

Eva Veronika Ullisch
Dr. med.

Charakterisierung der Sekretion von Drosophila Vitellogenin in transfizierten PC12 Zellen

Geboren am 20.11.1971 in Eckernförde
Reifeprüfung im Aug./Sept. 1990 in Apenrade, Dänemark
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1991 bis WS 1998/1999
Physikum am 11.04.1993 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Zürich, Stockholm und Heidelberg
Staatsexamen am 28.04.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Felix Wieland

Neunzehn PC12 Zellklone, die mit einem durch Mutagenese veränderten Drosophila Vitellogenin stabil transfiziert waren, wurden zunächst durch Immunfluoreszenz mit einem polyklonalen und einem monoklonalen Anti-Vitellogenin-Antikörper charakterisiert.

7 Zellklone, bei denen in der Immunfluoreszenz die Expression von Drosophila Vitellogenin nachgewiesen werden konnte, wurden durch metabolische Markierung mit radioaktivem (³⁵S)Sulfat und Autoradiographie biochemisch charakterisiert. Dabei wurde das Vitellogenin auch mit dem polyklonalen anti-Vitellogenin-Antikörper immunpräzipitiert. Eine Präzipitation mit dem monoklonalen anti-Vitellogenin-Antikörper IIIA3D8 war (auch unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen) nicht möglich.

Um zu testen, ob das Vitellogenin in den PC12 Zellklonen konstitutiv, also unreguliert, sezerniert wird, wurde am Beispiel des Zellklones c4 ein "pulse chase"-Experiment durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß der überwiegende Anteil des Vitellogenin konstitutiv freigesetzt wird.

Obwohl die Darstellung des von den PC12 Zellklonen exprimierten Vitellogenin durch Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper nicht möglich war und das synthetisierte Vitellogenin durch den monoklonalen Antikörper nicht immunpräzipitiert werden konnte, wurde die mRNA, die für den monoklonalen Antikörper IIIA3D8 kodiert, aus den entsprechenden Hybridomzellen isoliert und durch Agarose-Gelelektrophorese (Färbung des Gels durch Ethidiumbromid) und durch in vitro-Translation charakterisiert. Die RNA war nicht degradiert und die anschließend isolierte mRNA wurde in vitro translatiert, so daß sie für die nachfolgenden Mikroinjektions-experimente verwendet werden konnte.

Bei einem ersten Mitroinjektionsexperiment, das von Björn Oback im Institut für Neurobiologie, Heidelberg, durchgeführt wurde, wurde kein Immunaggregat aus dem Vitellogenin und einem dagegen gerichteten monoklonalen Antikörper erzielt.

Diese Arbeit ist ein kleiner Schritt auf dem Weg dahin, den Mechanismus der Sortierung sekretorischer Proteine im Trans-Golgi Netzwerk und der Bildung sekretorischer Granula zu verstehen.