Francis J.; Begg, Geoffrey S.; Chesterman, Colin N.** Complete Covalent Structure of Human Platelet Factor 4. *Thrombosis and Haemostasis*. 1980, 42, (5), 1652-1660.
22. **Deuel, Thomas F.; Senior, Robert M.; Chang, Donald; Griffin, Gail L.; Heinrikson, Robert L.; Kaiser, Emil Thomas** Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1981, 78 (7), 4584-4587.
23. **Senior, Robert M.; Griffin, Gail L.; Huang, Jung San; Walz, Daniel A.; Deuel, Thomas F.** Chemotactic Activity of Platelet Alpha Granule Proteins for Fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*. 1983, 96, 382-385.
24. **Petersen, Frank; Ludwig, Andreas; Flad, Hans-Dieter; Brandt, Ernst** TNF- α Renders Human Neutrophils Responsive to Platelet Factor 4 - Comparison of PF-4 and IL-8 Reveals Different Activity Profiles of the Two Chemokines. *The Journal of Immunology*. 1996, 156, 1954-1962.
25. **Thachil, Jecko** The prothrombotic potential of platelet factor 4. *European Journal of Internal Medicine*. 2010, 21, 79-83.
26. **Gupta, Shalley K.; Singh, Jai Pal** Inhibition of Endothelial Cell Proliferation by Platelet Factor-4 Involves a Unique Action on S Phase Progression. *The Journal of Cell Biology*. 1994, 127 (4), 1121-1127.
27. **Lasagni, Laura; Grepin, Renaud; Mazzinghi, Benedetta; Lazzeri, Elena; Meini, Claudia; Sagrinati, Costanza; Liotta, Francesco; Frosali, Francesca; Ronconi, Elisa; Alain-Courtois, Nathalie; Ballerini, Lara; Netti, Giuseppe Stefano; Maggi, Enrico; Annunziato, Francesco; Serio, Mario; Romagnani, Sergio; Bikfalvi, Andreas; Romagnani, Paola** PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. *Blood*. 2007, 109 (10), 4127-4134.
28. UniProtKB/SwissProt. [Online] 88, 2. März 2010. [Zitat vom: 11. April 2010.] <http://uniprot.org/uniprot/P10720>.

-
29. **Struyf, Sofie; Burdick, Marie D.; Proost, Paul; Van Damme, Jo; Strieter, Robert M.** Platelets Release CXCL4L1, a Nonallelic Variant of the Chemokine Platelet Factor-4/CXCL4 and Potent Inhibitor of Angiogenesis. *Circulation Research*. 2004, 95, 855-857.
30. **Struyf, Sofie; Burdick, Marie D.; Peeters, Elke; Van den Broeck, Karolien; Dillen, Chris; Proost, Paul; Van Damme, Jo; Strieter, Robert M. et al., et al.** Platelet Factor-4 Variant Chemokine CXCL4L1 Inhibits Melanoma and Lung Carcinoma Growth and Metastasis by Preventing Angiogenesis. *Cancer Research*. 2007, 67 (12), 5940-5948.
31. **Denton, Jeffrey; Lane, David A.; Thunberg, Lennart; Slater Angela M.; Lindahl, Ulf** Binding of platelet factor 4 to heparin oligosaccharides. *The Biochemical Journal*. 1983, 209 (2), 455-460.
32. **Visentin, Gian Paolo** Heparin-Induced Thrombocytopenia: Molecular Pathogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*. 1999, 82 (2), 448-456.
33. **Greinacher, Andreas; Pötzsch, B.; Amiral, J.; Dummel, V.; Eichner, A.; Mueller-Eckhardt, C.** Heparin-Associated Thrombocytopenia: Isolation of the Antibody and Characterization of a Multimolecular PF4-Heparin Complex as the Major Antigen. *Thrombosis and Haemostasis*. 1994, 71 (2), 247-251.
34. **Ziporen, L.; Li, Z.Q.; Park, K.S.; Sabnekar, P.; Liu, W.Y.; Arepally, G.; Shoenfeld, Y.; Kieber-Emmons, T.; Cines, D.B.; Poncz, M.** Defining an Antigenic Epitope on Platelet Factor 4 Associated With Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Blood*. 1998, 92 (9), 3250-3259.
35. **Graham, F.L.; Smiley, J.; Russell, W.C.; Nairn, R.** Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*. 1977, 36, 59-72.
36. **Young, Janet M.; Cheadle, Christopher; Foulke Jr, James S.; Drohan, William N.; Sarver, Nava** Utilization of an Epstein-Barr virus replicon as a eukaryotic expression vector. *Gene*. 1988, 62 (2), 171-185.
37. **Greiner, Bio-One** Instruction Manual miniPERM. 2005.
38. **Bradford, Marion M.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72, 248-254.
39. **RocheDiagnosticsGmbH.** Asserachrom PF4.
40. **Belin, Virginie; Rousselle, Patricia** Production of a recombinantly expressed laminin fragment by HEK293-EBNA cells cultured in suspension in a dialysis-based bioreactor. *Protein Expression and Purification*. 2006, 48 (1), 43-48.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Andreas Greinacher für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung während der Arbeit bedanken. Für Fragen und Anregungen hinsichtlich des Themas war er ein guter Ansprechpartner.

Darüber hinaus gilt mein Dank Professor Paola Romagnani, ohne deren freundliches Überlassen der Zelllinien EBNA 293-PF4 C-1D, V1-B4 und Mock eine Bearbeitung des Themas nicht möglich gewesen wäre.

Großer Dank gilt besonders Birgitt Fürll, die mich in die Geheimnisse der Labortätigkeiten einweihte. Sie hat mich während Arbeiten an den EBNA-Zelllinien und auch danach stets gut betreut und mir die Vielfältigkeit wissenschaftlicher Arbeiten näher gebracht. Sie hatte aber auch immer ein offenes Ohr, wenn es um die Erstellung schriftlicher Produkte der Versuche ging.

Mein Dank gilt auch der Firma ChromaTec GmbH, Greifswald. Dr. Holger Hippe sind die Aufreinigungen der Proteine zu verdanken. Jens Hoppen wies mich in den Umgang mit den *E. coli* ein und bewies große Geduld mit mir in der Herstellung rekombinanter DNA.

Ein sehr großer Dank geht an meine Familie. Sie hat mir vor allem während der letzten Phase der Arbeit immer wieder mit Rat und Tat zur Seite gestanden und kritische Anmerkungen hinsichtlich des Textverständnisses gestellt.