

Aus dem Institut für Humangenetik
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: **Prof. Dr. Eckart Meese**

Nachweis von Potein- Protein- Interaktionen des Intersectin 2- Proteins unter Verwendung des Yeast- Two- Hybrid Systems

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2009**

unter Leitung von
Prof. Dr. Cornelius Welter

vorgelegt von: **Andreas Neisius**
geb.: am 22.04.1978 in Merzig

**Meinen Eltern
und
meiner geliebten Frau Yvonne
gewidmet.**

I. ZUSAMMENFASSUNG	1
II. EINLEITUNG.....	7
1. Intersectin 1 und Intersectin 2	7
1.1 Allgemeine Klassifikation	7
1.2 Biologie und Funktion Intersectin 1	8
1.3 Biologie und Funktion Intersectin 2	8
2. Das Yeast- Two- Hybrid System	12
2.1 Übersicht	12
2.2 Prinzip und Anwendung des YTH- Systems	12
3. Ziele dieser Arbeit	15
III. Material und Methoden	16
A. Anwendung des Yeast- Two- Hybrid Systems.....	16
1. Hefestämme für das Matchmaker GAL4 YTH- System 3	16
2. Puffer und Stammlösungen für YTH- System	17
3. Hefe- Kultivierung	18
3.1 Kultur in Flüssigmedium	18
3.2 Kulturen auf Festmedium	18
3.3 Hefe- Glyzerolkulturen	18
4. Shuttle- Plasmide	19
4.1: pGADT7:	20
4.2: pGBKT7	21
4.3: pACT2	22
5. Hefe- Transformation	23
6. α - und β - Galaktosidase- Filter- Assay	24
7. Isolation von Plasmid- DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
8. Mating (des BD- und AD- Vektors)	26
9. Proteinisolierung und –nachweis	28
9.1 Methodenübersicht	28
9.1.1 Proteinisolierung aus Hefezellen	29
9.1.2 SDS- PAGE	30
9.1.3 Western Blot	31
9.1.4 Detektion	32
9.1.5 Proteinnachweis	32
9.2 Kultivierung von HEK- Zellen	33
9.2.1 Prinzip der Methode	33
9.2.2 Durchführung	35
9.3 Transfektion von HEK- Zellen	36
9.3.2 Durchführung	37
9.4 Immunpräzipitation	37
9.4.1 Prinzip der Methode	37
9.4.2 Durchführung	38
9.5 Methodenübersicht	39

B: Allgemeine Methoden der DNA- Klonierung	40
1. Bakterienstämme	40
2. Reagenzien	40
2.1 Puffer und Stammlösungen	40
2.2 Antibiotika- Stammlösungen	42
3. Bakterien- Medien	42
3.1 Festmedien	42
3.1.1 Kultur auf Festmedium	43
3.2 Flüssigmedien	43
3.2.1 Kultur in Flüssigmedium	44
3.2.2 Messen der Zelldichte	44
3.2.3 Anlegen einer E. coli- Glyzerinkultur	44
4. Vektoren	45
4.1 pCR4.0- Vektor	45
5. Agarose- Gelelektrophorese	45
6. Färbung und Auswertung von DNA- Agarosegelen	47
7. Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarose- Gelen	47
8. DNA- Fällung (Natriumacetat / Ethanol-Methode)	48
9. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI)- Extraktion	49
10. Präparation und Reinigung von Plasmid- DNA	50
11. DNA- Restriktion	52
12. Dephosphorylierung	53
13. Ligation	54
14. Transformation von E. coli	54
15. Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)	55
15.1 PCR- Ansatz bei Gebrauch der Taq- Polymerase von Pharmacia	56
16. DNA- Sequenzierung	57
16.1 Sequenzierung	58
C: Konstruktion der Intersectin 2- cDNA	59
1. Isolation von Gesamt- RNA aus HEL- Zellen und humanem Gewebe	59
2. Formaldehyd- RNA- Agarose- Gel	60
3. cDNA- Synthese aus Gesamt- RNA	61
4. Amplifikation der cDNA mit der PCR- Methode	62
5. Klonierung in den TOPO®- Kloning- Vektor	62
6. Präparation und Reinigung der Plasmid- DNA	63
7. Restriktionsverdau u. Ligation von DNA und BD- Vektor	63
8. Transformation in E. coli (TOP10)	63
9. Plasmidreinigung	63
IV. ERGEBNISSE	64
A: Konstruktion der ITSN 2- DNA und des ITSN 2- Bindungsdomänevektors	64
1. Übersicht	64

2.	Die Konstruktion der ITSN 2- cDNA und des ITSN 2- BD- Vektors.....	64
2.1	Isolation von Gesamt- RNA aus HEL- Zellen.....	65
2.2	cDNA- Synthese aus Gesamt- RNA.....	65
2.3	Amplifikation der cDNA mit der PCR- Methode.....	65
2.4	Klonierung in den Topo- Kloning- Vektor und Sequenzüberprüfung ...	66
2.5	Sequenzierung der Klone.....	67
2.6	Restriktion des pGBKT7- Vektors und des Intersectin 2- Topo- Cloning- Vektors mit Eco RI und Nco I und Ligation.....	68

B: Anwendung des Yeast- Two- Hybrid- Systems 71

1.	Übersicht.....	71
2.	Die fetal brain spezifische cDNA- Bank.....	72
3.	Verifikation des Phänotyps der im YTH- System verwendeten Stämme.....	73
4.	Nachweis der Interaktion zwischen p 53 und SV40Tag (Positivkontrolle) ..	74
5.	Tests auf regelrechte Funktion der transformierten Vektoren.....	77
5.1	Testen des DNA- BD- Proteins auf toxische Effekte.....	77
5.2	Testen des DNA- BD- Proteins auf Tanskriptionelle Aktivierung.....	78
5.3	Testen des DNA- BD/Bait- Proteins bezüglich der Mating Effizienz.....	79
5.4	Testen der eigentlichen Proteinherstellung mittels Western Blot.....	79
6.	Suche von Interaktionspartnern des ITSN 2- Proteins in der spezifischen cDNA- Bank.....	79
6.1	Mating des Bait- Plasmids mit der cDNA- Bank.....	79
6.2	Identifizierung der gefundenen Interaktionspartner.....	82
6.3	Analyse und Verifizierung der detektierten Interaktionspartner.....	82
6.4	Vektortausch und Re- Cotransformation.....	85
6.5	Entschlüsselung der Interaktionspartner.....	87

C: Nachweis der Protein- Protein- Interaktion in vivo 89

1.	Immunpräzipitation.....	89
----	-------------------------	----

V. Diskussion 92

A: Anwendung des Yeast- Two- Hybrid Systems 92

1.	Allgemeine Übersicht.....	92
2.	Suche von potentiellen Interaktionspartnern von ITSN 2 in einer prätransformierten cDNA- Bank.....	93
2.1	Übersicht.....	93
2.2	Unspezifische Expression von Reporter genen.....	94
2.3	Mating des Bait- Plasmids mit der prätransformierten cDNA- Bank.....	95
2.4	Aktivität der Reporter gene Mel1 und lacZ.....	96

2.5	Potentielle Ursachen für die Detektion von falsch positiven Klonen...	97
2.6	Potentielle Ursachen für die Detektion von falsch negativen Klonen ..	98
2.7	Potentielle Fehlerquellen im Rahmen des Matings	99
3.	Konklusion für das Screening einer prätransformierten cDNA- Bank mit dem Yeast- Two- Hybrid System	99
B:	In vivo Nachweis von Protein- Protein- Interaktionen	100
1.	Immunpräzipitation	100
C:	In vivo nachgewiesener Bindungspartner Spektrin	101
VI.	Literaturverzeichnis	105
VII.	Abkürzungsverzeichnis	116
VIII.	Publikationen / Danksagung	119
IX.	Lebenslauf	120

I. ZUSAMMENFASSUNG

Das in dieser Dissertation untersuchte Intersectin 2- Protein gehört zu einer multimodularen Proteinfamilie, die im Bereich der Endocytose eine tragende Rolle spielt. Bisher sind ca. 20 solcher Proteine bekannt. Intersectin 2 gehört ebenso wie Intersectin 1 zu den gerüstbildenden Proteinen des Actinskeletts (im englischen werden diese Proteine als „scaffolding“ Proteine bezeichnet). Intersectin 2 ist der Hauptmediator in der Clathrin- vermittelten Endocytose. Die Clathrin- abhängige Endocytose ist der Mechanismus, durch den Proteine und Membranlipide Zugang ins Zellinnere erhalten.

Das Intersectin 2 Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert, es werden hauptsächlich drei verschieden lange (6,5, 8 und 10 kb) Isoformen durch alternatives Splicen exprimiert. Das Protein besteht aus zwei EH (Eps15 homology)- Domänen und fünf SH3 (Src homology 3)- Domänen. Dazwischen liegt eine so genannte coiled- coil Region; am Carboxyterminus, welcher bei der kurzen Isoform fehlt, wird das Protein durch eine PH (pleckstrin homology)- Domäne, eine DH (Db1homology)- Domäne und eine C2- Domäne, dies ist eine Calcium bindende Domäne, ergänzt. Diese verschiedenen Domänen sind für die Interaktionen mit anderen Proteinen verantwortlich.

Bis jetzt wurden nur wenige Funktionen bzw. Interaktionen von Intersectin 2 gefunden. Die Arbeitsgruppe von Pucharos et al. konnte nachweisen, dass eine Überexpression von Intersectin 2 die Transferrinaufnahme hemmt. McGavin et al. haben gezeigt, dass ein Teil der Intersectin 2- DNA, welcher bei der Isolierung von SH3- Domänen als SH3P18 identifiziert wurde, als WASP interacting Protein bezeichnet wird. WASP steht für Wiskott- Aldrich Syndrom Protein und ist das Produkt eines Gens, das bei Kindern mit Wiskott- Aldrich Syndrom mutiert ist. Die T- Zell- Antigenrezeptor (TCR) induzierte Endocytose wird durch das Wiskott- Aldrich Syndrom Protein reguliert. Des Weiteren wurde von der Arbeitsgruppe um Nishimura et al. die Rolle von Intersectin (2 Splicevarianten von Intersectin 1) in der Entwicklung des Zentralnervensystems hervorgehoben. Es spielt als Interaktionspartner des Proteins Numb im Bereich der kortikalen Neurogenese eine wichtige Rolle, indem es die Guanin- Nucleotid- Exchange Faktor (GEF)- Aktivität der kurzen und langen Splicevariante von Intersectin 1 gegenüber Cdc42 (cell division cycle 42) in vivo erhöht. Diese Aktivitätserhöhung von GEF gegenüber Cdc42 wurde ebenfalls für die lange Isoform von Intersectin 2 beschrieben. Von Lim et al. wurde sowohl in vitro als auch

in vivo eine Protein- Protein- Interaktion zwischen Intersectin 2 und dem humanen Herpesvirus Typ 8 (HHV8), welches mit der Entstehung des Kaposi Sarkoms assoziiert ist, nachgewiesen. Aus der eigenen Arbeitsgruppe (Seifert et al.) wurden erst kürzlich einige minor Splicevarianten veröffentlicht, im Speziellen eine Variante, die das Exon 16 beinhaltet (ITSN2C). Entsprechende Expressionsstudien zeigten eine Hirngewebsspezifität für diese Variante.

Um weitere Wechselwirkungen und Funktionen des Intersectin 2- Proteins herauszufinden, wird in dieser Arbeit das Yeast- Two- Hybrid System benutzt. Hiermit können Protein- Protein- Interaktionen auf eukaryontischer Ebene nachgewiesen werden. Dieser Interaktionsnachweis erfolgt in einer kommerziell erhältlichen menschlichen cDNA- Bank des Matchmaker Yeast- Two- Hybrid Systems, in dem Intersectin 2 in den Bindungsdomänevektor eingesetzt wird, die cDNA- Bank befindet sich im Aktivierungsdomänevektor.

Auf diese Art und Weise werden schon mehr als 60 Klone als Bindungspartner identifiziert, von denen nach mehreren Kontrollexperimenten (α - und β - Galaktosidase-Assays, Vektortausch, etc.) noch 9 potentielle Bindungspartner übrig bleiben.

Mit Hilfe eines weiteren Testverfahrens, der Immunpräzipitation, wurde initial einer der 9 potentiellen Bindungspartner in vivo weiter untersucht.

Hierbei ließ sich Spektrin als Bindungspartner von Intersectin 2 in vivo nachweisen. Spektrin ist ein Makromolekül, welches aus langen Polypeptidketten mit bis zu 240 kDa aufgebaut ist. Es ist ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts von Erythrozyten, in diesem Zusammenhang wurde Spektrin auch erstmals beschrieben. Mittlerweile ist bekannt, dass Spektrin und Ankyrin eine wichtige Rolle in verschiedenen Zelltypen spielen, sie sind z.B. für die Funktion von Ionenkanal- und Zell- Adhäsionsmolekülen mitverantwortlich. Spectrin und Ankyrin werden ebenfalls wie Intersectin 2 zur Gruppe der „Scaffolding“ Proteine gezählt, sie spielen eine wichtige Rolle in der Organisation und Verfestigung der Plasmamembran von vielen Zelltypen.

Sowohl die Bindung von Spektrin via Ankyrin zu Band 3, und die Selbstassociation von Spektrin α - und β - Heterodimere, um schließlich aus diesen Tetramere zu formen, sind fundamental wichtig für die Stabilität der Erythrozytenmembran.

Kommt es zu einer Störung dieser Wechselwirkung, d.h. zu einem Verlust der Bindung, können hieraus mehrere erbliche Erkrankungen, wie z.B. die hereditäre Sphärozytose oder Elliptozytose, resultieren.

Spektrin scheint ebenfalls für die Genese neurologischer Erkrankungen verantwortlich zu sein. Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 5 (SCA5), als dominant vererbte progressive neurodegenerative Erkrankung, wird auf eine Mutation im β 3- Spektrin zurückgeführt. In der Literatur sind bereits mehrere Bindungspartner von Spektrin, wie die oben erwähnte Ankyrin- Spektrin- Wechselwirkung oder die Bindung zur Protein 4.1- Familie beschrieben, durch deren Ausfall es zu verschiedenen Membrandefekten der Erythrozyten (z.B. hämolytische Anämie durch Fehlfunktion der Spektrin- Protein 4.1- Bindung) kommen kann.

Der Spektrin- Ankyrin- Komplex spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im axonalen Anfangsbeich von Neuronen und im Bereich des Ranvier' schen Schnürrings; ein spannungsabhängiger Na^+ - Kanal bindet unter anderem an Ankyrin- G, β 4- Spektrin und Neurofascin, eine Störung dieser Wechselwirkung führt zur Unfähigkeit Aktionspotentiale zu generieren und unter anderem zu schwerer Ataxie.

Darüber hinaus wurde kürzlich eine Rolle von Spektrin bei malignen Erkrankungen nachgewiesen. Es wurden Spektrin Mutationen bei Brustkrebs und kolorektalen Karzinomen nachgewiesen und erhöhte hepatozelluläre Krebsraten in β 2- Spektrin- defizienten Mäusen beschrieben.

Inwieweit die Bindung zwischen Intersectin 2 und Spektrin bei diesen Krankheitsbildern eine Rolle spielt, bleibt weiterhin zu klären. Aufgrund der hohen Aktivität von Intersectin 2 im Aufbau des Zytoskeletts, gerade im Zusammenhang mit der Clathrin- vermittelten Endocytose, ist allerdings davon auszugehen, dass es für die Funktion und die Stabilität von Erythrozyten und wahrscheinlich auch diverser anderer Zellen essentiell ist.

Summary

Using the Matchmaker Two- Hybrid System to detect Protein- Protein- Interactions of the Human Endocytic Regulator Protein Intersectin 2

The human intersectin 2 as well as the human intersectin 1 (ITSN 2 and ITSN 1) are members of multimodular highly conserved protein family involved in clathrin- mediated endocytosis. Up to now, more than 20 proteins have been identified to participate in the molecular machinery of clathrin- mediated endocytosis. Intersectin 2 is one of the scaffolding proteins of the cytoskeleton of the human cell. Clathrin- mediated endocytosis is an multistep process to internalize proteins and membranlipids as receptor- ligand complexes or synaptic vesicle recycling in neurons in the cell.

Human intersectin 2 is localised on chromosome 2, expressing three major transcripts, a long isoform with 10 kb and two short isoforms with 8,5 and 6 kb, the long isoform corresponding to the 6 and 8,5 kb isoforms. Isolation and sequencing of the human intersectin 2 cDNA demonstrate the three major isoforms being produced by alternative splicing. The intersectin 2 Protein isoforms contain two EH (Eps15 homology)- domains and five SH3 (Src homology 3)- domains. In between there is a coiled- coil domain localised. The COOH- terminal segment of the long isoforms, which is lacking the short isoform, is composed of a DH (Db1 homology)- domain, a PH (pleckstrin homology)- domain and a C2 domain. These different domains appear responsible for different interactions to other proteins.

Whereas most analyses so far focused on intersectin 1, only little is known about intersectin 2. McGavin et al. showed, that intersectin 2 links the Wiskott- Aldrich Syndrom Protein (WASp)- mediated actin polymerization to the T- Cell Antigen Receptor endocytosis. Moreover Nishimura et al. underlined the important role of intersectin 1 as Cdc42 (cell division cycle 42) guanine nucleotide exchange factor (GEF) interacting with the protein numb, which specifically localizes to dendritic spines in cultured hippocampal neurons and is implicated in dendritic spine morphogenesis. Numb enhanced the GEF activity of intersectin 1 toward Cdc42 in vivo. Like intersectin 1, the long isoform of intersectin 2 (ITSN 2- L) exhibits GEF activity, activates Cdc42 and associates with WASp in T- cells.

Recently, Lim et al. showed an interaction between intersectin 2 and the K15 Pro-

tein of Kaposi's Sarcoma- associated Herpes Virus, also known as human herpes virus 8 (HHV 8). Around the same time minor splice variants have been published by our own group around Seifert et al.. Mainly important the different expression of one minor splice variant including exon 16 (ITSN2C) in normal human brain.

Investigating more protein- protein interactions and functions of intersectin 2 we use the Matchmaker Two- Hybrid System. Using a pretransformed human cDNA bank initially more than 60 clones were traced as potential binding partners. After several further control tests (α - und β - Galaktosidase- Assays, changing of the activating and binding vector) finally 9 potential binding partners have been revealed.

After sequencing, 1 of the 9 potential binding partners was procured to co-immunoprecipitation for in vivo experiments. At least spectrin has been proven as binding partner of intersectin 2.

Spectrin is a macromolecule with the size up to 240 kDa. New insights into the cell biology of ankyrin and spectrin reveal that these proteins actively participate in assembly of specialized membrane domains in addition to their conventional maintenance role as scaffolding proteins. The binding of spectrin via ankyrin to band 3 and the self- association of spectrin to form tetramers and larger oligomers are processes crucial to the overall stability of the red cell membrane. Disorders, involving the self- association process of spectrin manifest as elliptocytic and pyropoikilocytic disorders. In correlation to the phenotype, this means spherocytosis versus elliptocytosis. Some binding partners of spectrin have been described in the literature, as the spectrin- ankyrin binding to band 3 mentioned above, also the linkage between the protein 4.1 family and spectrin- actin binding domains. Any deficit in this binding can cause different membrane defects like haemolysis. Recently described inherited human diseases due to defects in spectrin or ankyrin include spinocerebellar ataxia type 5 and cardiac arrhythmia (loss- of- function mutations of ankyrin- B), termed sick sinus syndrome with bradycardia or ankyrin- b syndrom. Moreover roles in malignancies are suggested by identification of spectrin mutations in breast and colorectal cancers and the finding of increased hepatocellular cancer in β 2- spectrin- deficient mice. An ankyrin- spectrin pathway also operates at axon initial segments in neurons binding with a voltage- gated Na^+ - channel, where action potentials are generated, and nodes of Ranvier, where action potentials are propagated.

The role of the spectrin- intersectin 2 binding in these disorders is suggested. Regarding the high activity in scaffolding and the dominant function in the molecular

I. ZUSAMMENFASSUNG

machinery of clathrin- mediated endocytosis it can be assumed that intersectin 2 plays a determining role in functionality and stability of erythrocytes.

II. EINLEITUNG

1. Intersectin 1 und Intersectin 2

1.1 Allgemeine Klassifikation

Die menschlichen Intersectine 1 (ITSN 1) und 2 (ITSN 2) sind sogenannte multimodulare Proteine. Im Englischen werden sie als *scaffolding* Proteine bezeichnet. Sie regulieren den Endocytoseprozess; scaffolding bedeutet übersetzt soviel wie unterstützend, gerüstbildend. Sie sind beteiligt am Aufbau des Aktinskeletts.

Die Intersectine sind Mitglieder einer stark konservierten Proteinfamilie, die unter anderem bei der Clathrin- vermittelten Endocytose eine große Rolle spielen. Diese Funktion ist vor allem auf die Eps15 homology (EH)- Domäne zurückzuführen, da Proteine, die eine solche Domäne enthalten, eine führende Rolle in der Clathrin- abhängigen Endocytose haben. Bis jetzt sind mehr als 20 solcher Proteine identifiziert worden. Die Clathrin- abhängige Endocytose ist der Hauptmechanismus, durch den Proteine und Membranlipide Zugang ins Zellinnere erhalten.

Die Endocytose ist eine sehr wichtige Zellfunktion. Sie ist ein physiologisch regulierter Prozess, bei dem extrazelluläre Faktoren, wie z.B. Nährstoffe, Giftstoffe, Peptide und Pathogene von der Zelloberfläche in die Zelle aufgenommen werden. Hierbei invaginiert die Plasmamembran und es bilden sich abgeschnürte Vesikel mit den Stoffen von der Zelloberfläche. Die Vesikel bestehen zum Teil aus Clathrin und bei der Abschnürung werden Dynamin und Intersectin gebunden. Die abgeschnürten Vesikel werden von der Plasmamembran abgelöst und dann ins Zellinnere transportiert. Danach findet die Verarbeitung statt. Die Endocytose spielt auch eine große Rolle bei der Signaltransduktion.

Bei beiden menschlichen Intersectinen werden zwei kurze und eine lange Isoform mit unterschiedlichen Proteindomänen beschrieben.

1.2 Biologie und Funktion Intersectin 1

Intersectin 1 ist ein Protein, das in menschlichen Zellen [24, 42, 44], bei Ratten (genannt ESH1 [41, 44], Mäusen (genannt ESE1 [44, 48], *Xenopus laevis* [44, 58] und *Drosophila melanogaster* (genannt Dap160 [44, 45]) identifiziert wurde. In menschlichen Zellen existieren drei Hauptisoformen mit näherungsweise 15, 6 und 4,5 kb Länge. Die beiden Kurzen haben zwei Eps15 homology (EH)- Domänen, eine zentrale coiled-coil Region und fünf Src homology 3 (SH3)- Domänen. Die lange Isoform besteht noch aus einem verlängerten Carboxy- Ende, welches sich aus einer DH (Db1homology)-, einer PH (pleckstrin homology)- und einer C2- Domäne zusammensetzt [24, 42, 44]. Intersectin bindet mehrere Endocytose- relevante Proteine. Die EH- Domänen zum Beispiel binden Epsine [44, 48, 58] und Scamp1 [14, 44], die coiled-coil Region bindet mit Eps15 und Eps15R [44, 48] und mit den Endocytose- relevanten Proteinen SNAP23 und SNAP25 [41, 44]. Die SH3- Domänen interagieren mit Dynamin [41, 44, 48, 58] und Synaptojanin [41, 44, 58]. Außerdem spielt Intersectin 1 noch eine große Rolle bei der Signaltransduktion der Zelle, da es mit dem Ras- Austauschfaktor mSos1 [44, 56] interagiert.

1.3 Biologie und Funktion Intersectin 2

Intersectin 2 besitzt eine große Ähnlichkeit zu Intersectin 1. Es wurde anfänglich in menschlichen Zellen und Mäusezellen nachgewiesen [43, 44, 48], mittlerweile auch in Zelllinien von Hunden, Schimpansen und Ratten [64]. Das Intersectin 2 Gen besteht aus mindestens 41 Exons und umfasst einen Bereich von ca. 157 kb. Es ist auf Chromosom 2 lokalisiert und wird in drei Isoformen exprimiert, die durch alternatives Splicen entstehen. Die cDNA der beiden kurzen Isoformen sind 6,5 und 8 kb, die der langen ist 10 kb groß.

Intersectin 2 besitzt ähnliche Domänen wie Intersectin 1. N- terminal befinden sich zwei EH- Domänen (Aminosäuren 13- 108 und 237- 331). Die Homologie zu Intersectin1 beträgt in diesem Bereich: EH1 87,1% und EH2 72,6%. Untersucht man diese Aminosäuresequenz mit Hilfe des SMART (Simple Modular Analysis research tool), so findet man im Bereich der EH- Domänen auch so genannte EF- Hand Moti-

ve. Diese Motive sind Calcium bindend, wobei die Calciumbindung an die EH- Domänen bisher funktionell nicht erklärbar ist.

Die darauf folgende coiled- coil Region hat eine geringe Homologie. Sie besteht hauptsächlich aus Glutaminsäure (18.9%), Lysin (15%), Leucin (14.5%), Glutamin(11.3%) und Arginin (9.3%). Der zentrale Bereich besteht aus fünf SH3 Gruppen (A-E). Die kurze Isoform endet nach der letzten SH3- Gruppe (Abb.1). Der Carboxy-Terminus der langen Form besteht wie bei Intersectin 1 aus drei Domänen. Die erste Domäne von Aminosäure 1212- 1399 ist eine DH- Domäne. Diese wirkt üblicherweise als katalytische Region von Guanin- Nucleotid- Exchange- Faktoren (GEF's) für Rho- like GTPasen. Danach folgt eine PH- Domäne, ähnlich wie bei anderen Proteinen mit DH- Domäne (85,4% Homology zu Intersectin 1). Die letzte Domäne ist Calcium bindend und ist auch von anderen Proteinen bekannt. Diese ist wahrscheinlich an der Interaktion mit Membranen beteiligt.



Abb.1: Schematische Darstellung des Intersectin 2 Proteins (aus Lim et al 2007)

Ein Teil der Intersectin 2 cDNA wurde bei der Isolierung von SH3- Domänen als Klon SH3P18 isoliert, der laut Gendatenbankeintrag als WASP interacting Protein bezeichnet wird (AF001630). WASP steht für Wiskott- Aldrich Syndrom Protein und ist das Produkt eines Gens, das bei Kindern mit Wiskott- Aldrich Syndrom mutiert ist. Es ist ein hauptsächlich cytoplasmatisches Protein und wird nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert.

Mary K.H. McGavin et al. [36] haben gezeigt, dass die T- Zell Antigen Rezeptor (TCR) induzierte Endocytose vom Wiskott- Aldrich Syndrom Protein reguliert wird. Es bindet an cdc Rho42 GTPase, an die zytoplasmatische Tyrosinkinase Fyn und an die Adaptor- Proteine Nck und Grb2. Es scheint, als würde Intersectin 2 gemeinsam mit WASP und cdc42 die Clathrin- induzierte Endocytose mit der WASP- abhängigen Aktin- Polymerisation des Zytoskeletts verknüpfen. Außerdem hat es einen Ein-

fluss auf die TCR- induzierte Endocytose. Man nimmt an, dass die Anzahl der T- Zell- Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch Endocytose reguliert wird. Eine Invagination von Rezeptoren führt zu einer Verringerung der Gesamtzahl aktiver Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die Zelle reagiert dann abgeschwächt auf Antigenreize.

Die Arbeitsgruppe um Nishimura et al. [39] hob die Rolle von Intersectin 1 in der Entwicklung des Zentralnervensystems hervor. Hier gehen die Splicevarianten (lange und kurze Isoform) von Intersectin 1 direkte Wechselwirkungen mit dem Protein *Numb* ein. Dieses Protein kommt im Bereich der kortikalen Neurogenese während der Entwicklung des Nervensystems vor; im Speziellen hat es ebenfalls eine Funktion im Clathrin- vermittelten Endocytoseprozess. Durch die Wechselwirkung mit Intersectin wird die Bildung der dendritischen Dorne, vor allem im Bereich des Hippocampus beeinflusst. *Numb* steigert die Guanin- Nucleotid- Exchange- Faktor (GEF) Aktivität von Intersectin zu Cdc42 in vivo [39]. *Numb* formt zusammen mit Intersectin ein Komplex mit dem EphB2- Rezeptor und den NMDA (N- methyl-d-aspartate)- Typ Glutamatrezeptoren im Bereich der Postsynapse, so dass man davon ausgehen muss, dass dieser Komplex in der synaptischen Entwicklung eine gewichtige Rolle spielt. Ebenso wie für Intersectin 1 wird eine vermehrte Aktivierung von Cdc42 durch die gesteigerte Aktivität von GEF für die lange Isoform von Intersectin 2 beschrieben [26,47].

Weiterhin ist bekannt, dass Intersectin 2 Protein- Protein- Interaktionen mit dem Kaposi Sarkom assoziierten Herpesvirus (KHSV), welches auch als humanes Herpesvirus Typ 8 (HHV8) bekannt ist, eingeht. Dies wurde von Lim et al. [33] in vitro und in vivo nachgewiesen. Es handelt sich um eine spezifische Bindung mit einer der fünf SH3- Domänen. HHV 8 kann bei verschiedenen Krebsarten nachgewiesen werden, u. a. bei dem Kaposi Sarkom, bei dem primären Effusionslymphom (PEL aus der Gruppe der B- Zell Lymphome) und der multicentrischen Castleman Krankheit (MCD aus der Gruppe der B- Zell Lymphome). Das HHV 8- Genom kodiert ein bestimmtes Protein, das K15. Dieses Protein besitzt einen Carboxy- Terminus, welcher die Bindung zu bestimmten Interaktionsdomänen ermöglicht (z.B. zu SH2- oder SH3- Gruppen). K15 ist unter anderem für die Downregulierung der B- Zell- Rezeptoren verantwortlich und scheint somit eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der viralen Latenz zu sein, bzw. es scheint dadurch infizierte B- Zellen vor der Apoptose zu bewahren. Es konnte nachgewiesen werden, dass K15 und ITSN 2 in der B- Zelle kolo- kalisiert sind. Damit scheint K15 ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulierung des

endocytotischen Systems zuzukommen. Lim et al. konnten überdies nachweisen, dass es in Zellen mit einer Überexpression von ITSN 2 zu einer Inhibition der B- Zell Rezeptor- Internalisierung kam. Einen ähnlichen Mechanismus zeigen Publikationen, in denen nachgewiesen wurde, dass ITSN 2 den Transferrin- Uptake hemmen kann [43] und dass eine Überexpression von ITSN- SH3- Domänen die Endocytose inhibiert [33, 50].

Die meisten veröffentlichten Daten beziehen sich auf die wichtigen, so genannten „major“ Splicevarianten. Über die so genannten „minor“ Splicevarianten liegen bis jetzt noch wenige Informationen vor. Aus unserer Arbeitsgruppe (Seifert et al 2007) [47] wurde kürzlich noch eine neue Variante mit fehlendem Exon 7 veröffentlicht. Außerdem konnte eine relative Vermehrung einer bestimmten Splicevariante, die Exon 16 beinhaltet (ITSN2C), in erwachsenem Hirngewebe nachgewiesen werden (im Vergleich zu anderen menschlichen Gewebearten). Die hauptsächlich beschriebenen Varianten (so genannte major Splicevarianten) besitzen gerade dieses Exon 16 nicht. Vergleichbare Analysen ergaben das Fehlen dieser Variante in erwachsenem Hirntumorgewebe (bei Oligodendrogliomen). Diese Ergebnisse lassen ebenfalls den Schluss zu, dass ITSN2 eine wichtige Rolle im Bereich der physiologischen neuronalen Zellfunktion spielt.

Zusammenfassend kann man zur Funktion des Intersectin 2 also sagen, dass eine Überexpression sowohl der kurzen, als auch der langen Isoform eine Blockade der Transferrinaufnahme hervorruft. Außerdem wird die Clathrin- induzierte Endocytose gestoppt, wahrscheinlich durch Interaktionen mit den Bindungspartnern, die bei diesem Prozess eine Rolle spielen [44].

Die Intersectine stehen sowohl in Verbindung mit der Endocytose, als auch mit dem mitogenetischen System [40]. Sie sind am Bau des Aktinskeletts beteiligt. Intersectine stellen also als multiple Adapter für Proteine eine wichtige Schnittstelle in der biochemischen Regulation der Zellfunktionen (speziell der Endocytose und der zytoskelettalen Regulation) dar.

2. Das Yeast- Two- Hybrid System

2.1 Übersicht

Das Yeast- Two- Hybrid (YTH) System ist ein genetisches Testsystem mit dem sich in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) Protein-Protein-Interaktionen nachweisen und untersuchen lassen [15]. Das YTH- System wird hauptsächlich für die folgenden drei Fragestellungen eingesetzt:

- 1.) Findet eine Protein- Protein- Interaktion zwischen zwei bekannten Proteinen statt?
- 2.) Welche Protein- Domänen oder Aminosäurereste sind kritisch für die Interaktion?
- 3.) Lassen sich in einer cDNA- Bank Klone detektieren, die für Proteine kodieren, welche an ein bestimmtes Zielprotein binden?

2.2 Prinzip und Anwendung des YTH- Systems

Protein-Protein-Interaktionen sind essentiell für fast alle biologischen Prozesse (beispielsweise Replikation, Transkription und Signaltransduktion). Für die Untersuchung der Bedeutung und Wirkungsweise eines bestimmten Proteins ist deshalb auch die Frage nach dessen möglichen Interaktionspartnern von großer Bedeutung. Klassische Methoden, um interagierende Proteine zu finden, wie z.B. Koimmunopräzipitation oder chemische Quervernetzung (Crosslinking), haben den entscheidenden Nachteil, dass mit ihnen zunächst nur Informationen über die Größe des Proteins (bestimmte Bande im Polyacrylamidgel) gewonnen werden. Um vom Protein zum kodierenden Gen zu gelangen, muss ein schwieriger experimenteller Weg beschritten werden (Proteinanreicherung und -reinigung, Sequenzierung und/oder Antikörpergewinnung, Bank- Screening).

Mit dem YTH- System können Protein- Protein- Interaktionen *in vivo* detektiert werden. Zugleich ist die kodierende DNA- Sequenz für ein interagierendes Protein, das beim Screening einer Expressionsbibliothek mit dem YTH- System entdeckt wurde, sofort verfügbar. Nur die Sequenz des Zielproteins muss im Voraus bekannt sein.

Das YTH- System basiert auf dem modulären Aufbau vieler eukaryotischer Transkriptionsfaktoren, der erlaubt eine DNA- bindende Domäne von einer

transkriptionsaktivierenden Domäne zu trennen. Dies wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen z.B. für die Hefe-Proteine GCN4 [25] und GAL4 [29] gezeigt.

Die DNA- Bindungsdomäne (DB) lokalisiert einen bestimmten Transkriptionsfaktor zu einer spezifischen DNA- Sequenz in der URS (upstream regulating region) des Gens, das von diesem Faktor reguliert wird. Die Transkriptionsaktivierungsdomäne nimmt Kontakt zu anderen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie auf und dient der Initiation der Transkription. Brent und Ptashne konstruierten ein Fusionsgen, welches für ein Hybridprotein aus dem LexA- Repressor (aus *E.coli*) und dem GAL4- Protein (aus Hefe) kodierte [6]. Dieses Hybridprotein konnte in Hefe die Expression eines Gens aktivieren, dessen Promoter Bindungsstellen für LexA hatte, womit erstmals experimentell belegt wurde, dass mittels DNA- Rekombination die Domänen natürlicher Transkriptionsaktivatoren getrennt und neu kombiniert werden können, um funktionelle künstliche Transkriptionsfaktoren zu konstruieren.

Für die Anwendung eines YTH- Systems, das auf der Rekonstitution der Transkriptionsaktivität des GAL4- Proteins beruht, werden Plasmide konstruiert, die für zwei Arten von Hybridproteinen kodieren: Ein Test- Protein 'X' (oder das Zielprotein für das Screening einer Bank) wird mit der DNA-Bindungsdomäne (DB) von GAL4 fusioniert (**Abb. 2a**).

Das andere Testprotein 'Y' (oder die cDNAs einer Bank) wird mit der Aktivierungsdomäne von GAL4 verknüpft (**Abb. 2b**). Die Plasmide werden in einen Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* transformiert, der ein Reporter gen (z.B. *lacZ*) mit GAL4- Bindungsstellen in der Kontrollregion enthält. Die beiden Hybridproteine dürfen allein nicht in der Lage sein, das Reporter gen zu aktivieren. Nur wenn die beiden Hybridproteine 'X- GAL4BD' und 'Y- GAL4AD' miteinander interagieren, werden die GAL4- Aktivierungs- und Bindungsdomäne zusammengebracht. Die Funktion des GAL4- Proteins wird somit rekonstituiert und das Reporter gen kann exprimiert werden (**Abb. 2c**).

In dieser Doktorarbeit wurde das YTH- System für das Screening einer gekauften cDNA- Bank eingesetzt, um Bindungspartner für das ITSN 2 (Zielprotein) zu finden. Anhand der so entdeckten Bindungspartner sollen dann Rückschlüsse auf die Funktion des ITSN 2 in der menschlichen Zelle, auch im Zusammenhang mit den schon weiter oben erwähnten, bereits nachgewiesenen Funktionen gezogen werden.

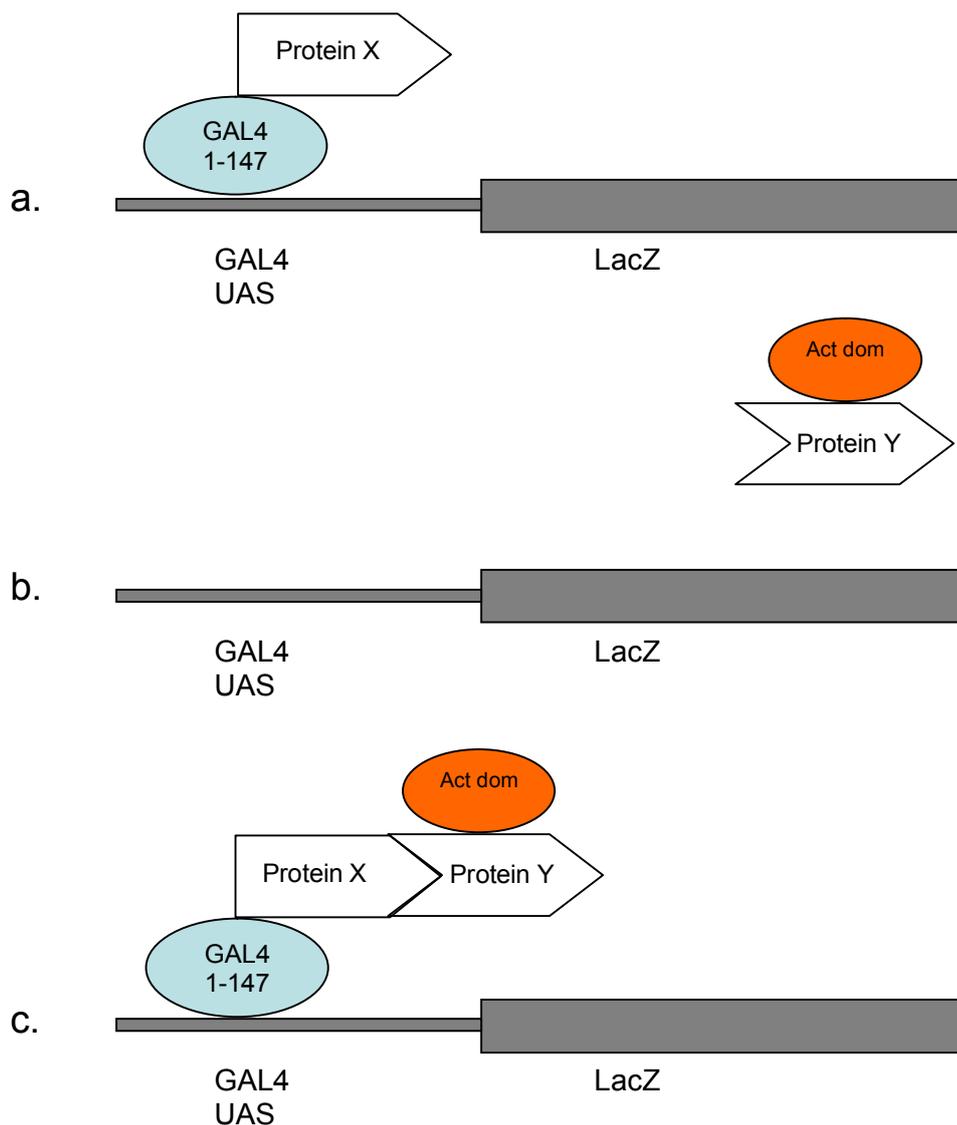


Abb.2: Funktionsprinzip des YTH- Systems, das in dieser Doktorarbeit verwendet wurde.

a.) Das Zielprotein 'X' (z.B. das Intersectin 2) wird mit der DNA-Bindungsdomäne des GAL4- Proteins fusioniert. Dieses Hybridprotein bindet an die GAL4- Bindungsstelle des Reportergens (lacZ), kann aber nicht dessen Expression aktivieren, da es keine Aktivierungsfunktion besitzt.

b.) Das Protein 'Y' (bzw. die von der cDNA- Bank kodierten Proteine), wird mit der Aktivierungsdomäne des GAL4- Proteins fusioniert. Seine Aktivierungsfunktion wird nicht wirksam, da dieses Hybridprotein nicht an die DNA binden kann.

c.) Wenn die beiden Hybridproteine 'X- GAL4BD' und 'Y- GAL4AD' miteinander interagieren, werden die DNA- Bindungsfunktion und die Aktivierungsfunktion zusammengebracht. Der entstandene Proteinkomplex hat somit die Transkriptionsaktivierungseigenschaften des nativen GAL4- Proteins. Somit kann der Komplex aus den beiden Hybridproteinen an die GAL4-Bindungsstelle in der regulatorischen Region des Reportergens lacZ binden und dessen Expression aktivieren. Die Expression von lacZ wird durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. [1]

3. Ziele dieser Arbeit

Der zentrale Bereich des Intersectin 2 besteht aus fünf SH3- Domänen. Dieser zentrale Bereich ist bei allen drei Splicevarianten des Intersectin 2 identisch. SH3- Domänen sind dafür bekannt, dass Proteine an ihnen binden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Bindungspartner für das von Intersectin 2 kodierte Protein gefunden werden, um die Bedeutung des Intersectin 2 für die biochemische Zellfunktion weiter zu erforschen. Hierfür wird das Matchmaker 3- Two- Hybrid System der Firma Clontech® mit einer prätransformierten cDNA- Bank benutzt. Diese cDNA- Bank kodiert für eine bestimmte Anzahl bekannter Proteine, die eine Rolle in menschlichen Zellen spielen.

Die Screening- Bibliothek ist in den Vektor pACT 2, den Aktivierungsdomänevektor des Yeast- Two- Hybrid- Systems hineinkloniert.

Das Intersectin 2 muss in pGBKT 7, den Bindungsdomänevektor des Systems kloniert werden.

Die beiden Vektoren mit der Bank und dem Intersectin 2 werden in einen geeigneten Hefestamm des Yeast- Two- Hybrid Systems (AH 109) transformiert und auf einem bestimmten Selektionsmedium ausplattiert.

Die nun gewachsenen Kolonien werden u. a. mit Hilfe des α - und β - Galaktosidase- Filter- Assays auf Bindungspartner überprüft. Die blau angefärbten Kolonien werden dann noch mit verschiedenen Kontrollversuchen auf falsch- positive Ergebnisse, beziehungsweise auf andere Fehlerquellen überprüft.

Danach werden die so gefundenen Bindungspartner noch sequenziert und charakterisiert.

Die so mittels Yeast- Two- Hybrid System identifizierten potentiellen Bindungspartner werden nun noch in vivo überprüft. Dies geschieht durch ein weiteres Nachweisverfahren, die Immunpräzipitation.

III. Material und Methoden

A. Anwendung des Yeast- Two- Hybrid Systems

1. Hefestämme für das Matchmaker GAL4 YTH-System 3

Die Hefestämme AH 109 und Y 187 wurden von Clontech speziell für das YTH- System entwickelt. AH 109 verfügt über HIS3, ADE2, lacZ und MEL1 als Reportergene, Y 187 benutzt nur lacZ. Sie können für die Untersuchung zweier bekannter klonierter Proteine auf Interaktion verwendet werden, oder für das Screening einer cDNA- Bibliothek auf Proteine, die mit einem bekannten klonierten Protein interagieren. AH 109 ist der Hefestamm für die GAL4- DNA- Bindungsdomäne und Y 187 dient als Mating- Partner für die komplexe cDNA- Bibliothek, die dann in dieser GAL4- DNA- Aktivierungsdomäne exprimiert wird.

AH 109: *MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2 :: GAL1_{UAS}- GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}- GAL2_{TATA}- ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS}- MEL1_{TATA} lacZ (Harper et al.)*

Y187: *MAT α , ura3- 52, his3- 200, ade2- 101, trp1- 901, leu2- 3, 112, gal4 Δ , met-, gal80 Δ , URA3 :: GAL1_{UAS} - GAL1_{TATA} - lacZ (Holz)*

2. Puffer und Stammlösungen für YTH- System

Puffer/ Lösung	Präparation (für 1l)
3-Amino-1,2,4- Triazol, 5M	420.5g 3-AT mit A.d. auf 1l auffüllen, lösen, filtersterilisieren
Cycloheximid 1000x (1mg/ml)	1g Cycloheximid auf 10ml mit A.d. auffüllen, lösen, filtersterilisieren, bei 4°C lagern
10x Dropout Lösung	300mg L-Isoleucin, 1500mg L- Valine, 200mg L-Adenin Hemisulfat, 200mg L-Arginin HCl, 200mg L-Histidin HCl, 1000mg L-Leucin, 300mg L-Lysin HCl, 200mg L- Methionin, 500mg L- Phenylalanin, 2000mg L-Threonin, 200mg L-Tryptophan, 300mg L-Tyrosin, 200mg L-Uracil mit A.d. auf 1l auffüllen, autoklavieren. Je nach Selektion werden bestimmte Aminosäuren weggelassen.
40% Glukoselösung	400g Glukose mit A.d auf 1l auffüllen, lösen, autoklavieren oder filtersterilisieren
SD- Agar (Minimalmedium für Selektion bestimmter Hefe- Phänotypen)	6.7g Difco yeast nitrogen base without amino acids und 20g Agar mit A.d. auf 850ml auffüllen, 100ml geeigneter 10x Dropout zugeben, mit HCl pH= 5.8 einstellen, autoklavieren, auf 55°C abkühlen, 50ml 40% Glukoselösung zugeben, mischen, Platten gießen
SD-Medium	Präparation wie SD- Agar, aber ohne Zugabe von Agar
Yeast-Lysis-Solution	2% Triton X-100, 1%SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris (pH 8.0), 1.0mM EDTA
YPD-Agar (Vollmedium für Hefekultivierung)	20g Difco Pepton, 10g Yeast Extrakt, 20g Agar mit A.d. auf 950ml auffüllen, pH 5.8 einstellen, autoklavieren, abkühlen auf 55°C, 50ml 40% Glukoselösung zugeben, Platten gießen
YPD- Medium	Präparation wie YPD-Agar, aber ohne Zugabe von Agar

Z-Buffer	16.1g Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O, 5.5g NaH ₂ P0 ₄ x H ₂ O, 0.75g KCl, 0.246g MgSO ₄ x 7H ₂ O mit A.d. auf 1l auffüllen, pH7.0 einstellen, autoklavieren
X-Gal Stammlösung	20mg/ ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside in DMF (N, N-Dimethylformamide) lösen, bei -20°C lichtgeschützt lagern
Z- Buffer/X-Gal-Lösung (ca. 100ml)	100ml Z-Buffer, 0.27ml β-Mercaptoethanol, 1.67ml X-Gal Stammlösung, mischen, erst kurz vor Gebrauch ansetzen

Tab.1: Puffer und Stammlösungen für das Matchmaker Yeast- Two- Hybrid System 3

3. Hefe- Kultivierung

3.1 Kultur in Flüssigmedium

Etwa 100ml YPD- Medium oder SD-Selektionsmedium (in 250ml Erlenmeyerkolben) werden mit einer Hefe- Kolonie beimpft. Die Inkubation erfolgt bei 30°C im Schüttler (230rpm) bis zur Sättigung (ca. 2-3 Tage).

3.2 Kulturen auf Festmedium

Eine Hefe- Kolonie wird in ca. 500µl Flüssigmedium resuspendiert. Mit der Impföse wird ein Tropfen dieser Resuspension auf eine Platte mit geeignetem Festmedium übertragen und ein Verdünnungsausstrich durchgeführt. Die Platten werden in Kunststofftüten verpackt und mit der Oberseite nach unten im 30°C- Brutschrank 3-7 Tage inkubiert.

3.3 Hefe- Glyzerolkulturen

Etwa 10ml YPD- Medium werden mit einer frischen Hefe-Kolonie (2-3 Tage auf Platte gewachsen) beimpft und im Schüttler (230rpm) bei 30°C bis zur OD₆₀₀= 0.8-1.0 wachsen gelassen. Zu dieser 10ml Kultur werden anschließend 5ml 50% Glyzerol

(in YPD verdünnt) gegeben und gemischt. Aliquots werden in sterile Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

4. Shuttle- Plasmide

Vektor	Beschreibung
	BD= Bindungsdomäne, AD= Aktivierungsdomäne
pGBKT7	7.3 kb , DNA-BD Vektor, für Fusion mit ITSN 2 (Zielprotein), Selektionsmarker ist TRP1, Kana
pGADT7	8.0 kb, DNA-AD Vektor, für cDNA Bibliothek Selektionsmarker: Leu2 , Amp
pACT2	8.1 kb, AD Vektor <i>Selektionsmarker: Leu2, amp (Li et al., 1994)</i>
pCL1	15.3 kb, Plasmid für Positiv-Kontrolle, kodiert und exprimiert Wildtyp GAL4 Protein, Selektionsmarker: <i>Leu2, amp</i> (Field und Song, 1989)
pGBKT7-Lam	8.17 kb, Plasmid für Detektion falsch positiver Klone, kodiert für Lamin C, Selektionsmarker: <i>Trp1, Kana</i>
pGADT7-T	10.1 kb Plasmid für Positivkontrolle, kodiert für SV 40 large T- Antigen in AD- Vektor pGADT7 Selektionsmarker: Leu2, amp
pGBKT7-53	8.3 kb, Plasmid für Positivkontrolle, kodiert für p53 im GAL4 BD- Vektor Selektionsmarker: TRP1, Kana

Tab. 2: Plasmide für die Arbeit mit dem Matchmaker YTH- System 3 (Clontech®)

Die Vektoren lassen sich sowohl in geeigneten Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae*, als auch in *E. coli* Stämmen amplifizieren (so genannte Shuttle- Plasmide).

4.1: pGADT7:

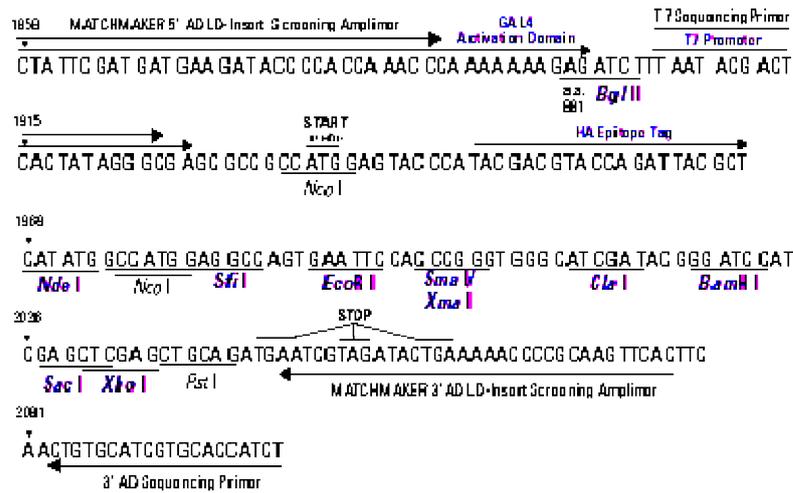
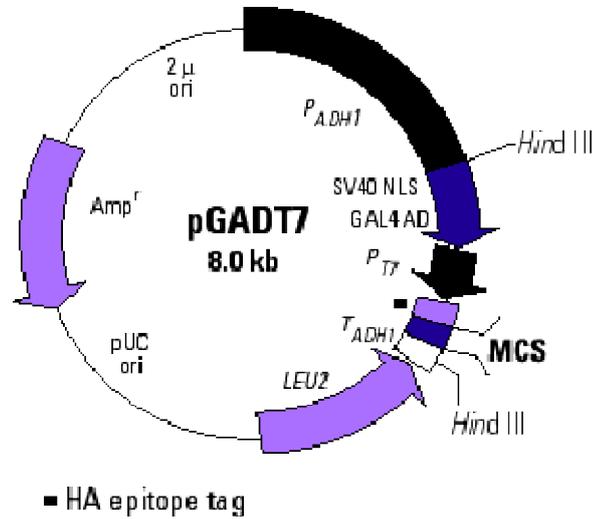


Abb.3: [62]

4.2: pGBKT7

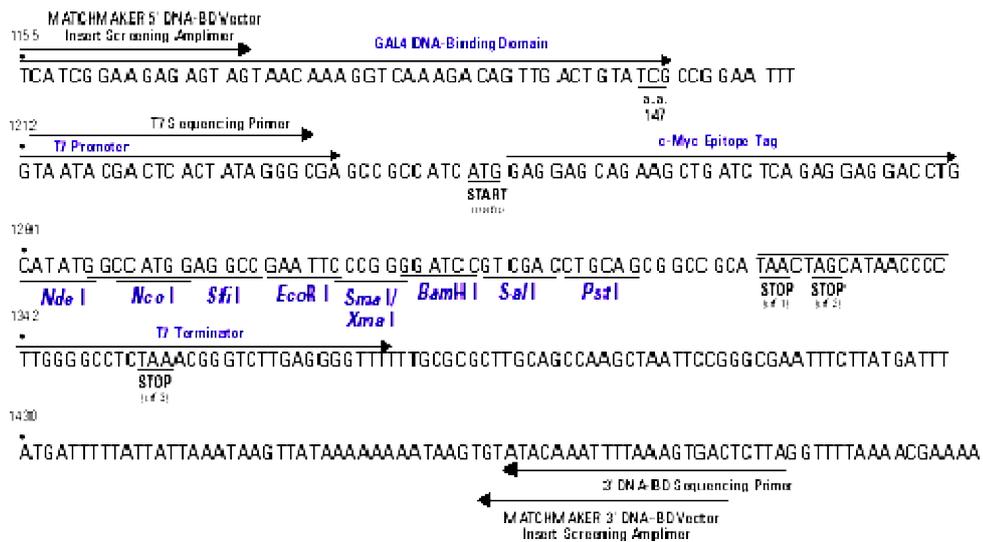
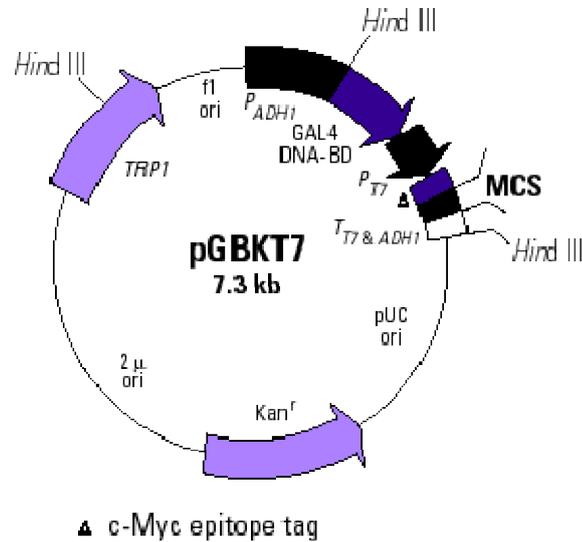


Abb.4: [60]

5. Hefe- Transformation

Prinzip der Methode

Um die Hefe-Transformation durchzuführen, nutzt man die Lithiumacetat-Methode (Gietz, 1992)). Kompetente Hefe- Zellen werden gemeinsam mit der Plasmid- DNA in einer Lithiumacetat- Lösung resuspendiert. Anschließend wird die Resuspension mit Lithiumacetat haltigem Polyethylenglykol (PEG) gemischt und bei 30°C inkubiert. Danach werden die transformierten Zellen auf geeignetem Selektionsmedium (SD- Agar) ausplattiert.

Material

Die Hefe Transformation wurde mit dem "S.c. EasyComp™ Transformation Kit" von Invitrogen durchführt. Weiterhin werden benötigt: YPD- oder geeignetes SD-Medium, Erlenmeyerkolben, 30°C-Schüttler, Agar- Platten mit geeignetem Selektionsmedium, 30°C- Brutschrank

Durchführung

Die Herstellung kompetenter Hefe- Zellen, sowie die anschließende Transformation wurden nach dem Protokoll von Invitrogen mit dem „S.c. EasyComp™ Transformation- Kit“ durchgeführt Das Protokoll kann dem Kit- Handbuch entnommen werden. Die transformierten Zellen werden auf geeignetem SD-Medium ausplattiert, und die Platten mit der Oberseite nach unten (in Kunststofftüten verpackt) bei 30°C für 3-7 Tage inkubiert. Je nach Zielsetzung, können danach von einzelnen Kolonien Glycerol- Kulturen angelegt werden, oder die Transformanten werden mit dem β - Galaktosidase- Filter- Assay auf Protein- Protein- Interaktion untersucht.

6. α - und β - Galaktosidase- Filter- Assay

Methodik

Die Hefe-Stämme Y187 und AH109 enthalten *lacZ* und *Mel1* als Reportergene für den Protein- Protein- Interaktions- Nachweis. Diese Reportergene werden über einen Gal4 regulierten Promoter aktiviert.

Wenn das Hybridprotein, das von GAL4- Aktivierungsdomänevektor (AD- Vektor) kodiert wird, an das GAL4-Bindungsdomäne-Hybridprotein bindet, entsteht ein Proteinkomplex mit GAL4- transkriptionsaktivierenden Eigenschaften. Dieser Komplex bewirkt die Expression von *lacZ* und *Mel1*. Das *Mel1* Gen kodiert für α - Galaktosidase, das *lacZ*- Gen für die β - Galaktosidase. Beide spalten das Substrat X-Gal, wobei ein blauer Farbstoff entsteht.

Der β - Galaktosidase- Filter- Assay erlaubt die gleichzeitige Untersuchung vieler Hefekolonien auf Expression des *lacZ*- Reportergens. Die transformierten Zellen werden auf ein Filter übertragen und einem Gefrier/Tau-Zyklus mit flüssigem Stickstoff ausgesetzt. Anschließend werden die Filter mit X-Gal haltiger Lösung getränkt und inkubiert.

Material

Whatmann #5 Filterpapier, steril (75mm-Filter für 100mm-Platte, 125mm-Filter für 150mm-Platte), sterile Pinzetten, Z-Puffer, Z-Puffer/X-Gal-Lösung, X-Gal-Stammlösung, flüssiger Stickstoff

Durchführung [39]

Die besten Ergebnisse werden mit frischen Kolonien (2-4 Tage bei 30°C gewachsen) erzielt. Die Z- Puffer/X-Gal-Lösung wird frisch angesetzt.

Um den α - Galaktosidase Assay durchzuführen wird das Substrat X Gal bereits vor Ausplattieren der Klone zu den entsprechenden Flüssigmedien hinzugefügt. Auf diese Art und Weise kann eine Blaufärbung direkt überprüft werden. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen pro Agarplatte verwendet (von 50 μ l – 200 μ l Zusatz). Die Intensität der Blaufärbung war von der Konzentration abhängig.

Um den β - Galaktosidase- Assay durchzuführen wurde für jede zu testende Transformanten- Platte ein Whatmann #5 Filterpapier in eine 100mm (150mm)- Petrischale plaziert und mit 2.5ml (5ml) Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkt.

Mit einer Pinzette wird je ein steriles, trockenes Filterpapier auf die Oberfläche der Transformanten- Platten gelegt und vorsichtig angepreßt. Die Kolonien sollen am Papier haften bleiben. Luftblasen zwischen Filter und Kolonien müssen vermieden werden. Die Orientierung des Filters auf der Platte muss gekennzeichnet werden. Nach 2-5 min wird der Filter mit den anhaftenden Kolonien in ein Gefäß (z.B. Petrischale) mit flüssigen Stickstoff übertragen und vollständig für mind. 10 Sekunden eingetaucht. Dabei soll die Seite mit den anhaftenden Kolonien nach oben zeigen. Anschließend wird der Filter mit einer Pinzette aus dem flüssigen Stickstoff genommen und vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach dieser Behandlung sind die Zellen permeabilisiert.

Der aufgetaute Filter wird danach vorsichtig auf einen anderen, mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkten, Filter übertragen, wobei die Kolonien wieder nach oben weisen. Luftblasen zwischen beiden Filtern müssen vorsichtig entfernt werden. Die Filter werden anschließend bei RT oder 30°C inkubiert (1h- 24h) und periodisch auf das Erscheinen blauer Kolonien geprüft. Eine Inkubation > 8h erhöht die Wahrscheinlichkeit für die Blau-Färbung falschpositiver Kolonien. Kolonien, die β -Galaktosidase produzieren, werden auf der Ausgangsplatte identifiziert, gepickt und auf frisches Wachstumsmedium übertragen.

7. Isolation von Plasmid- DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Prinzip der Methode

Die Hefe- Zellwand wird enzymatisch (Lyticase) und physikalisch (vortexen nach Inkubationszeit) aufgebrochen. Die Plasmid- DNA, die mit chromosomaler DNA verunreinigt ist, wird dann über die mitgelieferten Säulen gereinigt und isoliert. Plasmid- DNA, die auf diese Art gewonnen wurde, kann als PCR- Template eingesetzt- oder genutzt werden, um *E.coli* zu transformieren.

Falls eine besonders reine DNA (z.B. für die Sequenzierung) oder größere Menge Plasmid- DNA benötigt wird, muss immer zunächst *E.coli* transformiert werden. Die Plasmid- DNA kann dann nach Standardmethoden (z.B. Alkalische Lyse) isoliert werden.

Material

„Yeastmaker™ Yeast Plasmid Isolation Kit“, 250 ml 20% SDS, 200 ml Lyticase (5 units/μl in TE), 1 ml Kaliumphosphat (67 mM KH₂PO₄; pH 7,5), CHROMA- SPIN™- 1000 DEPC- H₂O Säulen, 2 ml Eppendorf Gefäße, SD Medium, TE Puffer (PH 7,4)

Durchführung

2ml YPD- oder geeignetes SD-Medium werden mit einer transformierten Hefe-Kolonie beimpft und etwa 2-3 Tage bei 30°C geschüttelt (230rpm). Danach wird die Kultur in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt und mit 10μl Lyticase versetzt. Die Lösung wird 30- 60 min bei 37°C inkubiert und dann gevortext. Hiernach werden 10μl SDS zugesetzt und erneut gevortext. Die Suspension wird nun auf die mitgelieferten CHROMA- SPIN™- 1000 DEPC- H₂O Säulen aufgetragen und danach 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wird gesammelt, die DNA (enthält das Plasmid) ist nun gereinigt und gebrauchsfertig für eine PCR oder die *E.coli* Transformation. [63]

8. Mating (des BD- und AD- Vektors)

Prinzip der Methode

Da Hefen im Gegensatz zu den Bakterien eukaryote Zellen sind, werden sie bei guten Kultivierungseigenschaften (in Medien und auf Kulturplatten) verstärkt in wissenschaftlichen Laboren eingesetzt. Die Generationszeit ist kurz (1,5h), dadurch eignen sich Hefezellen gut für molekulargenetische Untersuchungen. Im Yeast- Two- Hybrid System ist das Genom von *S. cerevisiae* auf 16 Chromosomen verteilt und haploid. Es gibt zwei verschiedene Geschlechter (mating types),

den a- und den α - Typ. Es gibt auch einige diploide Zellen, die durch Fusion von zwei verschiedenen geschlechtlichen Zellen entstehen. Die Vermehrung von Hefezellen wird als „budding“ bezeichnet, sie ist unsymmetrisch und funktioniert mittels Zellaussprossung. An der Mutterzelle bilden sich Knospen, die mit einem vollständigen Chromosomensatz versehen sind. Diese spalten sich im weiteren Verlauf ab und können nach dem Heranwachsen ebenfalls wieder Knospen bilden, usw. Bei knappem Nahrungsangebot fusionieren haploide Zellen verschiedener Geschlechter zu einer diploiden Zelle, die dann durch Meiose wieder haploide Zellen hervorbringt.

Im Yeast- Two- Hybrid System macht man sich das zu Nutzen, um 2 verschiedene Plasmide in dieselbe Zelle zu bringen; es stellt somit eine Alternative zur Kotransformation dar. Um die Ergebnisse des Systems zu kontrollieren, ist es wichtig, dass sich durch das erfolgreiche Mating auch die Wachstumscharakteristika ändern und verschiedene Reportergene vorkommen. Im Yeast Two Hybrid System findet das Mating zwischen dem Stamm AH 109 (a- Typ) und dem Stamm Y 187 (α - Typ) statt. In AH 109 befindet sich der Bindungsdomänevektor mit dem zu untersuchenden Substrat (in diesem Fall ITSN 2) und in Y 187 befindet sich die cDNA- Bank, die zum Screening der Bindungspartner benötigt wird.

Durchführung

Die Durchführung des Matings erfolgt streng nach dem Small- Scale Yeast Mating Protocol der Firma Clontech. Bevor das Bank Screening durchgeführt wird, müssen erst noch einige Kontrollen bezüglich der Funktionsfähigkeit der Hefestämme durchgeführt werden. Dies ist ebenfalls im Protokoll von Clontech beschrieben, außerdem wird das zu untersuchende Substrat noch auf seine Mating Effizienz (die Rate sollte zwischen 3 und 10 % liegen) getestet. Die Kontrolle und die Funktionsweise des Bankscreenings sind beispielhaft in Tab.3 dargestellt.

RECOMMENDED SET-UP FOR LIBRARY SCREENING USING YEAST MATING			
Cross	Strain[Plasmid]	Plate on SD Minimal medium	Mel1/LacZ Phenotype
Control	AH109[pGBKT7-53]	–Leu/–Trp ^a	Blue
	x Y187[pGADT7-T or pTD1-1]	–His/–Leu/–Trp ^b	Blue
		–Ade/–His/–Leu/–Trp ^b	Blue
Experi- mental	AH109[bait] x Y187[library]	–Leu ^{c, d}	White
		–Trp ^{c, d}	White
		–Leu/–Trp ^d	Varies
		–His/–Leu/–Trp/(+3-AT) ^e	(Experimental) ^f
		–Ade/–His/–Leu/–Trp	(Experimental) ^f

Tab.3: Screening of a Pretransformed Library by Yeast Mating (Fa. Clontech)

9. Proteinisolierung und –nachweis

9.1 Methodenübersicht

- Proteinisolierung aus Hefezellen
- Gelelektrophorese (SDS Page)
- Elektrotransfer (Western Blot)
- Immunoblot (Antikörper gekoppelt)

9.1.1 Proteinisolierung aus Hefezellen

Material

Blue Caps, Brutschrank, Eis, Eppendorfgefäße (1,5 ml), SDS- Puffer, SD- TRP, Spektrophotometer, Wasserbad, Zentrifuge

Methodik

1. Animpfen von Übernachtskulturen: SD- TRP Medium, je 5 ml werden jeweils mit 1 Kolonie versetzt und über Nacht bei 230 rpm bei 30 ° inkubiert.
2. Am nächsten Morgen wird eine frische Kultur beimpft, so dass eine Start OD₆₀₀ (siehe III B 3.2.2) von 0,15 entsteht.
3. Diese Kultur wird in einem Zeitfenster von 4- 6 h im Schüttler bei 30 °C wachsen gelassen bis die OD₆₀₀ zwischen 0,45 und 0,7 liegt.
4. 1,5 ml der Suspension werden in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bei 14000 rpm bei RT für 3 min zentrifugiert, der Überstand wird verworfen.
5. Es werden 50µl SDS Puffer (1x) auf das Pellet pipettiert, gevortext und dann für ca. 2 min auf Eis gelegt.
6. Danach folgt ein Hitzeschock (5 min bei 95° kochen).
7. Dann 1 min mit 14000 rpm bei RT zentrifugieren und
8. auf SDS- Page auftragen

9.1.2 SDS- PAGE

Material

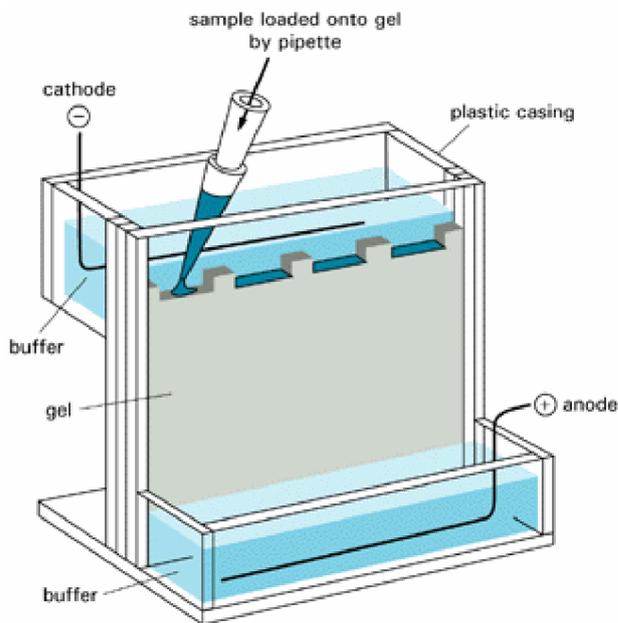


Abb.6: SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (Gel mit Kammer und angelegter Spannung abgebildet)

Prinzip der Methode

Das Gel besteht aus einer netzartigen Struktur von Natrium- Dodecyl- Sulfat- Polyacrylamid. Unter bestimmten Voraussetzungen können Proteine die Maschen des Netzwerkes passieren. Um eine Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht zu erreichen, müssen diese die gleiche geometrische Form (eindimensional) und die gleiche Ladung (negativ) aufweisen. SDS ist ein anionisches Detergens, das sich an die Proteine anlagert, ihnen eine negative Gesamtladung verleiht und ihre dreidimensionale Struktur durch Auflösung aller nicht kovalenten Bindungen in eine eindimensionale überführt (unterstützt durch Reduktionsmittel, die die kovalenten Disulfidbrücken spalten). Wird ein elektrisches Feld an das Gel angelegt, wandern kleine Proteine mit geringem Molekulargewicht aufgrund geringerer Reibungskraft schneller durch das Gel als die größeren Proteine mit höherem Molekulargewicht.

9.1.3 Western Blot

Material

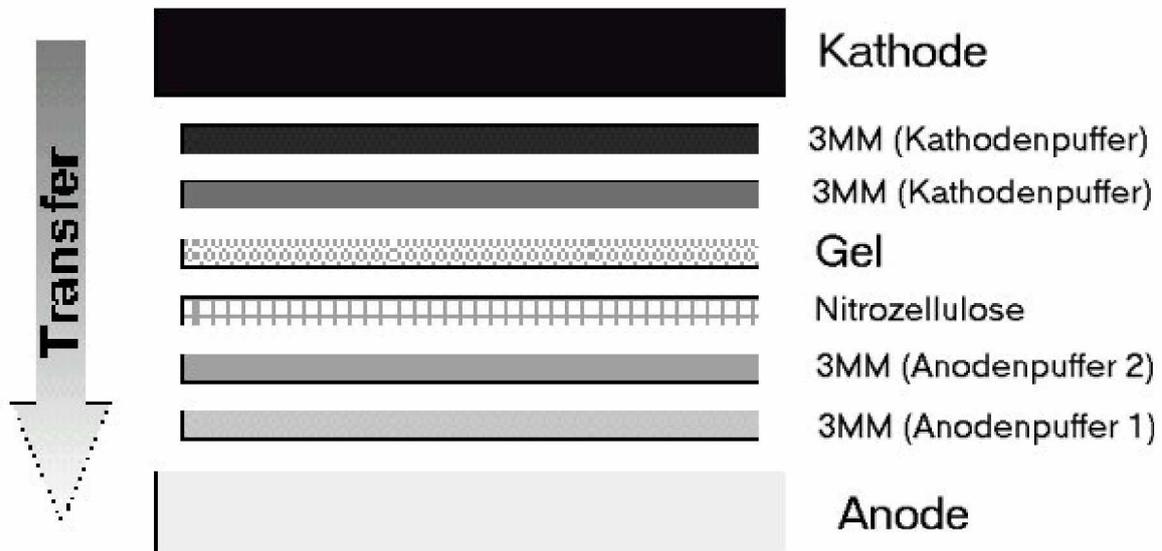


Abb.7 : Schema eines Western Blots mit SDS Gel

Prinzip der Methodik

Durch die Methodik des Western Blots werden die im Gel aufgetrennten Proteine durch elektrischen Strom auf eine sehr dünne, stabile Membran (bestehend aus Nitrozellulose oder Polyvinylidendifluorid o.ä.) gebracht. Hier werden die Proteine festgehalten, durch die spezielle Oberfläche ist die Membran in der Lage, große Mengen an Protein zu speichern.

9.1.4 Detektion

Material

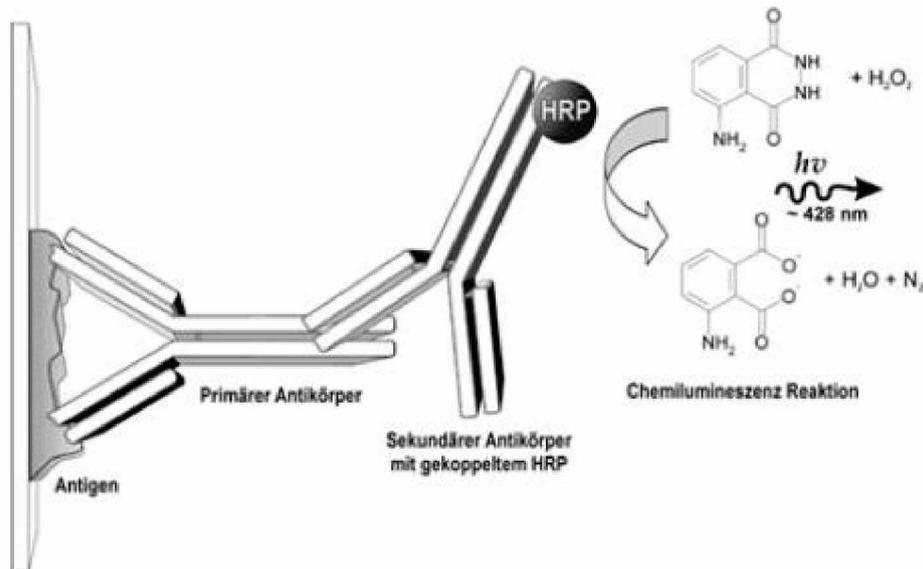


Abb. 8 : Schematische Darstellung einer Detektion

Da die Proteine auf der Membran nach dem Western Blotting nicht sichtbar sind, muss man Antikörper zu Hilfe nehmen. Der primäre Antikörper bindet an sein Antigen, welches auf einer Membran fixiert ist. An diesen wiederum bindet der sekundäre Antikörper, der z. B. mit dem Enzym HRP gekoppelt ist. Das HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, dessen Chemilumineszenz detektiert werden kann.

9.1.5 Proteinnachweis

Material

Plotting Membran, Western Blocking Reagenz, PBS, Tween20, Schüttler, Enhanced Chemiluminescence Entwicklungslösung (ECL), Röntgenfilm, primärer (anti-flag) und sekundärer (anti-maus) Antikörper

Methodik

1. Die geplottete Membran wird für eine Stunde in 0,5% Blocking Puffer (5 ml Western Blocking Reagenz (WBR) + 45 ml PBS) gelegt.

2. Nun wird die Membran für eine Stunde in konzentrierten Blocking Puffer(1%), der mit dem primären Antikörper versetzt ist (2,5 ml WBR + 47.5 ml PBS inklusive 10 ml PBS mit 20µl prim. Antikörper) gelegt.
3. Waschen : 2x 10min mit PBST (50 ml PBS + 50µl Tween20)
2x 10min mit 0,5% Blocking Puffer
4. Die Membran wird jetzt eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (10ml 0,5%WBR + 1µl sek. Antikörper) versetzt.
5. Waschen: 4x15 min mit PBST
6. Detektion der Banden nach kurzem Abspülen mit Wasser mit dem ECL Detektionssystem. 2 ml der Lösung werden gleichmäßig über der Membran verteilt, durch eine Oxidation von Luminol durch eine Peroxidase während einer 3 minütigen Inkubationzeit wird eine Chemilumineszenz ausgelöst [18]. Die Aktivität dieser Peroxidase kann durch Exposition (30s - 10min) eines Röntgenfilms auf der Membran nach entsprechender Entwicklung dargestellt werden.

9.2 Kultivierung von HEK- Zellen

9.2.1 Prinzip der Methode

Die Zellen werden bei konstantem pH Wert, einer relativen Luftfeuchtigkeit von >80% und bei 37 °C in einem Brutschrank vermehrt. Bei HEK Zellen handelt es sich um in Kultur gehaltene embryonale Nierenzellen des Menschen.

Die Subkultivierung findet in Zellkulturflaschen in einem bestimmten Medium statt. Dieses Kulturmedium muss üblicherweise alle 2 - 3 Tage gewechselt werden. Dem Kulturmedium ist ein pH- Indikator (Phenolrot) zugefügt, wenn dieser im Farbton Richtung sauer (gelb) umschlägt, spricht das für eine hohe Stoffwechselaktivität der Zellen, respektive eine hohe Zellzahl oder eine Kontamination. In einem solchen Fall muss das Medium öfter gewechselt werden, bzw. die Kultur muss passagiert werden. Wenn der Indikator Richtung basisch (pink) umschlägt, muss der Verschluss der Kulturflasche überprüft werden, ggf. ist dieser leicht zu öffnen. Nach einer bestimmten Kultivierungszeit erreichen die Zellen das so genannte Stadium der Konfluenz. Der

Boden der Schalen ist nun dicht bewachsen, es erfolgt hierdurch eine Hemmung der weiteren Proliferation, es kommt zur so genannten Kontaktinhibition. Um eine weitere Proliferation zu erhalten, müssen die Zellen verdünnt werden. Dieses Verdünnen, bzw. das Überführen der Zellen in ein neues Kulturgefäß nennt man Passagieren oder Subkultivieren.

Um die Zellen zu passagieren, müssen sie zunächst von der Oberfläche der Kulturfaschen gelöst werden. Dieses Ablösen wird mit Trypsin durchgeführt. Trypsin ist eine Protease, die die Zelloberfläche verändert und somit die Zellwand- Oberflächen Wechselwirkung stört und zum Ablösen der Zellen führt. Um ein problemloses Gelingen dieser Methode zu erreichen, muss das Kulturmedium Ca^{2+} und Mg^{2+} frei sein, da diese Ionen inhibitorisch auf die Protease Trypsin wirken. Folglich werden die Kulturen mit Ca^{2+} und Mg^{2+} freier Pufferlösung gewaschen. Die Einwirkzeit der Trypsin Lösung muss unter 10 Minuten liegen, da eine hohe Toxizität besteht.

Die Zellen werden in Zellkulturflaschen mit mindestens der doppelten Menge an frischem Medium und Serum pipettiert. Durch die Beimengung von Serum wird die Protease inaktiviert.

Zur Sicherheit und Erhöhung der Effizienz werden die Zellen nochmals abzentrifugiert und in frisches Medium überführt, da eventuelle Trypsin Reste die Anheftung der Zellen verlangsamen. Nach bestimmten Richtlinien werden die Zellen nun verdünnt, da dies für die Subkultiveringung eine wichtige Rolle spielt. Bei langsam wachsenden Zelllinien liegt die Verdünnung zwischen 1:2 und 1:5, bei schnell wachsenden Zelllinien, wie bei den HEK- Zellen zwischen 1:5 und 1:20.

Das Wachstum der Zellen ist vor allem von der anfänglich eingesetzten Zellzahl abhängig. Bei einer zu niedrigen Zellzahl wachsen diese nur langsam, zu dicht ausgesäte Zellen müssen sehr oft subkultiviert werden, was bei nicht permanenten Zellen die Lebenszeit der Zellen verkürzt. Um die Zellen auszuzählen wird eine Neubauer-Zählkammer und ein Mikroskop benutzt [75].

9.2.2 Durchführung

Um die Zellen zu kultivieren, wurde als Standardmedium das „Dulbeccos's Modified Eagle Medium“ mit den Zusätzen fetales Kälberserum (FKS) und den Antibiotika Streptomycin und Penicillin benutzt.

Um die adhärenenten HEK- Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflaschen zu lösen, wurde wie folgt vorgegangen:

- Das alte Medium wird aus der Zellkulturflasche mit einer sterilen Glaspipette und einer Absaugvorrichtung entfernt.
- Es werden 2 ml Trypsin 0,05% hinzugegeben und 5 min inkubiert.
- Es werden 10 ml Medium zu den abgelösten Zellen hinzugegeben und durch hin- und herpipettieren werden die Zellen abgelöst.
- Die abgelösten Zellen werden in ein Zentrifugengefäß überführt und bei 1200 U/min 10 Minuten abzentrifugiert.
- Der Überstand wird abpipettiert, das Zellpellet wird in 1 ml frischem Medium eluiert.
- Nun erfolgt die Verdünnung und die Verteilung auf mehrere Zellkulturflaschen.

Im nächsten Schritt wird die Zellzahl mit der Neubauer- Zählkammer bestimmt.

Zunächst wird die Oberfläche der Zählkammer mit 70% igem Isopropanol gereinigt. Das Deckglas wird ebenfalls mit Alkohol gereinigt. Nachdem man das Deckglas angehaucht und auf die Zählkammer gelegt hat, erscheinen so genannte „Newtonringe“, dies bedeutet, dass alles richtig angebracht ist und die Tiefe der Zählkammer gut eingestellt ist. Die Kammer wird mit Hilfe einer Pipette befüllt, sie zieht sich über Kapillarkräfte von selbst voll, wichtig ist eine akkurate Füllung.

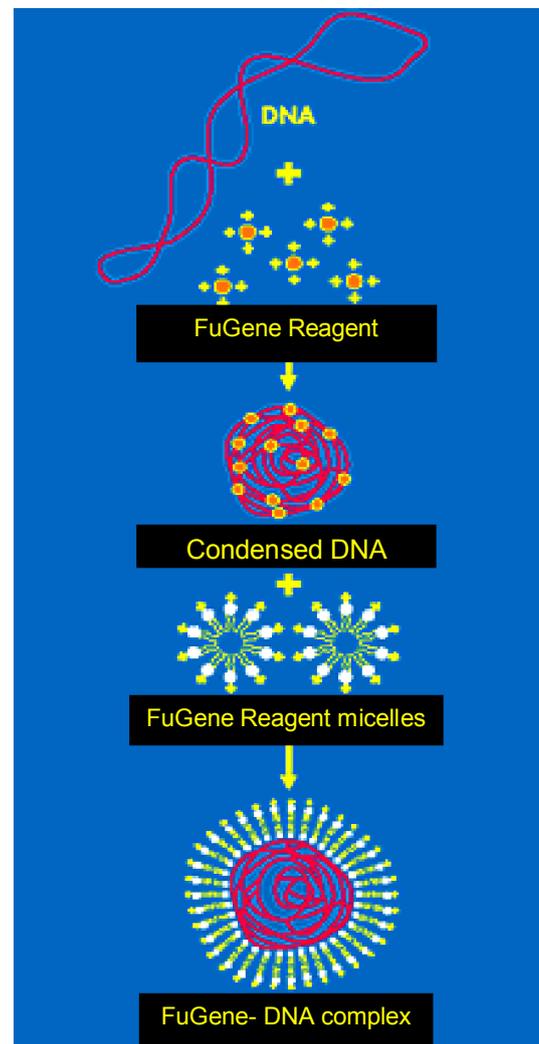
Nun wird die Kammer unter das Mikroskop gelegt und solange justiert bis die Einteilungslinien sichtbar werden. Die Neubauer Zählkammer besteht aus 9 großen Quadraten, die 0,1 mm tief und eine Fläche von 1 mm² haben, damit beträgt das Volumen exakt 0,1 µl. Es werden in 4 Feldern mit je 16 Unterquadraten je 3 dieser Unterquadrate ausgezählt. Aus diesen 12 Unterquadraten wird die mittlere Zellzahl pro Unterquadrat berechnet und mit $1,6 \times 10^5$ multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten (Kammer mit 0,0625 mm² Fläche pro Unterquadrat mit einer Tiefe von 0,1 mm; ein Feld mit 16 Unterquadraten hat eine Fläche von 1 mm²; bei einer Tiefe von

0,1 mm ergibt sich ein Volumen pro Feld von 0,1 μl , d.h. Zellzahl $\times 16 \times 10 \times 10^3 =$ Zellzahl/ml).

9.3 Transfektion von HEK- Zellen

Im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Transfektionen wurden mit einem Roche® Kit, dem „FuGENE® 6 Transfection Reagent Kit“, durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein multikomponentes Reagens, welches ein Komplex mit DNA formt und diesen Komplex dann in die Zellen transportiert. Dieses Reagens wird verwendet, um hohe Transfektionsraten zu erzielen. [70]

Abb.9: Transfektion mit dem FuGene Transfection Reagens von Roche®



9.3.2 Durchführung

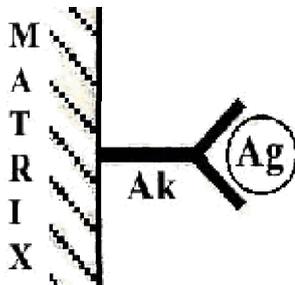
Die konkrete Durchführung lässt sich aus dem Protokoll von Roche entnehmen [70].

- Das FuGene Reagens wird zur DNA, die in Optimem gelöst ist, gegeben.
- Der Komplex wird gemischt und 15 min bei RT inkubiert.
- Der Komplex wird zu den Zellen hinzugegeben.
- Die Zellen werden zurück in den Inkubator getan, bis die Gen Expressions Analyse durchgeführt wird.
- Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wird ein GFP (green fluorescent protein)- Expressionsvektor verwendet.

9.4 Immunpräzipitation

9.4.1 Prinzip der Methode

In der so genannten Immunpräzipitation werden Antigene aus einer Lösung mit spezifisch gegen eben diese Antigene gerichteten Antikörpern herausgefiltert. Die Antikörper bilden mit den Antigenen Immunkomplexe, die dann mit verschiedenen Methoden präzipitiert werden können. Besteht zwischen dem Protein mit der Antigenstruktur und einem anderen Protein eine Interaktion, so kann dieses Protein mitpräzipitiert werden. In einem speziellen Immunoblot können dann die präzipitierten Proteine nachgewiesen werden. Falls die Bindung zwischen den Proteinen nicht stark genug ist, um während des Verfahrens bestehen zu bleiben, können die Proteine in den Zellen mit membrangängigen Detergenzien quervernetzt werden. Im Immunoblot wird ein Antikörper gegen den zu erwartenden Wechselwirkungspartner, oder ein Antikörper gegen ein Protein mit einer spezifischen Tag- Antigen Struktur verwendet. Auf diese Art und Weise kann man Protein- Protein- Wechselwirkungen in vivo nachweisen.



- Ein immobilisierter Antikörper ist an eine beliebige Matrix gekoppelt
- Der Antikörper erkennt sein Antigen
- Hierdurch erfolgt eine spezifische Anreicherung dieses Antigens

Abb.10 : Schematische Darstellung der Immunpräzipitation [74]

9.4.2 Durchführung

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Immunpräzipitationen wurden mit dem „FLAG® Tagged Protein Immunoprecipitation Kit“ von Sigma® durchgeführt. Die Durchführung richtet sich im Großen und Ganzen nach dem mitgelieferten Protokoll [72]. Das Wirkprinzip des Sigma Kits beruht auf der Tatsache, dass ein FLAG Peptid (in diesem Fall: N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C), welches mit dem Zielprotein am N- oder am C- terminalen Ende fusioniert ist, detektiert wird. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die Proteine ihre Konformation und Funktion beibehalten können; durch den hydrophilen Charakter des FLAG- Peptids ist dieses auf der Proteinoberfläche lokalisiert und kann somit leichter von einem Antikörper gebunden werden. Der in dieser Arbeit verwendete p3XFLAG-CMV-13- Vektor ist bereits mit der kodierenden Sequenz für das FLAG- Peptid versehen. Die benutzten eukaryontischen Vektoren sind in Abb.11 noch einmal dargestellt.

Die Immunpräzipitation wird nun in folgenden Schritten durchgeführt:

- Zell Lyse
- Bindung des Antigens an einen spezifischen Antikörper
- Präzipitation des Antigen- Antikörper- Komplexes
- Waschen und Eluieren des Komplexes

Benutzte Vektoren:

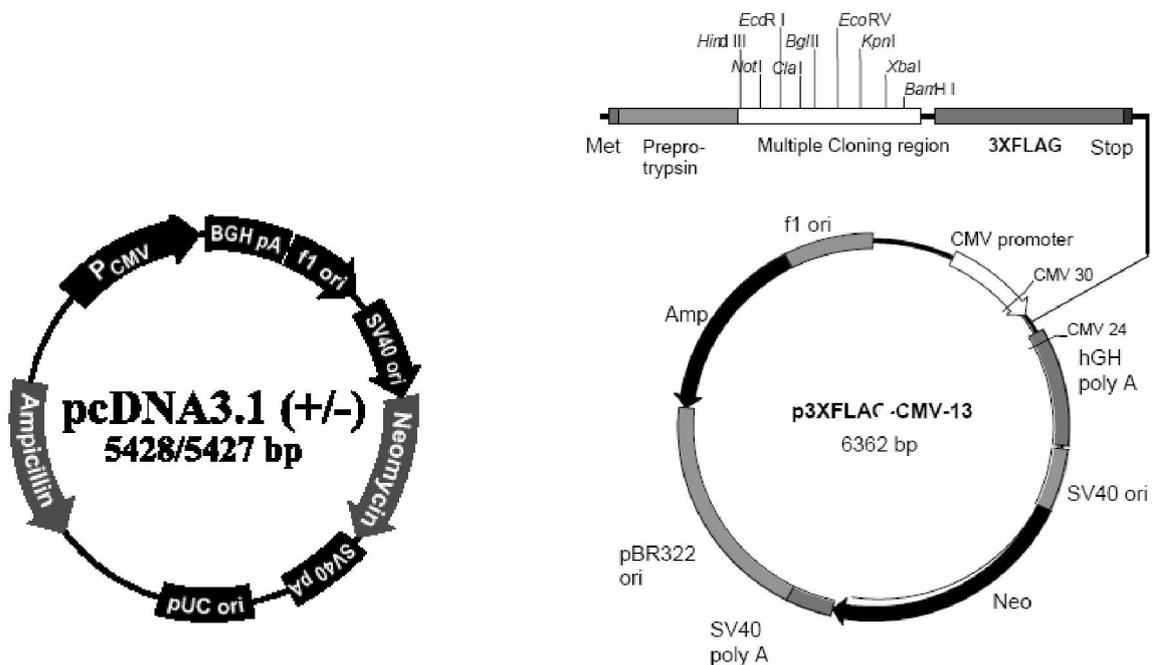


Abb.11 : pcDNA 3.1 Vektor [69]

p3XFLAG-CMV-13- Vektor (Sigma®) [73]

9.5 Methodenübersicht

- Proteinisolierung aus HEK- Zellen
- Gelelektrophorese (SDS Page)
- Elektrotransfer (Western Blot)
- Immunoblot (Antikörper gekoppelt)

Die Methoden sind detailliert unter III A 9.1 beschrieben.

B: Allgemeine Methoden der DNA- Klonierung

1. Bakterienstämme

Folgende Stämme von Escherichia coli wurden verwendet:

TOP10 One Shot™ [68]

F-mcrA Δ(mrr- hsaRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 garU garK rpsL endA1 nupG (Invitrogen)

Epicurian® Coli XL1- Blue Supercompetent Cells [59]

supE44 hsaR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac[F proAB lacI^qZΔM15 Tn10(tet)] (Stratagene)

2. Reagenzien

2.1 Puffer und Stammlösungen

Puffer/ Lösung	Präparation
CaCl ₂ 1M	110.9g in 1l A.d. lösen
DMSO 7% (v/v)	70ml DMSO mit A.d. auf 1l auffüllen
EDTA 0.5M, pH8	186.1 g/l A.d. mit 10N NaOH pH8 einstellen
Ethanol 70% (v/v)	700ml/ l A.d.
Ethidiumbromid-Stammlsg.	10mg/ ml A.d.
Gelatine 2% (w/v)	20g/ l A.d.
Glyzerol 10% (w/v)	100g/ l A.d.
Glyzerol 50% (v/v) in LB- Medium	500g mit LB-Medium auf 1l auffüllen

GEB-Ladepuffer 5x	50% Glyzerol, 100mM Na ₂ EDTA (pH8), 1%SDS, 0.1% Brom- phenol- Blau, 0.1% Xylen- Cyanol
IPTG-Stammlösung	200mg/ ml A.d., sterilfiltrieren, Aliquots bei -20°C lagern
Lysozym-Stammlösung	1g/ ml A.d., Aliquots bei -20°C lagern
Maltose 20% (w/v)	20g/ 100ml A.d., sterilfiltrieren
MgCl ₂ x 6 H ₂ O 1M	203.3 g in 1l A.d. lösen
MgSO ₄ x 7 H ₂ O 1M	246.5g in 1l A.d. lösen
Natriumacetat 3M, pH5.2	408.3g in 1l A.d lösen, pH 5.2 einstellen
NaCl 5M	292.2g in 1l A.d. lösen
NaOH 10N	400g in 1l A.d. lösen
PEG 3350, 50% (w/v)	50g PEG 3350 mit A.d. auf 100ml auffüllen, sterilfiltrieren
PCI (50:48:2)	50ml Phenol (neutralisiert mit Tris- HCl), 48ml Chloroform, 2ml Isoamylalkohol, bei 4°C lagern
SM-Puffer	5.8g NaCl, 2.0g MgSO ₄ * 7H ₂ O, 50ml Tris- HCl (1M, pH7.5), 5ml 2% (w/v) Gelatine, mit A.d. auf 1l auffüllen
SDS 10% (w/v)	100g/ l A.d.
SSC-Puffer 20x, pH7	175.3g NaCl, 88.2g Natriumcitrat, 800ml A. d., mit 10 N NaOH auf pH7.0, mit A.d. auf 1l auffüllen
STE-Puffer 10x	1M NaCl, 200mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM EDTA
TAE-Puffer 50x, pH8.5	242g Tris, 57.1ml Essigsäure, 100ml 0.5M EDTA, mit A.d. auf 1l, pH 8.5
TE-Puffer 10x	100mM Tris, pH7.4, 10mM EDTA
Tris-HCl 1M, pH7.5; pH8; pH9.5	121.1g/1l A.d., gewünschten pH mit 37% HCl einstellen
X-Gal-Stammlösung	20mg in 1ml Dimethylformamid lösen, sterilfiltrieren, Aliquots bei -20°C lagern

Tab. 4: Puffer- und Stammlösungen

2.2 Antibiotika- Stammlösungen

Ampicillin (Amp)	50mg / ml in H ₂ O lösen, sterilfiltrieren, Aliquots bei -20°C lichtgeschützt lagern, Arbeitskonzentration 50- 100µg/ ml
Kanamycin (Kana)	10mg/ ml in H ₂ O lösen, sterilfiltrieren, Aliquots bei -20°C lichtgeschützt lagern, Arbeitskonzentration 10- 50µg/ ml

Tab.5: Antibiotika- Stammlösungen

Dies sind nur die wichtigsten, bzw. die gebräuchlichsten Reagenzien. Weitere verwendete Lösungen werden direkt bei der Methodik angegeben.

3. Bakterien- Medien

3.1 Festmedien

LB Agar (1l)	10g NaCl, 10g Trypton, 5g Hefe Extract, 20g Agar, mit A.d. auf 1l auffüllen, mit 5N NaOH pH7.0 einstellen, autoklavieren
LB- Ampicillin Agar (1l)	1l LB Agar, autoklavieren, abkühlen auf 55°C, 50mg filtersterilisiertes Ampicillin zugeben
LB- Kanamycin Agar (1l)	1l LB Agar, autoklavieren, abkühlen auf 55°C, 50mg filtersterilisiertes Kanamycin zugeben
LB Agar für Blau-Weiß-Selektion	1l LB Agar, autoklavieren, abkühlen auf 55°C, 200µl IPTG- Stammlösg.und 2ml X- Gal zugeben, mischen
NZY Agar (1l)	5g NaCl, 2g MgSO ₄ *7 H ₂ O, 5g Hefe Extrakt, 10g NZ Amin (Casein Hydrolysat), 15g Agar, mit A.d. auf 1l auffüllen, mit NaOH auf pH7.5 einstellen, autoklavieren

Tab.6: Festmedien

Für die Herstellung von Agarplatten werden etwa 25ml/ 100mm-Petrischale autoklavierter und auf 55°C abgekühlter Agar verwendet. Anschließend werden die Platten mindestens 30min unter der Sterilbank getrocknet.

3.1.1 Kultur auf Festmedium

Es werden Verdünnungsausstriche von Glycerinkulturen oder Einzelkolonie-Suspensionen angefertigt. Die Platten werden anschließend über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2 Flüssigmedien

LB- Medium (1l)	10g NaCl, 10g Trypton, 5g Hefe-Extrakt, mit A.d. auf 1l auffüllen, mit 5N NaOH pH7 einstellen, autoklavieren
LB- Ampicillin Medium (1l)	1l LB Medium, autoklavieren, auf 55° C abkühlen, 50mg filtersterilisiertes Ampicillin zugeben
LB- Kanamycin Medium (1l)	1l LB Medium, autoklavieren, auf 55°C abkühlen, 50mg filtersterilisiertes Kanamycin zugeben
NZY Medium (1l)	5g NaCl, 2g MgSO ₄ *7 H ₂ O, 5g Hefe Extrakt, log NZ A-min (Casein Hydrolysat), mit A.d. auf 1l auffüllen, mit NaOH auf pH7.5 einstellen, autoklavieren
SOB Medium (1l)	20g Trypton, 5g Hefe Extrakt, 0.5g NaCl, mit A.d. auf 1l auffüllen, autoklavieren, danach zugeben: 10ml 1M MgCl ₂ , 10ml 1M MgSO ₄ , filtersterilisieren
SOC Medium (100ml)	100ml SOB Medium, 1ml 2M (40%) Glukoselösung zugeben, sterilfiltrieren

Tab.7 : Flüssigmedien

3.2.1 Kultur in Flüssigmedium

Je nach Zielsetzung werden 5ml (im Reagenzglas) oder 50ml (im 250ml Erlenmeyerkolben) Kulturmedium mittels Impföse oder sterilem Zahnstocher mit einer Einzelkolonie beimpft. Die Inkubation erfolgt in der Regel im Schüttler (ca. 230rpm) bei 37°C über Nacht.

3.2.2 Messen der Zelldichte

Über die Messung der OD_{600} einer Bakteriensuspension lässt sich mit dem Spektrophotometer die Zelldichte abschätzen. Als Nullwert wird die OD_{600} des verwendeten Kultur- oder Suspensionsmediums bestimmt. Eine $OD_{600} = 1$ entspricht etwa 0.8×10^9 Zellen/ml Medium. Für die meisten Anwendungen werden die Zellen bis zum Beginn der Sättigungsphase (Zelldichte etwa $1-2 \times 10^9$ Zellen/ml) wachsen gelassen.

3.2.3 Anlegen einer E. coli- Glyzerinkultur

In einem 1.5ml Eppendorfgefäß werden 500µl einer E. coli Übernachtskultur mit 100µl Glycerin (in LB-Medium) gut gemischt und anschließend bei -70°C gelagert.

4. Vektoren

4.1 pCR4.0- Vektor



Abb. 12: pCR4.0 Vector [66]

5. Agarose- Gelelektrophorese

Prinzip der Methode

Diese Methode ermöglicht die Trennung von DNA- Fragmenten verschiedener Größe. Sie beruht auf den Wanderungseigenschaften elektrisch geladener Moleküle in einem elektrischen Feld konstanter Spannung. Bei der Agarose- Gelelektrophorese wird der Molekularsiebeffekt der Gelmatrix genutzt, um die negativ geladenen DNA-Fragmente während ihrer gerichteten Wanderung von der negativen zur positiven Elektrode in Abhängigkeit von ihrer Größe aufzutrennen. Die pro Zeiteinheit zurückgelegte Wegstrecke ist dabei etwa proportional zum dekadischen Logarithmus der Fragmentlänge. Die Wahl der geeigneten Agarosekonzentration ermöglicht eine Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 0.1 kb bis 60 kb.

Agarosekonzentration (%)	aufgetrennter Größenbereich (bp)
0.3	5000 bis 60000
0.6	1000 bis 20000
0.8	800 bis 10000
1.0	400 bis 8000
1.2	300 bis 7000
1.5	200 bis 4000
2.0	100 bis 3000

Tab.8: Trennungsbereiche von Agarosegelen [35]

Material

Strom/Spannungs- Netzgerät, Elektrophoresekammer, Kamm, SeaKem® GTG® Agarose (Biozym), Laufpuffer TAE Ix, Gelladepuffer GEB Ix, Längenstandards (je nach Fragestellung: 1kb- Leiter (Invitrogen), Marker VIII (Roche)), jeweils mit der Konzentration 100ng/µl.

Durchführung

Die Agarose wird in Ix TAE aufgekocht, bis sie sich vollständig gelöst hat. Die Lösung ist dann klar und schlierenfrei. Nach Abkühlen auf Handwärme wird in der Gelkammer das 0.3 bis 0.5 cm dicke Gel gegossen, wobei ein an der Gelkammer befestigter spezieller Kamm, die Ausbildung der Gelladetaschen ermöglicht. Das feste Gel wird in die Elektrophoresekammer überführt, nachdem der Kamm entfernt wurde. Anschließend wird die Kammer mit Laufpuffer gefüllt und das Gel beladen. Es wird eine Spannung zwischen 25-150 V angelegt.

6. Färbung und Auswertung von DNA- Agarosegelen

Prinzip der DNA-Färbung mit Ethidiumbromid

Der Farbstoff Ethidiumbromid besteht aus aromatischen planaren Kationen, die mit der DNA interkalierend binden. Dabei wird die Fluoreszenz im UV- Bereich im Vergleich zum freien Farbstoff verstärkt und die DNA leuchtet orangerot auf. Durch Anfärben mit Ethidiumbromid lassen sich im Gel noch Mengen von nur 50ng DNA sichtbar machen.

Material

EtBr- Färbelösung [100µl Stammlösung (conc.: 10mg/ml) in 1l A.d.], UV- Leuchttisch, Polaroid- Sofortbildkamera, Polaroid- Sofortbildfilm (ISO 3000/36°)

Durchführung

Nach der Elektrophorese wird das Gel mit A.d. gespült und anschließend 20 min in EtBr gefärbt. Danach wird das Gel 10 min gewässert. Die Auswertung erfolgt auf dem UV- Leuchttisch. Zur Dokumentation können die Ergebnisse mit der Polaroid- Sofortbildkamera fotografiert werden (Belichtungszeit: 1s, Blende: 8).

7. Isolierung von DNA- Fragmenten aus Agarose- Gelen

Material

GFX Mikro- Spin Zentrifugenfilter (Pharmacia©), UV-Leuchttisch (302 nm), Skalpell

Durchführung

Das gefärbte Agarose- Gel wird auf dem UV- Transilluminator bei schwacher UV- Intensität ausgewertet, und die gewünschte Bande wird zügig mit einem sterilisierten Skalpell herausgeschnitten. Das DNA- haltige Agaroseblöckchen wird anschließend in ein 1.5ml Eppendorfgefäß überführt. Jetzt wird das Agarosestückchen, welches

die DNA beinhaltet, gewogen. Je 100 mg werden 300µl Capture Puffer zugegeben. Nach kräftigem vortexen wird die Probe 5 - 15 min bei 60°C inkubiert, bis die Agarose sich aufgelöst hat. Jetzt wird die Probe auf eine Mikro- Spin Säule pipettiert und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Mikro- Spin Zentrifugenfilter (im Eppendorfgefäß) zügig in eine Tischzentrifuge gestellt. Es wird 30s bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Lösung wird verworfen und der Mikro- Spin Filter wird in ein neues Gefäß gestellt. Jetzt wird 500µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und wieder bei voller Geschwindigkeit 30s zentrifugiert. Danach überführt man die Säule in ein frisches Eppendorf- Gefäß und pipettiert 50 µl Elutionspuffer (10mM Tris- HCL, pH 8.0) auf die Säule. Nach einer Minute Inkubationszeit bei RT wird 1 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befindet sich am Boden des Eppendorfgefäßes die DNA- haltige Lösung, aus der mittels Natriumacetat/ Ethanol- Präzipitation die DNA gefällt wird.

8. DNA- Fällung (Natriumacetat / Ethanol- Methode)

Prinzip der Methode

Die DNA- Fällung mittels Natriumacetat und Ethanol beruht auf der kombinierten Wirkung von Aussalzeffekt (durch Natriumacetat) und Herabsetzung der Solvatationskraft des Lösungsmittels durch die niedrige Dielektrizitätskonstante des wasserlöslichen Ethanol. Die Salzionen konkurrieren mit der DNA um die solvatisierenden Lösungsmittelmoleküle, so dass ab einer bestimmten NaAc- Konzentration nicht mehr genügend Wasser/ Ethanolmoleküle zur Verfügung stehen, um die DNA in Lösung zu halten. Damit steigen die Wechselwirkungen zwischen den DNA-Molekülen und die DNA fällt aus.

Material

Natriumacetat 3M (pH5.2), Ethanol 100% und 70%, TE- Puffer, Isopropanol 100%

Durchführung

Die DNA-Lösung wird mit 1/10 Vol. NaAc (3M) und 2.5 Vol. Ethanol (100%) gemischt und etwa 20min bei -70°C (oder 1-2h bei -20°C) gefällt. Danach wird 15 - 30min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15min, 14000rpm, 4°C). Der Überstand wird dekantiert und das DNA- Pellet im Vakuum getrocknet. Die DNA kann in einem geeigneten Volumen TE (1x) oder H₂O gelöst und bei -4°C (in TE) oder -20°C (H₂O) gelagert werden.

Alternativ kann die DNA mit 1 Vol. Isopropanol 100% gefällt und anschließend, wie oben angegeben, weiterverarbeitet werden.

9. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI)-Extraktion

Prinzip der Methode

Mit der PCI- Extraktion lassen sich DNA- Lösungen von Verunreinigungen aus Proteinen oder Agarosebestandteilen reinigen. Nach gründlichem Mischen der DNA- Lösung mit PCI und anschließender Zentrifugation befindet sich die (wasserlösliche) DNA in der wässrigen Phase, während sich Proteine und andere Verunreinigungen an der Grenzfläche zwischen wässriger (oberer) und organischer (unterer) Phase ansammeln.

Material

Phenol- Chloroform- Isoamylalkohol (PCI), Mischungsverhältnis 50:48:2

Durchführung

Die DNA- Lösung wird mit 1Vol. PCI gemischt (das Volumen der DNA- Lösung sollte nicht weniger als 100µl betragen), etwa 10s gründlich gevortext und anschließend ca. 1min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert. Danach wird die obere (wässrige), DNA- hal-

tige Phase vorsichtig abpipettiert, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und begutachtet. Sollte nach der PCI- Extraktion die abgenommene wässrige Phase noch sichtbare Verunreinigungen aufweisen, wird die Extraktion wiederholt. Aus der gereinigten Lösung wird die DNA gefällt.

10. Präparation und Reinigung von Plasmid- DNA

Prinzip der Methode

Die Präparation der Plasmid- DNA erfolgt mittels alkalischer Lyse. Die geernteten und resuspendierten Bakterienzellen werden in einer Lösung aus NaOH und SDS, in Gegenwart von RNase A (baut die freigesetzte RNA ab) lysiert. SDS, das Phospholipide und Proteine der Zellmembranen herauslöst, führt zur Lyse der Zellen, während NaOH lineare chromosomale DNA, sowie Proteine denaturiert. Die kleinere Plasmid- DNA in ccc (covalently closed circular) Form unterliegt dagegen bei optimierten Bedingungen kaum einer Denaturierung. Das alkalische Lysat wird durch Zugabe von saurem Kaliumacetat neutralisiert. Durch den erhöhten Salzgehalt beginnt SDS zu präzipitieren und schwerlösliche Komplexe mit Zelltrümmern, denaturierten Proteinen und chromosomaler DNA zu bilden, die sich leicht abzentrifugieren lassen. Da die kleinere cccPlasmid- DNA in Lösung bleibt, lässt sie sich mit dem Überstand leicht von der chromosomalen DNA (im Pellet) trennen. Mit einem makroporösen Anionenaustauscher, der selektiv Nukleinsäuren von anderen Substanzen wie Proteine, Kohlenhydrate oder Farbstoffe trennt, wird die Plasmid- DNA aufgereinigt. Zunächst wird die DNA bei niedriger Ionenstärke gebunden. Durch schrittweises Waschen und Eluieren mit Puffern steigender Ionenstärke werden kontaminierende Substanzen beseitigt. Mit einem Puffer hoher Salzkonzentration (1.25M NaCl, pH8.5) wird schließlich die DNA von der Säule gelöst und eluiert. Die DNA- Fällung erfolgt mit Isopropanol.

Material

Puffer	Chemikalien	Präparation (für 1l)
P1 (Resuspension)	Tris-HCl, EDTA, RNase	6.06 Tris (50mM) und 3.72g EDTA (10mM) in 800ml H ₂ O lösen, mit HCl pH8 einstellen, 100µg/ml RNase zugeben,
P2 (Lyse)	NaOH, SDS	8.0g NaOH (200mM) in 950ml H ₂ O lösen, 50ml 20%SDS zugeben
P3 (Neutralisation)	Kaliumacetat	294.5g KAc (3M) in 500ml H ₂ O lösen, mit Essigsäure pH5.5 einstellen, Volumen mit H ₂ O auf 1l bringen
QBT (Equilibrierung)	NaCl, MOPS, Ethanol, Triton X-100	43.83g NaCl (750mM) und 10.46g MOPS (50mM) in 100ml H ₂ O, pH 7 einstellen, 150ml 100% EtOH und 15ml 10% Triton X-100 zugeben, mit H ₂ O auf 1l bringen
QC (Waschen)	NaCl, MOPS, Ethanol	58.44g NaCl (1M) und 10.46g MOPS (50mM) in 800ml H ₂ O, pH 7 einstellen, 150ml 100% EtOH zugeben, mit H ₂ O auf 1l bringen
QF (Elution)	NaCl, Tris-HCl, Ethanol	73.05g NaCl (1.25M) und 1.21g Tris (50mM) in 800ml H ₂ O lösen, mit HCl pH8.5 einstellen, 150ml 100% EtOH zugeben, mit H ₂ O auf 1l bringen

Tab.9: Puffer für Plasmid- Isolation (Alkalische Lyse)

Weiteres Material:

1x TE, 100% Isopropanol, 70% Ethanol, Faltenfilter, Anionen- Austauscher- Säulen (z.B. von QIAGEN: QIAprep spin column; Quiagen- tip 20, 100 oder 500.)

Die Plasmid- Präparation und Reinigung wurde in der Regel mit den folgenden Kits von QIAGEN®: QIAprep Spin Plasmid Kit; MINI-, MIDI-, MAXI- Kit oder Pharmacia® Biotech inc.: GFX Mikro Plasmid Prep Kit durchgeführt.

Durchführung

Hier wird nur das Protokoll für die Midi- Präparation (QIAGEN) [71] angegeben. Weitere Protokolle finden sich in den Broschüren zu den jeweiligen Kits. Etwa 50ml einer Übernachtskultur werden 15min bei 6000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Bakterienpellet in 4ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2, wird vorsichtig gemischt (Tubes invertieren, nicht vortexen) und 5min bei RT inkubiert. Danach werden 4ml Puffer P3 (eisgekühlt) zugesetzt und die Lösungen erneut durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach 15min Inkubation auf Eis, wird 30min bei 20000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird durch ein befeuchtetes Faltenfilter filtriert und auf eine Anionen- Austauscher- Säule (QIAGEN-tip 100) gegeben, die mit 4ml QBT-Puffer equilibriert wurde. Das Bakterien- Pellet wird verworfen. Nachdem der Überstand durch die Säule gelaufen ist, wird mit 2x 10 ml QC-Puffer gewaschen und anschließend die DNA mit 5ml QF-Puffer eluiert. Die Fällung der Plasmid- DNA erfolgt durch Zugabe von 0.7 Vol. (3.5 ml) raumtemperiertem Isopropanol. Es wird sofort für 30min bei 15000x g und 4°C zentrifugiert. Das DNA- Pellet wird mit 2ml 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert (4°C, 15000x g, 10min), getrocknet und in TE oder H₂O gelöst.

11. DNA- Restriktion

Prinzip der Methode

Für den Restriktionsverdau von DNA werden Restriktions- Enzyme verwendet. Sie spalten DNA an einer spezifischen Stelle innerhalb einer meist palindromischen Erkennungssequenz. Je nach Enzym können dabei glatte (blunt)- oder überhängende (sticky) Enden entstehen.

Material

Restriktionsenzyme (z.B. von Roche[®]) Enzym-Puffer (wird vom Hersteller des Enzyms mitgeliefert)

GEB-Ladepuffer 5x

Durchführung

Die Restriktion erfolgt nach den Angaben der Hersteller. Es wird 1-2h inkubiert. Danach wird die Reaktion abgestoppt (10min bei 65°C). Für weitere Restriktionen in anderen Puffern muss zunächst eine PCI- Extraktion mit DNA- Fällung durchgeführt werden. Zur Analyse mittels Gelelektrophorese wird der Restriktionsansatz mit 0.2 Vol GEB-Ladepuffer gemischt.

12. Dephosphorylierung

Prinzip der Methode

Die SAP (Shrimp Alkalische Phosphatase) katalysiert die Dephosphorylierung des freien 5' -Phosphat von DNA und RNA. Sie ist an 5'- überhängenden und 5'- rezessiven, als auch an glatten Enden aktiv. Linearisierte Klonierungsvektoren mit gleichen Enden (blunt oder sticky) werden vor der Ligationsreaktion dephosphoryliert, um den Anteil rezirkulierter Vektoren (ohne Insert) zu senken und somit die Ausbeute an rekombinanten Vektoren zu erhöhen. Die für die Ligation notwendigen 5'- Phosphatgruppen können nach der Phosphatase- Behandlung nicht mehr von den Vektor- Enden, sondern nur vom zu klonierenden Insert- Fragment geliefert werden.

Material

Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) von Roche[®] Dephosphorylierungspuffer für SAP (wird mit Enzym geliefert)

Durchführung

Die Dephosphorylierung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt oder nach folgendem Protokoll: Der Vektor- Verdau (10µl oder 15µl mit 1µg Vektor) wird mit 10µl 5x Dephosphorylierungspuffer und 3µl SAP versetzt, mit A.d. auf 50µl aufgefüllt, gemischt und anschließend 30min (sticky ends) oder 60min

(blunt ends) im 37°C Wasserbad inkubiert. Danach wird die SAP 15min bei 65°C inaktiviert.

13. Ligation

Prinzip der Methode

Die T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiester- Bindung zwischen einer 3'- Hydroxylgruppe und einer 5'- Phosphatgruppe. Bei der Ligation von sticky oder blunt ends werden zwei Phosphodiester- Bindungen gebildet. Die Reaktion ist ATP abhängig. Je nach DNA- Konzentration können zirkuläre oder konkatemere Ligationsprodukte entstehen.

Material

Für alle durchgeführten Ligationen wurde der "Rapid DNA Ligation Kit" von Roche® verwendet. Er enthält T4- DNA- Ligase, DNA- Dilution- Buffer und Ligations-Buffer.

Durchführung

Die Ligation wird nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Es werden etwa 50ng Vektor und 150ng Insert eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde 5-30min bei RT inkubiert.

14. Transformation von E. coli

Prinzip der Methode

Plasmid- DNA wird zur Bakteriensuspension gegeben und tritt mit den Zellen in Wechselwirkung. Durch Hitzeshock kann die DNA effektiv in die Bakterien eindringen. Zunächst werden die Zellen unter nicht- selektiven Bedingungen wachsen gelassen, um die Synthese der Plasmid- kodierten Antibiotika- Resistenz- Faktoren zu ermöglichen. Durch anschließende Ausplattierung auf antibiotikahaltigen Agarplatten werden die Kolonien identifiziert, die Plasmide enthalten.

Material

E. coli TOP10 One Shot™ (Invitrogen®), Eis, Wasserbad 42°C, SOC Medium, LB Agar- Platten mit geeignetem Antibiotikum

Transformation von käuflich erhältlichen kompetenten Zellen

OneShotTOP10 Competent Cells (INVITROGEN®)

Epicurian Coli XL1-Blue Supercompetent Cells (STRATAGEN®)

Transformation (nach Strathern, 1991 [53])

50µl der kompetenten Zellen werden mit 1 – 3 µl Plasmid- DNA im eisgekühlten Eppendorfgefäß gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der Hitzeschock (45s im 42°C Wasserbad). Nach 2min auf Eis wird 200µl SOC- Medium zu den Zellen gegeben und danach etwa 1h bei 37°C und 250rpm geschüttelt. Es werden Aliquots von 50- 250µl auf LB- Agar mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

15. Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)**Prinzip der Methode**

Die PCR ermöglicht die selektive Amplifikation eines DNA- Abschnittes. Sie basiert auf der Denaturierung eines doppelsträngigen DNA- Templates, so dass spezifische Oligonukleotide (Primer) an entsprechende homologe DNA- Bereiche binden können. Diese Primer werden von einer DNA- abhängigen DNA- Polymerase bei Anwesenheit freier Desoxynukleotid- Triphosphate verlängert. Mit einem Thermocycler und einer hitzestabilen DNA- Polymerase, lässt sich die DNA in wiederholten Zyklen von Denaturierung, Primer- Anlagerung (Annealing) und Synthese (Elongation) exponentiell amplifizieren.

Material

Thermocycler, Taq- Polymerase (PHARMACIA®), 10x Taq- Puffer (PHARMACIA®), dNTP- Mix (je 1mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5'- und 3'- Primer (synthetisiert von

INTERAKTIVA[®] Biotechnologie GmbH, Ulm), Two PCR- Kit, Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg (Die Zusammensetzung der Kit- Komponenten ist im Kit- Handbuch angegeben).

Verwendete Primer:

SH3THSFor: 5'-GCC ATG GAT CAG TTA GCC CTT GAA CAG C-3' NcoI

SH3THSRev: 5'-CGA ATT CCT ACC CTT CAG TGA GAA AG-3' Eco RI

Flag- Tag (Eco): 5'-GTA CGA ATT CCT ACC CTT CAG TGA GAA AGC CTG-
3' Eco RI

Flag- Tag (Not): 5'-AGC TTG CGG CCG CGC AGT TAG CCC TTG AAC AGC-3'
Not I

15.1 PCR- Ansatz bei Gebrauch der Taq- Polymerase von Pharmacia

In ein 200µl PCR-Gefäß werden 10ng Template- DNA, jeweils 50µmol forward und reverse Primer, 10µl 10x Taq- Puffer, 2µl dNTP- Mix (10mM dNTPs) und 0.5µl Taq- Polymerase gegeben. Es wird anschließend auf 100µl mit A.d. aufgefüllt und gemischt. Danach wird das Gefäß in den auf etwa 80°C vorgeheizten Thermocycler gestellt und das PCR- Programm gestartet.

PCR- Programm

Die PCR wurde vollautomatisch in dem PCR- Automat (Perkin Elmer, GeneAmp PCR-System 9600) durchgeführt. Dabei fand das folgende Programm Anwendung:

- I. 94°C, 2min
- II. 35 Zyklen: 94°C, 30s
60°C, 30s
72°C (60s/ kb), 2min,
- III. 72°C, 10min,
- IV. kühlen bei 4°C

Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem "QIAquick PCR Purification Kit" von QIAGEN. Dieser Kit erlaubt die Entfernung von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzionen aus dem PCR-Reaktionsansatz mittels Säulenchromatographie. Die DNA wurde mit 30µl A.d. eluiert. Weitere Angaben zu Material und Durchführung sind dem Kit- Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

16. DNA- Sequenzierung

Prinzip der Methode

DNA wird nach dem Prinzip des Kettenabbruchs durch zufälligen Einbau von Nukleotid Derivaten (Sanger- Methode) sequenziert. Ein spezifischer Oligonukleotid- Primer, der sich an das denaturierte DNA-Template angelagert hat, wird von einer DNA- abhängigen DNA- Polymerase solange verlängert, bis zufällig ein Desoxy- nucleotid eingebaut wird. Diese Nukleotid- Derivate besitzen anstelle der 3'- Hydroxylgruppe ein Wasserstoffatom, das die Bildung einer Phosphodiesterbindung mit dem nächsten Nukleotid verhindert. Somit wird die DNA- Synthese nach Einbau des Derivats (chain terminator) abgebrochen. Die Sequenzierung wird im Thermocycler nach der Methode des DNA- Cycle- Sequencing unter Verwendung von Fluoreszenz- markierten Nukleotidderivaten durchgeführt. Die Analyse erfolgt mit einem Sequenzierungsautomaten.

Material

Thermocycler, 200µl PCR- Gefäße, "Dye Terminator Cycle- Sequencing"-Kit von PE Applied Biosystems[®], Sequenzierungs- Primer (1pmol/µl), Template- DNA, Eis, 3M NaAc (pH5.2), Ethanol 100% und 70%

Sequenzierungsprimer

GAL4BD- Primer (für pAS2-1, pGBT9): 5'- TCA TCG GAA GAG AGT AG- 3'

GAL4AD- Primer (für pACT-2): 5'- TAC CAC TAC AAT GGA TG- 3'

pACT2Rev: 5'-TCG TAG ATA CTG AAA AAC CCC GCA AGT TCA C-3'

pACT2For: 5'-CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CC-3'

Intseq1: 5'-GAC TAC AAA GAC CAT GAC GGT G-3'

Intseq2: 5'-CGT AGG AGA ACC TGG TTG GCT T-3'

Intseq3: 5'-AGG TGC ATG GAG GAA GAG GAT G-3'

Intseq4: 5'-GCA AGG AGA GTT ACA GGC CAG A-3'

Sequenzierungsansatz

In ein 200µl PCR- Gefäß werden 800ng Template- DNA (in maximal 8.8µl H₂O), 3.2µl Sequenzierungs-Primer (1pmol/µl) und 8µl Reaktionsmix (mit DNA- Polymerase) gegeben. Es wird mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt und gemischt. Die Reaktionsgefäße werden bis zum Start des Sequenzierungsprogramms auf Eis gestellt.

16.1 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte automatisch mit dem PCR-Automat (Perkin Elmer, GeneAmp PCR-System 9600) nach folgendem Programm:

- I. 25 Zyklen: 96°C, 10s
50°C, 5min
60°C, 3min
- II. 4°C, keine Zeitbegrenzung

Nach der Sequenzierung wird die DNA mit NaAc/Ethanol präzipitiert, gewaschen und danach das DNA- Pellet getrocknet. Die Inkubation der Fällung bei -70°C bzw. -20°C entfällt, um das Ausfällen von Salzen (stören bei der automatischen Sequenzanalyse) zu vermeiden. Die Sequenz wurde automatisch bestimmt.

C: Konstruktion der Intersectin 2- cDNA

1. Isolation von Gesamt- RNA aus HEL- Zellen und humanem Gewebe

Prinzip der Methode

Um intakte RNA aus Gewebe zu isolieren, kombiniert man die selektiven Bindungseigenschaften einer Membran, basierend auf einem Silica- Gel, mit der Geschwindigkeit der Mikrospin- Technologie. Durch spezielle hoch salzhaltige Puffer kann man bis zu 100µg RNA (länger als 200 Basen) an die Silica- Gel Membran binden. Die RNA wird dann gewaschen und später in 30µl eluiert.

Material

Die RNA- Isolation wird mit dem „RNeasy Kit“ von Qiagen© durchgeführt. Entscheidend ist hierbei der GITC (guanidin isothiocyanat) haltige Puffer, der die Gewebeprobe lysiert, homogenisiert und die RNasen inaktiviert.

Durchführung

Mit dem RNeasy- Kit können maximal 1×10^7 Zellen bearbeitet werden. Das Zell- Pellet wird mit 600µl RLT Puffer (GITC- haltig) lysiert. Das Eppendorf- Gefäß wird gevortext, um das Pellet mit dem Puffer zu mischen. Das Lysat wird direkt auf eine „QIA shredder“ Säule aufgetragen und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um es zu homogenisieren. Dem homogenisierten Lysat wird 600µl 70% Ethanol zugegeben. Bis zu 700µl der Probe können jetzt auf eine RNeasy Säule mit der silica- Membran aufgetragen werden. Nach 15s zentrifugieren (>10000 rpm) werden 700µl Waschpuffer RW1 auf die Säule gegeben und wieder 15s zentrifugiert. Dieser Schritt wird noch zweimal mit 500µl RPE- Puffer wiederholt. Schließlich wird 30- 50µl RNase freies Wasser direkt auf die getrocknete Silica- Membran gegeben und 1 min zentrifugiert, um die gereinigte RNA zu eluieren.

2. Formaldehyd- RNA- Agarose- Gel

Prinzip der Methode

Im Formaldehyd- Agarose- Gel werden die RNA- Moleküle unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Vor dem Beladen des Gels wird die RNA bei 65° denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen.

Material:

MOPS Puffer 10x (1l)	200 mM MOPS [(N- morpholino) Propan- Sulfonsäure] (41.8g), 50 mM NaAc (6.8g), 10mM EDTA (3.7g) in 1l A.d. lösen, pH 7.0 mit NaOH- Plätzchen (ca. 30 Stück) einstellen, sterilfiltrieren, lichtgeschützt aufbewahren
Formaldehyd- Agarose Gel (1%) (50 ml)	0.5 g Agarose in 47 ml 1x MOPS lösen (aufkochen bis schlierenfrei), auf 60° C abkühlen (Wasserbad), danach 3 ml Formaldehyd dazu, mischen, unter Abzug gießen
Formaldehyd- Ladepuffer (je RNA Probe)	10µl Formamid, 3.5 µl Formaldehyd, 2 µl 10x MOPS, 1 µl Ethidiumbromid (10µg/µl), 2 µl Bromphenolblau (gesättigte Lösung in A.d.), 2 µl steriles Glycerol

Tab.10: Lösungen für Formaldehyd- Agarose- Gel

Benötigt wird außerdem: Eis, Wasserbad 65° C

Durchführung

Etwa 2- 3 µg RNA- Probe wird mit dem RNA- Ladepuffer gemischt und 10 min im 65° C Wasserbad denaturiert. Dann kommt die Probe auf Eis. Um die erneute Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden, wird das Formaldehyd- Gel möglichst zügig beladen. MOPS 1x dient als Laufpuffer. Als Größenmarker wird E. coli 16s- und 23s- rRNA (wie die Proben behandelt) aufgetragen. Die Gel- Elektrophorese wird mit einer Spannung von 50- 100 Volt durchgeführt. Wenn die Bromphenolblau- Bande die Hälfte der Gellänge erreicht hat, wird das Gel mit A. d. gespült und danach mit dem UV- Transilluminator ausgewertet.

3. cDNA- Synthese aus Gesamt- RNA

Prinzip der Methode

Das Enzym Reverse Transkriptase kann in Gegenwart freier dNTPs RNA in komplementäre DNA (cDNA) umschreiben (RNA abhängige DNA- Polymerase). Die Synthese erfolgt von 5' nach 3', ausgehend von einem Oligo- dT- Primer, der an die Poly(A)- Sequenz der RNA hybridisiert ist. Danach erfolgt eine Degradation des RNA- Strangs durch RNase H. Jetzt wird durch eine DNA abhängige DNA- Polymerase der komplementäre DNA- Strang gebildet.

Material

Die cDNA- Synthese wurde mit dem „Omniscript Kit“ von Qiagen® durchgeführt. ES werden benötigt: Omniscript Reverse Transkriptase, dNTP- Mix, RNase freies Wasser, Eis, Wasserbad (37° C), Zentrifuge

Primer: oligo- dT Primer (Random Primer: zufällige Bindungsstellen)

Durchführung

Das Wasserbad wird auf 37° C erwärmt. Die folgenden Reagenzien werden aufgetaut und auf Eis gestellt: RNA- Template, Random Primer, 10x Puffer RT (Kit), dNTP Mix, RNase freies Wasser

Danach wird folgender Ansatz in ein Eppendorf- Gefäß pipettiert:

Komponenten	Volumen
Master Mix	
10x Puffer RT	2.0 µl
dNTP Mix (5mM jede dNTP)	2.0 µl
Oligo- dT Primer (10µM)	2.0 µl
RNase Inhibitor (10 units /µl)	1.0 µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1.0 µl
RNase freies Wasser	variabel
Template RNA	
Template RNA	Var., bis 2 µg
Totales Volumen	20 µl

Tab.11: cDNA Synthese mit dem OmniScript Kit

Nach dem Mischen des Mastermix wird dieser auf Eis gestellt. Anschließend wird das RNA Template in den Ansatz pipettiert, kurz gevortext und dann 5s zentrifugiert, um Reste von der Wand des Eppendorfgefäßes zu sammeln. Jetzt wird der Ansatz 1h im 37° C Wasserbad inkubiert.

4. Amplifikation der cDNA mit der PCR- Methode

Die Funktionsweise der PCR im Allgemeinen habe ich im Teil III B 15 erläutert. Hier wird nur das PCR- Programm für diese Amplifizierung angegeben. Durch die entsprechenden Primer wird nur das Stück des Intersectin 2- Gens mit den SH3- Gruppen amplifiziert.

Primer: ITSN SH3 FOR
 ITSN SH3 REV

PCR- Programm:

94°	1 min	prim. Denaturierung	
94°	10 sec	Denaturierung	(35 Zyklen)
53°	20 sec	Enhealing	
72°	2 min	Extension	
72°	10 min		
4°	∞	Aufbewahrung	

Tab.12: PCR Programm

5. Klonierung in den TOPO®- Kloning- Vektor

Dieser Schritt wird auch als Transformation in die kompetenten E. coli Zellen bezeichnet und ist im Teil Material und Methoden III B14 ausführlich erläutert. Er wird

durchgeführt, um genügend große Mengen der schon richtig geschnittenen DNA herzustellen.

6. Präparation und Reinigung der Plasmid- DNA

Diese Methode muss bei jeglicher Plasmid- DNA, die in Bakterienzellen enthalten ist angewendet werden, wenn die zu vervielfältigende DNA wieder isoliert werden soll. Sie ist ausführlich im Teil III B 10 beschrieben.

7. Restriktionsverdau u. Ligation von DNA und BD-Vektor

Auch diese Schritte werden im Teil III B 11 und 13 beschrieben. Es finden folgende Schritte statt:

- Behandlung mit Restriktionsenzymen
- Agarose- Gel Elektrophorese
- Gel Reinigung mit Pharmacia©- Kit
- Ligation

8. Transformation in E. coli (TOP10)

Nach der Ligation wird der fertige Bindungsdomäne- Vektor in chemisch kompetente E. coli Zellen transformiert, um genügend große Mengen des Vektors herzustellen. Die Transformation ist im Teil III B 14 erklärt.

9. Plasmidreinigung

Die Plasmidreinigung wird normalerweise mit dem Mini-, Midi-, oder Maxi- Kit von Qiagen durchgeführt. In diesem Fall wird der Midi Kit benutzt, um genügend große Mengen des Bindungsdomäne- Vektors herzustellen. Der genaue Ablauf ist im Teil III B 10 beschrieben.

IV. ERGEBNISSE

A: Konstruktion der ITSN 2- DNA und des ITSN 2- Bindungsdomänevektors

1. Übersicht

In dieser Arbeit wurde nur der Bereich von Intersectin 2 (1700 bp) benutzt, der die fünf SH3- Gruppen enthält, da diese Gruppen, wie schon in der Einleitung erwähnt, die höchste Bindungsaktivität auf andere Proteine entwickeln. Dieser Bereich ist in allen Isoformen enthalten, was bedeutet, dass die erzielten Ergebnisse sowohl für die kurze Isoform, als auch für die lange Isoform Gültigkeit besitzen.

Das Intersectin 2- Gen wurde aus HEL- Zellen (Human- Erythro- Leukaemia) bzw. aus menschlichen Nierengewebszellen in verschiedenen Schritten isoliert und dann wurde der entscheidende Abschnitt, der die fünf SH3- Gruppen enthält, in den Bindungsdomänevektor pGBKT7 des Yeast- Two- Hybrid Systems kloniert.

2. Die Konstruktion der ITSN 2- cDNA und des ITSN 2- BD- Vektors

- Isolation von Gesamt- RNA aus HEL- Zellen / menschlichen Nierengewebszellen
- cDNA- Synthese
- Amplifikation der cDNA mittels PCR
- Klonierung in den TOPO®- Klonung Vektor
- Sequenzierung der TOPO®- Klone um Mutationsvarianten auszuschließen
- Restriktionsverdau des Vektors pGBKT7 und Intersectin 2 mit Eco RI und Nco I und Ligation, Verifizierung der gelungenen Ligation

2.1 Isolation von Gesamt- RNA aus HEL- Zellen

Je Probe wurden etwa 1×10^7 Zellen für die Isolation der Gesamt- RNA mit dem RNeasy- Kit verwendet. Die isolierte Gesamt- RNA wird jeweils in 50 μ l A. d. gelöst. Anschließend wird die RNA Konzentration spektrophotometrisch bestimmt und Aliquots jeder RNA- Probe (1 – 3 μ l) mit einem Formaldehyd- Agarose- Gel analysiert.

2.2 cDNA- Synthese aus Gesamt- RNA

Mit Hilfe des „Omniscript Kit“ von Qiagen© wird aus den Gesamt- RNA Proben cDNA hergestellt. Hierfür wird ein PolyT- Primer eingesetzt.

2.3 Amplifikation der cDNA mit der PCR- Methode

Die PCR wurde mit spezifischen Primern durchgeführt, um den, für diese Arbeit wichtigen Abschnitt des Intersectin 2 zu vervielfältigen, welcher die fünf SH3- Gruppen enthält. Die Primer heißen ITSN SH3 FOR und ITSN SH3 REV, und wurden bei der Firma Interactiva synthetisiert.

Die PCR wurde nach der im Teil III C 4 beschriebenen Vorschrift (PCR- Programm) durchgeführt.

Hiernach wurden verschiedene PCR- Produkte zusammen mit einer Kb- Leiter in einem Agarose- Gel elektrophoretisch aufgetrennt, um zu überprüfen ob ein PCR- Produkt die gewünschte Länge von 1700 Basen hat. In der folgenden Abbildung wurde in dem PCR- Produkt eine Bande entsprechender Größe gefunden.

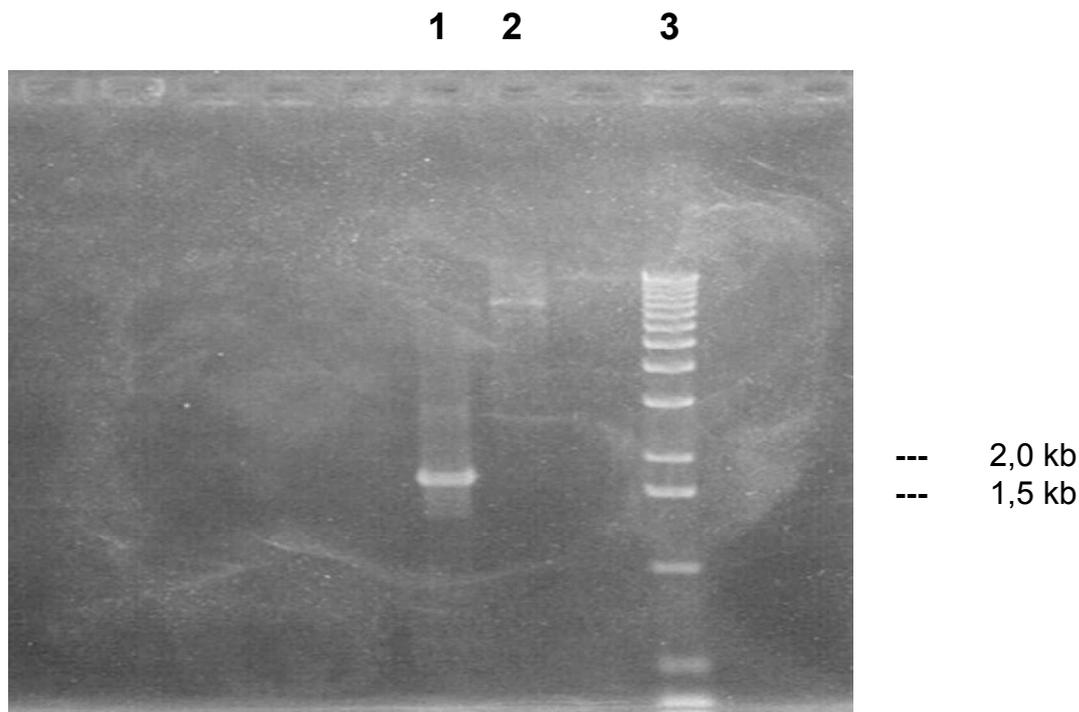


Abb.13: Agarose Gel mit PCR Produkten und Referenz kB Leiter

- 1: PCR Produkt mit 1,7 kB
- 2: leeres Produkt
- 3: kB Leiter

2.4 Klonierung in den Topo- Kloning- Vektor und Sequenz- überprüfung

Es wurden 3 µl des PCR- Produkts mit der 1,7 kb Bande nach der im Teil III B14 beschriebenen Vorschrift in einen Klonierungsvektor ligiert und in kompetente TOP 10 One Shot E. Coli transformiert.

Nach der Inkubationszeit von 12 Stunden wurden die Bakterien auf 2 LB- Platten ausplattiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden willkürlich 8 Stück, die alle das gewünschte Fragment von 1,7 kb enthalten sollten, ausgewählt und in LB- Kulturmedium angeimpft.

Um den Nachweis zu Erbringen, dass das gewünschte Fragment wirklich im Klonierungsvektor enthalten war, wurde von den 8 Kulturen ein Micro- Kit von Qiagen© zur

Plasmidisolierung und anschließend ein Restriktionsverdau mit Eco RI und Nco I durchgeführt. Die Proben wurden jetzt erneut elektrophoretisch aufgetrennt.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

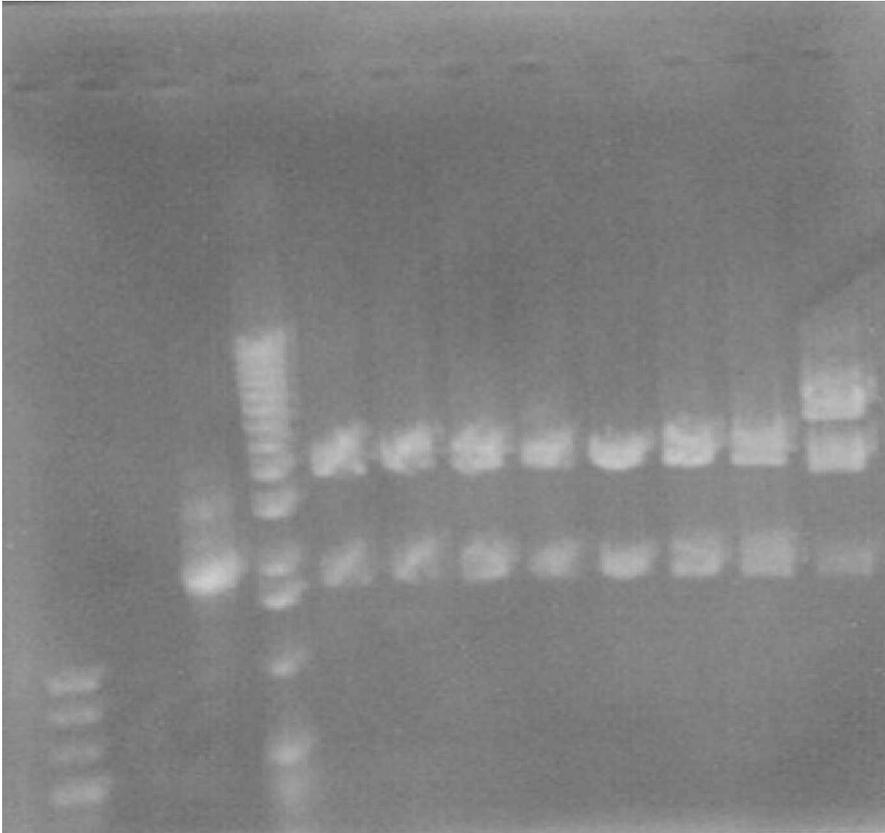


Abb.14: Agarosegel vom Restriktionsverdau des PCR Produkts im Topo Cloning Vektor (ITSN 2 in 3.1- 3.8)

1- 3: S1- S3, fremde Proben

4: kb Leiter

5- 12: Probe 3.1 bis 3.8 in aufsteigender Reihenfolge

Auf diesem Photo konnte man erkennen, dass alle 8 Proben (3.1- 3.8) ein Fragment von 1700 Basen beinhalteten.

2.5 Sequenzierung der Klone

Die 8 restriktionsenzymatisch überprüften Klone wurden jetzt sequenziert, um Mutationsvarianten auszuschließen. Hierfür muss erst photometrisch die Konzentration

der Lösungen bestimmt werden (siehe Tabelle 13), da nur mit maximal 600 ng Aliquots sequenziert werden kann.

Konzentrationsmessung:

Probenname	Konzentration	Sequenzierungsmenge
3.1	57 ng/µl	6,8 µl
3.2	49 ng/µl	6,8 µl
3.3	96 ng/µl	6 µl
3.4	80 ng/µl	6,8 µl
3.5	43 ng/µl	6,8 µl
3.6	58 ng/µl	6,8 µl
3.7	54 ng/µl	6,8 µl
3.8	59 ng/µl	6,8 µl

Tab.13: Aufgrund des Pipettiervorganges wurden die Mengen der DNA gerundet.

Bei der Sequenzierung der 8 Proben stellte der Klon 3.5 eine mutationsfreie Variante dar, d.h. es lag ein korrekter Readingframe vor. Deswegen wurde von dieser Probe ein Glycerolstock angelegt (hiervon wurde im weiteren Verlauf die Amplifizierung des Intersectin 2 durchgeführt). In der Regel wurde für die Vermehrung der Intersectin 2-Sequenz (im Plasmid), je nachdem welche Mengen benötigt wurden, ein Qiagen® Midi- Kit benutzt.

2.6 Restriktion des pGBKT7- Vektors und des Intersectin 2-Topo- Cloning- Vektors mit Eco RI und Nco I und Ligation

Der Klon wurde über Nacht als Kultur in LB- Medium angeimpft. Die nachfolgende Plasmidisolierung erfolgte mit dem Midi- Kit. Von dem gelösten Pellet wurde die Konzentration bestimmt (802 ng/µl). Das eluierte Pellet (16 µl) wurde mit den Enzymen Eco R1 und Nco1 verdaut. Dann wurde dieser Restriktionsverdau zusammen mit einer kb- Leiter auf ein CTG- Agarosegel aufgetragen, um das entsprechende Fragment mit einer Länge von ca. 1,7 kb herauszuschneiden. Diese Bande wurde mit

dem DNA- Purifikation- Kit von Pharmacia© von den Gelrückständen gereinigt. Ebenso wurde der Bindungsdomänevektor pGBKT7 (dargestellt in Teil III A 4.2) mit den gleichen Enzymen geschnitten, um gleiche Schnittstellen herzustellen. Danach wurden ca. 40 ng Vektoren mit ca. 150 ng „Insert“(1.7 kb des Intersectin 2, gereinigte Gelbände) über 2 Tage bei 4° C ligiert.

Der Ligationsansatz wurde in kompetente E. Coli Zellen (TOP 10 One Shot®) transformiert und auf LB- Agarplatten (+ Kanamycin) ausplattiert. Von den so entstandenen Kolonien wurden 9 Stück angeimpft, um zu überprüfen in welchen Kolonien der Fusionsvektor enthalten ist. Von den angeimpften Kolonien wurde ein Mikro- Kit mit anschließendem Restriktionsverdau (wieder mit Eco RI und NcoI) durchgeführt und die verdauten Proben erneut elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei sah man, dass das gewünschte Insert nicht in allen Proben vorhanden war (siehe Abb.: 15).

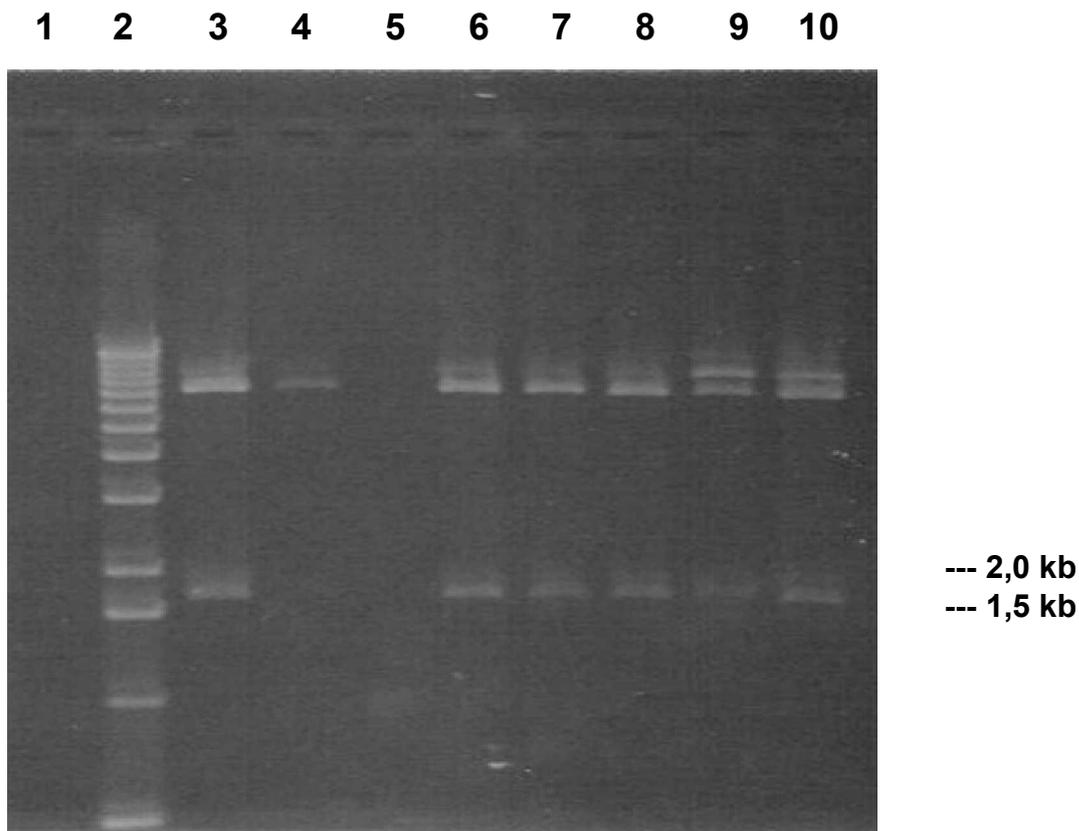


Abb.15: Agarosegel mit dem Restriktionsverdau des ligierten Fusionsvektors
 1: Probe 4.1
 2: kb Leiter
 3-10: Proben 4.2- 4.9 in aufsteigender Reihenfolge (4.7 entspricht 8)

Von den hier dargestellten Proben wurden Glycerolstockkulturen hergestellt und bei -70° eingefroren. Die Kolonie 4.7 wurde willkürlich ausgewählt und im weiteren Verlauf im Yeast- Two- Hybrid System benutzt.

Anschließend wurde noch einmal eine Sequenzierung durchgeführt, um sicherzustellen, dass kein Fehler im reading frame vorliegt.

Außerdem erfolgte anschließend ein Western Blot, um zu beweisen das auch das entsprechende Protein in den Hefezellen kodiert wird (siehe III A 9.1 und Abb. 16)

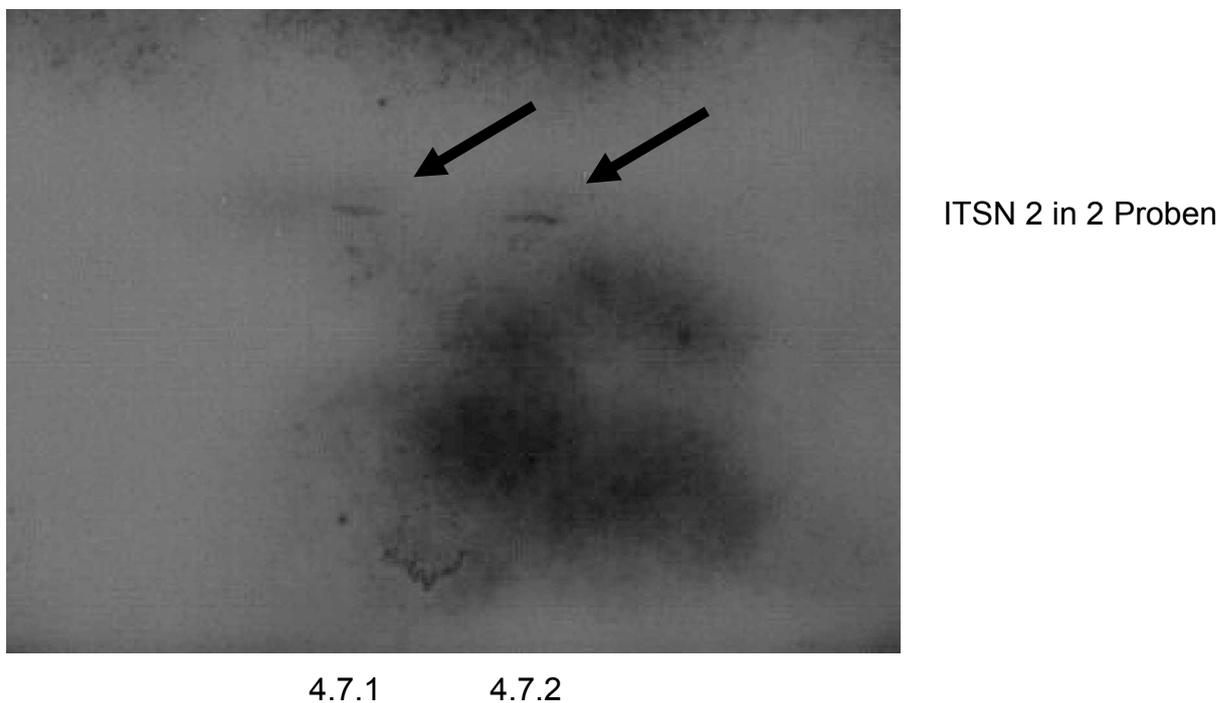


Abb.16: Western Blot mit 2 Proben des weiterhin benutzten Klons 4.7

B: Anwendung des Yeast- Two- Hybrid- Systems

1. Übersicht

Das Yeast- Two- Hybrid System (Matchmaker- GAL4- Two- Hybrid System 3 von Clontech[®]) wurde in dieser Doktorarbeit für folgende Aufgabenstellung verwendet:

Für den Test auf Protein- Protein- Interaktionen zwischen einem bestimmten Bereich des Intersectin 2 und Proteinen, die von der prätransformierten cDNA- Bank (fetal brain cDNA Bank) gebildet werden.

Das Yeast- Two- Hybrid System, mit dem diese Aufgabenstellung bearbeitet wurde, funktioniert über die Rekonstitution der transkriptionsaktivierenden Eigenschaften des GAL4- Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae*, durch zwei miteinander interagierende Hybrid- Proteine.

Das Protein X (Intersectin 2) wurde hierfür mit der GAL4- Bindungsdomäne (BD) und das Protein Y (cDNA- Bank) mit der GAL4- Aktivierungsdomäne verknüpft. Wenn X und Y miteinander interagieren, wird die GAL4- Aktivierungsdomäne mit der GAL4- Bindungsdomäne zusammengebracht und ein Proteinkomplex mit GAL4- Transkriptionseigenschaften entsteht. Dadurch wird die Expression von Reportergenen aktiviert, welche jeweils von einem Promoter mit GAL4- Bindungsstellen reguliert werden (Abb.2)

Das Yeast- Two- Hybrid System ist eine sehr sensitive Methode, um auch relativ schwache und transiente Proteininteraktionen zu detektieren. Solche, mit anderen Methoden schwer detektierbaren Interaktionen können ausschlaggebend sein für eine einwandfreie Funktion von komplexen biologischen Systemen [17]. Da das Yeast- Two- Hybrid System in vivo durchgeführt wird, sind die Proteine außerdem ihrer natürlichen Grundform ähnlicher, was auch noch zu einer höheren Sensitivität der Detektion führt.

Durchführung im Detail

- Herstellung des BD- Vektors mit dem ITSN 2- Insert (in IV A beschrieben)
- Verifikation des Phänotyps der im YTH- System verwendeten Stämme von *S. cerevisiae*
- Positiv- und Negativkontrollen nach Vorschrift
- Diverse Tests auf regelrechte Funktion der Vektoren
- Eigentliche Suche von Interaktionspartnern des Intersectin 2 in der fetal brain spezifischen cDNA Bank
- Identifizierung der Interaktionspartner
- Verifizierung der Interaktionspartner

2. Die fetal brain spezifische cDNA- Bank

Um das gesamte Verfahren zu vereinfachen wurde eine hochkomplexe prätransformierte fetal brain cDNA- Bank benutzt, um Bindungspartner für die von Intersectin 2 kodierte Proteine zu finden.

Die so genannte cDNA Bibliothek wurde von der Firma Clontech erworben. Sie ist in den GAL4- Aktivierungsdomänevektor (AD)- Vektor kloniert und schon in einen bestimmten Host strain von *Saccharomyces cerevisiae* prätransformiert (Y 187). Diese Matchmaker Bibliothek beinhaltet mehr als 1×10^6 unabhängige Klone.

Jetzt muss man nur noch den konstruierten DNA- Bindungsdomänevektor mit diesem Aktivierungsdomänevektor zusammenbringen (Mating).

Wenn die transformierten Kulturen miteinander „maten“ entstehen diploide Zellen, welche vier Reportergene besitzen: HIS3, ADE2, MEL, und lacZ.

Die GAL4- DNA- Bindungsdomäne bindet an die GAL- UAS (upstream activating sequences) und wenn zwei Proteine interagieren entsteht ein GAL4- Transkriptionsfaktor mit Bindungsdomäne und Aktivierungsdomäne, das entsprechende Reportergene aktiviert. Hierdurch wird das Wachstum auf dem Selektionsmedium erst möglich, ebenso wie die Expression von alpha- (MEL1- Produkt) respektive β - Galaktosidase (lacZ Produkt).

3. Verifikation des Phänotyps der im YTH- System verwendeten Stämme

Für die Arbeit mit dem YTH- System wurden die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme AH 109 und Y 187 verwendet (beide von Clontech). Beide Stämme sind auxotroph für Adenin, Tryptophan, Leucin und Histidin sowie prototroph für Uracil.

Beide Stämme sind GAL4- negativ (und GAL 80- negativ); dies bedeutet, beide Stämme haben keine natürlich vorkommenden regulatorischen Proteine, die an den Promotor der Reportergene binden. Der Promotor wird nur dann aktiviert, wenn das zusammengefügte GAL4- Protein bindet.

Es wurden jeweils Glycerol- Kulturen beider Stämme auf YPDA – Platten ausgestrichen und 4 Tage bei 30°C inkubiert.

Einige der frisch gewachsenen Kolonien wurden gepickt und auf Selektionsmedium (SD- Medium) ausgestrichen, welches entweder kein Adenin (SD/-Ade), kein Methionin (SD/-Met), kein Tryptophan (SD/-Trp), kein Leucin (SD/-Leu), kein Histidin (SD/-His) oder kein Uracil (SD/-Ura) enthält.

Stamm	SD/-Ade	SD/-Met	SD/-Trp	SD/-Leu	SD/-His	SD/-Ura	YPDA
AH 109	-	+	-	-	-	+	+
Y 187	-	-	-	-	-	+	+

Tab.14: Phänotyp Verifikation von AH 109 und Y 187 auf Selektions- Medium + bedeutet Wachstum, - bedeutet kein Wachstum

Da die in Tab. 14 zusammengefassten Wachstumsergebnisse dem zu erwartenden Phänotyp der Stämme AH 109 und Y 187 entsprechen, konnten diese für die Arbeit mit dem YTH- System eingesetzt werden.

4. Nachweis der Interaktion zwischen p 53 und SV40Tag (Positivkontrolle)

Es wurden zwei verschiedene Arten von Positivkontrollen durchgeführt. Zum einen schon fertige Hefestämme, welche schon ein Plasmid enthalten und zum anderen fertige Plasmide, welche allerdings erst noch in die Hefestämme transformiert werden müssen.

A) pGBKT7-53 in AH109

B) pTD1-1 in Y187

pGBKT7-53 in AH 109 ist ein Plasmid der für das p53 Gen der Maus exprimiert und schon in den Hefestamm AH 109 hineintransformiert wurde.

p53 und das große Antigen des SV 40 Virus (T- Antigen) binden aneinander. Dies ist eine bekannte Interaktion und führt nachweisbar zu Interaktionen im YTH- System (Li&Fields 1993).

Diese sichere Interaktion wird im YTH- System in allen Arten von Positivkontrollen genutzt, egal ob prätransformiert oder nicht (speziell für das mating).

pTD1-1 ist das passende Plasmid mit dem großen T- Antigen SV 40, das schon in Y187 prätransformiert ist.

Die fetal brain spezifische cDNA- Bank, welche im weiteren Verlauf zum Screening von Interaktionspartnern mit dem ITSN 2- Protein verwendet wurde, ist ebenfalls in Y 187 prätransformiert.

Nun müssen die beiden Stämme der Positivkontrollen miteinander verschmolzen werden (mating). Dies erfolgte nach der Vorschrift des small- scale mating protokolls aus dem Matchmaker User Manual.

Die Kontrollen wurden sowohl einzeln als auch nach dem Mating „gemeinsam“ auf verschiedenen, nach Vorschrift hergestellten Dropout- Agarplatten ausgestrichen:

- pGBKT-7-53, pTD-1, und ITSN2 nach Transformation in den Bindungsdomänevektor (im folgenden Bait- Plasmid genannt) jeweils alleine auf SD/-Leu und SD/-Trp.

- ITSN 2 und pTD1-1 nach erfolgtem „mating“ gemeinsam sowie die Positivkontrolle pGBKT-7 und pTD1-1 gemeinsam ebenfalls nach erfolgtem mating auf jeweils SD/-Leu, SD/-Leu/-Trp, SD/-His/-Leu/-Trp, SD/-Ade/-Leu/-Trp und SD/-Ade/-Leu/-His/-Trp.

Die Hefen mit dem Bindungsdomänevektor sollten einzeln nur im Dropout SD/-Trp wachsen, die Hefen mit dem AD- Vektor also mit pTD1-1 und die Hefen mit der prätransformierten cDNA Bank sollten einzeln nur in SD/- Leu wachsen. Das Dropout Medium SD/-Leu/-Trp selektiert die diploiden Zellen, welche beide Vektoren enthalten. Die Selektion diploider Zellen mit der Expression interagierender Proteine erfolgt in den Dropouts SD/-His/-Leu/-Trp und SD/-Ade/-Leu/-His/-Trp, weil nur diese Zellen den HIS3- Reporter respektive den ADE2- und HIS3- Reporter exprimieren.

Verdünnungsreihe der Proben, einzeln und nach erfolgtem Mating:

		SD/-Leu	SD/-Trp	SD/-L/-T	SD/-H/-L/-T	SD/-A/-L/-T	SD/-A/-L/-H/-T
ITSN 2 (in AH109)	1:100	-	++				
	1:1000	-	++				
pGBKT7- 53 (in AH109)	1:100	-	++				
	1:1000	-	++				
pTD1-1 (in Y187)	1:100	++	-				
	1:1000	++	-				
ITSN 2 + pTD1-1	1:100	++		+	-	-	-
	1:1000	++		+	-	-	-
pGBKT7- 53 + pTd1	1:100	+++		+	+	++	+
	1:1000	++		+	+	+	+

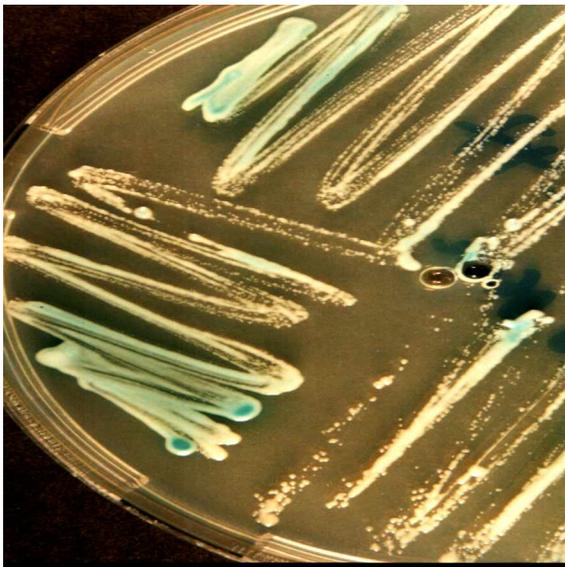
Tab.15: Die nicht beschrifteten Felder wurden nicht ausgestrichen. + entspricht der Stärke des Wachstums.

In Tabelle 15 sieht man, dass die Vektoren jeweils alleine ordnungsgemäß gewachsen sind und das auch diploide Zellen entstanden sind, da nur diese auf dem SD/-Leu und -Trp wachsen können. Die Positivkontrolle mit pGBKT-7-53 und pTD1 führte zur Aktivierung der Promotoren ADE2 und HIS3, da ein Wachstum erfolgte. ITSN 2 hingegen interagierte erwartungsgemäß nicht mit pTD1.

Die Transformanten wurden 4 Tage bei 30°C inkubiert.

Im Verlauf wurde die Transformation von pGBKT-7-53 mit pTD-1 als Positivkontrolle benutzt.

Weiterhin wurde AH109 mit pCL1 transformiert, der für den Wildtyp des GAL4-Proteins kodiert. Diese Transformation diente als Positivkontrolle für das Funktionieren des α - und β -Galaktosidase-Filter-Assay



α -Galaktosidase-Filter-Assay
von pGBKT7-53 mit pTD1-1



β -Galaktosidase-Filter-Assay
von pGBKT7-53 mit pTD1-1

Abb.17: Fotos der Assays nach 4 Tagen (Filter nach 2h Inkubation bei RT)

Als Negativkontrolle wird das Mating von pGADT-7 mit pGBKT-7-Laminin benutzt
[1, 2]

Vektoren	SD- Medium	Mel1/lac Z	His/Ade
pCL1	SD/-Leu	Blau	Positiv
pGADT-7 +pGBKT7- Lam	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	Weiß	negativ

Tab.16: Vektoren für die Negativkontrolle

5. Tests auf regelrechte Funktion der transformierten Vektoren

Nach der Transformation des Bait Plasmids (ITSN 2 in pGBKT- 7) in kompetente Hefezellen des Stammes *S.cerevisiae* nach der Vorschrift des "S.c. EasyComp™ Transformation Kit" von Invitrogen® (III, A 5) mussten noch einige Tests laut des Benutzerhandbuchs von Clontech durchgeführt werden:

- Testen des DNA- BD/Bait- Proteins auf toxische Effekte
- Testen des DNA- BD/Bait- Proteins auf Transkriptionelle Aktivierung
- Testen des DNA- BD/Bait- Proteins bezüglich der Mating Effizienz
- Testen der eigentlichen Proteinherstellung mittels Western- Blot

5.1 Testen des DNA- BD- Proteins auf toxische Effekte

ITSN 2 (nach Transformation in AH 109) und der leere BD- Vektor pGBKT- 7 (ebenfalls nach Transformation in AH 109) wurden in SD- Medium /- Trp angeimpft und nach Vorschrift in den Schüttler gestellt. Nun wurde das Wachstum alle 2 Stunden mittels Photometer kontrolliert. Das Wachstum sollte bis max. 10 h nach Animpfen kontrolliert werden. Bis zur vierten Messung nach 7 h verhielt sich das Wachstum äquivalent, d.h. Hefen mit dem korrekten Intersectin 2- Protein waren genauso so gut gewachsen wie Hefen mit dem leeren BD- Vektor. Das hergestellte Intersectin 2- Protein ist folglich nicht toxisch.

5.2 Testen des DNA- BD- Proteins auf Tanskriptionelle Aktivierung

Im folgenden Teil wurden nun sowohl ITSN 2 (in AH109) und pGBKT- 7 (leer) als Negativkontrolle auf den in der Tabelle aufgeführten Medien ausplattiert.

Medium (Agar)	ITSN 2 in AH 109	pGBKT- 7 in AH 109
SD/- TRP/X- Gal	+, aber keine Blaufärbung	+, aber keine Blaufärbung
SD/- His/-Trp/X-Gal	-	-
SD/- Ade/-Trp/X-Gal	-	-

Tab.17: Wachstum von Kolonien auf den o.g. SD- Medien

Da keine der gewachsenen Kolonien blau wurde, findet keine transkriptionelle Aktivierung der Reportergene statt. Da allerdings ein spärliches Hintergrundwachstum auf einigen Selektionsmedien außer dem QDO Medium ohne Adenin auftrat, musste noch eine Verdünnungsreihe mit der Zugabe von 3- AT durchgeführt werden. Hier- von ist bekannt, dass dadurch ein solches Hintergrundwachstum reduziert, bzw. eliminiert werden kann. In der Tabelle 18 wird dargelegt, dass schon die geringste im Yeast Protocols Handbook aufgeführte Konzentration zu einer Unterdrückung dieses Wachstums geführt hat. Deswegen wurde im weiteren Verlauf bei allen TDO- Agar- Platten (-His/-Leu/-Trp) 2,5 mM 3- AT hinzugefügt.

Anteil von 3- AT	ITSN2 in AH 109	pGBKT- 7 in AH 109
0	+	+ (etwa gleich)
2,5 mM	-	-
5 mM	-	-
7,5 mM	-	-

Tab.18: Verdünnungsreihe mit 3- AT um ‚Background‘ Wachstum zu eliminieren

5.3 Testen des DNA- BD/Bait- Proteins bezüglich der Mating Effizienz

Dieser Test wurde exemplarisch durchgeführt und lag immer in dem von Clontech geforderten Bereich zwischen 3 und 10 % (bei 6,4%). Die Effizienz wurde zwischen dem Mating von ITSN 2 in AH 109 mit pTD1- 1 (in Y 187) und dem Mating von pGBKT7- 53 (in AH 109) mit pTD1-1 (in Y187) verglichen.

5.4 Testen der eigentlichen Proteinherstellung mittels Western Blot

Die Durchführung dieses Tests ist im Ergebnissteil unter IV A 2.6 bereits beschrieben.

Alle 4 Tests erfüllten die Kriterien, die im Handbuch von Clontech aufgeführt sind.

6. Suche von Interaktionspartnern des ITSN 2- Proteins in der spezifischen cDNA- Bank

6.1 Mating des Bait- Plasmids mit der cDNA- Bank

Nachdem alle entsprechenden Test erfolgreich durchgeführt wurden und den Vorgaben entsprachen, konnte nun das Mating zwischen dem Bindungsdomänevektor (ITSN 2 in AH 109) und der spezifischen cDNA- Bank in dem Aktivierungsdomänevektor (cDNA in Y187) nach dem Mating Protokoll von Clontech durchgeführt werden. Es entstanden hierbei diploide Zellen, die *HIS3*, *ADE2*, *MEL1* und *lacZ* als Reportergene enthielten. Bei erfolgreichem Mating und stattfindender Interaktion der fusionierten Proteine konnten die Interaktionspartner durch Selektionierung mit dem α - und β - Galaktosidase- Assay aus den gewachsenenen Kolonien herausgefiltert werden.

Die Ausplattierung des Matings (nach Matchmaker User Manual) erfolgte parallel auf QDO- und auf TDO- Platten. Dies ist in Abbildung 19 noch einmal schematisch dargestellt. Von der cDNA- Bibliothek wurden noch entsprechende Verdünnungsreihen (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) auf SD/-L, SD/-Trp und auf SD/-L/-Trp ausplattiert, um die geforderten Effizienzkontrollen durchzuführen.

Es wurden je 200µl auf 30 QDO- Platten (SD/-Ade/-Trp/-His/-Leu)
 100µl auf 20 TDO- Platten (SD/-Trp/-His/-Leu) + 2,5mM 3AT

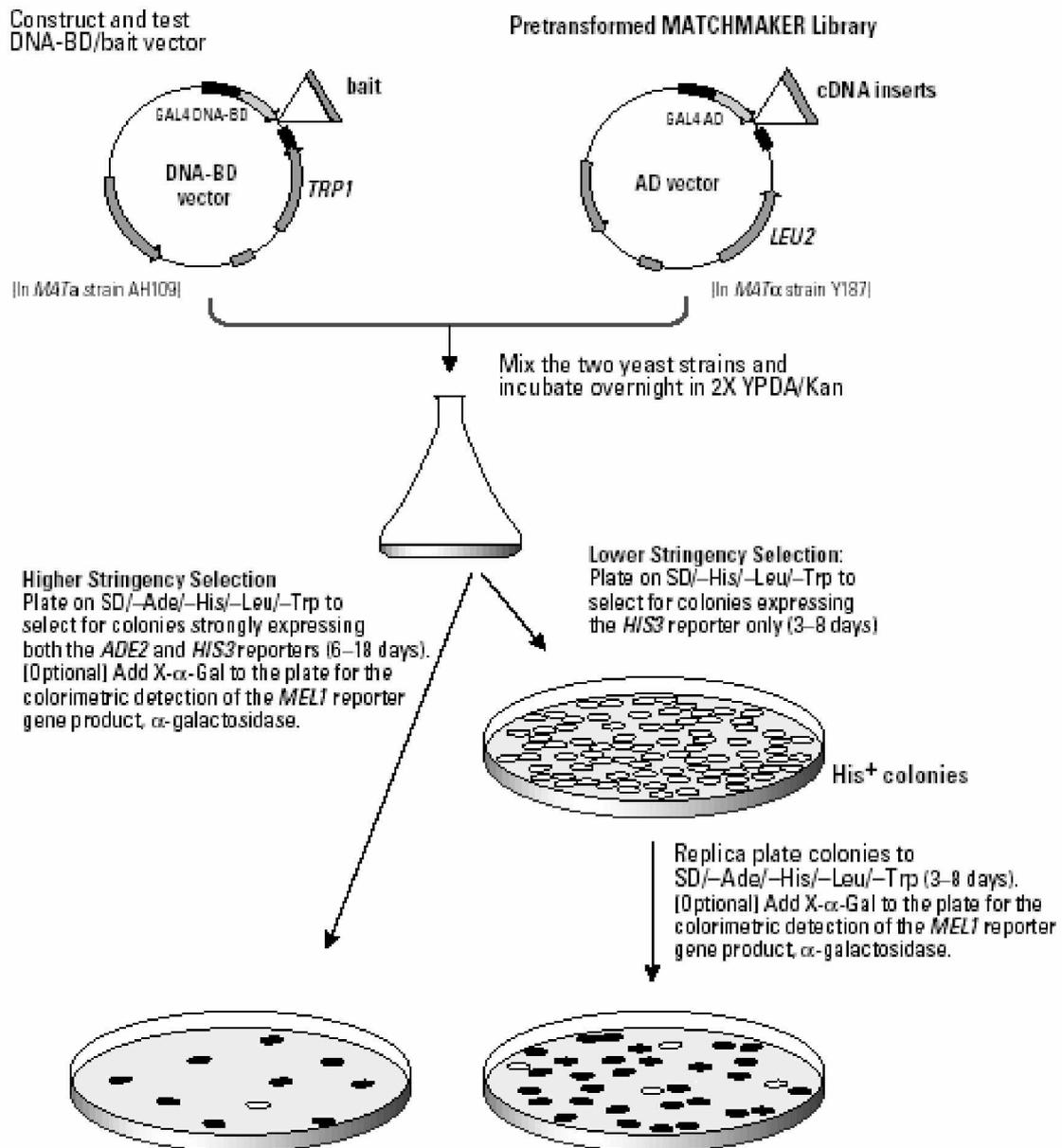
ausplattiert und täglich auf Wachstum bis zum 8. Tag kontrolliert. Am 5. Tag waren auf den QDO- Platten 35 Kolonien gewachsen, auf den TDO- Platten insgesamt schon 208 Kolonien, welche auf 13 weitere QDO- Platten umplattiert wurden, d.h. das Wachstum auf dem 4fach Dropout Medium war im Vergleich deutlich vermindert.



Abb.18: Wachstum der Kolonien am 5. Tag auf QDO

Außerdem wurden noch die Positivkontrollen (pGBKT7-53 + pTD1-1 mit ausplattiert). Am 7. Tag wurden weitere 112 Kolonien auf QDO überführt und am 8. Tag noch weitere 64 Kolonien. Am 7. und am 8. Tag wurden außerdem noch jeweils ca. 30 weitere Kolonien auf den primären QDO- Platten detektiert. Diese wurden auf Rasterplatten überführt, die umplattierten Kolonien von TDO auf QDO zeigten fast alle zwischen dem 4. und 6. Tag ein relativ konstantes und ähnliches Wachstum, so dass diese ebenfalls auf Rasterplatten übertragen wurden. Einige Beispiele des Wachstums sind in Abbildung 18 dargestellt. Die

Koloniefärbung reichte von weiß bis leicht rose. Insgesamt waren weit über 500 Kolonien gewachsen, hiervon schon über 60 primär auf den QDO- Platten.



- Blue colonies contain both plasmids as well as interacting hybrid proteins. These Ade⁺, His⁺, Mel⁺ colonies are candidates for a two-hybrid interaction.
- Rare white colonies are false positives (i.e., contain noninteracting proteins)

Abb.19: Two- Hybrid- Screening von ITSN 2 in dem BD- Vektor mit einer prätransformierten cDNA- Bank, paralleles Ausplattieren und Umplattieren von TDO auf QDO ist dargestellt. Die positiven Kolonien färben sich im α- und β- Galaktosidase- Assay blau, die falsch positiven Klone bleiben weiß.

6.2 Identifizierung der gefundenen Interaktionspartner

- Die Identifizierung erfolgte in mehreren Schritten, zunächst wurden die Plasmide aus den Hefezellen mit dem „Yeastmaker™ Yeast Plasmid Isolation Kit (siehe III A 7) isoliert.
- Hiernach erfolgte eine Transformation der Plasmid DNA in E.coli nach III B 14.
- Jetzt wurde die Plasmid DNA nach III B 10 präpariert.
- Die Sequenzierung der einzelnen Plasmid DNA erfolgte wie in III B 16 beschrieben.
- Überprüfung der Sequenzen mittels der Gendatenbank (inklusive Kontrolle der einzelnen „Reading frames“)

6.3 Analyse und Verifizierung der detektierten Interaktionspartner

Methodik

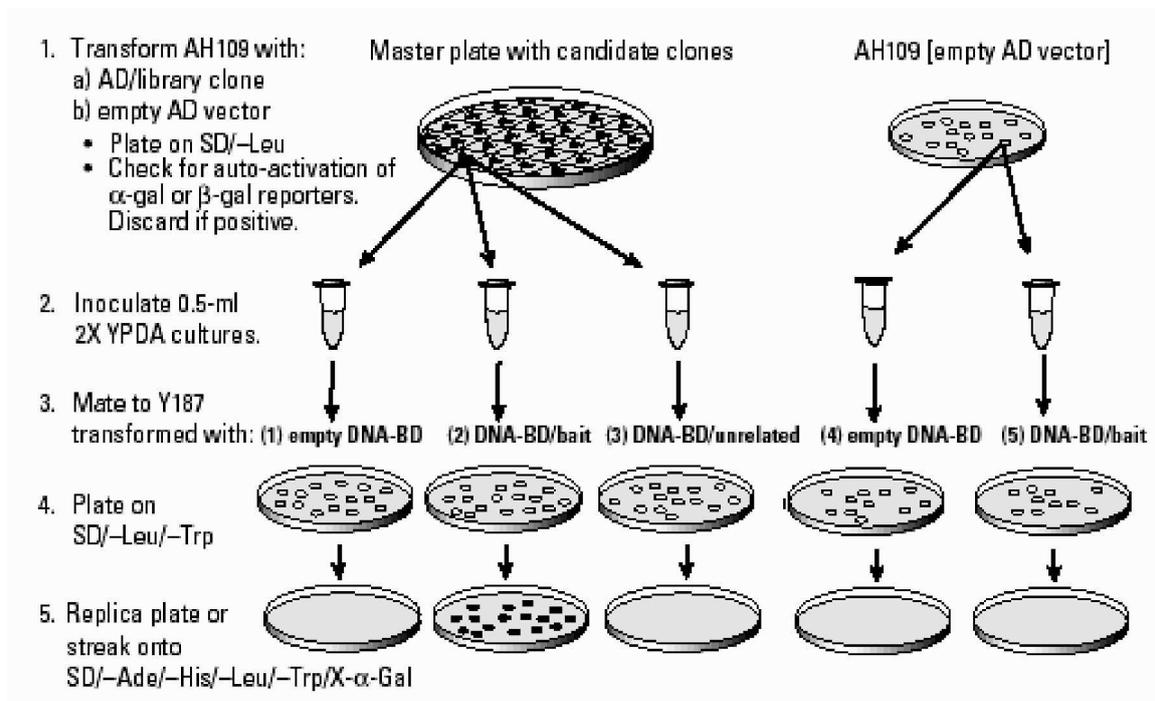


Abb.20: Schematische Darstellung der Verifizierung der Interaktionspartner.

Die so gefundenen Interaktionspartner (mit erfolgreicher Blaufärbung in α - und β -Galaktosidase Assay) mussten nun noch etlichen Test unterzogen werden, um falsch positive Interaktionspartner herauszufiltern. Es wurde u. a. getestet, ob die möglichen Bindungspartner nicht schon alleine eine α - und β -Galaktosidase-Reporteraktivität besaßen. Außerdem wurde kontrolliert, ob auch alle anderen Reporter gene expriert wurden (siehe verschiedene Dropoutplatten in obiger Darstellung: Abb. 20).

Auf den folgenden Bildern sind Beispiele der verschiedenen Färbungen mittels α - und β -Galaktosidase- Assay aufgeführt. Hier zeigt sich auch das teils unterschiedliche Wachstum der verschiedenen Kolonien ebenso wie die unterschiedlich starke Blaufärbung. Die Blaufärbung wurde speziell beim β -Galaktosidase- Filter-Assay stündlich (von 1-24 h) kontrolliert. Eine Inkubationszeit von $> 8h$ erhöht das Auftreten von falsch positiven Klonen.

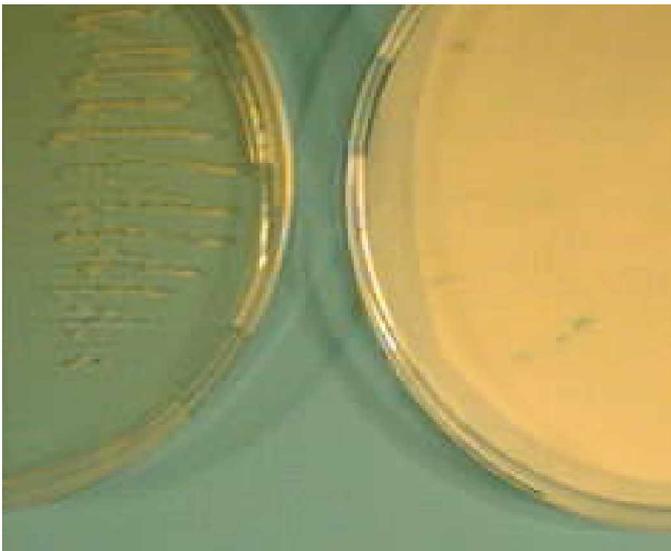


Abb.21 +22: Bilder von β -Galaktosidase Assays
Links der direkte Abklatsch der benachbarten Agarplatte
Unten kompletter Abklatsch nach längerer Inkubationszeit



Mit dem β - Galaktosidase- Filter-Assay wurde die lacZ- Expression mittels Blaufärbung kontrolliert. Die Transformanten wurden hierzu etwa 4 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend wurde der Filter- Assay nach Permeabilisierung durch flüssigen Stickstoff durchgeführt.

Im Folgenden werden die so verifizierten Interaktionspartner tabellarisch aufgelistet. Aus Zeitgründen wurden nicht alle blau gewordenen Transformanten weiter getestet, primär wurden die sehr schnell positiven und die mit starker Färbung ausgewählt, um die weiteren Tests durchzuführen.

Interakti- onspartner	Solitär auf QDO	Mit ITSN2 auf QDO	Blaufärbung im α - Ga- laktosidase Assay	Blaufärbung im β - Galaktosidase Assay
I 2	negativ	positiv	positiv	positiv
I 9	negativ	positiv	positiv	positiv
I 22	negativ	positiv	positiv	positiv
I 14	negativ	positiv	positiv	positiv
III 35	negativ	positiv	positiv	positiv
V 7	negativ	positiv	positiv	positiv
VI 4	negativ	positiv	positiv	positiv
VII 40	negativ	positiv	positiv	positiv

VII 47	negativ	positiv	positiv	positiv
Positiv-kontrolle	negativ	positiv	positiv	positiv
Negativ-kontrolle	negativ	negativ	negativ	negativ

Tab.19: Ergebnisse des durchgeführten cDNA Bank Screenings mit ITSN2 (ITSN 2 in pGBKT7, cDNA in pGADT7)

6.4 Vektortausch und Re- Cotransformation

Um die von Clontech vorgeschriebenen Tests zu vervollständigen musste noch ein Austausch des Bindungsdomänevektors gegen den Aktivierungsdomänevektor stattfinden und danach die Prozedur sowohl mit Mating und Aktivierung der Reportergene sowie die α - und β - Galaktosidase- Assays erneut durchgeführt werden.

Um ITSN 2 vom Bindungsdomäne- in den Aktivierungsdomänevektor zu überführen wurden die Restriktionsendonukleasen *Nco I* und *Eco R I* benutzt. Nach dem Verdau von pGBKT- 7 (inklusive ITSN 2) zeigte sich in der Kontrollgelelektrophorese neben der Vektorbande nur eine zusätzliche Bande der entsprechenden Größe, d.h. es gab planmäßig nicht mehrere Schnittstellen. ITSN 2 ließ sich so in pGADT 7 ligieren. An dieser Stelle wurde noch einmal eine Sequenzierung durchgeführt, um eine Mutation respektive ein Verlust des korrekten Reading frames auszuschließen.

Auf ähnliche Weise mussten die potentiellen Interaktionspartner aus dem Aktivierungsdomänevektor restringiert werden. Dies gelang bei allen Interaktionspartnern außer bei **I 14** mit *Bam H1* und *BGL 2*. Bei **I 14** entstanden 2 Bruchstücke, so dass in diesem Fall erst mittels PCR zwei neue Restriktionstellen eingeführt werden mussten. Für die PCR wurden die Primer pACT For und pACT Rev benutzt. Am 5'- Ende wurde eine *Nde I* Restriktionsstelle und am 3'- Ende eine *Sal I* Restriktionsstelle eingeführt. Hiermit ließ sich nun auch **I 14** in den Bindungsdomänevektor überführen. Die Vektoren wurden dann vor der erneuten Ligation jeweils mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten.

Nach erfolgter Ligation wurde der Erfolg kontrolliert und ob die Interaktionspartner auch tatsächlich korrekt überführt wurden. Hierzu wurden die ligierten Vektoren wieder restringiert, in Gelelektrophoresen der Inhalt kontrolliert und die Inserts sequenziert. Das hier beschriebene Verfahren ist noch einmal in Abbildung 23 skizziert.

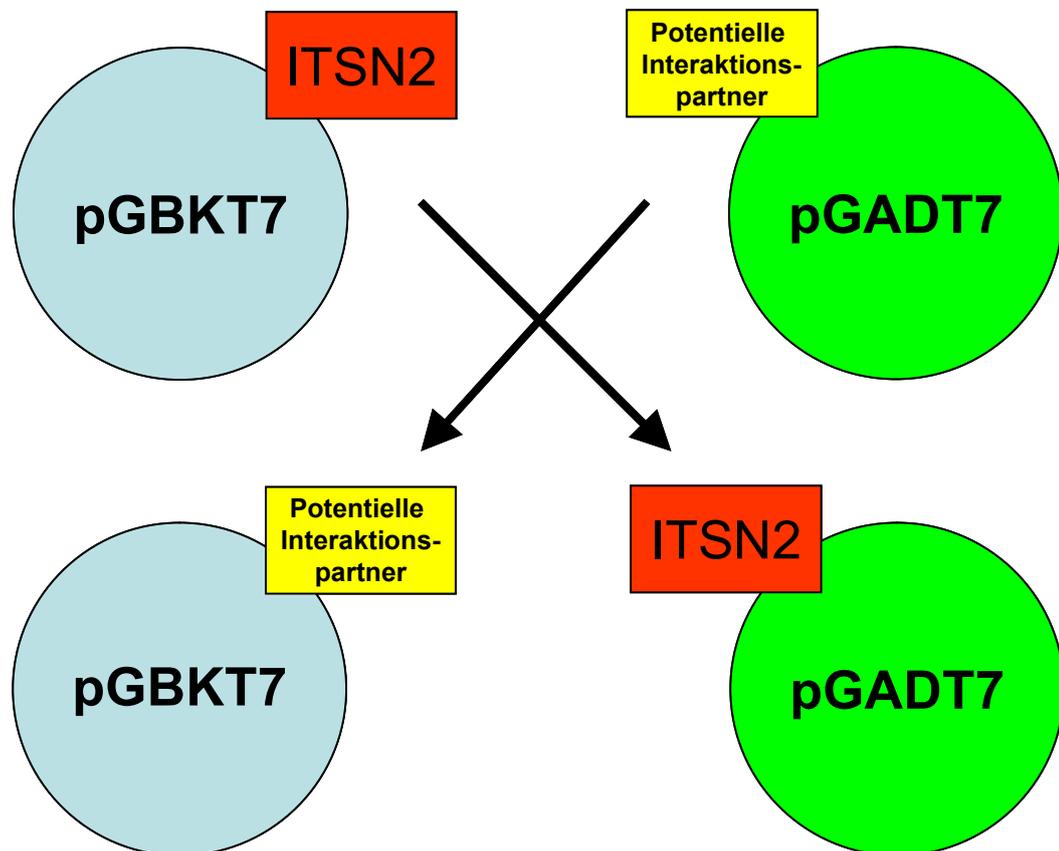


Abb.23: Schematische Darstellung des oben beschriebenen Vektortauschs

Nachdem alle 9 Interaktionspartner korrekt überführt waren wurde ein neues Mating durchgeführt. Es zeigte sich ein gutes und gleichmäßiges Wachstum auf den QDO-Platten, außerdem wurden alle Proben auch noch auf TDO-Platten ausgestrichen und bei erwartungsgemäß deutlich stärkerem Wachstum dann später auf QDO-Platten überführt. Auch hier zeigte sich bei allen 9 Interaktionspartnern ein gutes Wachstum. Die QDO-Platten waren jeweils mit α -Galaktosidase nach Vorschrift von Clontech versetzt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Interaktionspartner (in pGBKT7)	Solitär auf QDO	Mit ITSN 2 (in pGADT7) auf QDO	Blaufärbung im α - Galaktosidase Assay
I 2	negativ	positiv	positiv
I 9	negativ	positiv	positiv
I 14	negativ	positiv	positiv
I 22	negativ	positiv	positiv
III 35	negativ	positiv	positiv
V 7	negativ	positiv	positiv
VI 4	negativ	positiv	positiv
VII 40	negativ	positiv	positiv
VII 47	negativ	positiv	positiv
Positivkontrolle	negativ	positiv	positiv
Negativkontrolle	negativ	negativ	negativ

Tab.20: Ergebnisse nach erfolgreichem Vektortausch

6.5 Entschlüsselung der Interaktionspartner

Nachdem die oben aufgeführten Interaktionspartner alle von Clontech vorgeschriebenen Test bestanden hatten, wurden diese sequenziert und mit Hilfe einer zugänglichen Genomdatenbank entschlüsselt.

Interaktionspartner	Name des Gens lt. Datenbank
I 2	CNK (Cytokin Inducable Kinase)
I 9	Semaphorin Y
I 14	Spektrin (Homo sapiens spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin): SPTAN 1)
I 22	Zinkfingerprotein
III 35	STMN II (Stagmin)

V 7	NNRF
VI 4	ATF 5
VII 40	dNTPase
VII 47	EIF 3S3

Tab.21: Entschlüsselung nach der Genomdatenbank

C: Nachweis der Protein- Protein- Interaktion in vivo

Aus Zeitgründen war es im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich, alle Bindungspartner in vivo zu überprüfen. Initial wurde ein Bindungspartner, nämlich der vielversprechenste, mit einem weiteren Nachweisverfahren überprüft:

- **Immunpräzipitation**

Interaktionspartner	Name des Gens lt. Datenbank
I 14	Spektrin (Homo sapiens spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin): SPTAN 1)

Tab.22: Bindungspartner, der dem o. g. Test unterzogen wurde

1. Immunpräzipitation

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Immunpräzipitation wurde nach dem Protokoll „FLAG® Tagged Protein Immunoprecipitation Kit“ der Firma Sigma® [72] durchgeführt.

Um die so genannte Co- Immunopräzipitation durchzuführen, wurde zunächst der kodierende Bereich von Spektrin aus dem AD- Vektor des Two- Hybrid Systems ausgeschnitten und in einen eukoaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (Abb.11, III A 9.4.2), der für einen Ha- Tag kodiert hineinkloniert. Wegen nicht übereinstimmender Restriktionsfragmentschnittstellen zwischen dem BD- Vektor mit der Intersectin 2- Sequenz (des Two- Hybrid Systems) und dem eukaryontischen Expressionsvektor p3XFLAG- CMV-13 wurde die Intersectin 2- Sequenz aus menschlichen Nierengewebszellen mit Primern, die am Ende Erkennungs- Sequenzen für die Restriktionsenzyme Not I und Eco RI besitzen erneut amplifiziert. Nach entsprechendem Restriktionsenzymverdau des PCR- Produkts und des p3XFLAG- CMV-13- Vektors (Abb.11, III A 9.4.2) mit Eco RI und Not I erfolgte die Ligation und Klonierung. Nach Sequen-

zierung zur Überprüfung des korrekten Readingframes erfolgte die Anwendung des Vektor- Klons mit der korrekten Intersectin 2- Sequenz im Immunopräzipitationsversuch.

Dies ist im Folgenden für den Bindungspartner Spektrin (Homo sapiens spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin): SPTAN 1) angeführt, da für Spektrin im Two-Hybrid System eine Bindung sicher nachgewiesen wurde.

Die Vektoren setzten sich daher wie folgt zusammen:

- Intersectin 2 + p3XFLAG- CMV-13- Vektor (enthält bereits die Sequenz für das Flag- Peptid)
- Spektrin (mit HA- Tag aus dem Two- Hybrid System) + pcDNA3.1- Vektor

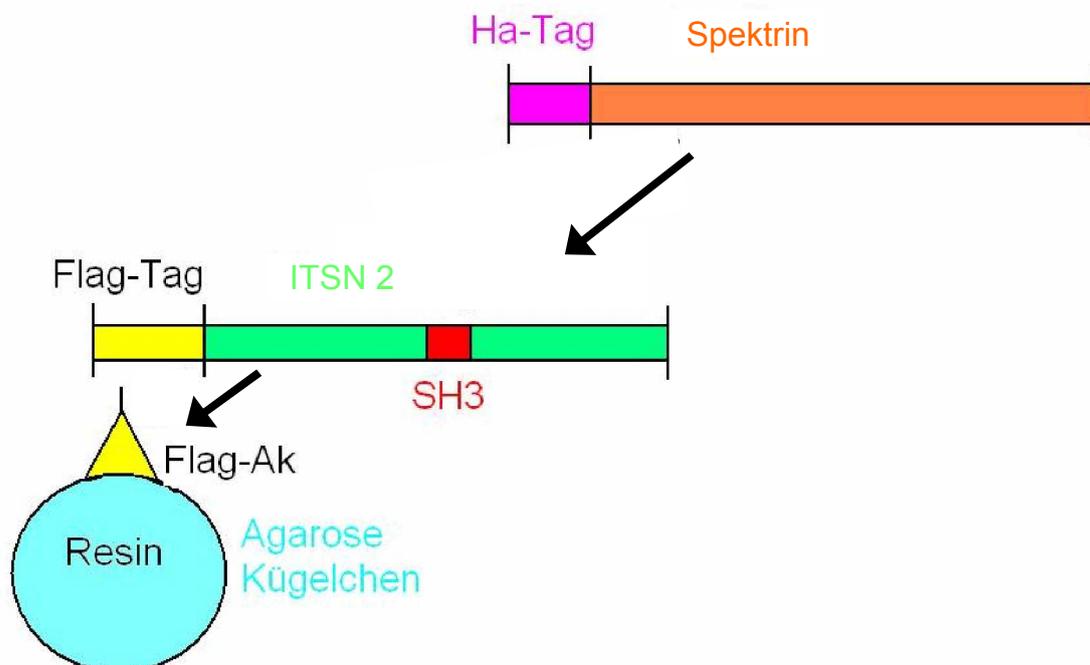


Abb.24: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Intersectin 2 und Spektrin

Diese neuen Vektoren wurden dann sowohl alleine als auch zusammen in HEK-293 Zellen transfiziert. Bei der Immunpräzipitation wurde dann die Bindung von Intersectin 2 mit Spektrin mittels eines Western Blots (Abb.25) nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente der leere p3XFLAG- CMV-13- Vektor mit Flag Peptid bzw. der pcDNA3.1- Vektor mit der Spektrin- Sequenz, hier ließ sich erwartungsgemäß keine Bande nachweisen.

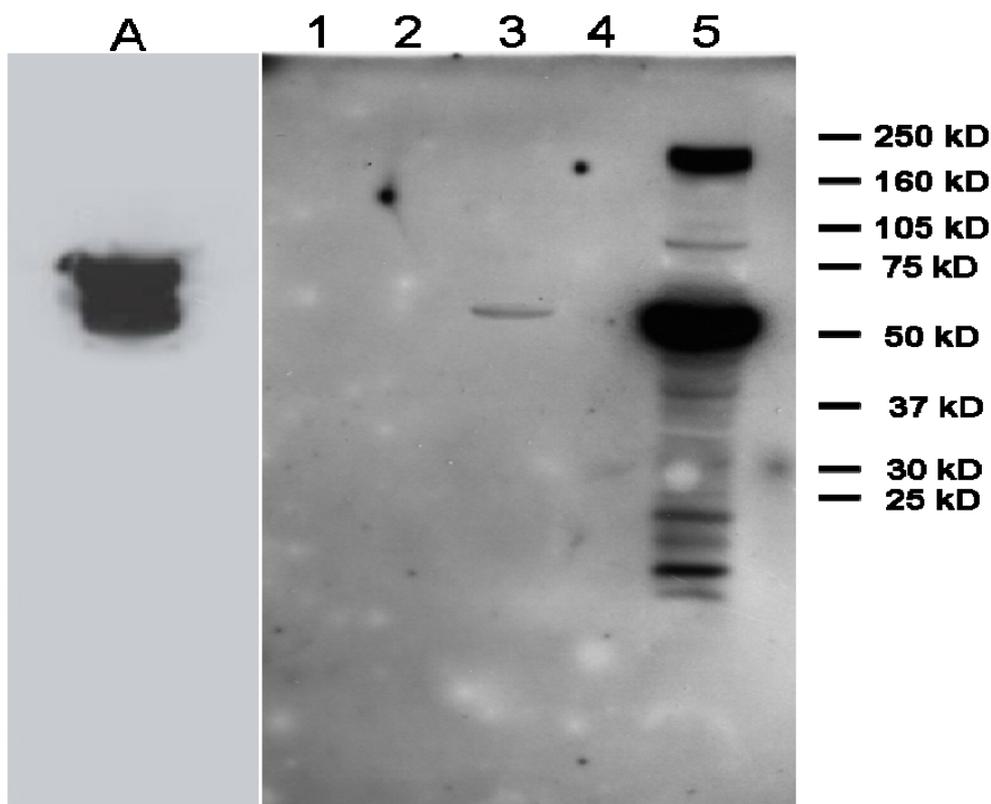


Abb.25: Interaktionsnachweis im Western Blot

- A: Exprimiertes Intersectin 2- FLAG- Protein
- 2: Negativ Kontrolle mit pcDNA3.1- Vektor
- 3: Immunpräzipitiertes Spektrin- Protein
- 4: Negativ Kontrolle mit FLAG- Vektor ohne Insert
- 5: Exprimiertes Spektrin Protein mit HA- Tag

V. Diskussion

A: Anwendung des Yeast- Two- Hybrid Systems

1. Allgemeine Übersicht

Mit dem Yeast- Two- Hybrid System können interagierende Proteine detektiert werden. Dies erfolgt *in vivo* in eukaryotischen Zellen; die Gene bzw. die cDNA, die für die entsprechenden Proteine kodieren, welche miteinander interagieren, können identifiziert werden.

Die Grundlagen für dieses System wurden 1986 respektive 1987 von Keegan, Ptashne und Ma gelegt [29, 34]. Man macht sich die Funktion von verschiedenen Transkriptionsfaktoren zu Nutze, die im Yeast- Two- Hybrid System auf verschiedene Domänen verteilt werden, welche sich trennen lassen. Hierbei handelt es sich um eine DNA- Bindungsdomäne (BD) und eine Aktivierungsdomäne (AD), als Transkriptionsfaktor kommt hier u. a. das GAL4- Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* zum Einsatz.

Die Interaktion von Proteinen wird in dieser Dissertation mit dem Yeast- Two- Hybrid System 3 von Clontech® nachgewiesen. Der Grundaufbau des Systems beruht auf grundlegenden Überlegungen von Bartel et al. 1993 [1, 2]. Durch zwei interagierende Hybridproteine, von denen das eine mit der GAL4- Bindungsdomäne und das andere mit der GAL4- Aktivierungsdomäne verbunden ist, erfolgt die Rekonstitution von Transkriptionsaktivierungseigenschaften des GAL4- Proteins. Durch Entstehen eines neuen Proteinkomplexes, der die gleiche Aktivierungsfunktion und -spezifität von Transkriptionsfaktoren des Wildtyp- GAL4- Proteins besitzt, kann über bestimmte Reportergene, denen ein Promotor mit einer Gal4- Bindungsstelle vorgeschaltet ist, eine Interaktion der Proteine nachgewiesen werden.

In dieser Doktorarbeit wurde das Yeast- Two- Hybrid System benutzt, um potentielle Bindungspartner für das von Intersectin 2 kodierte Protein zu finden und so dessen Funktion in der Zelle weiter zu erforschen. Für die Suche nach Interaktionspartnern wurde eine in den Aktivierungsdomänevektor prätransformierte cDNA- Bibliothek der Firma Clontech® benutzt. Es waren insgesamt über 500 Kolonien gewachsen, hiervon

schon etwa 60 primär auf den 4- fach Dropout- Platten (QDO). Nach dem Screening dieser Klone und Abschluss der geforderten Kontrollen konnten 9 Klone identifiziert, sequenziert und als potentielle Bindungspartner bestätigt werden. Hierbei handelt es sich unter anderem um Semaphorin Y, Stagmin II, Zinkfingerproteine und Spektrin.

In dem folgenden in vivo Experiment, der Immunpräzipitation, d. h. in einem weiteren Nachweisverfahren in eukaryontischen Zellen wurde zunächst aus Zeitgründen nur einer der neun potentiellen in vitro Bindungspartner weiter getestet.

In diesem Fall wurde speziell die Bindung von **Intersectin 2** und **Spektrin** weiter untersucht.

2. Suche von potentiellen Interaktionspartnern von ITSN 2 in einer prätransfomierten cDNA- Bank

2.1 Übersicht

Intersectin 2 ist Mitglied einer multimodularen Proteinfamilie, die bei der Clathrin-vermittelten Endocytose eine große Rolle spielt. Es gehört zu den scaffolding Proteinen, die beim Gerüstbau der Zelle benötigt werden (Aktinskelett). Die Clathrin-vermittelte Endocytose stellt den wichtigsten Aufnahmeweg für Membranlipide und Proteine in die Zelle dar. Intersectin 2 wurde anfänglich nur in menschlichen Zellen und Mäusezellen nachgewiesen [43, 44, 48], mittlerweile ist auch ein Nachweis in Zelllinien von Hunden, Schimpansen und Ratten erfolgt [64]. Pucharos et al. konnten nachweisen, dass bei einer Überexpression von ITSN 2 die Clathrin-vermittelte Endocytose gehemmt wird [44].

Der zentrale Bereich, der in allen 3 Isoformen des ITSN 2- Proteins vorhanden ist, beinhaltet fünf SH3- Domänen, von denen eine hohe Proteinbindungsaffinität bekannt ist. Man weiß, dass die SH3- Domänen durch ihre Beteiligung an Protein- Protein- Wechselwirkung eine wichtige Funktion bei der zellulären Signalübertragung besitzen. Es wurden bereits mehrere Interaktionspartner von SH3- Domänen gefunden, wie z. B. Dynamin und Synaptojanin [41, 44, 58].

Außerdem wurde, wie bereits in der Einleitung erwähnt, eine SH3- Domäne des Intersectin 2 (SH3P18) als WASP- interacting Protein isoliert. WASP steht für das Wiskott- Aldrich Syndrom Protein und ist bei Kindern mit dem Wiskott- Aldrich Syndrom mutiert. Mc Gavin konnte nachweisen, dass T- Zell- Antigen- Rezeptor (TCR)- induzierte Endocytose eben von diesem WASP- Gen respektive dem hiervon gebildetem Protein reguliert wird [36]. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass Intersectin 2 gemeinsam mit WASP und cdc42 die Clathrin- induzierte Endocytose mit der WASP- abhängigen Aktin- Polymerisation des Zytoskeletts verknüpfen. Es konnten bis jetzt allerdings noch keine hierfür verantwortlichen Interaktionspartner nachgewiesen werden.

Um die Funktionen des Intersectin 2 weiter zu charakterisieren, sollen Proteine detektiert werden, die mit dem Intersectin 2 interagieren. Anhand der gefundenen Interaktionspartner können dann Rückschlüsse auf die Wirkung und die Funktion in der menschlichen Zelle gezogen werden. Von den im Yeast-Two- Hybrid System in dieser Arbeit detektierten potentiellen Bindungspartnern wurde bisher nur Semaphorin (Tab.21, IV B 6.5) in der Literatur als in vivo Bindungspartner erwähnt [64].

In dieser Dissertation wurde eine prätransformierte cDNA- Bank der Firma Clontech® benutzt und in den Aktivierungsdomänevektor des Yeast- Two- Hybrid Systems eingesetzt. Mit der aktuell gebräuchlichen 3. Generation des Systems können ca. 10^7 Klone in Hefezellen auf Expression von Proteinen untersucht werden und ob diese mit einem bestimmten Zielprotein (ITSN 2) im dazugehörigen Bindungsdomänevektor interagieren [1]. Durch bestimmte Verfahrensweisen ist es mit diesem System möglich, auch auf die kodierende Sequenz des interagierenden Proteins zuzugreifen.

2.2 Unspezifische Expression von Reportergenen

Um die unspezifische Expression der Reportergene zu vermeiden, hat es sich als sinnvoll erwiesen, nicht die cDNA- Bank in den Bindungsdomänevektor zu klonieren [1]. Dies hätte nämlich die Detektion multipler falsch positiver Klone zur Folge. Alle von der cDNA- Bank kodierten Proteine mit transkriptionsfördernden Eigenschaften könnten dann die Aktivierung der Reportergene verursachen, da die Proteine mit der GAL4- Bindungsdomäne an den Promotor der Reportergene binden könnten. Deswegen wird die Sequenz des zu untersuchenden Proteins (Intersectin 2) in den

GAL4- Bindungsdomänevektor kloniert, dieser kodiert nun für das Intersectin 2 mit einer N- terminalen GAL4- Bindungsdomäne. Die prätransformierte cDNA- Bank wird in einem GAL4- Aktivierungsdomänevektor geliefert, der für eine N- terminale GAL4- Aktivierungsdomäne kodiert.

Folglich muss aber auch ausgeschlossen werden, dass eine unspezifische Expression der Reportergene durch das fusionierte Hybridprotein aus Intersectin 2 und GAL4- Bindungsdomänevektor ausgelöst werden kann [2, 49]. Dies wurde getestet indem man die Transformanten des Stamms AH 109, die das Plasmid mit ITSN 2 im GAL4- BD- Vektor enthielten, alleine auf SD/ -Trp (inklusive X- Gal) ausplattierte. Bei Expression des lacZ- Gens müsste es schon so zu einer Blaufärbung der Kolonien kommen. Sogar bei Einwirkzeiten von mehr als 8 h (diese Grenze wird von Clontech gesetzt, da es bei Einwirkzeiten von > 8 h vermehrt zum Auftreten von falsch positiven Klonen kommen kann) ließ sich keine Blaufärbung nachweisen. Das Hybridprotein aus Intersectin 2 und dem GAL4- Bindungsdomänevektor kann keine unspezifische Expression der Gene bewirken, die von einem Promoter mit GAL4- Bindungsstellen kontrolliert werden. Dieselbe Testung wurde auch auf Dropoutplatten – Adenin und – Histidin durchgeführt, auch hier zeigte sich keine Blaufärbung.

Außerdem wurden noch Testungen bezüglich der Mating- Effizienz und einer etwaigen Toxizität des gebildeten Hybridproteins durchgeführt. Eine Toxizität konnte ausgeschlossen werden, die Wachstumsergebnisse zwischen dem leeren Bindungsdomänevektor und dem Vektor mit Intersectin 2 als Insert waren im geforderten Kontrollzeitraum in etwa gleich. Um die Effizienz des Matings zu überprüfen wurde das Wachstum von ITSN 2 (in AH 109) mit pTD1- 1 (in Y187) mit dem Wachstum von pGBKT7- 53 (in AH109) mit pTD1- 1 verglichen. Die Effizienz lag im geforderten Range.

2.3 Mating des Bait- Plasmids mit der prätransformierten cDNA- Bank

Nachdem alle von Clontech geforderten Tests ohne nennenswerte Abweichungen erfüllt waren, konnte nun mit dem Mating der prätransformierten cDNA- Bank mit ITSN 2 angefangen werden. Hierzu wurde der Bait- Plasmid mit ITSN 2 und die cDNA- Bank in Hefezellen transformiert und nach Vorschrift auf TDO- Platten (SD/ -

Leu/ -Trp/ -His) und QDO- Platten (SD/ -Leu/ -Trp/ -His/ -Ade) ausplattiert. Während auf den TDO- Medien nur das His3- Reporter gen untersucht wird, werden bei den QDO- Platten sowohl das His3- als auch das Ade2- Reporter gen untersucht. Falls das Wachstum direkt und relativ zügig auf dem QDO- Medium erfolgt, lässt sich hieraus auf eine starke Bindung zwischen den Proteinen schließen. Um die schwachen Bindungen zu detektieren verwendet man anfänglich nur das His3- Reporter gen (dies sind die Kolonien auf den TDO- Platten) und verifiziert diese dann in einem nächsten Schritt weiter indem man Ade2 und Mel1 als Reporter gene benutzt.

Im Wachstumsverhalten zeigten sich primär (nach 5 Tagen) ca. 35 Kolonien auf den QDO- Platten und innerhalb der erlaubten 8 Tage noch mal weitere 35 Kolonien, auf den TDO- Platten zeigten sich innerhalb dieser 8 Tage über 450 Kolonien, die nach umplattieren auf QDO- Platten allerdings auch fast alle wieder gewaschen sind, so dass insgesamt über 500 Kolonien auf QDO- Medium gewachsen waren. Als Ursache für das Wachstum auf TDO- und nicht primär auf QDO- Medium kommen zwei Ursachen in Betracht. Entweder es kommt zu einer unspezifischen Expressierung von His3 durch die Transformanten auf den TDO- Platten (das wären dann falsch positive Ergebnisse), oder die Bindung der Transformanten zu Intersectin 2 ist sehr schwach ausgeprägt, so dass kein primäres Wachstum auf QDO- Medium möglich ist. Da die potentiellen Bindungspartner auf SD/ -Leu/ -Trp/ -His (TDO) alleine nicht gewachsen waren (dies wurde im Nachhinein mit allen Bindungspartnern getestet), konnte die unspezifische Expressierung ausgeschlossen werden und es muss von vielen schwachen Bindungen zu dem zu untersuchenden Intersectin 2- Protein ausgegangen werden.

2.4 Aktivität der Reporter gene Mel1 und lacZ

Außer den oben abgehandelten Reporter genen His3 und Ade2, welche über die verschiedenen Dropout- Medien überprüft werden, werden im Matchmaker 3 Yeast- Two- Hybrid System noch zwei weitere Reporter gene benutzt, die Bestandteile des Hefestammes AH 109 sind. Hierbei handelt es sich um LacZ und um Mel1. Das LacZ- Mel1- Gen wird über den GAL4- Transkriptionsfaktor reguliert. Mel1 kodiert für die α - Galaktosidase, die die Hydrolyse von Melibiose zu Glukose und Galaktose katalysiert. LacZ kodiert für die β - Galaktosidase.

In dieser Doktorarbeit wurden beide Verfahren parallel eingesetzt, die Expression der α - Galaktosidase war allerdings intensiver und stärker als die Expression der β - Galaktosidase. Hierfür gibt es mehrere Erklärungen. Zum einen kann es sein, dass die Konzentration des zugegebenen X- Gal's bei den durchgeführten β - Galaktosidase Assays nicht ausreichend hoch war. Zum anderen würde bei einer hohen Anzahl von Kopien des LacZ- Reportergens der β - Galaktosidase Assay nicht richtig funktionieren (laut Clontech Handbuch). Eine weitere Fehlerquelle kann ein inadäquater Gefrier/Tau- Zyklus bei der Durchführung des β - Galaktosidase Assays sein, falls es hierdurch nur zu einer unzureichenden Permeabilisierung der Zellwand kommt.

2.5 Potentielle Ursachen für die Detektion von falsch positiven Klonen

Hypothetisch können einige Punkte angeführt werden, die für das Auftreten von falsch positiven Kolonien ursächlich sein könnten [2, 49].

- Unspezifische Aktivierung: Einzelne Klone können zu einer unspezifischen Aktivierung der Reportergene führen. Aus diesem Grund wurden bei allen potentiellen Bindungspartnern, die die Reportergene aktiviert haben, weitere Tests durchgeführt (z.B. wurde der AD- Vektor mit der Sequenz eines potentiellen Bindungspartners alleine in Hefezellen eingesetzt).
- Falscher reading frame: Eine häufige Ursache kann ein verschobener reading frame sein. Durch eine Verschiebung des reading frames werden andere Aminosäuren kodiert, welche dann evtl. eine viel höhere Bindungsfähigkeit haben. Hierdurch wird dann eine Interaktion mit ITSN 2 erst möglich, diese ist aber eben keine echte Interaktion mit dem Originalsubstrat.
- Veränderung des Hefegenoms, wie z.B. Rekombinations- oder Mutationsvorgänge können zur Aktivierung von Reportergenen führen.
- Bilden von Hybridproteinen: Wenn in einem Klon zwei oder mehrere unterschiedliche GAL4AD- Vektoren enthalten sind, kann es zur Blaufärbung der Kolonien kommen, ohne dass ein Bindungspartner von ITSN 2 exprimiert wird.

Dies ist möglich, weil die verschiedenen Aktivierungsdomänevektoren in der Lage sein könnten, so genannte GAL4- AD- Hybridproteine zu exprimieren und miteinander einen transkriptionsaktivierenden Komplex zu bilden. Ein solcher Komplex wäre in der Lage eine unspezifische Expression von lacZ auszulösen. Während der Transformation ist die Hefezelle in der Lage, mehrere verschiedene GAL4- AD/cDNA- Vektoren aufzunehmen. Durch wiederholtes Ausplattieren der Kolonien auf den Selektionsnährböden kann man dies kontrollieren, da bei jedem Vorgang die Anzahl der Plasmide vermindert wird und damit auch die Expression von lacZ abnimmt.

2.6 Potentielle Ursachen für die Detektion von falsch negativen Klonen

Es gibt verschiedene Gründe für das Auftreten von falsch negativen Klonen.

- Es erfolgt keine richtige Proteinfaltung oder es kommt zur posttranslationalen Modifikation der Proteine in der Hefezelle. Deshalb kommt es nicht zur Interaktion.
- Es kommt zu einer sterischen Behinderung der Protein- Protein- Interaktion durch die fusionierten GAL4- AD/BD- Vektoren. Durch die Umklonierung der beiden Proteine sowohl in den GAL4- AD-, als auch in den GAL4- BD- Vektor und Untersuchung beider Vektorkombinationen auf entsprechende Protein- Protein- Interaktionen kann diese Ursache minimiert werden.
- Fehlende lacZ- Expression, weil die exprimierten Hybridproteine bzw. die jeweiligen Komplexe, die aus interagierenden Hybridproteinen gebildet werden, nicht in den Hefe Zellkern transportiert werden. Dieses Risiko wird durch die Immundetektion der Hybridproteine im Hefezellkern entkräftet.
- Ein falsch negatives Ergebnis kann auch auf der fehlenden Expression eines der beiden Hybridproteine beruhen. Um dies auszuschließen wurde die Expression der Hybridproteine (u.a. ITSN 2) mittels Westernblot nachgewiesen.

2.7 Potentielle Fehlerquellen im Rahmen des Matings

- Die Konzentration der Hefestämme mit den zu untersuchenden Hybridproteinen ist zu gering.
- Je eines der beiden Hybridproteine ist für die Hefezellen toxisch, dies wurde einzeln und über Verdünnungsreihen ausgeschlossen.
- Das zu untersuchende Protein (Intersectin 2) ist für die Hefezellen toxisch (wurde ebenfalls ausgeschlossen).

3. Konklusion für das Screening einer prätransformierten cDNA- Bank mit dem Yeast- Two- Hybrid System

Man sollte alle oben angeführten Einwände bzw. Fehlerquellen bei Benutzung des Yeast- Two- Hybrid Systems berücksichtigen.

Zum einen muss die Toxizität einzelner Proteine für die Hefezellen beachtet werden. Wenn Klone einen Vektor enthalten, der für ein toxisches Protein kodiert, kommt es nicht zum Wachstum und diese Klone können folglich bei dem Bank- Screening überhaupt nicht erfasst werden.

Zum anderen gibt es einige Klone, die anhand des Bank- Screenings als potentielle Bindungspartner in Frage kommen, schließlich aber doch als falsch positiv widerlegt werden und solche die fälschlicherweise gar nicht detektiert werden, obwohl sie im GAL4- AD- Vektor die Sequenz für ein potentiellen Bindungspartner des Zielproteins besitzen.

In Anbetracht dieser Tatsachen scheint es logisch, dass mit dem Yeast- Two- Hybrid System nicht jeder durch die cDNA- Bank repräsentierte Bindungspartner gefunden werden kann. Dieses System eignet sich in erster Linie zum Nachweis von in Hefezellen interagierenden Proteinen. Aufgrund der Beschaffenheit der Hefezellen kann konsekutiv angenommen werden, dass dieselbe Interaktion auch in anderen eukaryontischen Zellen stattfindet, da diese den Hefezellen ähnlich sind.

Allerdings ist der Nachweis von Protein- Protein- Interaktionen in Hefezellen im Yeast- Two- Hybrid System noch längst kein Beweis für eine tatsächliche Interaktion in anderen (menschlichen) Zellen und Geweben. Um diesen Nachweis zur erbringen, sind weitere Testverfahren wie die Koimmunopräzipitation erforderlich.

B: In vivo Nachweis von Protein- Protein- Interaktionen

1. Immunpräzipitation

Für den Nachweis von Protein- Protein- Interaktionen in der menschlichen Zelle wurden in dieser Arbeit die Immunpräzipitation verwendet. Für diese Methode gibt es natürlich auch mögliche Fehlerquellen, bzw. Schwierigkeiten, die im Folgenden diskutiert werden.

Im Rahmen der verschiedenen Waschschriffe kann es zum Protein- oder Bindungspartnerverlust kommen; ebenso kann es zu Schwierigkeiten im Rahmen des Eluierens kommen.

Bei sehr schwachen Protein- Protein- Interaktionen kann es während der Immunpräzipitation zum Lösen derselben kommen.

Die Konzentration der benutzten Antikörper kann ebenfalls, auch schon bei kleinen Abweichungen, erhebliche Auswirkung auf die Detektion haben.

Letztendlich entscheidend sind der primäre und sekundäre Antikörper. Wenn es durch Lagerung, Hitze, Kälte, o.ä. auch nur zu geringen Beeinträchtigung der jeweiligen Funktion kommt, hat dies fatale Folgen für die Detektion.

Das Kontrollexperiment für die Bindung von Spektrin mit Intersectin 2 mit Hilfe der Immunpräzipitationstechnik ergab eine Bestätigung der Bindung.

C: In vivo nachgewiesener Bindungspartner Spektrin

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zumindest ein Bindungspartner, das Spektrin (SPTAN 1: spectrin, alpha, non- erythrocytic 1 (Alpha- fodrin)) als Interaktionspartner von Intersectin 2 in diversen Tests nachgewiesen werden. Dieses Protein bzw. Mutationen oder Störungen dieses Proteins werden mit diversen Erkrankungen, wie dem Sjörgen Syndrom, dem systemischen Lupus erythematosus, der multiplen Sklerose, mit anderen Autoimmunerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [65].

Spektrin ist ein Makromolekül, das aus langen Polypeptidketten mit bis zu 240 kDa aufgebaut ist; es treten Alpha- und Betaspektrine auf, diese Proteine bilden normalerweise als Wiederholungssequenzen Heterodimere, die sich dann End- zu- End zu Tetrameren zusammenlagern (der N- Terminus jeder α - Untereinheit lagert sich an den C- Terminus jeder β - Untereinheit an). Sie sind ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts von Erythrozyten, der erste Nachweis von Spektrin erfolgte auch in Erythrozyten. Mittlerweile ist bekannt, dass Spektrin und Ankyrin eine wichtige Rolle in verschiedenen Zelltypen spielen, sie sind z.B. für die Funktion von Ionenkanal- und Zell- Adhäsionsmolekülen mitverantwortlich [4]. Spectrin und Ankyrin werden ebenfalls wie Intersectin 2 zur Gruppe der Scaffolding Proteine gezählt.

Zusammen mit Aktin, Ankyrin und dem so genannten *Band 3* Protein (Membran Anionen Transporter 1, AE1) bildet Spektrin die entscheidenden Wechselwirkungen aus, um das Zytoskelett mit der Zellmembran zu stabilisieren [21, 38]. Sie werden in dem meisten, allerdings nicht in allen, Vielzellern exprimiert. Im Gegensatz zu anderen gerüstbildenden Proteinen wie Aktin und Tubulin, kann man Spektrin und Ankyrin in Bakterien, Pflanzen und Pilzen nicht nachweisen.

Sowohl die Bindung von Spektrin via Ankyrin zu Band 3 und die Selbstassoziation von Spektrin, Tetramere und größere Oligomere zu formen sind fundamental wichtig für die Stabilität der Erythrozytenmembran, als auch für die Membranstabilität diverser anderer Zellen. Mehrere erbliche hämolytische Erkrankungen wie z.B. die hereditäre Sphärozytose belegen diese Prinzipien. Die Gruppe dieser Erkrankungen resultiert aus einem Bindungsverlust zwischen der Zellmembran und Spektrin, im Spe-

ziellen werden sie meistens durch die Abwesenheit oder die Mutation von Band 3 oder Ankyrin ausgelöst [13, 21]. Die hereditäre Sphärozytose war die erste Erkrankung, für die ein Zusammenhang mit Spektrin und Ankyrin nachgewiesen werden konnte.

Ankyrin scheint hierbei das wichtigste Adapterprotein zu sein, welches das Tetramer des Band 3 Proteins mit dem Actin- Spektrin- Zytoskelett verbindet. Diese Verbindung beinhaltet eine direkte Bindung zwischen Ankyrin und der 14. und 15. Wiederholungseinheit von β - Spektrin. Das Spektrin- Gerüst wird durch die Selbstassoziation von Spektrin, Heterodimeren in Tetramere und größere Oligomere zusammenzulagern, stabilisiert. Dieser Prozess hängt maßgeblich von der 17. Wiederholungseinheit des β - Spektrins und des kurzen NH₂ terminalen Endes des α - Spektrins ab [21]. Anfängliche Annahmen, dass die Bindung von Ankyrin zu Band 3, Ankyrin zu Spektrin und Spektrin zu sich selbst unabhängig voneinander stattfindet [21, 52], wurden widerlegt. Diese Wechselwirkungen könnten die hohe Sensitivität des Membranskeletts auf Mutationen erklären, die zwischen die Selbstassoziation und die Ankyrin Bindungsdomäne fallen.

Die Korrelation von Phänotypen, wie z.B. Sphärozytose versus Elliptozytose mit Defekten in den Membranbindungen oder der Spektrin- Selbstassoziation erscheinen nicht in allen Arten der erblichen Fehlfunktionen (milde Hämolyse oder intermediäre Erythrozytenmorphologie).

Die Mechanismen, durch die letztendlich ein solcher Defekt in der Morphologie oder in der Stabilität hervorgerufen wird, sind weiterhin unklar, lassen aber den Schluss zu, dass es funktionelle Verbindungen geben muss, am ehesten durch Konformationsänderungen zwischen Wiederholungseinheiten und wahrscheinlich in diesem Fall zwischen den α - und β - Einheiten [21, 23].

Im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen konnte nachgewiesen werden, dass die Spinozerebelläre Ataxie Typ 5 durch eine Mutation des β 3- Spektrin- Gens ausgelöst wird. Die Spinozerebelläre Ataxie ist eine dominant vererbte progressive neurodegenerative Erkrankung, die mit einer verwachsenen Sprache und einem progredienten Koordinationsverlust einhergeht [4, 27].

Darüberhinaus haben die Arbeitsgruppen um Sjoblom et al. und Kitsin et al. [31, 51] nachweisen können, dass Spektrin ebenfalls eine wichtige Rolle bei Malignomen spielt. Es konnte gezeigt werden, dass bei Mamma- und Kolorektalen Karzinomen

Spektrinmutationen vorliegen und dass bei β 2- Spektrin- defizienten Mäusen eine erhöhte Rate von hepatozellulären Karzinomen vorliegt.

Weiterhin wurden wichtige Wechselwirkungen zwischen der so genannten Protein 4.1- Familie (4.1R, 4.1G, 4.1B, 4.1N) und dem Aktin- Spektrin- Komplex über die Spectrin- Actin- Bindungsdomäne (SAB) nachgewiesen [12, 20, 54, 55]. Defekte im Bereich der Protein 4.1- Familie führen unter anderem durch Stabilitätsabnahme im Zytoskelett zur hämolytischen Anämie.

In einem kürzlich erschienen Artikel von Ipsaro et al. [28] wurde noch einmal die Wichtigkeit der Ankyrin- Spektrin- Interaktion hervorgehoben. Diese spielt mit ihren Subdomänen (im Speziellen Zu 5 und 272) eine herausragende Rolle im Bereich der Protein- Protein- Wechselwirkung zwischen der Zellmembran und dem Zellskelett, dem so genannten „vertikalen Netzwerk“ [28, 57].

In diesem Netzwerk bestehen hauptsächlich 2 „Brücken“, die Verbindung zwischen dem integralen Membranprotein Glykoprotein C zu einem Proteinkomplex (band 4.1, Spektrin und Aktin) [20, 28] im zytoskelettalen Netzwerk und die Verbindung zwischen dem Anionentransporterprotein Band 3 in der Membran über das Adapterprotein Ankyrin direkt zu β - Spektrin im zytoskelettalen Netzwerk [3, 28].

Letztendlich wurde nachgewiesen, dass die 14. und 15. Spektrin- Wiederholung die kleinste, physische Region des β - Spektrins darstellt, die mit höchster Affinität die Zu5- Subdomäne des Ankyrins bindet. Somit liegt fast die komplette Bindungsaffinität des Spektrins für Ankyrin in diesem kurzen Bereich [11, 28].

Der Spektrin- Ankyrin- Komplex spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im axonalen Anfangsbereich von Neuronen und im Bereich des Ranvier' schen Schnürrings; ein spannungsabhängiger Na^+ - Kanal bindet unter anderem an Ankyrin- G, β 4- Spektrin und Neurofascin, ein Störung dieser Wechselwirkung führt zur Unfähigkeit Aktionspotentiale zu generieren [4, 5, 32] und unter anderem zu schwerer Ataxie.

β 4- Spektrin ist ein wesentlicher Bestandteil eines hoch spezialisierten Membranuntergrunds im axonalen Anfangsbereich von Neuronen und im Bereich des Ranvier' schen Schnürrings. In Kenntnis dieser Funktionen wird angenommen, dass Spektrin und Ankyrin wichtig für die Aufrechterhaltung der Integrität myelinierter Axone sind.

Eine sogenannte „Loss- off- function“- Mutation von Ankyrin- B wird für eine dominant vererbte Herzrhythmusstörungen mit einem erhöhten Risiko des plötzlichen Herztodes verantwortlich gemacht. Diese spezifische Art der Herzrhythmusstörung wurde in

der alten Nomenklatur als Long- QT- Syndrom geführt, mittlerweile wird sie als „Sick Sinus Syndrom mit Bradykardie“ (OMIM) oder einfach als „Ankyrin- B“ Syndrom bezeichnet [4, 37].

Inwieweit die Interaktion von Spektrin und Intersectin 2 im Rahmen der Stabilität und der Funktion der Zelle und im Speziellen der Stabilität der Erythrozyten eine Rolle spielt, ist bis jetzt noch unbekannt.

Da wie aufgeführt Spektrin ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts ist und Intersectine am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind, ergibt die nachgewiesene Bindung von Intersectin 2 und α - Spektrin einen Hinweis über die molekulare Grundlage dieser Intersectin- Beteiligung am Zytoskelett.

Aufgrund der bis dato nachgewiesenen wichtigen biologischen Funktionen von Spektrin in verschiedenen Zelltypen ist zu erwarten, dass der nachgewiesenen Interaktion von Spektrin und Intersectin 2 eine wichtige Bedeutung zukommt.

Bezüglich dieser Fragestellung sind weitere Tests mit der Frage nach der Art und des Ausmaßes der Interaktionswirkung von Intersectin 2 mit Spektrin in der Zukunft durchzuführen.

VI. Literaturverzeichnis

1. Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R, Fields S (1993)
Using the two- hybrid system to detect protein- protein interactions.
In Cellular Interactions in Development, A Practical Approach, ed. Hartley,
D.A.,
Oxford University Press, Oxford: 153-179
2. Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R, Fields S (1993)
Elimination of false positives that arise in using the two- hybrid systems.
Bio Techniques 14 : 920- 924
3. Bennett V (1992)
Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cyto-
plasm.
J Biol Chem. 267: 8703-6
4. Bennett V, Healy J (2008)
Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and anky-
rin. Review.
Trends Mol Med. 14:28-36.
5. Berghs S, Aggujaro D, Dirx R Jr, Maksimova E, Stabach P, Hermel JM,
Zhang JP, Philbrick W, Slepnev V, Ort T, Solimena M (2000)
BetaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of
ranvier in the central and peripheral nervous system.
J Cell Biol. 151: 985-1002
6. Brent R, Ptashne M (1985)
A Eukaryotic Transcriptional Activator Bearing the DNA specificity of a Proka-
ryotic Repressor.
Cell 43: 729- 736

7. Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991)
The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest.
Proc. Natl. Acad. Science USA 88: 9578- 9582
8. Clontech (1996)
Yeast Protocols Handbook (PT3024-1). CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, USA
9. Clontech (1999)
Matchmaker Gal4 Two- Hybrid System 3 (PT3247-1). CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, USA
10. Clontech (2001)
Matchmaker Pretransformed Libraries (PT3183-1). CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, USA
11. Davis JQ, Bennett V (1984)
Brain ankyrin. A membrane-associated protein with binding sites for spectrin, tubulin, and the cytoplasmic domain of the erythrocyte anion channel.
J Biol Chem. 259: 13550-9
12. Discher DE, Winardi R, Schischmanoff PO, Parra M, Conboy JG, Mohandas N (1995)
Mechanochemistry of protein 4.1's spectrin-actin-binding domain: ternary complex interactions, membrane binding, network integration, structural strengthening.
J Cell Biol. 130: 897-907
13. Eber SW, Gonzalez JM, Lux ML, Scarpa AL, Tse WT, Dornwell M, Herbers J, Kugler W, Ozcan R, Pekrun A, Gallagher PG, Schröter W, Forget BG, Lux SE (1996)
Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary

- spherocytosis.
Nat Genet. 13: 214-8
14. Fernández-Chacón R, Achiriloaie M, Janz R, Albanesi JP, Südhof TC (2000)
SCAMP1 function in endocytosis.
J Biol Chem. 275: 12752-6
15. Fields S, Song O (1989)
A novel genetic system to detect protein- protein interactions.
Nature 340: 245- 247
16. Fields S (1993)
The two- hybrid system to detect protein- protein interactions
Methods: A companion to Methodes.
Enzymology 5: 116- 124
17. Fields S, Sternglanz R (1994)
The two- hybrid system: an assay for protein-protein interactions.
Trends in Genetics 10: 286- 292
18. Fowler (1995)
Use of monoclonal antibodies for western blotting with enhanced chemilumi-
nescent detection.
Methods Mol Biol. 45: 115-27
19. Gietz D, Jean AS, Woods RA, Schiestl RH (1992)
Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells.
Nucleic Acid Research 20: 1425
20. Gimm J A, An X, Nunomura W, Mohandas N (2002)
Functional characterization of spectrin-Actin-binding domains in 4.1 family of
proteins.
Biochemistry 41: 7275–7282.

21. Giorgi M, Cianci CD, Gallagher PG, Morrow JS (2001)
Spectrin oligomerization is cooperatively coupled to membrane assembly: a linkage targeted by many hereditary hemolytic anemias?
Exp Mol Pathol. 70: 215-30

22. Glenn M, Rainbow L, Auradé F, Davison A, Schulz TF (1999)
Identification of a spliced gene from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encoding a protein with similarities to latent membrane proteins 1 and 2A of Epstein-Barr virus.
J Virol. 73: 6953-63

23. Grum VL, Li D, MacDonald RI, Mondragón A (1999)
Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility.
Cell. 98: 523-35.

24. Guipponi M, Scott HS, Chen H, Schebesta A, Rossier C, Antonarakis SE (1998)
Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon.
Genomics. 53: 369-76.

25. Hope I A, Struhl K (1986)
Functional Dissection of a Eukaryotic Transcriptional Activator Protein, GCN4 of Yeast.
Cell 46: 885- 894

26. Hussain NK, Jenna S, Glogauer M, Quinn CC, Wasiak S, Guipponi M, Antonarakis SE, Kay BK, Stossel TP, Lamarche- Vane N, McPherson PS (2001)
Endocytic protein intersectin-I regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP.
Nat Cell Biol 3: 927-932,

27. Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, Gincel D, Armbrust KR, Dalton JC, Stevanin G, Dürr A, Zühlke C, Bürk K, Clark HB, Brice A, Rothstein JD, Schut LJ, Day JW, Ranum LP (2006)
Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5.
Nat Genet. 38: 184- 90
28. Ipsaro JJ, Huang L, Gutierrez L, MacDonald RI (2008)
Molecular epitopes of the ankyrin-spectrin interaction.
Biochemistry 47:7452-64
29. Keegan L, Ptashne M (1986)
Separation of DNA Binding from the Transcription- Activating Function of a Eukaryotic Regulatory Protein.
Science 231: 699- 703
30. Kennedy SP, Weed SA, Forget BG, Morrow JS (1994)
A partial structural repeat forms the heterodimer self-association site of all beta-spectrins.
J Biol Chem. 269: 11400-8
31. Kitisin K, Ganesan N, Tang Y, Jogunoori W, Volpe EA, Kim SS, Katuri V, Kalakury B, Pishvaian M, Albanese C, Mendelson J, Zasloff M, Rashid A, Fishbein T, Evans SR, Sidawy A, Reddy EP, Mishra B, Johnson LB, Shetty K, Mishra L (2007)
Disruption of transforming growth factor-beta signaling through beta-spectrin ELF leads to hepatocellular cancer through cyclin D1 activation.
Oncogene. 26:7103- 10
32. Kordeli E, Lambert S, Bennett V (1995)
AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier.
J Biol Chem. 270: 2352-9

33. Lim CS, Seet BT, Ingham RJ, Gish G, Matskova L, Winberg G, Ernberg I, Pawson T (2007)
The K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus recruits the endocytic regulator intersectin 2 through a selective SH3 domain interaction.
Biochemistry 46: 9874-85
34. Ma J, Ptashne M (1987)
A new Class of Yeast Transcriptional Activators.
Cell 51: 113- 119
35. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989)
Molecular Cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor, New York
36. McGavin MK, Badour K, Hardy LA, Kubiseski TJ, Zhang J, Siminovitch KA (2001)
The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis.
J Exp Med. 194: 1777-87
37. Mohler PJ, Le Scouarnec S, Denjoy I, Lowe JS, Guicheney P, Caron L., Driskell IM, Schott JJ, Norris K, Leenhardt A, Kim RB, Escande D, Roden DM (2007)
Defining the cellular phenotype of "ankyrin-B syndrome" variants: human ANK2 variants associated with clinical phenotypes display a spectrum of activities in cardiomyocytes.
Circulation. 115:432- 41
38. Nehls V, Zeitler-Zapf P, Drenckhahn D (1993)
Different sequences of expression of band 3, spectrin, and ankyrin during normal erythropoiesis and erythroleukemia.
Am J Pathol. 142: 1565-73

39. Nishimura T, Yamaguchi T, Tokunaga A, Hara A, Hamaguchi T, Kato K, Iwamatsu A, Okano H, Kaibuchi K (2006)
Role of numb in dendritic spine development with a Cdc42 GEF intersectin and EphB2.
Mol Biol Cell. 17: 1273-85
40. O'Bryan JP, Mohny RP, Oldham CE (2001)
Mitogenesis and endocytosis: What's at the INTERSECTIoN? Review
Oncogene. 20: 6300-8
41. Okamoto M, Schoch S, Südhof TC. (1999)
EHS1/intersectin, a protein that contains EH and SH3 domains and binds to dynamin and SNAP-25. A protein connection between exocytosis and endocytosis?
J Biol Chem. 274: 18446-54
42. Pucharcós C, Fuentes JJ, Casas C, de la Luna S, Alcántara S, Arbonés ML, Soriano, E, Estivill X, Pritchard M (1999)
Alu-splice cloning of human Intersectin (ITSN), a putative multivalent binding protein expressed in proliferating and differentiating neurons and overexpressed in Down syndrome.
Eur J Hum Genet. 7: 704-12
43. Pucharcos C, Estivill X, de la Luna S (2000)
Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis.
FEBS Lett. 478: 43-51
44. Pucharcos C, Casas C, Nadal M, Estivill X, de la Luna S (2001)
The human intersectin genes and their spliced variants are differentially expressed.
Biochim Biophys Acta. 1521: 1-11

45. Roos J, Kelly RB (1998)
Dap160, a neural-specific Eps15 homology and multiple SH3 domain- containing protein that interacts with Drosophila dynamin.
J Biol Chem. 273: 19108-19
46. Schneider S, Buchert M, Hovens CM (1996)
An in vitro assay of b- galactosidase from yeast.
Biotechniques, 20: 960- 962
47. Seifert M, Ampofo C, Mehraein Y, Reichrath J, Welter C (2007)
Expression analysis of human intersectin 2 gene (ITSN2) minor splice variants showing differential expression in normal human brain.
Oncol Rep. 17: 1207-11
48. Sengar AS, Wang W, Bishay J, Cohen S, Egan SE (1999)
The EH and SH3 domain Ese proteins regulate endocytosis by linking to dy namin and Eps15.
EMBO J. 18: 1159-71
49. Serebriiskii I, Estojak J, Berman M, Golemis EA (2000)
Approaches to detecting false positives in yeast- two hybrid systems.
Biotechniques, 28: 328- 330, 332- 336
50. Simpson F, Hussain NK, Qualmann B, Kelly RB, Kay BK, McPherson PS, Schmid SL (1999)
SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation.
Nat Cell Biol. 1: 119-24
51. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan

- J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE (2006)
The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers.
Science. 314:268- 74
52. Southgate CD, Chishti AH, Mitchell B, Yi SJ, Palek J (1996)
Targeted disruption of the murine erythroid band 3 gene results in spherocytosis and severe haemolytic anaemia despite a normal membrane skeleton.
Nat Genet. 14: 227-30
53. Strathern JN., Higgins DR (1991)
Recovery of Plasmids from Yeast into *Escherichia coli*: Shuttle Vectors.
Methods of Enzymology 194: 319- 329
54. Takakuwa Y, Tchernia G, Rossi M, Benabadji M, Mohandas N (1986)
Restoration of normal membrane stability to unstable protein 4.1-deficient erythrocyte membranes by incorporation of purified protein 4.1.
J Clin Invest. 78: 80-5
55. Tchernia G, Mohandas N, Shohet SB (1981)
Deficiency of skeletal membrane protein band 4.1 in homozygous hereditary elliptocytosis. Implications for erythrocyte membrane stability.
J Clin Invest. 68: 454-60
56. Tong XK, Hussain NK, de Heuvel E, Kurakin A, Abi-Jaoude E, Quinn CC, Olson MF, Marais R, Baranes D, Kay BK, McPherson PS (2000)
The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain.
EMBO J. 19: 1263-71
57. Tse WT, Lux SE (1999)
Red blood cell membrane disorders.
Br J Haematol. 104: 2-13

58. Yamabhai M, Hoffman NG, Hardison NL, McPherson PS, Castagnoli L, Cesareni G, Kay BK (1998)
Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains.
J Biol Chem. 273: 31401-7
59. <http://www.bionmr.phys.chem.ethz.ch/MANUALS/XL1-blue.pdf>
60. <http://www.clontech.com/techinfo/vectors/vectorsF-I/pGBKT7.shtml>
61. http://www.clontech.com/techinfo/vectors_dis/pACT2.shtml
62. <http://www.clontech.com/techinfo/vectors/vectorsF-I/pGADT7.shtml>
63. <http://www.clontech.com/techinfo/manuals/PDF/PT3049-1.pdf>
64. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ITSN2&search=itsn2&suff=txt#ort>
65. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SPTAN1&search=spectrin>
66. http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr4topo_map.pdf
67. http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/easycompvc_man.pdf
68. http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/oneshottop10_man.pdf
69. <http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna3.1+.pdf>
70. <http://labs.mgb.pitt.edu/gjoerup/Fugene6.pdf>

71. http://www.qiagen.com/literature/Handbooks/PDF/Plasmid_DNA_isolation/DE/LargeScale/PLS_Plasmid_DE/Plasmid-HB_Web_12_01de_prot_01.pdf
72. <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/flagipt1bul.pdf>
73. <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/datasheet/e4776dat.pdf>
74. http://www.eb.tuebingen.mpg.de/kiebler/lectures_00-01/vorlesung_4/sld017.htm
75. http://www.unisaarland.de/fak8/heinzle/de/teaching/Bioinformatik_GPr_2003/1_Zellzucht_Lehr_.pdf

VII. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
A. d.	Aqua destillata
AD	Aktivierungsdomäne
Ak	Antikörper
Amp.	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
3-AT	3-Amino-1,2,4- triazol
BD	Bindungsdomäne
bp	base pairs (Basenpaare)
bzgl.	bezüglich
c-	centi
ca.	circa
ccc	circular covalently closed (zirkulär kovalent geschlossen)
CTP	Cytidintriphosphat
DA	Dalton
d.h.	das heißt
DMF	N,N- Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	double stranded (doppelsträngig)
E. Coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galaktosid
kb	Kilobasenpaare
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Luria broth
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	milli
Mb	Megabasenpaare
min	Minute
ml	Milliliter
p-	mikro-
n-	nano
NaAc	Natriumacetat
OD	Optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PEG	Polyethylenglykol
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur (ca. 23°C)
s.	siehe
S.	Seite
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SD	selective dropout (Selektionsmedium)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
ss	single stranded (einzelsträngig)
St.-Lsg.	Stammlösung
Tab.	Tabelle
TAE	Tris- Acetate EDTA buffer

TAg	T-Antigen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Tymidintriphosphat
U	Unit (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
v	volume (Volumen)
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w	weight (Gewicht, Masse)
WT	Wildtyp
xg	mal Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galctoside
z.B.	zum Beispiel

VIII. Publikationen / Danksagung

Da bis jetzt Intersectin 2 als Bindungspartner von Spektrin in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, ist eine Publikation der in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse in Vorbereitung.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Cornelius Welter für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Themas danken. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich und meine Belange und hat sich viel Zeit für die persönliche Unterstützung genommen.

Mein großer Dank gilt vor allem Dr. Markus Seifert, der mich während der gesamten Laborarbeit tagtäglich betreut hat und mir mit seinem biologischen Fachwissen sehr viel geholfen hat. Er hat große Geduld mit einem „Nicht-Biologen“ bewiesen, wenn es um den ein oder anderen Versuchsaufbau ging. Ohne ihn wären manche Dinge sicherlich nicht möglich gewesen.

Ich danke allen Mitarbeitern der Humangenetik, namentlich möchte ich hier vor allem Dr. Matthias Engel aus unserer Arbeitsgruppe erwähnen und Gerlinde, die immer für Sterilgut gesorgt hat, auch teils zu unorthodoxen Zeiten.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Klaus Dieter Zang und seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. Eckart Meese für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel am Institut für Humangenetik.

Ein besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben, nicht nur finanziell sondern auch mental und mich mit dem wohl notwendigen Nachdruck letztendlich bis zum Fertigstellen der Arbeit begleitet haben.

Schließlich möchte ich nun noch ganz besonders meiner geliebten Frau Yvonne danken, die in den letzten Monaten des Schreibens sehr viel Geduld mit mir hatte und einige Abstriche hinnehmen musste. Sie hat mich immer unterstützt.

IX. Lebenslauf

Personenbezogene Daten

Name: Andreas Neisius
Adresse: Falkensteinerstrasse 74, 55129 Mainz
Tel. 06131 6278189
Mobil: 0177 7755580
E-mail: a.neisius@gmx.de
Geburtsdatum/- ort: 22 April 1978, Merzig
Nationalität: Deutsch
Familienstand: verheiratet mit Yvonne Neisius, geb. Schykowski, Ärztin
Eltern: Prof. Dr. med. Dietmar A. Neisius und
Sibylle R. Neisius, geb. Berend

Schulbildung

1984 – 1985 Scheffelschule, Grund- und Hauptschule, Herten/ Rhein
felden, Baden- Württemberg
1985 – 1988 Grundschule Sonnenfeld Homburg, Saarland
1988 – 1997 privates Gymnasium Johanneum Homburg, Saarland
7/ 1997 Allgemeine Hochschulreife (Abitur, Note: 1,6)

Wehrpflicht

09/ 1997 – 09/ 1998 Zivildienst als Rettungssanitäter beim Malteser Hilfsdienst

Universitäre Bildung

10/ 1998 – 3/ 2004 Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität
des Saarlandes, Homburg
4/ 2004 – 5/ 2005 Studium an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
8/ 2000 Physikum
3/ 2002 1. Staatsexamen
3/ 2004 2. Staatsexamen
6/ 2005 3. Staatsexamen
6/ 2005 Approbation als Arzt
(Regierungspräsidium Baden- Württemberg)

- 4/ 2004 – 5/ 2005 Praktisches Jahr an der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg
1. Terial: Chirurgie, am Universitätsspital Zürich, Schweiz
 2. Terial: Gynäkologie (Prof. Bastert, Heidelberg)
 3. Terial: Innere Medizin (Heidelberg)

Praktika/ sonstige Tätigkeiten

- 7 – 8/ 1997 Comprehensive Cancer Center, Duke University, N.
Carolina, USA
- 8/ 1998 – 3/2004 ehrenamtliche Tätigkeit als Rettungssanitäter, Malteser
Hilfsdienst
- 8/ 2000 – 3/ 2004 Studentische Hilfskraft Institut für Anatomie: Tutor für ana-
tomische Demonstrationen (Theorie u. Praxis) für Medi-
zinstudenten, Dozent für die Ausbildung von Physiothera-
peuten und Lehrpersonal in der Krankenpflege
- 3/ 2001 HNO- Facharzt Praxis (Dr. Backes) in Heusweiler
- 8 – 9/ 2002 Urologie (Prof. Vallancien) L' Institut Mutualiste Montsou-
ris, Paris
- 3/ 2003 – 3/ 2004 Studentische Hilfskraft in der Universitätsfrauenklinik
Homburg: Organisation und Betreuen klinischer Studien
(Schwerpunkt: Onkologie), Mitorganisation von Symposien
- 8/ 2003 Gastroenterologie/ Haematologie/ Onkologie (Prof. Kölbel)
KH der Barmherzigen Brüder, Trier

Sonstige Qualifikationen

- Sprachen: Englisch, Französisch
- EDV

Beschäftigungsverhältnisse

- seit 8/ 2005 Assistenzarzt der Urologischen Klinik und Poliklinik,
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
(Direktor: Prof. Dr. J. W. Thüroff)