

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. G. Sczakiel

Identifizierung und Charakterisierung
von Interaktionspartnern
des Integrins $\alpha6\beta4$

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Jan Leppert
aus Aachen

Lübeck 2003

1. *Berichterstatter:*

Herr Prof. Dr. G. Sczakiel

2. *Berichterstatter/ Berichterstatterin:*

Herr Dr. rer. Nat. U. Zähringer

Tag der mündlicher Prüfung: 11.10.2004

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 11.10.2004

I. Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	8
1.1 Integrine	8
1.2 Das Integrin $\alpha 4$	9
1.2.1 Vorkommen, Aufbau und Funktion	9
1.2.2 Funktion des $\alpha 4$ -Integrins in Hemidesmosomen	10
1.2.3 Signaltransduktion	12
1.3 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen	16
2.1.2 Medien	19
2.1.2.1 Medien für die Aufzucht von Bakterien	19
2.1.2.2 Medien für die Aufzucht von Hefen	20
2.1.3 Bakterien- und Hefestämme	21
2.1.4 Plasmide	21
2.1.5 Antikörper	22
2.1.7 Primer	22
2.1.8 Radioisotope	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Zellaufzucht	24
2.2.1.1 Zellaufzucht von E. coli	24
2.2.1.1.1 Zellaufzucht von E. coli in Flüssigmedium	24
2.2.1.1.2 Zellaufzucht von E. coli auf Agarplatten	25
2.2.1.2 Zellaufzucht von S. cerevisiae CG1945	25
2.2.1.2.1 Zellaufzucht von S. cerevisiae CG1945 in Flüssigmedium	25
2.2.1.2.2 Zellaufzucht von S. cerevisiae CG1945 auf Agarplatten	25
2.2.2 Transformation von Bakterien und Hefen	26
2.2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen	26
2.2.2.1.1 Herstellung elektro-kompetenter E. coli-Zellen	26
2.2.2.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter E. coli-Zellen	26
2.2.2.1.3 Herstellung kompetenter S. cerevisiae-Zellen	27
2.2.2.2 Transformation von E. coli	27
2.2.2.2.1 Elektroporation	27
2.2.2.2.2 Hitzeschock-Transformation	28
2.2.2.3 Transformation von S. cerevisiae	28
2.2.3 Nukleinsäure-Techniken	29
2.2.3.1 Gelelektrophorese	29
2.2.3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.3.1.2 Denaturierende Polyacrylamidgele (Sequenzierungsgel)	30
2.2.3.2 Plasmidpräparationen	31
2.2.3.2.1 Analytische Plasmidisolierung	31
2.2.3.2.2 Präparative Plasmidisolierung	32
2.2.3.2.3 Plasmidpräparation aus Hefe mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	32
2.2.3.3 Ethanol-fällung	33
2.2.3.4 Gelelektion	33
2.2.3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.2.3.6 Enzymkatalysierte Reaktionen an DNA	34
2.2.3.6.1 Restriktionsspaltung von DNA	34
2.2.3.6.2 Klenow-Auffüllreaktion	35
2.2.3.6.3 Dephosphorylierung	35
2.2.3.6.4 DNA-Ligation	36
2.2.3.6.5 Polymerasekettenreaktion	37
2.2.3.7 Sequenzierung von DNA	38
2.2.4 Arbeiten mit Proteinen	39

Danksagung

2.2.4.1 Analytische SDS-Gelelektrophorese	39
2.2.4.2 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Membranen	40
2.2.4.3 Immundetektion von Proteinen	41
2.2.4.4 Proteinextraktion aus Hefen	41
2.2.4.5 In vitro Translation	42
2.2.4.6 Immuno- und Coimmunopräzipitation	43
2.2.5 Colony-Lift Filter Assay	44
3 Ergebnisse	46
3.1 Beschreibung des Systems	46
3.2 Konstruktion und Charakterisierung von DNA-BD- λ 4-Yeast-Two-Hybrid-Vektoren	48
3.3 Amplifikation und Charakterisierung der cDNA-Bibliothek	54
3.4 Isolierung von λ 4-Interaktionspartnern	59
3.5 Charakterisierung der isolierten λ 4-Interaktionspartner	68
Überlappung	70
Überlappung	70
4 Diskussion	75
4.1 Beschreibung und Darstellung der identifizierten Proteine	76
4.1.1 Filamin B (Klon 442/9)	76
4.1.2 Dipeptidylpeptidase-like Protein 9 (DPP9) (445/1)	77
4.1.3 PKC-interacting Protein 1 (PKCI-1) (Klon 455/3)	78
4.1.4 Junctional Adhesion Molecule (JAM) (Klon 512/3)	78
4.1.5 Zn-alpha2-Glycoprotein (ZAG) (Klon 517/2)	79
4.2 Bewertung der aufgezeigten Interaktionen	80
4.3 Ausblick	82
5 Zusammenfassung	83
6 Anhang	84
6.1 Verwendete Geräte	84
6.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	85
7 Literaturverzeichnis	87
8 Danksagung	99
9 Lebenslauf	100

II Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1,2,4,-triazol
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cfu	kolonieformende Einheiten (" <i>colony forming units</i> ")
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
cm	Zentimeter
Co-IP	Coimmunopräzipitation
dATP	Desoxyriboadenosidtriphosphat
dCTP	Desoxyribocytosidtriphosphat
dGTP	Desoxyriboguanidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-BD	DNA-bindende Domäne
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fa.	Firma
FN III	Fibronectin TypIII-ähnliche Domäne
g	Erdbeschleunigung (9,81 ms ²)
G	Guanin
Grb2	" <i>growth factor receptor binding protein 2</i> "
GTP	Guanosin-5'-triphosphat

Abkürzungen

H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HRP	Peroxidase aus Meerrettich (" <i>horseradish peroxidase</i> ")
IVT	<i>in vitro</i> Translation
kb	Kilobasen oder Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
M	Mol/l
MAP	<u>M</u> itogen- <u>a</u> ktivier <u>e</u> <u>P</u> roteinkinase
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mM	Millimol/l
MW	Molekulargewicht
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>"phosphat-buffered saline"</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (" <i>polymerase chain reaction</i> ")
PEG	Polyethylenglycol
Pi3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (" <i>sodium dodecyl sulfate</i> ")
Sek.	Sekunden
ss	Einzelstrang
Std.	Stunden
T	Thymin

Abkürzungen

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>"Tris-buffered saline"</i>
TBST	<i>"Tris-buffered saline + Tween"</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
ü.N.	über Nacht
Upm.	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
W	Watt
XCB	Xylencyanol
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-Galactosid
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol/l
Ω	Ohm

1 Einleitung

1.1 Integrine

Integrine bilden eine große Familie von Transmembranrezeptoren. Sie werden aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten zusammengesetzt, der α - und der β -Untereinheit. Bis heute wurden 18 α - und 8 β -Untereinheiten entdeckt, die in den unterschiedlichsten Kombinationen vorliegen können. Die Anzahl der mittlerweile gefundenen Kombinationen beträgt 24 (Hynes, 1992; Giancotti und Maniero, 1994; Hynes, 2002).

Allen Integrinen gemeinsam ist eine große (~650 Aminosäuren) extrazelluläre Domäne, eine gewöhnlich kleinere zytoplasmatische Domäne (~50 Aminosäuren) und eine Transmembranregion (Hynes, 1987). Die α -Untereinheit besteht aus zwei Polypeptidketten, die durch proteolytische Spaltung eines Propeptids entstehen und anschließend über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden werden (siehe Abb. 1).

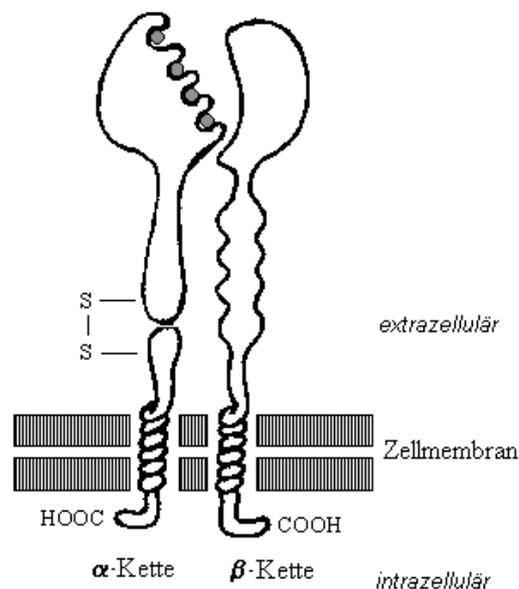


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Integrins.

Eine wesentliche Aufgabe von Integrinen besteht in der Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix. Darüber hinaus vermitteln sie auch Zell/Zell-Adhäsionen (Hynes, 1992). Die Bindung von Liganden, wie z.B. Collagen, Fibronectin, Laminin oder Oberflächenrezeptoren anderer Zellen, erfolgt über die extrazelluläre Domäne der α - und β -Untereinheit und ist von der Anwesenheit zweiwertiger Ionen abhängig.

Integrine sind an physiologischen Prozessen wie Embryogenese, Wundheilung, Hämostase und Inflammation (Hynes, 1992; Hynes, 2002) aber auch an der Tumorgenese beteiligt (Giancotti und Maniero, 1994).

Weiterhin steuern Integrine durch Signaltransduktion viele zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose (Clark und Brugge, 1995; LaFlamme *et al.*, 1997).

1.2 Das Integrin $\alpha6\beta4$

1.2.1 Vorkommen, Aufbau und Funktion

Das $\alpha6\beta4$ -Integrin findet sich in hoher Anzahl auf Zellen der Basalschicht von Plattenepithelien (Kajiji *et al.*, 1987; Suzuki und Naitoh, 1990; Sonnenberg *et al.*, 1990). Zudem wird es auf weiteren Zelltypen, wie z.B. Keratinozyten (Adams und Watt, 1991), Thymozyten (Wadsworth *et al.*, 1992) und auf Schwannzellen (Einheber *et al.*, 1993) des peripheren Nervensystems exprimiert.

Aufgrund seiner extrazellulären Struktur kann das $\alpha6\beta4$ -Integrin der Familie der Integrine zugeordnet werden (Kajiji *et al.*, 1989). Allerdings unterscheidet es sich hinsichtlich seiner intrazellulären Struktur deutlich gegenüber allen anderen Mitgliedern dieser Familie. So besitzt die zytoplasmatische Domäne der $\beta4$ -Untereinheit im Gegensatz zu den weitaus kürzeren Domänen anderer Integrine über 1000 Aminosäuren. Zum C-terminalen Ende hin beinhaltet diese 2 Paare Fibronectin TypIII-ähnlicher Domänen (Hogervorst *et al.*, 1990). Diese Paare werden wiederum durch ein sogenanntes „Connecting Segment“, eine Sequenz von 142 Aminosäuren, getrennt (siehe Abb. 3). Dieses „Connecting Segment“ scheint das Ziel mehrerer Regulationsmechanismen zu sein, einer Tyrosinphosphorylierung (Maniero *et al.*, 1995) sowie proteolytischer Prozesse (Giancotti *et al.*, 1992).

Es existieren insgesamt vier Isoformen der β 4-Untereinheit, die durch alternatives Prozessieren der mRNA generiert werden (Isoformen A-D) (Fornaro und Languino, 1997). Die am weitesten verbreitete Isoform ist die Variante β 4A (Suzuki und Naitoh, 1990).

Die Bindung des α 6 β 4-Integrins erfolgt spezifisch an verschiedene Isoformen des Laminins, wobei die höchste Bindungsaffinität zu Laminin 5 besteht (Lee *et al.*, 1992; Falk-Marzillier *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu allen anderen Integrinen verbindet das α 6 β 4-Integrin die Basalmembran nicht mit dem Actinfilamentsystem der Zelle, sondern mit den Keratinfilamenten (Hynes, 2002).

1.2.2 Funktion des α 6 β 4-Integrins in Hemidesmosomen

Intrazellulär liegt das α 6 β 4-Integrin als ein Bestandteil von Hemidesmosomen vor (Carter *et al.*, 1990; Stepp *et al.*, 1990). Hemidesmosomen sind komplexe Strukturen, welche die Basalzellen von Epithelien mit der Basalmembran verbinden (Jones *et al.*, 1998). Sie enthalten neben dem α 6 β 4-Integrin noch ein weiteres transmembranöses Protein, das Bullöse-Pemphigoid-Antigen-2 (BPAG2; BP180) (Giudice *et al.*, 1992; Hopkinson *et al.*, 1992).

Zu den übrigen Komponenten von Hemidesmosomen zählen intrazellulär lokalisierte Proteine. Dazu gehören das Bullöse-Pemphigoid-Antigen-1 (BPAG1; BP230), welches das Hauptziel von Autoantikörpern bei der blasenbildenden Hautkrankheit bullöses Pemphigoid darstellt (Sawamura *et al.*, 1991), und Plectin (HD1) (Hieda *et al.*, 1992 Okumura *et al.*, 1999). BP180 bildet mit der α 6-Untereinheit (Hopkinson *et al.*, 1998) und der β 4-Untereinheit (Borradori *et al.*, 1997; Aho und Uitto, 1998) einen Komplex, der für die Adhäsion an die Basallamina verantwortlich ist. BP180 interagiert über die Bindung an BP230 mit dem Keratinfilamentsystem der Zelle (Hopkinson *et al.*, 2000), wie ein Versuch mit BP230^{-/-} Knock-out-Mäusen zeigte (Guo *et al.*, 1995). Diese Mäuse wiesen zwar eine Bildung von Hemidesmosomen auf, welche jedoch nicht mit den Keratinfilamenten verbunden waren. Weiterhin vermittelt Plectin (HD1) die Bindung zwischen der zytoplasmatischen Domäne der β 4-Untereinheit und dem Keratinfilamentsystem (Niessen *et al.*, 1997; Reznicek *et al.*, 1998). Diesen durch α 6 β 4 vermittelten transmembranösen Verbindungen zwischen Basallamina und Zelle kommt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Integrität der Haut und anderer Epithelien zu (Dowling *et al.*, 1996). In einem Versuch von van der Neut und Mitarbeitern starben β 4^{-/-} Knock-Out-Mäuse bereits pränatal an einem

Einleitung

Syndrom, das der humanen Erkrankung Epidermolysis bullosa ähnelt (Van der Neut *et al.*, 1996). Bei dieser Erkrankung schließen sich Hemidesmosomen nicht zu Komplexen zusammen, wodurch sich die Basalzellen von Epithelien nicht an die Basallamina verankern können (Niessen *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996). Gagnaux-Palacios und Mitarbeiter konnten diesen Effekt in Zellen von Patienten mit Epidermolysis Bullosa durch Transfektion mit einer intakten $\beta 4$ -Untereinheit umkehren (Gagnaux-Palacios *et al.*, 1997).

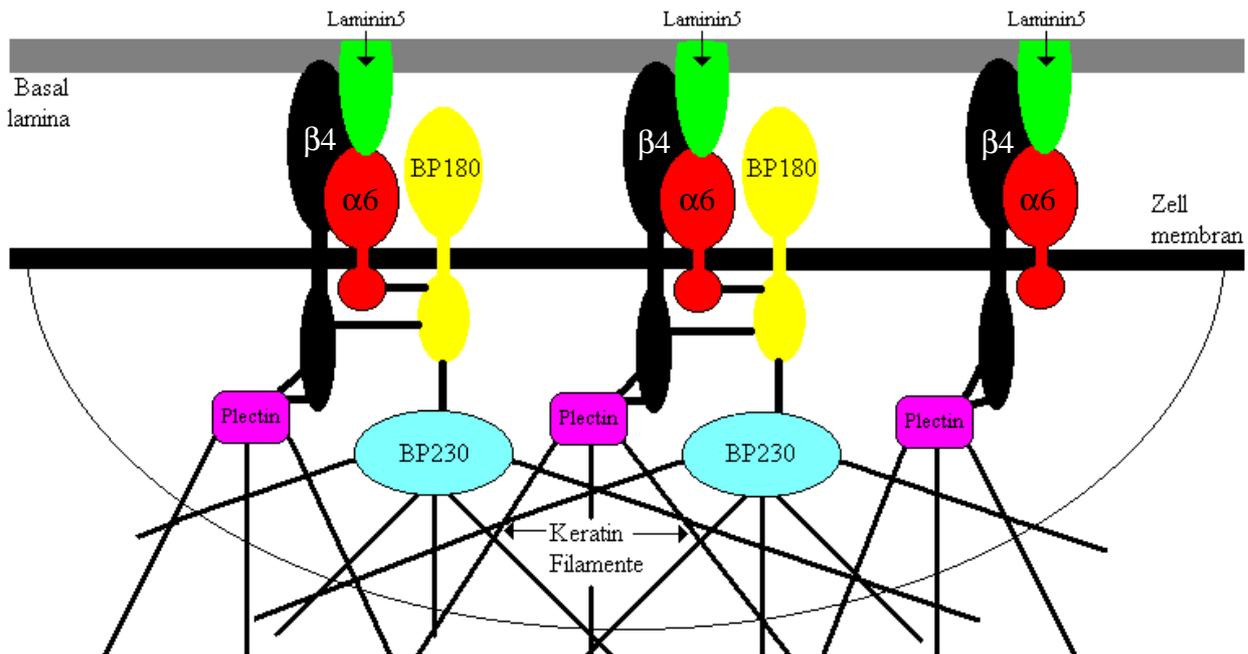


Abbildung 2: Aufbau eines Hemidesmosoms
BP230: Bullöses-Pemphigoid-Antigen 1 (türkis)
BP180: Bullöses-Pemphigoid-Antigen 2 (gelb)
 $\alpha 6$: alpha6-Untereinheit des Integrins $\alpha 6 \beta 4$ (rot)
 $\beta 4$: beta4-Untereinheit des Integrins $\alpha 6 \beta 4$ (schwarz)
Die Begrenzung des Hemidesmosoms ist schematisch als Halbkreis dargestellt.

Der molekulare Interaktionsmechanismus zwischen den transmembranösen und intrazellulären Komponenten von Hemidesmosomen ist bisher nicht aufgeklärt. Mutationsanalysen mit verschiedenen Formen von $\beta 4$ zeigten, daß die Interaktion von $\alpha 6 \beta 4$ mit den zytoskelett-bindenden Proteinen auf einen bestimmten Bereich zurückzuführen ist (Spinardi *et al.*, 1995). Dieser liegt auf der zytoplasmatischen Domäne der $\beta 4$ -Untereinheit und umfasst eine 303 Aminosäuren lange Region, welche die ersten beiden Fibronectin TypIII-ähnlichen Domänen und das Connecting-Segment enthält (Spinardi *et al.*, 1993).

1.2.3 Signaltransduktion

Die Adhäsionsfunktion des $\alpha 6\beta 4$ -Rezeptors scheint in komplexen Epithelien wie der Epidermis mit der Aktivierung von Signalwegen gekoppelt zu sein (Giancotti, 1996).

Auf der zytoplasmatischen Domäne der $\beta 4$ -Untereinheit finden sich fünf putative NxxY Tyrosinphosphorylierungsmotive (Position des Tyrosinrestes: As 855, As 1039, As 1343, As 1526, As 1642), die häufig in Signalproteinen vorkommen und als Erkennungssequenz für Phosphotyrosinbindungs-Domänen (PTB) dienen (Kavanaugh *et al.*, 1995). Bisher konnte für drei dieser Motive (As 1342, As 1526, As 1642) eine Phosphorylierung *in vitro* nachgewiesen werden (Maniero *et al.*, 1995; Dans *et al.*, 2001). Ein weiteres bekanntes Motiv der $\beta 4$ -Untereinheit ist das YxxL-Motiv (Position des Tyrosinrestes: As 1422 und As 1440). Dieses kommt in Transmembranrezeptoren (Immun- und Zytokinrezeptoren) vor und ist in diesen räumlich ähnlich angeordnet wie auf der $\beta 4$ -Untereinheit (Giancotti, 1997). Das YxxL-Motiv stellt eine Erkennungssequenz für Proteine mit einer SH2-Domäne dar (Pawson, 1995). Maniero und Mitarbeiter konnten nachweisen, daß die $\beta 4$ -Untereinheit an den Tyrosinresten 1422 und 1440 phosphoryliert wird und essentiell ist für die Assemblierung von Hemidesmosomen (Maniero *et al.*, 1995).

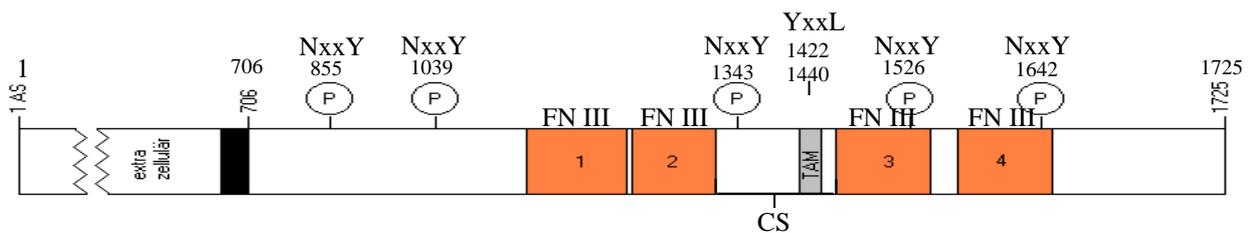


Abbildung 3: Die zytoplasmatische Domäne der $\beta 4$ -Untereinheit

FN III: Fibronectin TypIII-ähnliche Domänen

CS: "connecting segment"

NxxY: putatives Tyrosinphosphorylierungsmotiv

YxxL: Erkennungssequenz für SH2-Domänen

Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen zeigten *in vitro* Studien, daß die $\beta 4$ -Untereinheit die Signalproteine Shc/Grb2 rekrutieren kann (Maniero *et al.*, 1995; Dans *et al.*, 2001). Shc ist ein Adaptorprotein der Signaltransduktion, das eine SH2 und eine PTB besitzt (Yajnik *et al.*, 1996). Die Rekrutierung von Shc durch die $\beta 4$ -Untereinheit kann durch eine Tyr→Leu-Substitution je eines Tyrosins durch Leucin an den Positionen 1526 oder 1642 unterbunden

werden (Dans *et al.*, 2001). Durch eine Tyr→Leu-Substitution an den Positionen 1422 und 1440 konnte eine Schwächung der Bindung von Shc an die $\beta 4$ -Untereinheit gezeigt werden (Dans *et al.*, 2001). Dans und Mitarbeiter vermuteten daher, daß die PTB von Shc an die NxxY-Motive der Positionen 1526 und 1624 bindet und dabei der an die beiden YxxL-Motive bindenden SH2-Domäne von Shc eine unterstützende Funktion bei der Bindung an die $\beta 4$ -Untereinheit zukommt. Shc fungiert als bekannter Adaptor für Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2) und spielt eine wichtige Rolle im Ras-vermittelten Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP)-Signalweg (Maniero *et al.*, 1997).

Das Grb2-Protein kann als Komponente der Signalübertragung die Signale über mSOS an RAS weiterleiten (Maniero *et al.*, 1997; Wary *et al.*, 1996; Egan *et al.*, 1993). Das aktivierte Ras-Protein aktiviert wiederum den MAP-Signalweg und führt so zur Modulation der Genexpression und dadurch zur Regulation von Proliferation oder Differenzierung (Cowley *et al.*, 1994). Ein schematisches Modell dieser Signaltransduktion veranschaulicht Abbildung 4. Diese Beobachtungen erklären wie zelluläres Verhalten, unter anderem Zellproliferation und -differenzierung, beeinflußt werden könnte (Giancotti, 1996).

So ist die Expression von $\alpha 6\beta 4$ in der Epidermis ausschließlich auf basale, stark proliferierende Keratinozyten beschränkt (Kajiji *et al.*, 1989). Nach Zellteilung und Migration in suprabasale Schichten, wird $\alpha 6\beta 4$ nicht mehr exprimiert. Die Progression des Zellzyklus wird gehemmt und die Differenzierung der Zellen beginnt (Hall und Watt, 1989). Weiterhin konnte in Basalzellkarzinomen, (Schofield *et al.*, 1998) stark proliferierenden Karzinomzellen des Plattenepithels, eine hohe $\alpha 6\beta 4$ -Expression nachgewiesen werden (Kimmel und Carey, 1986).

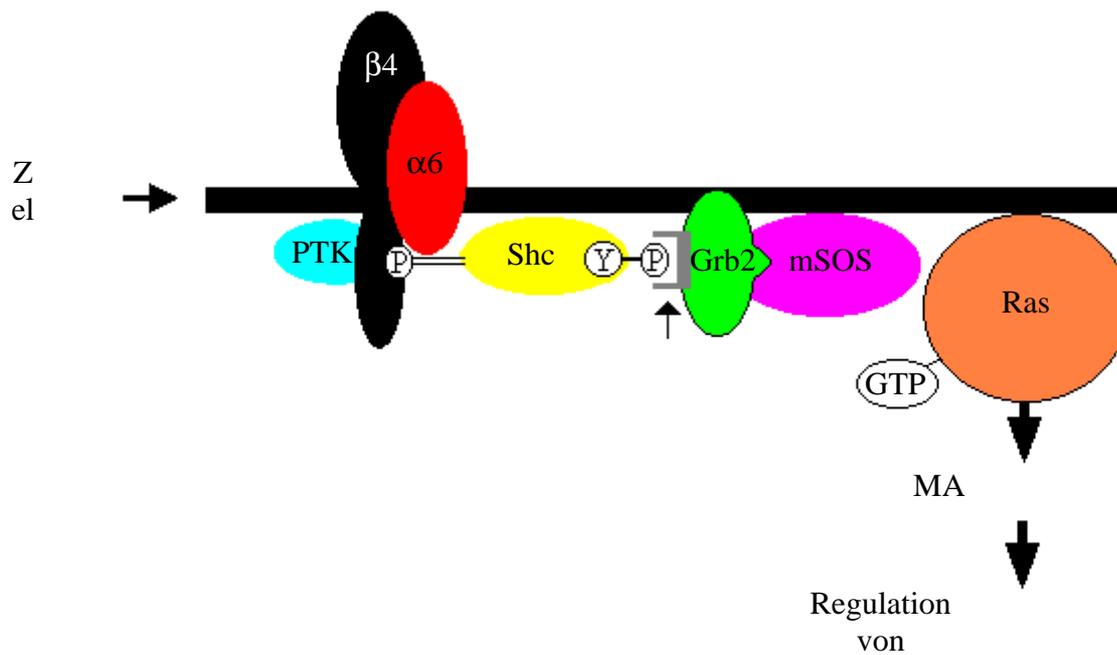


Abbildung 4: Die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs durch α6β4

Weitere Beziehungen zwischen Signalwegen und dem Integrin α6β4 wurden in Coimmunopräzipitationsexperimenten gezeigt. Diese deuten auf eine Verbindung von Integrin α6β4 mit dem Phosphoinositol 3-Kinase-Signalweg (Pi3-K) hin (Hintermann *et al.*, 2001).

In Transfektionsstudien zeigten Zellen, welche mit dem Erb2-Onkogen transfiziert wurden, eine Überexpression von α6β4. Nur in Zellen, die diese α6β4-Überexpression zeigten, konnte

eine übernormale Aktivierung des Pi3-K-Signalweges detektiert werden. Außerdem zeigten diese Zellen eine stark gesteigerte Invasivität (Gambaletta *et al.*, 2000).

Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen scheinen Patienten mit Mammakarzinomen, bei denen eine $\alpha6\beta4$ -Überexpression nachgewiesen wurde, eine wesentlich schlechtere Prognose zu haben. Bei diesen Patienten zeigten die Karzinome eine wesentlich höhere Metastasierungsneigung als die Kontrollgruppe (Shaw *et al.*, 1997).

Die molekularen Interaktionsmechanismen, mit denen $\alpha6\beta4$ Pi3-K aktiviert, sind bisher nicht bekannt.

1.3 Zielsetzung

Die Funktion des $\alpha6\beta4$ -Integrins beschränkt sich nicht nur auf seine Adhäsionsfunktion, sondern das $\alpha6\beta4$ -Integrin kann über Signaltransduktion die Genexpression, proliferative Aktivität und Differenzierung beeinflussen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Interaktionsproteine zu identifizieren, die für Aktivierung oder Regulation der Signalübertragungen oder der Adhäsionsfunktion via der zytoplasmatischen Domäne der $\beta4$ -Untereinheit verantwortlich sein können. Hierzu sollte das Yeast-Two-Hybrid System verwendet werden, welches ein weitverbreitetes System zur Detektion interagierender Proteine darstellt. Der erste Teilaspekt dieses Vorgehens ist die Konstruktion sogenannter Fusionsproteine, die eine Fusion eines Teils der zytoplasmatischen Domäne der $\beta4$ -Untereinheit und eines Yeast-Two-Hybrid-Vektors darstellen. Als nächster Schritt folgte die Etablierung des Yeast-Two-Hybrid-Systems und die simultane Transformation der Fusionsproteine mit einer cDNA-Bibliothek in Hefezellen, mithilfe dessen interagierende Proteine identifiziert werden sollen. Da dieser Schritt häufig mit falsch positiven Ergebnissen einhergeht, mußte die Verifizierung der positiven beziehungsweise der Ausschluß der falsch positiven Proteine erfolgen.

Um eine genauere Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer *in vivo* Interaktion treffen zu können sollen die Ergebnisse des Yeast-Two-Hybrid-Systems anschließend proteinbiochemisch überprüft werden. Dazu sollen eventuell positive Proteine mit den Fragmenten der zytoplasmatischen Domäne der $\beta4$ -Untereinheit coimmunopräzipitiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen

In dieser Arbeit wurde lediglich Wasser verwendet, welches durch eine Millipore®-Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q® biocell aufbereitet worden war.

<u>Blockpuffer:</u>	3 % Rinderserumalbumin in Waschpuffer	
<u>Blotpuffer:</u>	192 mM	Glycin
	25,0 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1,3 mM	SDS
	5,0 % (v/v)	Methanol
<u>Denhardt-Lösung:</u>	5 g/l	Ficoll Typ 400
	5 g/l	Polyvinylpyrrolidin
	5 g/l	Rinderserumalbumin
<u>DNA-Probenpuffer (6x):</u>	100 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	70,0 % (v/v)	Glycerin
	200 mM	EDTA, pH 8,3
	0,05 % (v/v)	Bromphenolblau
	0,05 % (v/v)	XCB
<u>Elektrophoresepuffer:</u>	30 g/l (w/v)	Tris/HCl, pH 7,5
	144 g/l (w/v)	Glycerin
<u>„Gritz-Puffer“:</u>	650 µl	Proteinpuffer
	6,5 µl	100 mM PMSF
	6,5 µl	31 mg/ml Benzamidin
	6,5 µl	30 µg/ml Leupeptin
	6,5 µl	140 µg/ml Pepstatin
	6,5 µl	2,1 mg/ml Aprotinin

Material und Methoden

<u>Hybridisierungslösung:</u>	50,0 % (v/v)	Formamid
	5 x	SSC
	5 x	Denhardt-Lösung
	0,1 % (w/v)	SDS
	50,0 mM	NaH ₂ PO ₄ -Puffer, pH 6,5
	50,0 µg/ml	denaturiertes Heringssperma
<u>10x Ligationspuffer:</u>	500 mM	Tris/HCl pH 7,5
	100 mM	MgCl ₂
	100 mM	DTT
<u>PBS:</u>	150 mM	NaCl
	16 mM	NaH ₂ PO ₄
	4 mM	Na ₂ HPO ₄
<u>PEG/LiAc-Lösung:</u>	8 ml	50 % PEG
	1 ml	10x TE-Puffer
	1 ml	10x LiAc
<u>Proteinpuffer:</u>	6 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	10 % (v/v)	Glycerin
	2 % (w/v)	SDS
	5 % (v/v)	Me-EtOH
	0,25 % (v/v)	Bromphenolblau
<u>Sammelgelpuffer:</u>	0,5 M	Tris/HCl, pH 6,8
	0,4 % (w/v)	SDS
		pH 6,8
<u>SDS-Loadingbuffer:</u>	5 ml	80%-iges Glycerin
	15 ml	10%-iges SDS
	6,25 ml	4 x Sammelgelpuffer
	23,75 ml	H ₂ O
<u>SSC (20x):</u>	3,0 M	NaCl
	0,5 M	Na-Citrat
		pH 7,0

Material und Methoden

<u>TAE-Puffer (50x):</u>	2 M	Tris/HCl, pH 7,5
	5 mM	EDTA
	5,71 % (v/v)	Eisessig pH 8,3
<u>TBE-Puffer (5x):</u>	445 mM	Tris/HCl, pH 8,3
	445 mM	Borsäure
	10 mM	EDTA (Titriplex)
<u>TBS-Puffer:</u>	20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	0,5 M	NaCl pH 7,6
<u>TBST-Puffer:</u>	100 ml	TBS
	0,1 % (v/v)	Tween 20
<u>TE-Puffer (10x):</u>	100 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	10 mM	EDTA
<u>Trenngelpuffer:</u>	1,5 M	Tris/HCl, pH 8,8
	0,4 % (w/v)	SDS pH 8,8
<u>Waschpuffer:</u>	10,0 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	100,0 mM	NaCl
	0,1 % (v/v)	Tween 20
<u>Z-Puffer:</u>	16,2 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O
	5,5 g/l	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	0,75 g/l	KCl
	0,246 g/l	MgSO ₄ x 7H ₂ O pH 7,0
<u>X-gal Stocklösung:</u>	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranosid wurde mit einer Konzentration von 20 mg/ml bei -20°C gelagert.	
<u>Z-Puffer/X-gal-Lösung:</u>	100,0 ml (v/v)	Z-Puffer
	0,27 ml (v/v)	β -Mercaptoethanol
	1,67 ml (v/v)	X-gal Stocklösung

2.1.2 Medien

2.1.2.1 Medien für die Aufzucht von Bakterien

<u>LB-Medium (pro l):</u>	10 g	Peptone 140
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl

Zunächst wurden 900 ml H₂O zugefügt, anschließend mit NaOH der pH auf 7,4 eingestellt. Dann wurde das Medium mit H₂O auf 1 Liter aufgefüllt und autoklaviert. Für die Anzucht von plasmidtragenden *E.coli* Stämmen wurde nach Abkühlung auf 55°C dem Medium eine entsprechende Menge Antibiotikum zugesetzt. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar-Agar zugefügt.

M9-Medium:

<u>10x Stammlösung:</u>	60 g/l	NaH ₂ PO ₄
	30 g/l	KH ₂ PO ₄
	10 g/l	NH ₄ Cl
	5 g/l	NaCl

Der pH wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt und anschließend autoklaviert.

<u>1x M9-Medium:</u>	100 ml	10x Stammlösung
	1 ml	1 M MgSO ₄
	1 ml	0,1 M CaCl ₂
	5 ml	40 % Glukoselösung

Das Medium wurde anschließend mit H₂O auf 1 Liter aufgefüllt.

<u>SOC-Regenerationsmedium (200 ml):</u>	4,0 g	Peptone 140
	1,0 g	Hefeextrakt
	37,2 g	KCl
	117,0 g	NaCl
	406,6 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O
	493,3 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
	793,0 g	Glukose

Material und Methoden

Zunächst wurden die Substanzen in 150 ml H₂O gelöst und der pH mit NaOH auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde das Medium mit H₂O auf 200 ml aufgefüllt und aliquotiert.

2.1.2.2 Medien für die Aufzucht von Hefen

<u>YPD-Medium (pro l):</u>	20 g	Difco Peptone
	10 g	Hefeextrakt

Nach Zugabe von 950 ml H₂O wurde der pH mit HCl auf 5,8 eingestellt und das Medium autoklaviert. Anschließend wurde das Medium auf ~55°C abgekühlt und 50 ml einer sterilen 40%-igen Glukoselösung zugesetzt. Für YPD-Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 20 g/l Agar hinzugefügt.

<u>SD-Medium (pro l):</u>	6,7 g	Yeast nitrogen base ohne Aminosäuren
	20 g	Agar (nur für Platten)
	850 ml	H ₂ O
	100 ml	Dropout-Lösung (10x) pH 5,8

Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Nach der Abkühlung auf ~55°C folgte die Zugabe von 3AT (3-Amino-1,2,4-triazol), entsprechend gewünschter Endkonzentration, sowie 50 ml einer 40%-igen Glukoselösung.

Dropout-Lösung (10x): 10x Dropout-Lösungen bestehen aus verschiedenen Kombinationen von Aminosäuren. Mit SD/-Trp/-Leu wird ein Medium bezeichnet, dem eine Dropoutlösung zugesetzt wurde, der Trp (Tryptophan) und Leu (Leucin) fehlen.

2.1.3 Bakterien- und Hefestämme

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Referenz</i>
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>recA13</i> , <i>supE44</i> , <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> (Sm ^r), <i>xyl-5</i> , λ ⁻ <i>leu mtl-1</i>	Lorow und Jessee, 1990
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>), U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>HsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>S. cerevisiae</i> CG1945	MATa, <i>ura3.52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> <i>,trp1-901</i> , <i>leu2-3.112</i> , <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>cyh2</i> , LYS2:: <i>gal1uas- gal1tata-his3</i> URA3:: <i>gal1uas- gal1tata-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994

Tabelle 1: Verwendete Bakterien- und Hefestämme

2.1.4 Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Spezifikation</i>	<i>Länge(kb)</i>	<i>Referenz</i>
pACT2	<i>gal4 AD</i> , <i>leu2</i> , <i>amp^R</i> , HA epitope tag	8,1	Li <i>et al.</i> , 1994
pAS2-1	<i>gal4 DNA-BD</i> , <i>trp1</i> , <i>amp^R</i> , <i>cyh2</i>	8,4	Harper <i>et al.</i> , 1993
pCL1	Wildtyp <i>gal4-Gen</i> , <i>leu2</i> , <i>Amp^R</i>	15,3	Fields und Song, 1989
pVA3-1	pAS2-1-Derivat; Murines p53 <i>trp1</i> , <i>Amp^R</i>	9,4	Iwabuchi <i>et al.</i> , 1993 Chien <i>et al.</i> , 1991
pLAM5'-1	pAS2-1-Derivat; Humanes Lamin; <i>trp1</i> , <i>amp^R</i>	9,1	Bartel <i>et al.</i> , 1993
pTD1-1	pACT2-Derivat; T-Antigen, <i>leu2</i> , <i>amp^R</i>	9,0	Li und Fields, 1993
pAS-PvuII/CT	pAS2-1-Derivat mit 237 bp β 4-Integrin	8,6	Diese Arbeit
pAS-EcoRV/BamHI	pAS2-1-Derivat mit 438 bp β 4-Integrin	8,8	Diese Arbeit

Material und Methoden

pAS-EcoRI/NaeI	pAS2-1-Derivat mit 493 bp β 4-Integrin	8,8	Überlassen durch Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far
----------------	---	-----	--

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

2.1.5 Antikörper

- Anti-HA-Antikörper (IgG): Ein polyklonaler Antikörper, der mit hoher Affinität ein Peptid mit der Sequenz YPYDVPDYA erkennt (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, USA (HA-Tag Polyclonal Antibody)).
- Anti-Myc-Antikörper (IgG): Monoklonaler Antikörper, der eine Sequenz des humanen p62-c-Myc-Gens erkennt. Diese liegt zwischen den Aminosäuren 408-439 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, USA (c-Myc Monoclonal Antibody)).
- DNA-BD-Antikörper (IgG): Monoklonaler Antikörper, der spezifisch an die DNA-Bindungsdomäne des hefespezifischen Proteins Gal4 bindet (Aminosäuren 1-147) (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, USA (GAL4 DNA-BD Monoclonal Antibody)).
- HRP-conjugated-Antibody (IgG): Polyklonaler HRP ("*horseradish peroxidase*") konjugierter Antikörper, der den Fc-Teile anderer Antikörper erkennt und bindet (Jackson ImmunoResearch vertrieben durch Dianova, Hamburg).

2.1.7 Primer

Die Primersequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

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

AD-5' 5'- GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG AT -3'

Co-IP-AD-3' 5'- ACT TGC GGG GTT TTT CAG TAT CTA CGA T -3'

Co-IP-AD-5'	5'- AAA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA GCC GCC ACC ATG TAC CCA TAC GAC GTT CCA GAT TAC GCT CCA CCA AAC CCA AAA AAA GAG -3'
Co-IP-BD-3'	5'- TAC CTG AGA AAG CAA CCT GAC CTA CAG G -3'
Co-IP-BD-5'	5'- AAA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA GCC GCC ACC ATG GAG GAG CAG AAG CTG ATC TCA GAG GAG GAC CTG GGT CAA AGA CAG TTG ACT GTA TCG -3'
LF-3'	5'- CGG GAT CCT TAG CCG TGA GGG GGT GGC T -3'
LF-5'	5'- CGG AAT TCT GTG CCT GCT GCA AGG C -3'
FN2-5'	5'- CGG AAT TCC GCA CCC ACC AGG AAG T -3'
TAM-3'	5'- CGG GAT CCT TAC AGG CGA GAG TCG TGG GA -3'
TAM-5'	5'- CGG AAT TCA ACC TGG CCA CCC AGC -3'
FN3-3'	5'- CGG GAT CCT TAC GGG TGC ACC TGG GAT TC -3'
FN4-5'	5'- CGG AAT TCC AGA GCC CAC TGT GTC CC -3'
CT-3'	5'- CGG GAT CCT CAA GTT TGG AAG AAC TGT TG -3'

2.1.8 Radioisotope

EasyTaq™Methionine L-(³⁵S) (1175 Ci/mM)

Perkin Elmer, Zaventem, Belgien

2.2 Methoden

Ein großer Teil der in dieser Arbeit verwendeten Versuchsprotokolle sind im Laborhandbuch Molecular Cloning von Sambrook, Fritsch und Maniatis (1989) detailliert beschrieben. Die unten angegebenen Methoden umfassen daher lediglich dort nicht aufgeführte oder modifizierte Arbeitsvorschriften.

2.2.1 Zellaufzucht

2.2.1.1 Zellaufzucht von *E. coli*

2.2.1.2.1 Zellaufzucht von *E. coli* in Flüssigmedium

Für die Aufzucht von *E. coli* in Flüssigmedium wurde autoklaviertes LB-Medium verwendet. Diesem wurde im Bedarfsfall vor Gebrauch das für die Selektion erforderliche Antibiotikum zugesetzt.

Verfahren: Für große Volumina (>150 ml) wurde zunächst eine Übernachtskultur von 4 ml angelegt. Sowohl kleinere Volumina als auch Übernachtskulturen wurden direkt aus einer Glycerinkultur oder mit Einzelkolonien von einer Platte angeimpft. Die Kultur wurde dann in einem Warmluftschüttler (200-250 Upm.) bei 37°C über Nacht inkubiert und anschließend durch Zentrifugation für 5 Min. bei 4°C und 15000 x g pelletiert. Im Bedarfsfall wurden transformierte Zellen als Glycerinkultur konserviert. Zur Herstellung einer Glycerinkultur wurden 0,5 ml Bakterienkultur mit 0,5 ml 80%-igem, autoklaviertem Glycerin gründlich gemischt und bei -80°C eingefroren. Diese so gewonnenen Glycerinkulturen sind mehrere Jahre haltbar.

2.2.1.1.2 Zellaufzucht von *E. coli* auf Agarplatten

Verfahren: Zur Herstellung von Agarplatten wurde LB-Medium mit 15 g/l Agar versetzt, anschließend autoklaviert und auf Petrischalen ($\varnothing=110$ mm) gleichmäßig verteilt.

10-100 μ l einer 1:10000 verdünnten Glycerinkultur, einer Übernachtskultur oder eines Transformationsansatzes wurden mit einer sterilen Pipette auf eine Agarplatte ausgestrichen. Nach dem Trocknen der Platten für 5 Min. bei Raumtemperatur wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei sichtbar werden einzelner Kolonien wurde das weitere Wachstum durch sofortige Lagerung bei 4°C stark verzögert und so eine Konservierung für mehrere Wochen erreicht.

2.2.1.2 Zellaufzucht von *S. cerevisiae* CG1945

2.2.1.2.1 Zellaufzucht von *S. cerevisiae* CG1945 in Flüssigmedium

Verfahren: Für die Anzucht von CG1945 wurden 50 ml YPD-Medium in einem Schikanekolben mit 2-3 Hefekolonien einer YPD-Platte beimpft und für 16-18 Std. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml des Mediums mit einer Pipette abgenommen und die optische Dichte (OD) bestimmt. Weitere 250 ml YPD wurden mit einem entsprechenden Volumen der angewachsenen Hefe angeimpft bis die OD 0,2 betrug. Es folgte eine weitere Inkubation bei 200 Upm. bei 30°C bis eine OD von 0,5 erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und weiterverarbeitet.

2.2.1.2.2 Zellaufzucht von *S. cerevisiae* CG1945 auf Agarplatten

Verfahren: Zur Herstellung von Agarplatten wurde YPD-Medium oder SD-Medium mit 20 g/l Agar versetzt, anschließend autoklaviert und auf Petrischalen ($\varnothing=110$ mm) gleichmäßig verteilt. 150 μ l einer Flüssigmediumkultur oder eines Transformationsansatzes

wurden mit einer sterilen Pipette auf einer Platte ausgestrichen. Nach dem Trocknen der Platten für 5 Min. bei Raumtemperatur wurden die Platten für 3-6 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.2 Transformation von Bakterien und Hefen

2.2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

2.2.2.1.1 Herstellung elektro-kompetenter *E. coli*-Zellen

Verfahren: 5 ml LB-Medium wurden mit *E. coli*-Zellen beimpft, über Nacht bei 37°C im Warmluftschüttler bei 210 Upm. inkubiert und anschließend auf jeweils 2x 500 ml LB-Medium aufgeteilt. Dieser Ansatz wurde dann bei 210 Upm. und 37°C inkubiert bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 (ca. 3-3½ Std.). Anschließend wurde die Zellsuspension auf 20x 50 ml Falconröhrchen verteilt und für 15 Min. bei 4°C und 2800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 50 ml eiskaltem 10%-igem (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach einer erneuten 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 2800 x g wurde der Überstand wiederum verworfen. Die gewonnenen Pellets wurden mit je 25 ml eiskaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert und auf 10x 50 ml Falconröhrchen verteilt. Nach der dritten 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 2800 x g wurden die 10 Pellets wiederum mit je 25 ml eiskaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert und anschließend in 5x 50 ml Falconröhrchen zusammengeführt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die 5 Pellets mit 700 µl 10%-igem Glycerin resuspendiert, zusammengeführt, gemischt und zu je 170 µl aliquotiert. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

2.2.2.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Verfahren: 5 ml LB-Medium wurden mit *E. coli*-Zellen beimpft, über Nacht bei 37°C und 210 Upm. inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurde in einem 1 Liter Schikanekolben 500 ml LB-Medium angeimpft und unter starkem Schütteln (200-250 Upm.) bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer OD von 0,4-0,6 erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 4°C und 5000 x g. Das Zellpellet wurde anschließend mit 100 ml eiskalter 100 mM Calciumchloridlösung resuspendiert und 25 Min. bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen in 5 ml eiskaltem 75 mM Calciumchlorid/25 % (v/v)

Glycerin aufgenommen und unmittelbar zur Transformation eingesetzt bzw. in Aliquots von je 1 ml bei -70°C eingefroren.

2.2.2.1.3 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Verfahren: Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde von einer YPD-Platte eine oder mehrere Hefekolonien in 1 ml flüssiges YPD-Medium überimpft. Nach gründlicher Resuspension des Zellpellets mittels eines Vortexers wurde die Zellsuspension in 50 ml YPD-Medium überführt und mit 250 Upm. bei 30°C für 16-18 Std. inkubiert. Bei einer OD_{600} von ~ 1 war die stationäre Phase der Zellkultur erreicht. Mit dieser Kultur wurden 300 ml YPD-Medium auf eine $\text{OD}_{600} \sim 0,2$ eingestellt. Die Zellsuspension wurde mit 250 Upm. bei 30°C für etwa 3 Std. inkubiert bis eine OD von $\sim 0,5$ erreicht wurde. Anschließend wurden die 300 ml YPD-Medium in 6x 50 ml Falconröhrchen überführt und die Zellen mit $1400 \times g$ für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Resuspendiert wurden die Zellpellets in je 5 ml 1x TE-Puffer. Nach erneuter Zentrifugation mit $1400 \times g$ für 5 Min. bei Raumtemperatur wurden die Zellen in frisch angesetzten 1,5 ml 1x TE/LiAc-Puffer resuspendiert. Die Zellen konnten entweder direkt für eine Transformation genutzt oder wenige Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.2.2.2 Transformation von *E. coli*

Um Plasmide in Bakterien der Gattung *E. coli* einzuschleusen, existieren verschiedenste Methoden. Angewendet wurden in dieser Arbeit die Verfahren Elektroporation und Hitzeschock-Transformation.

2.2.2.2.1 Elektroporation

Die Elektroporation eignet sich dafür, Zellen mit geringen Mengen Plasmid-DNA zu transformieren. Hierbei sinkt die Transformationseffizienz bei steigender Konzentration von Plasmid-DNA.

Verfahren: Zu 140 µl elektrisch-kompetenten *E. coli*-Zellen (siehe 2.2.2.1.1) wurden 1 µl Plasmid-DNA (~0,005-0,1 µg) gegeben. Die Zwischenlagerung der Ansätze erfolgte immer auf Eis. Der Ansatz wurde in eine Küvette (0,1 cm Küvetten) pipettiert, diese wurde in den Küvettenhalter des Gerätes Gene Pulser® II von Bio-Rad eingesetzt und der Strom appliziert. Die verwendeten Parameter waren 2,5 kV, 25 µF und 250 Ω. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Zellen für 1 Std. bei 37°C bei 210 Upm. in einem Warmluftschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf mit Antibiotika je nach Selektionsmarker des Plasmids versetzten LB-Platten ausgestrichen.

2.2.2.2 Hitzeschock-Transformation

Für diese Art der Transformation wurden chemisch-kompetente Zellen verwendet (siehe 2.2.2.1.2).

Verfahren: 30 µl chemisch kompetenter Zellen wurden zu 2-5 µl eines Ligationsansatzes (siehe 2.2.3.6.4) oder 10-100 ng Plasmid-DNA pipettiert. Dieser Ansatz wurde daraufhin 30 Min. in einem Eisbad inkubiert und anschließend bei 42°C für 45 Sek. erwärmt. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis wurde dem Ansatz 800 µl SOC-Medium zugefügt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C bei 210 Upm. in einem Warmluftschüttler. Abschließend folgte die Ausplattierung je 100 µl des Ansatzes auf entsprechende LB-Platten, die dem Selektionsmarker des Plasmids entsprechende Antibiotika enthielten.

2.2.2.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation von *S. cerevisiae* wurden kompetente Hefezellen benötigt (siehe 2.2.2.1.3).

Verfahren: Zu 100 µl kompetenten Hefezellen wurde 0,1 µg Plasmid-DNA gegeben. Um die Effizienz der Transformation zu erhöhen, wurden 100 µl Heringssperma (10 µg/ µl) zugefügt und der Ansatz gut gemischt. Anschließend wurden 600 µl frisch angesetzte PEG/LiAc-Lösung zugegeben und der Ansatz wiederum durchmischt.

Bei 200 Upm. erfolgte eine halbstündige Inkubation der Zellen in einem Warmluftschüttler bei 30°C. Danach wurden 70 µl DMSO zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für

2 Min. bei 42°C im Wasserbad erhitzt und nachfolgend sofort auf Eis gestellt. Im Anschluß daran erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C für 5 Sek.. Nach Resuspension des Zellpellets in 0,5 ml TE-Puffer wurden jeweils 100 µl des Transformationsansatzes auf YPD-Platten ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte für 3-6 Tage bei 30°C im Brutschrank.

2.2.3 Nukleinsäure-Techniken

2.2.3.1 Gelelektrophorese

In einer Gel-Matrix beruht die elektrophoretische Auftrennung von Makromolekülen auf deren unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten in einem homogenen elektrischen Feld. Dabei ist für die Wanderungsgeschwindigkeit hauptsächlich die Molekülgröße entscheidend. Der Trennbereich eines Gels ist wiederum von der Porengröße der Gel-Matrix abhängig, die aus Art und Konzentration der Matrixmoleküle resultiert.

2.2.3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Agarosegelen ist eine einfache und effiziente Methode zur Analyse von Nukleinsäuren.

Verfahren: Eine entsprechende Menge an Agarose wurde in 100 ml 1x TAE-Puffer bis zur vollständigen Lösung in einer Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurde die Lösung mit 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in ein Elektrophoreseschlitten gegossen. Nun wurde das Gel in eine mit 1x TAE-Puffer angefüllte Horizontalkammer gelegt. Die mit 6x DNA-Proben-Puffer versetzten Proben wurden anschließend in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei maximal 150 mA. Durch interkalierte Ethidiumionen bestand die Möglichkeit, die DNA unter einem UV-Transluminator (260-350 nm) zu visualisieren und nach der elektrophoretischen Auftrennung zu photographieren. Tabelle 4 gibt Aufschluß über die Trennbereiche der verschiedenen Agarose-Gelkonzentrationen.

<i>Trennbereich (bp)</i>	<i>Agarose-Gelkonzentration (%)</i>
800-10000	0,7
500-7000	0,8

Material und Methoden

400-6000	1,2
200-4000	1,5
100-3000	2,0

Tabelle 3: Trennbereiche von Agarosegelen in Abhängigkeit der Agarosekonzentration

2.2.3.1.2 Denaturierende Polyacrylamidgele (Sequenzierungsgel)

Der Vorbereitung der Glasplatten für Sequenzierungsgel kommt große Bedeutung zu, da sich die Platten nach der Elektrophorese ohne sorgfältige Säuberung nicht voneinander trennen würden.

Verfahren: Zwei Platten wurden gründlich gesäubert, mit H₂O abgespült und mit Ethanol entfettet und getrocknet.

Eine große Platte (33 x 42 cm), auf der das Gel haften bleiben sollte, wurde silanisiert. Eine kleine Platte (33 x 39 cm) dagegen, die sich vom Gel lösen sollte, wurde silikonisiert. Aufgrund der geringen Dicke (0,4 mm) des verwendeten Polyacrylamidgels würde das Gel andernfalls zerreißen.

Große Platte: Die Mitte der Platte wurde nach dem Trocknen mit einem Gemisch aus 10 ml Ethanol (70 %), 300 µl Eisessig und 35 µl Silan begossen und dieses mit einem Kimwipe-Tuch gut verteilt. Nach 3-5 Min. wurde der Vorgang wiederholt. Anschließend wurde die Platte unter einem Abzug 60 Min. getrocknet, dreimal mit Ethanol (70 %) überschichtet und nochmals 60 Min. getrocknet.

Kleine Platte: Unter einem Abzug wurde die Platte mit 10 ml 5%-igem Dichlordimethylsilan in Chloroform begossen. Mit einem Kimwipe-Tuch wurde die Lösung verteilt. Die Platte wurde 60 Min. unter einem Abzug belassen, um die Lösung verdampfen zu lassen.

Beide Platten wurden an den Längsseiten und unteren Enden mit Spacern versehen, umklammert und in Schräglage aufgestellt. Anschließend wurde eine 8%-ige Polyacrylamidlösung hergestellt.

8%-ige Polyacrylamidlösung (pro 100 ml):

50 g	Harnstoff
16 ml	Polyacrylamid (40%)
20 ml	5x TBE

Die Lösung wurde mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt.

Diese Lösung wurde durch ein Kimwipe-Tuch filtriert und die Polymerisation wurde durch Zugabe von 1 ml APS (10 %) und 100 µl TEMED gestartet. Anschließend wurde die Lösung zwischen die Platten gegossen und der Kamm (32 Taschen) eingesetzt. Nach der Installation des Gels in der Elektrophoresekammer und dem Auffüllen mit 1x TBE-Puffer wurde ein „Vorlauf“ bei 55 W durchgeführt, um störende Elektrolyte zu entfernen. Nach 30 Min. wurde der „Vorlauf“ gestoppt und die Taschen mit 1x TBE gespült, um den Harnstoff zu entfernen. Nun wurden die Proben, die mit DNA-Probenpuffer versetzt waren, aufgetragen und die Elektrophorese gestartet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die kleine Platte vorsichtig mit einem Spatel abgehoben. Nach einer 30-minütigen Trockenzeit bei 75°C wurde das Gel in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm gelegt und über Nacht bei Raumtemperatur exponiert.

2.2.3.2 Plasmidpräparationen

2.2.3.2.1 Analytische Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde mit dem Qiagen Kit entsprechend dem Protokoll durchgeführt.

Verfahren: Eine 4 ml Übernachtskultur wurde nach 16 Std. Wachstum bei 5000 x g 25 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lysispuffer wurde der Ansatz vorsichtig vermischt und nachfolgend 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 µl eiskalter Neutralisationspuffer zugegeben und 5 Min. bei 4°C inkubiert. Um die entstandenen Zelltrümmer zu entfernen, wurde der Ansatz für 15 Min. bei 4°C und 15000 x g zentrifugiert, der Überstand auf eine Säule (Qiaprep spin column) mit eingesetzter Siliciummatrix gegeben und der Durchfluß verworfen. Die Plasmid war nun an die Siliciummatrix der verwendeten Säule gebunden. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 500 µl Waschpuffer und nachfolgender Zentrifugation bei Raumtemperatur für 1 Min. und 15000 x g. Das Plasmid wurde mit 50 µl H₂O von der Säule eluiert. Für die detaillierte Pufferzusammensetzung siehe Tabelle 4.

<i>Resuspensionspuffer</i>	<i>Lysispuffer</i>	<i>Neutralisationspuffer</i>	<i>Waschpuffer</i>
----------------------------	--------------------	------------------------------	--------------------

Material und Methoden

50 mM	Tris/HCl	200 mM	NaOH	3 M	Kalium-Acetat	1 M	NaCl
10 mM	EDTA	1 % (w/v)	SDS			50 mM	MOPS
100 µg/ml	RNase A					15 %	Isopropanol
pH 8,0				pH 5,5		pH 7,0	

Tabelle 4: Pufferzusammensetzung

2.2.3.2.2 Präparative Plasmidisolierung

Zur präparativen Plasmidisolierung wurden Anionenaustauschersäulen (modifiziertes Silicagel) der Firma Qiagen (standardmäßig: Tip-500 für 500 ml Kultur) eingesetzt. Dabei nutzt man die unterschiedliche Affinität von chromosomaler und plasmidaler DNA an das Säulenmaterial bei entsprechenden pH/Salzkonzentrationen. Die Aufreinigung richtet sich nach dem Herstellerprotokoll. Bei Plasmiden mit hoher Kopienzahl pro Zelle konnte aus einem halben Liter Zellsuspension bis zu 1 mg Plasmid gewonnen werden.

2.2.3.2.3 Plasmidpräparation aus Hefe mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Nukleinsäuren aus Hefen von Proteinen und anderen Verunreinigungen zu trennen, wurden die Nukleinsäuren mit Phenol-Chloroform extrahiert. Sowohl Phenol als auch Chloroform können Proteine denaturieren, die sich nach Zentrifugation in der Interphase ansammeln.

Verfahren: Mit einer Öse wurden zunächst angewachsene Hefekolonien von einer YPD- oder SD-Platte gewonnen, in 500 µl H₂O resuspendiert und mit 1 Volumen Phenol-Chloroform (Mischverhältnis=25:24:1 Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol) versetzt und für 5 Min. bei Raumtemperatur stark geschüttelt. Das Gemisch wurde dann durch eine 5-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 15000 x g getrennt. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, mit 500 µl Chloroform versetzt, 5 Min. geschüttelt und bei Raumtemperatur für weitere 5 Min. bei 15000 x g zentrifugiert. Die Nukleinsäuren, die sich in der oberen wässrigen Phase befanden, wurden mit Ethanol gefällt (siehe 2.2.3.3).

2.2.3.3 Ethanolfällung

Die Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol ist die gebräuchlichste Methode, um DNA aus wässrigen Lösungen zu konzentrieren. In ethanolhaltigen Lösungen mit monovalenten Salzen sind Nukleinsäuren unlöslich und präzipitieren. Salze bleiben dabei größtenteils (ca. 90 %) in Lösung.

Verfahren: Zu wässrigen DNA-Lösungen wurde das 2,5-fache Volumen an 96%-igem eiskaltem Ethanol und $\frac{1}{15}$ Volumen an 3 M Natriumacetat (pH 4,5 bis 5,0) gegeben. Durch eine 45-minütige Zentrifugation bei 15000 x g bei 18°C präzipitierten die Nukleinsäuren. Der Überstand wurde mit einer zur Kapillare ausgezogenen Pasteurpipette vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut für 15-30 Min. bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für 10 Min. bei Raumtemperatur getrocknet und nachfolgend in H₂O resuspendiert.

2.2.3.4 Gelelution

Mit Hilfe der Gelelution ist es möglich, störende DNA-Fragmente von einem zu isolierenden DNA-Fragment zu trennen. Dieses Verfahren erreicht bei der Isolierung von DNA-Fragmenten definierter Größe (300-3000 bp) Ausbeuten von bis zu 80 % der Ausgangsmenge.

Verfahren: Zunächst wurde die DNA mit Hilfe eines ethidiumbromidhaltigen Agarosegels (siehe 2.2.3.1.1) ihrer Größe nach aufgetrennt. Unter UV-Licht (260-350 nm) wurden die gewünschten DNA-Fragmente anhand des interkalierenden Ethidiumbromids detektiert und aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung der Nukleinsäuren wurde gemäß des Protokolls von BIO101 (Kit "GeneClean II,") durchgeführt.

2.2.3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Grundlage der photometrischen Bestimmung ist das Lambert-Beersche Gesetz,

$$E = \epsilon \times c \times d.$$

Verfahren: Da ϵ dem molaren Extinktionskoeffizienten und d der Küvettendicke entsprechen, konnte mit Hilfe der Extinktion (E) die Konzentration (c) der Nukleinsäuren berechnet werden. Dazu wurde die Absorption einer geeigneten Verdünnung der Nukleinsäure in 1x TE-Puffer bei einer Wellenlänge von 260 nm gegenüber 1x TE-Puffer gemessen. Eine Absorptionseinheit (1 OD) entspricht bei doppelsträngiger DNA etwa 50 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.3.6 Enzymkatalysierte Reaktionen an DNA

2.2.3.6.1 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen spalten sequenzspezifisch DNA. Nach dem Schneiden ihrer Erkennungssequenzen hinterlassen sie je nach verwendetem Enzym sogenannte stumpfe („*blunt*“) oder 3'- bzw. 5'- überhängende („*sticky*“) Enden.

Verfahren: Für die Spaltung doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II benutzt, die spezifisch 4-8 Nukleotide lange palindromische Sequenzabschnitte erkennen und an definierbaren Stellen schneiden. Bei dem Reaktionsansatz wurden die Pufferbedingungen dem Restriktionsenzym entsprechend gewählt. Das Volumen des eingesetzten Enzyms, welches in Glycerin gelöst ist (50 % (v/v)) betrug nicht mehr als 10 % des Volumens des Gesamtreaktionsansatzes, da eine erhöhte Glycerinkonzentration die Ursache vermehrter Fehlsplattungen sein kann.

Ein exemplarischer Reaktionsansatz:

0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	DNA
$\frac{1}{10}$ Volumen	10x Puffer
$\frac{1}{10}$ Volumen	Restriktionsenzym (1 Unit pro μg DNA)

Zunächst wurden die Reagenzien in eine entsprechende Menge H_2O pipettiert, um ein geeignetes Volumen (10-20 μl) zu erhalten. Anschließend erfolgte eine 2-stündige Inkubation bei enzymespezifischer Temperatur.

2.2.3.6.2 Klenow-Auffüllreaktion

Um nach einer Restriktion vorhandene überlappende Enden („*sticky-ends*“) des neu entstandenen DNA-Fragments aufzufüllen, wurde das Klenowfragment benutzt. Eine Untereinheit der von *E. coli* stammenden DNA-Polymerase I ohne 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Das Klenowfragment kann die Auffüllreaktion an 5'-überhängenden DNA-Enden („*sticky-ends*“) zu glatten Enden („*blunt-ends*“) katalysieren.

Verfahren:

Ein exemplarischer Reaktionansatz :

1-5 µg	DNA
3 µl	Klenowpuffer (10x)
4 µl	10 mM dNTP's (je 2,5 mM)
5 µl	10 mM DTT
3 µl	Klenow (2 U/µl)

Der Reaktionsansatz wurde dann mit H₂O auf 30 µl aufgefüllt und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3.6.3 Dephosphorylierung

Nach Spaltungsreaktionen mit nur einer Restriktionsendonuklease oder nach Restriktionen, aus denen glatte Termini resultieren, wird die Vektor-DNA zur Minimierung von Rezirkulationen ohne Insert bei der Ligationsreaktion vorher dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde mit intestinaler alkalischer Phosphatase (CIP), die aus Kälberdarm isoliert wird, durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse der 5'-terminalen Phosphatgruppe, wobei eine Hydroxylgruppe am 5'-Ende generiert und anorganisches Phosphat freigesetzt werden. Die durch Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA wird zunächst mit Ethanol gefällt und in 30 µl 1x CIP-Puffer resuspendiert. Pro Ansatz werden 2x 1 Enzymeinheit Phosphatase eingesetzt.

10x CIP-Puffer:	500 mM	Tris/HCl, pH 9,0
	10 mM	MgCl ₂

Material und Methoden

1 mM	ZnCl ₂
10 mM	Spermidin

Bei der Dephosphorylierung von 5'-überhängenden Termini wird insgesamt 60 Min. bei 37°C inkubiert, wobei nach den ersten 30 Min. erneut Phosphatase zugegeben wird. Für die Dephosphorylierung von glatten oder 5'-rezessiven (3'-überhängenden) Enden wird 15 Min. bei 37°C, dann 15 Min. bei 56°C, inkubiert, erneut Phosphatase zugegeben und weitere 15 Min. bei 37°C inkubiert. In der Regel wurde die Vektor-DNA des Dephosphorylierungsansatzes aus einem Agarose-Gel eluiert (siehe 2.2.3.4), um insbesondere bei kombinierten Restriktionsspaltungen den geschnittenen Vektor von herausgespaltenen DNA-Fragmenten zu trennen.

2.2.3.6.4 DNA-Ligation

Die Ligation dient der Verknüpfung linearisierter Vektor-DNA mit der zu klonierenden Fremd-DNA (Insert). Bedingung hierfür ist die Existenz von komplementären oder glatten Enden an den zu verbindenden Doppelsträngen. Zur Ligation wird die ursprünglich aus *E. coli*-Phagen T4 gewonnene und jetzt klonierte T4 DNA-Ligase verwendet (Weiss *et al.*, 1968), die in Gegenwart von ATP neue Phosphodiesterbindungen zwischen den benachbarten, freien 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen knüpft. Die Effizienz der Ligation hängt stark vom Verhältnis der eingesetzten DNA-Fragmente ab. Deshalb wird die Menge an Insert-DNA bei konstanter Menge Vektor-DNA in 3 Schritten um den Faktor 5-15 variiert, um so das optimale Verhältnis Vektor zu Insert-DNA abzudecken. Die Fremd-DNA sollte hierbei im Überschuß, im Unterschuß und im gleichen molaren Verhältnis zur Vektor-DNA vorliegen. Die Qualität des Vektors wird durch zwei Ligationskontrollen analysiert. Eine Reaktion wird ohne Fremd-DNA und Ligase (Kontrolle des Anteils von ungeschnittenen Vektor) und eine Reaktion ohne Fremd-DNA (Kontrolle für eine kombinierte Spaltung oder der Dephosphorylierungseffizienz) durchgeführt. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgt bei einer Temperatur von 14°C für mindestens 5 Std. oder über Nacht. Für die nachfolgende Transformation (siehe 2.2.2.1.2) von Bakterienzellen mit rekombinanter DNA wird die Hälfte (7,5 µl) des Ligationsansatzes eingesetzt. Der restliche Teil wird bei -20°C gelagert.

Ein exemplarischer Reaktionsansatz:

1-10 µg	Vektor-DNA
1-10 µl	Fremd-DNA (Insert)

Material und Methoden

1,5 µl	10x Ligationspuffer Puffer (10 mM ATP)
1 µl	T4-Ligase (10 U/µl)

Der Ligationsansatz wurde mit H₂O auf 15 µl aufgefüllt.

2.2.3.6.5 Polymerasekettenreaktion

Die Verwendung der Polymerasekettenreaktion ("*polymerase chain reaction*", PCR) basiert auf den Arbeiten von Saiki et al. (1985) und dient der Vervielfältigung von geringen Mengen DNA. Dabei kommen thermostabile DNA-Polymerasen (z.B. aus *Thermus aquaticus* (Taq), *Pyrococcus woesei* (Pwo) oder *Pyrococcus furiosus* (Pfu)) zur Anwendung. Mit Hilfe zweier terminaler DNA-Oligonukleotide (Primer) und dNTP's wird die DNA durch mehrfache Wiederholung eines 3-stufigen Reaktionszyklus amplifiziert. Dieser läßt sich wie folgt unterteilen.

1. Denaturierung der DNA (typischerweise bei 90-95°C)
2. Hybridisierung bei einer zu ermittelnden Temperatur (55-70°C; je nach Template und Primerkonzeption)
3. Polymerisation (65-74°C), bei der die Polymerase den Primer komplementär zur Matrize verlängert.

Nach einem einmaligen Denaturierungsschritt von 5 Min. bei 95°C verlaufen die folgenden Schritte zyklisch (bis auf Schritt 8):

1.	<u>1 Min.</u>	<u>95°C</u>	
2.	30 Sek.	94°C	} 2 Zyklen
3.	2 Min.	65°C	
4.	<u>2 Min.</u>	<u>72°C</u>	
5.	30 Sek.	94°C	} 2 Zyklen
6.	2 Min.	65°C	
7.	<u>2 Min.</u>	<u>70°C</u>	
8.	30 Sek.	94°C	} 21 Zyklen
9.	2 Min.	65°C	
10.	<u>2 Min.</u>	<u>68°C</u>	
11	7 Min.	68°C	

Ein exemplarischer Reaktionsansatz:

Endkonzentration

Material und Methoden

10 x PCR-Puffer	1 x
MgCl ₂	1,5 mM (variabel)
dNTP's	je 50 µM
Primer 5'	0,4 µM
Primer 3'	0,4 µM
Taq-Polymerase	1 U
Template-DNA	10-500 ng

Der Reaktionsansatz wurde mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt.

2.2.3.7 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierungsmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) beruht auf dem basenspezifischen Abbruch einer *in vitro* synthetisierten DNA, bei der die zu sequenzierende DNA als Matrize dient (Dideoxy-Kettenabbruch-Sequenzierung). Die enzymatische Synthese des neuen DNA-Stranges wird in vier verschiedenen Reaktionen parallel durchgeführt. In diesen Ansätzen sind jeweils die vier Desoxynukleotide (dNTP's) enthalten und eines der vier möglichen 2',3'-Dideoxynukleotide (ddNTP's). Die Dideoxynukleotide führen nach ihrem Einbau zu einem Abbruch der Kettenverlängerung, da die Polymerase durch die fehlende 3'-Hydroxylgruppe der Dideoxyribose keine Phosphodiesterbindung ausbilden kann. Hierbei ist das Konzentrationsverhältnis der dNTP's zu ddNTP so gewählt, daß einerseits genügend lange Ketten gebildet werden und andererseits Abbrüche statistisch nach jeder der entsprechenden Basen entstehen. Um die Ketten mit den definierten Kettenabbrüchen detektieren zu können, wird in den Reaktionsansätzen ein radioaktives Desoxynukleotid (α -³⁵S-dATP) eingesetzt. Werden die vier Reaktionsansätze anschließend durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen parallel zueinander aufgetrennt (siehe 2.2.3.1.2), so kann man die einzelnen Kettenlängen durch Autoradiographie visualisieren und damit von unten nach oben in 5'-3'-Richtung der Kettensynthese die Sequenz bestimmen.

Da die Methode auf dem längenmäßigen Auftrennen von Ketten mit definierter 3'-Abbruchstelle beruht, ist es wichtig, daß alle Kettenspezies ein identisches 5'-Ende haben. Ein kurzes Desoxyoligonukleotid (Primer), welches zu einer Sequenz kurz vor dem zu sequenzierenden Bereich komplementär ist, dient als Startpunkt für die DNA-Polymerase.

Durch die Wahl eines solchen Primers wird der zu sequenzierende Bereich definiert. Die Polymerisationsreaktion kann mit verschiedenen DNA-Polymerasen durchgeführt werden. Zum einen kann das Klenowfragment der *E. coli* DNA-Polymerase I (Sanger *et al.*, 1977), welches noch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität ("*proofreading*") trägt, eingesetzt werden. Weiterhin kommen heute auch die T7 DNA-Polymerase (Tabor und Richardson, 1987) und die Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Innis *et al.*, 1988) zum Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das von der Firma Pharmacia angebotene ^{T7}-SequenzierTM-Kit eingesetzt. Die Sequenzierung wurde mit isolierter, einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA durchgeführt und orientierte sich an den von Pharmacia mitgelieferten Handbüchern.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 Analytische SDS-Gelelektrophorese

Als Methode zur analytischen und präparativen Auftrennung eines Proteingemisches wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entwickelt (Laemmli, 1970). Sie ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts und der Reinheit von Proteinen. In Verbindung mit Elektrotransfer und Elektroelutionsmethoden lassen sich die Proteine präparativ aufarbeiten. Durch Erhitzen einer Proteinlösung in Gegenwart des stark anionischen Detergenz SDS und reduzierender Detergenzien wie β -Mercaptoethanol oder DTT kommt es zur Zerstörung der Tertiärstruktur von Proteinen. SDS kann sich jetzt an das Protein lagern. Die dadurch entstehenden linearisierten Polypeptidketten mit negativer Nettoladung überlagern die Eigenladung der Proteine, so daß deren Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld hauptsächlich von ihrer Größe abhängig ist. Bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese ist dem eigentlichen Trenngel mit einem pH von 8,8 ein sogenanntes Sammelgel mit einem pH von 6,8 vorgeschaltet. Durch die Großporigkeit des Sammelgels kaum an der Migration behindert, werden die Proteine im elektrischen Feld bis zum Erreichen des Trenngels beschleunigt und in einer scharfen Bande konzentriert. Im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

In dieser Arbeit wurden Trenngele von 10-15 % und Sammelgele von 4 % verwendet (siehe Tab. 5). Die dabei benutzten Flachgele bestanden aus zwei gekammerten Glasplatten, die durch sogenannte Spacer voneinander getrennt waren.

Material und Methoden

Verfahren: Die Herstellung des Gels erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und sofort mit n-Butanol überschichtet. Dabei diente APS als Radikalstarter und TEMED als Katalysator und Stabilisator intermediär auftretender Radikale. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das n-Butanol abgegossen und das Sammelgel eingefüllt. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm eingesetzt, um Taschen für die Proteinproben zu formen. Nach Polymerisation wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gespannt und diese mit Elektrophoresepuffer (siehe Tab. 5) gefüllt. Nach Pipettieren der zuvor denaturierten Proben in die vorgeformten Taschen liefen diese bei einer Spannung von 100 V durch das Sammelgel. Erreichten die Proben das Trenngel wurde die Spannung auf 160-180 V erhöht. Das Proteingel wurde nach Abschluß der Elektrophorese entweder weiterverarbeitet (Western-Blot) oder photographiert und getrocknet.

<i>Trenngel</i>		<i>Sammelgel</i>		<i>Elektrophoresepuffer</i>	
3,75 ml	Trenngelpuffer	1,25 ml	Sammelgelpuffer	25 mM	Tris
5,0 ml	Acrylamid(30%)	0,75 ml	Acrylamid(30%)	150 mM	Glycin
6,0 ml	H ₂ O	2,9 ml	H ₂ O	0,1 %	SDS
0,25 ml	4% APS	0,1 ml	4% APS		
7,0 µl	TEMED	7,0 µl	TEMED		

Tabelle 5: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

2.2.4.2 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Membranen

Durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine (siehe 2.2.4.1) können elektrophoretisch mit Hilfe einer sogenannten *semi-dry* Blotapparatur auf eine PVDF-Membran übertragen werden.

Verfahren: Hierzu wurde die Membran auf ein geringfügig größeres Maß als das des zu blottenden Gels zurechtgeschnitten, mit Methanol benetzt und für 2 Min. in Blotpuffer äquilibriert.

Zwei Filterpapiere wurden ebenfalls für 5 Min. im gleichen Puffer inkubiert.

Die Komponenten wurden hiernach in der Blotkammer luftblasenfrei nach folgendem Schema zusammengesetzt:

Kathode

Blotpuffer-getränkte Filterpapiere

Polyacrylamidgel (SDS-Gel)
PVDF-Membran
Blotpuffer-getränkte Filterpapiere
Anode

Mit dem anionische Detergenz beladene Proteine wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode und damit aus dem Gel auf die Membran.

Überschüssiger Puffer wurde nach dem Aufeinanderstapeln der Lagen entfernt, die Apparatur geschlossen und für 75 Min. eine Stromstärke von 1 mA pro cm² Blotfläche angelegt. Dabei stellt sich eine Spannung von ungefähr 12 V ein, die bis zum Ende des Transfers auf etwa 30 V ansteigt. Spezifische Proteinbanden können nach dem Trocknen des Blots mittels Antikörper detektiert werden.

2.2.4.3 Immundetektion von Proteinen

Als Western Blot wird die Detektion eines Proteins mittels spezifischer Antikörper bezeichnet (Kyhse-Andersen, 1984).

Verfahren: Für die Durchführung einer immunspezifischen Detektion von Proteinen wurden zuerst die freien Bindestellen auf der PVDF-Membran (siehe 2.2.4.2) durch Inkubation mit einer proteinreichen Lösung blockiert. Dazu wurde die Membran 60 Min. in Blockpuffer inkubiert und anschließend zweimal für 10 Min. mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einer entsprechenden Verdünnung des primären Antikörpers, der spezifisch das zu analysierende Protein bindet, über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde nachfolgend erneut mit PBS gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Detektion erfolgte über einen peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, der den konstanten Bereich (Fc-Teil) des Primärantikörpers erkannte (HRP-conjugated-Antibody).

Das Nachweisverfahren mittels Chemolumineszenz (ECL Western Blotting Detection Reagents (Fa. Amersham)) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.4 Proteinextraktion aus Hefen

Zur Proteinextraktion wurde eine Übernachtskultur angelegt. Hierzu wurden 5 ml SD-Medium mit 3-4 Hefekolonien beimpft und über Nacht inkubiert. 50 ml YPD-Medium wurden mit

dieser Übernachtskultur inokuliert und bei 30°C und 220-250 Upm. inkubiert bis zu einer OD von 0,6-0,9 (Dauer ca. 4-8 Std.).

Anschließend wurde die Zellsuspension 5 Min. bei 4000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 ml YPD-Medium resuspendiert und die OD bestimmt. Um den Zielwert der OD von 0,12-0,16 zu erreichen, wurde ein Teil dieser Zellsuspension mit einer entsprechenden Menge YPD-Medium versetzt, bis wiederum 100 ml Zellsuspension zur Verfügung standen. Nachfolgend wurden die 100 ml Zellsuspension bei 30°C und 220-250 Upm. in einem Warmluftschüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 (~4 h) inkubiert. Anschließend wurden diese 100 ml auf zwei 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt und 5 Min. bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte unter ständiger Eislagerung der Röhrchen. Nach der Zentrifugation wurden die Pellets mit je 5 ml eisgekühltem PBS resuspendiert, zusammengeführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Hiernach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter oben beschriebenen Bedingungen. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Pellet wurde in ein mit Stickstoff vorgekühltes Teflongefäß überführt und dann in einem Mikrodismembrator (Fa. B.Braun) dismembriert. Diese Probe wurde in 675 µl „Gritz-Puffer“ resuspendiert und nachfolgend für 5-10 Min. denaturiert. Nun wurde die Probe 5 Min. bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser Überstand enthielt die zu extrahierenden Proteine, konnte aliquotiert und bei -80°C gelagert werden.

Bei Bedarf konnte die Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt und beispielsweise einer Western-Blot-Analyse unterzogen werden.

2.2.4.5 *In vitro* Translation

In dieser Arbeit wurde das *In vitro* Translation-Kit TNT-Master-Mix verwendet und nach vorgegebenen Protokoll vorgegangen.

Für die Transkription ist eine einzel- oder doppelsträngige Matrize nötig, die von der RNA-Polymerase des Phagen T7 in mRNA umgeschrieben werden kann. Diese RNA-Polymerase benötigt einen doppelsträngigen Promotorbereich (siehe Abb.5), der entweder bereits bei Plasmiden vorhanden ist oder mittels PCR angefügt werden muß.



3'-ATT ATG CTG AGT GAT ATC CGG ATC CCA TGA TCC CTA G-5'

Abbildung 5: T7-Promotor

Die T7-RNA-Polymerase beginnt stromabwärts des Promotorbereichs mit der Transkription. Die gebildete, synthetische mRNA wird anschließend durch die freien Ribosomen in Polypeptid translatiert. Um diese Schritte durchlaufen zu können, wurden der Lösung alle notwendigen NTP's (ATP,GTP,UTP,CTP) sowie alle an tRNA gekoppelten Aminosäuren zugefügt. Um das Endprodukt, also das entstehende Protein, radioaktiv zu markieren, wurde eine der Aminosäuren gegen ein radioaktives Äquivalent ersetzt. In dieser Arbeit wurde Methionin verwendet, das mit radioaktivem Schwefel 35 (³⁵S) markiert war und in das translatierte Protein eingebaut wurde. Dadurch war es möglich, das Protein nach Auftrennung in einem SDS-PAGE (siehe 2.2.4.1) mittels X-OMAT-Film (Kodak) sichtbar zu machen.

Verfahren:

Ein exemplarischer Reaktionsansatz:

500-700 ng	DNA Template
40 µl	TNT-Master-Mix
2 µl	³⁵ S-Methionin

Der Reaktionsansatz wurde dann mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und bei 30°C eine Stunde lang inkubiert. Das Protein stand dann weiteren Versuchen zur Verfügung und konnte 1-2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.2.4.6 Immuno- und Coimmunopräzipitation

Mithilfe der Immunopräzipitation ist die Isolierung eines Proteins in einer Lösung mittels spezifischer Antikörper möglich.

Verfahren: Die aus der *in vitro* Translation stammende Proteinlösung wurde für 2 Std. bei 4°C in einem Überkopfschüttler mit dem für das Zielprotein spezifischen Antikörper inkubiert. Dieser war an eine Fc-(konstante Region von Immunglobulinen)-Teil-bindende Matrix gebunden. In dieser Arbeit wurden als Matrix Eisenkügelchen (Dynabeads[®]) verwendet (Gaudernack *et al.*, 1986). Nach einer zweistündigen Inkubation wurden die über den Antikörper an das Zielprotein gebundenen Dynabeads[®] mittels eines Magneten sedimentiert. Es folgten drei Waschschrte mit TBST-Puffer, die dazu dienten nicht

gebundenes Protein und freie Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Ansatz mit 15 µl SDS-Loading-Puffer versetzt und für 3 Min. auf 90°C erhitzt. Dadurch wurde das gebundene Protein von den Antikörpern gelöst. Nachfolgend wurden die Proteine mittels einer SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.1) ihrer Größe nach aufgetrennt.

Ein exemplarischer Reaktionsansatz:

10 µl	IVT-Produkt
10 µl	Dynabeads® (Dyna)

Die Coimmunopräzipitation dient dem Nachweis einer Interaktion zweier Proteine.

Verfahren: Zwei Proteine (gewonnen durch eine IVT (siehe 2.2.4.5)) wurden mittels einer einstündigen Inkubation bei 30°C zur Interaktion angeregt. Anschließend wurden die Proben wie bei einer Immunopräzipitation behandelt (siehe oben). Die Proteine wurden dann in einer SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.1) voneinander getrennt und durch die radioaktive Markierung auf einem X-OMAT-Film visualisiert. Waren zwei statt einer Proteinbande zu erkennen, hatte eine Interaktion stattgefunden.

Ein exemplarischer Reaktionsansatz:

10 µl	IVT-Produkt1
10 µl	IVT-Produkt2
10 µl	Dynabeads®

2.2.5 Colony-Lift Filter Assay

Diese Methode ermöglicht, die Messung der Aktivität von β -Galaktosidase.

Verfahren: Pro Platte wurde je ein Filterpapier mit 2,5 ml Z-Puffer/X-gal-Lösung befeuchtet. Anschließend wurde ein unbehandeltes Filterpapier auf die Oberfläche einer mit Kolonien bewachsenen Platte gedrückt, um so die Zellen am Filterpapier zu fixieren. Filterpapier und Petrischale wurden markiert, um die Orientierung des Filterpapiers auch später noch nachvollziehen zu können. Danach wurde das Filterpapier mit einer Pinzette abgenommen und für 10-15 Sek. in flüssigen Stickstoff gehalten. Das gefrorene Filterpapier wurde danach bei Raumtemperatur aufgetaut, luftblasenfrei auf das mit Lösung durchtränkte Filterpapier aufgebracht und bei 30°C bis zur Blaufärbung der Kolonien inkubiert. Die Blaufärbung signalisierte die Expression der β -Galaktosidase.

X-gal Stocklösung:

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranosid wurde in DMF mit einer Konzentration von 20 mg/ml bei -20°C gelagert.

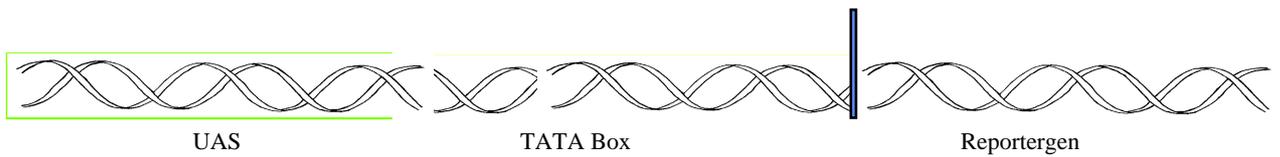
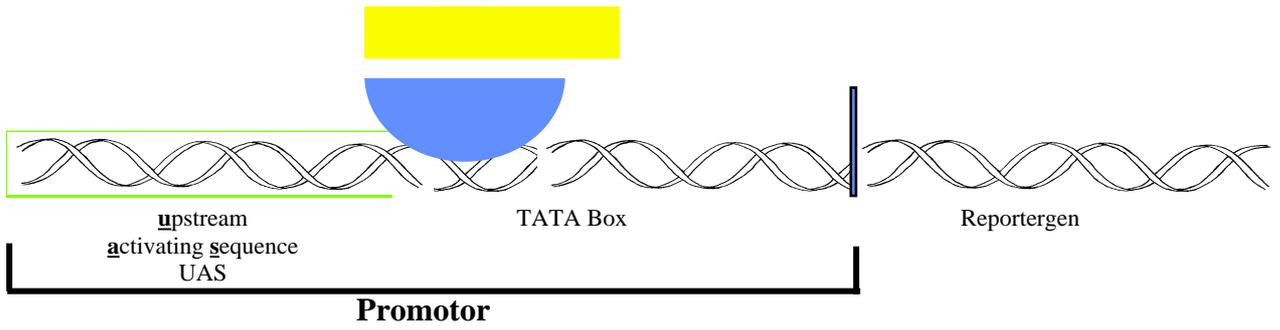
3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Systems

Das Yeast-Two-Hybrid System, erstmals beschrieben 1989 (Li und Fields, 1989), hat eine breite Anwendung als Suchtest für Proteininteraktionspartner. Dieses relativ neue molekularbiologische Verfahren ermöglicht es, Interaktionspartner für ein beliebiges Protein zu finden.

Das System basiert auf einer transkriptionellen Aktivierung von Reporter genen. Zur transkriptionellen Aktivierung eines Reporter gens werden sowohl eine DNA-bindende Domäne (DNA-BD) als auch eine aktivierende Domäne (AD) benötigt. Beide Domänen bilden normalerweise eine Polypeptidkette, wie zum Beispiel das Gal4-Protein, und können nur in dieser Form die entsprechenden Reporter gene aktivieren. In dem in der vorliegenden Dissertation verwendeten Yeast-Two Hybrid-System wurden beide Domänen des Gal4-Transkriptionsfaktors durch rekombinante DNA-Techniken physikalisch voneinander getrennt. Mit Hilfe von Klonierungsvektoren werden Fusionsproteine dieser Domänen mit den zu untersuchenden Wechselwirkungspartnern erzeugt. Dabei fusioniert die Nukleotidsequenz des Zielproteins (Baitprotein) mit der DNA-BD (Baitplasmid) und ein cDNA-Fragment einer cDNA-Bibliothek mit der AD (Libraryplasmid). Anschließend erfolgt die simultane Transformation beider Plasmide in *S. cerevisiae* CG1945 Hefezellen, in deren Genom die Reporter gene integriert sind. In der Hefezelle entstehen durch Transkription und Translation die Fusionsproteine (DNA-BD+Bait und AD+Libraryfragment). Kommt es zur Interaktion zwischen Baitprotein und Libraryprotein, wird ein Transkriptionsfaktor mit Bindungsaffinität zur *UAS* ("upstream activation site") des Promotors erzeugt, einer Genomsequenz der Hefezelle, die spezifisch von der DNA-BD erkannt wird. Der Transkriptionsfaktor aktiviert die Reporter gene (*his3* und *lacZ*), die in 3'-Richtung des Promotors liegen und die Interaktion phänotypisch detektierbar machen (siehe Abb.6).

Die Reporter gene können ausschließlich durch den beschriebenen Ablauf aktiviert werden, da den verwendeten Hefestämmen der funktionelle Aktivator Gal4 fehlt.



Das DNA-BD/Bait-Fusionsprotein bindet an die UAS, kann aber ohne die AD keine Transkription starten.

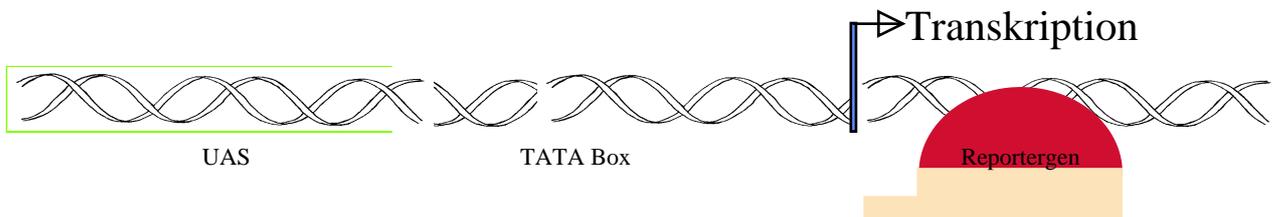


Abbildung 6: Prinzip des Yeast-Two-Hybrid-Systems.

3.2 Konstruktion und Charakterisierung von DNA-BD- β 4-Yeast-Two-Hybrid-Vektoren

Zur Erstellung der Baitplasmide wurde der Expressionsvektor pAS2-1 (Clontech) verwendet. pAS2-1 ist ein Shuttle-Vektor, der sowohl in Bakterien als auch in Hefen repliziert wird. Neben dem Ampicillinresistenzgen (*amp^r*) zur Selektion in Bakterien und dem Cyclohexamidresistenzgen (*cyh2*) zur Selektion in Hefen kodiert das Plasmid für hefespezifische Proteine. Die Transkription der 147 Aminosäure langen DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) erfolgt durch den Promotor *ADHI* (Alkoholdehydrogenase 1-Gen). Der 1500 bp lange *ADHI* Promotor führt zu einer Überexpression der Sequenzen, die unter seiner Kontrolle stehen (Ammerer, 1983). Hinter der kodierenden Region der DNA-BD befindet sich eine Linkerregion, in die DNA-Fragmente, die für die zytoplasmatische Domäne der β 4-Untereinheit kodieren (siehe Abb.7), durch Ligation eingefügt werden können (siehe 2.2.3.6.4). Die Transkription wird durch den Terminator der Alkoholdehydrogenase 1 (*ADHI*), welcher der Linkerregion folgt, gestoppt. Zudem verfügt der Vektor über ein *trp1*-Gen, welches für ein Enzym der Tryptophansynthese kodiert. Die Aminosäure Tryptophan ist für das Wachstum von Hefezellen essentiell und wird für die Selektion in Trp-auxotrophen Hefen (*S. cerevisiae* CG1945) verwendet.

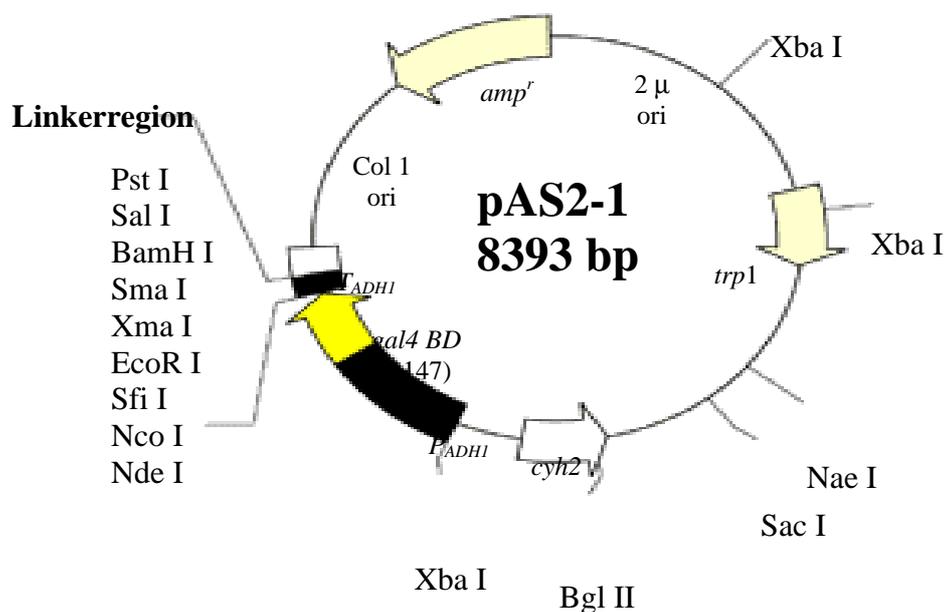


Abbildung 7: Vektor pAS2-1

Die Abbildung stellt den Aufbau des zur Klonierung der $\beta 4$ -Fragmente verwendeten Vektors pAS2-1 dar.

Zunächst wurden verschiedene cDNA-Fragmente, die für zytoplasmatische Teile der $\beta 4$ -Untereinheit kodieren, durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen generiert (siehe Abb.8). Nach Gelelution wurden diese Fragmente in den mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespaltenen Vektor pAS2-1 ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert (siehe 2.2.2.2.2). Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Restriktionsanalyse überprüft. Alle Baitplasmide wurden anschließend mittels Sequenzierung dahingehend überprüft, ob das neue Insert im korrekten Leseraster der DNA-Bindungsdomäne liegt (siehe 2.2.3.7).

Insgesamt wurden in dieser Arbeit folgende 2 Baitplasmide konstruiert.

pAS EcoRV/BamHI:

Der Vektor A1R1 (A1R1 beinhaltet die Hälfte der 3. Fibronektin TypIII-ähnliche Domäne bis zum Stopp-Codon) wurde mit der Restriktionsendonuklease NcoI gespalten (siehe 2.2.3.6.1), anschließend eine Auffüllreaktion durchgeführt (siehe 2.2.3.6.2) und der Vektor mit der Restriktionsendonuklease BamHI erneut gespalten. Daraufhin wurde der Vektor von dem herausgespaltenen Fragment getrennt (siehe 2.2.3.4).

In einem neuen Ansatz wurde der Vektor A1R1 mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV und BamHI gespalten und das entstandene Fragment eluiert. Anschließend wurde das Fragment mit dem NcoI/BamHI gespaltenen Vektor glatt („blunt“) ligiert (siehe 2.2.3.6.4).

Die Länge des $\beta 4$ -Inserts betrug 456 bp (T7-Sequenzierung).

pAS PvuII/CT:

Das Baitplasmid pAS EcoRV/BamHI wurde mit den Restriktionsendonukleasen PvuII und BamHI gespalten (siehe 2.2.3.6.1). Ebenso wurde der Vektor pAS2-1 mit diesen Restriktionsenzymen gespalten. Anschließend erfolgte die Ligation des $\beta 4$ -Fragments mit dem Vektor (siehe 2.2.3.6.4).

Die Länge des $\beta 4$ -Inserts betrug 222 bp (T7-Sequenzierung).

Das Plasmid pAS EcoRV/BamHI, welches das C-terminale Ende einschließlich des NxxY-Tyrosinphosphorylierungsmotivs 1642 der $\beta 4$ -Untereinheit trägt, wurde in dem durchgeführten Screen eingesetzt. In den später folgenden Retransformationen wurde das Bait pAS PvuII/CT

Ergebnisse

benutzt, um eine genauere Aussage über die an der Interaktion beteiligten Regionen des C-terminalen Endes der $\beta 4$ -Untereinheit treffen zu können. Eine Verwendung längerer Fragmente der $\beta 4$ -Untereinheit wurde durch den Umstand verhindert, daß längere Konstrukte zu einer autonomen Transaktivierung der Reportergene führten (Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far, Institut für Molekulare Medizin, Lübeck).

Abbildung 8 stellt den Bezug der beiden verwendeten Baitplasmide zur $\beta 4$ -Aminosäuresequenz dar.

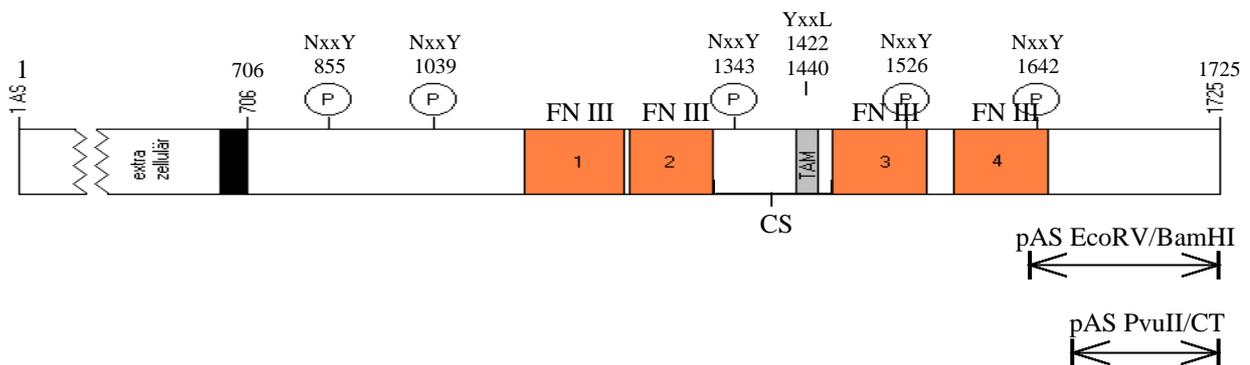


Abbildung 8: Lokalisation der für die Klonierung in pAS2-1 verwendeten $\beta 4$ c-DNA-Fragmente.

FN III: Fibronectin TypIII-ähnliche Domäne

NxxY: Tyrosinphosphorylierungsmotiv

YxxL: Erkennungssequenz für SH2-Domänen

Rechts als Pfeil gekennzeichnet sind die beiden verwendeten Baits in Bezug zur $\beta 4$ Aminosäuresequenz.

Bevor mit dem Screen begonnen werden konnte mußte sichergestellt werden, daß das DNA-BD- $\beta 4$ -Fusionsprotein nicht selbst die Transkription der beiden Reportergene aktivieren konnte. Die DNA-BD- $\beta 4$ -Fusionsproteine können direkt aufgrund intrinsischer Aktivität der zytoplasmatischen Domäne der $\beta 4$ -Untereinheit oder indirekt über eine Interaktion mit hefeeigenen Proteinen zu einer transkriptionellen Aktivierung führen.

Um Aufschluß über das Vorhandensein und die Intensität der Transaktivierung zu gewinnen, wurde das entsprechende Baitplasmid in Hefezellen transformiert (siehe 2.2.2.3).

Nachfolgend wurde überprüft, ob der in das Genom der Hefezellen eingefügte *lacZ*-Reporter aktiviert wurde (siehe 2.2.5). Dieser *lacZ*-Reporter steht unter der Kontrolle eines UAS_{G17mer} -Promotors (Giniger und Ptashne, 1988).

UAS_{G17mer} : 5' - CGG AAG ACT CTC CTC CG -3'

Dieses artifizielle Konstrukt wurde in den verwendeten Hefestämmen (*S. cerevisiae* CG1945) in dreimaliger Abfolge als Promotor des *lacZ*-Reportergens in das Hefegenom eingefügt.

Ergebnisse

Ursprünglich wird dieser Promotor durch den Gal4-Transkriptionsfaktor aktiviert. In dem verwendeten Hefestamm (*S. cerevisiae* CG1945) wurde das Gen für das Gal4-Protein allerdings durch gezielte Deletion zerstört, so daß der Reporter nur durch die Interaktion der beiden physikalisch voneinander getrennten Domänen (DNA-BD+Bait und AD+Libraryfragment) transkribiert werden konnte.

Zur Prüfung der autonomen Aktivierung durch die DNA-BD- β 4-Fusionsproteine erfolgte nach der Transformation in *S. cerevisiae* CG1945 eine Ausplattierung auf SD/-Trp-Selektionsmedium. Anschließend wurde die Aktivität der durch den *lacZ*-Reporter kodierten β -Galaktosidase bestimmt. Dazu wurde nach dem Wachstum der Kolonien ein Colony-Lift Filter Assay durchgeführt (siehe 2.2.5). Kommt es zu einer Induktion der β -Galaktosidase, so spaltet diese das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-D-Galactosid (X-Gal) in Gegenwart von Sauerstoff in einen blauen Farbstoff. Die beiden in dieser Arbeit generierten β 4-Baitplasmide zeigten keine beziehungsweise keine autonome transkriptionelle Transaktivierung des β -Gal-Reportergens.

Das zweite Reportergen *his3* ist ein hefeeigenes Gen, welches bereits im Genom des in dieser Arbeit verwendeten Hefestamms (*S. cerevisiae* CG1945) vorhanden ist. Allerdings wurde der ursprüngliche *his3*-Promotor des *his3*-Gens vollständig durch einen *gal1*-Promotor ersetzt (Feilotter *et al.*, 1994). Dieser wird wie der *lacZ*-Reporter entweder durch das native Gal4-Protein oder durch eine Interaktion der Domänen (DNA-BD+Bait und AD+Libraryfragment) transkribiert. Eine transkriptionelle Aktivierung des Reportergens *his3* führt zur Translation des His3-Proteins. Dieses ist essentiell für die Synthese der Aminosäure Histidin, die wiederum für das Wachstum der Kolonien notwendig ist. Der *his3*-Reporter besitzt eine schwache, basale Promotoraktivität. Dadurch kommt es zu einem geringen Wachstum auf histidinfreiem Nährmedium (SD/-His). Zur Unterdrückung dieser Basalaktivität wird 3-Amino-1,2,4,-triazol (3AT) verwendet, ein kompetitiver Inhibitor des His3-Proteins.

Um das Wachstum auf Platten mit SD/-His zu verhindern, mußte zunächst eine ausreichend hohe 3AT-Konzentration ermittelt werden. Zuerst wurden Plasmide mit einem DNA-BD- β 4-Fusionsprotein in Hefezellen transformiert (siehe 2.2.2.3). Anschließend wurden diese Hefezellen auf Platten mit steigenden Konzentrationen von 3AT ausplattiert.

Bei der Abwesenheit von 3AT fand ein Koloniewachstum statt, während bei 3AT-Konzentrationen ab 15 mM überhaupt kein Wachstum zu beobachten war. Um einerseits die Basalaktivität des Promotors zu unterdrücken, andererseits aber noch das Zellwachstum für

Ergebnisse

interagierende Klone zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit eine Konzentration von 8 mM 3AT gewählt.

Für den Nachweis einer möglichen Interaktion ist eine Expression der β 4-Fusionsproteine in Hefezellen notwendig. Um die Expression der β 4-Fusionsproteine zu bestätigen, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (siehe 2.2.4.3).

Zunächst wurden die Baitplasmide (pAS2-1 + β 4-Fragment) in Hefezellen transformiert und die Zellen auf SD/-Trp-Selektionsmedium ausplattiert. Nach dem Wachstum der Kolonien wurden diese von der Platte entfernt und die Proteine anschließend aus den Hefezellen extrahiert (siehe 2.2.4.4). Die elektrophoretische Auftrennung des löslichen Proteinextraktes erfolgte auf einer SDS-PAGE mit einem 4%-igen Sammelgel und einem 10%-igen Trenngel. Nachfolgend wurden die Proteine auf eine Membran transferiert (siehe 2.2.4.2)

Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch monoklonale Antikörper, die spezifisch die DNA-BD erkennen. Als sekundärer Antikörper wurde HRP-konjugierter-Ziegen Anti-Maus IgG-Antikörper verwendet (siehe 2.2.4.3).

Die Visualisierung erfolgte durch die Anregung von Luminol mittels einer Oxidationsreaktion, die von der an den Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase katalysiert wird (ECL-Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech)). Mittels des Computerprogramms DNA-Strider 1.1 und eines Berechnungsprogramms, welches durch die Internetseite <http://www.ultranet.com> (Gill und Hippel, 1989) zur Verfügung gestellt wird, wurde das Molekulargewicht der konstruierten DNA-BD- β 4-Fusionsproteine theoretisch ermittelt und mit den durch die elektrophoretische Auftrennung ermittelten Molekulargewichten verglichen (siehe Tab. 6).

<i>DNA-BD-β4-Fusionsprotein</i>	<i>theoretisches Molekulargewicht (kDa)</i>	<i>apparentes Molekulargewicht (kDa)</i>
DNA-BD	21,8	22
pAS EcoRV/BamHI	31	31
pAS PvuII/CT	29	29
pAS EcoRI/NaeI	34,5	34

Tabelle 6: Molekulargewichte der DNA-BD- β 4-Fusionsproteine

Das Baitplasmid pAS EcoRI/NaeI (überlassen durch Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far) wurde in einigen Versuchen als Vergleichsstandard verwendet.

Ergebnisse

Mit dieser Analyse konnte gezeigt werden, daß die Fusionsproteine in Hefezellen stabil exprimiert wurden (siehe Abb.9). Weiterhin konnte das theoretisch ermittelte Molekulargewicht der β 4-Fusionsproteine durch einen Vergleich mit dem bekannten β 4-Fusionsprotein (pAS EcoRI/NaeI) und dem Proteinmolekulargewichtsstandard bestätigt werden.

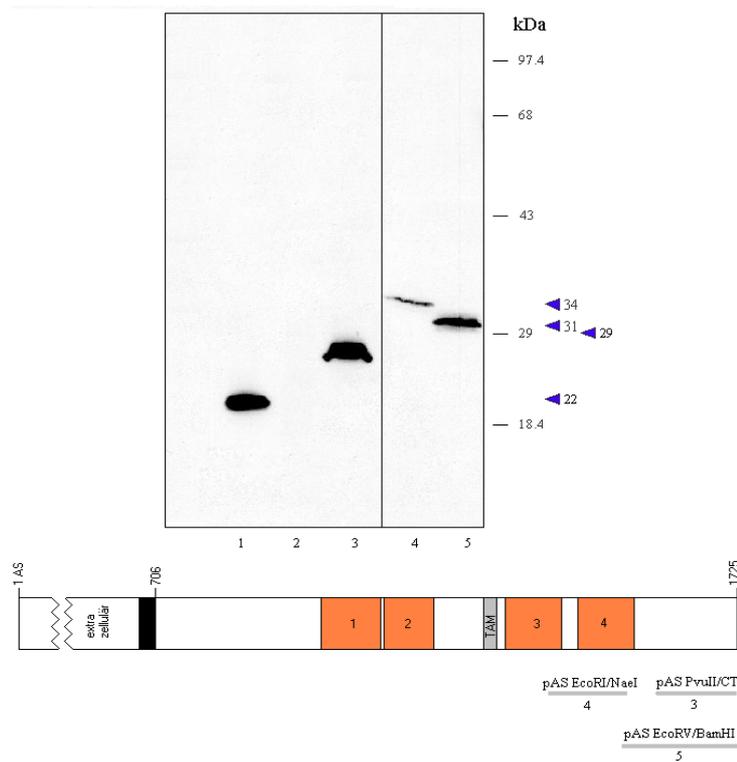


Abbildung 9: Expression der DNA-BD- β 4-Fusionproteine in CG1945 Hefezellen

Bahn 1 stellt die DNA-bindende Domäne ohne Insert dar. Bahn 2 zeigt Hefezellextrakt (CG1945) ohne transformiertes Plasmid. Bahnen 3, 4 und 5 zeigen die in Hefe transformierten DNA-BD- β 4-Fusionsproteine. Das Baitplasmid pAS EcoRI/NaeI (überlassen durch Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far) ist für die Größenordnung zusätzlich aufgetragen. Zusätzlich ist in der unteren graphischen Darstellung die Beziehung der verwendeten Baits zur β 4-c-DNA veranschaulicht.

3.3 Amplifikation und Charakterisierung der cDNA-Bibliothek

Eine typische humane Zelle enthält 10000-30000 verschiedene mRNA-Spezies. Eine cDNA-Bibliothek soll die Gesamtheit der in einem bestimmten Gewebe exprimierten mRNA repräsentieren.

In dieser Arbeit wurde eine humane Prostata cDNA Bibliothek (Clontech) verwendet. Durch den Hersteller wurde aus Prostatagewebe mRNA isoliert, die mittels einer oligo-dt-geprimten reversen Transkription in cDNA überführt wurde. Für den Erhalt doppelsträngiger DNA-Fragmente erfolgte anschließend eine PCR. Diese cDNA-Fragmente wurden in den Vektor pACT2 inkloniert (siehe Abb. 10), der sowohl in Bakterien als auch in Hefen repliziert werden kann. pACT2 besitzt einen verkürzten *ADHI* Promotor (Ammerer, 1983), der in enger Nachbarschaft einer Sequenz des Plasmids pBR322 steht, welche eine transkriptionelle Verstärkung bewirkt (Clontech Manual PT3024-1; Tornow und Santangelo, 1990). Dieser *ADHI*-Promotor kontrolliert gemeinsam mit der Sequenz aus pBR322 die Expression der Aktivierungsdomäne. Hinter dem kodierenden Bereich für die AD befindet sich eine Linkerregion, in welche die aus der reversen Transkription und anschließenden PCR gewonnenen cDNA-Fragmente inkloniert werden können (siehe Abb.10, 2.2.3.6.4). Der die Transkription stoppende Terminator des *ADHI*-Gens befindet sich hinter der Linkerregion.

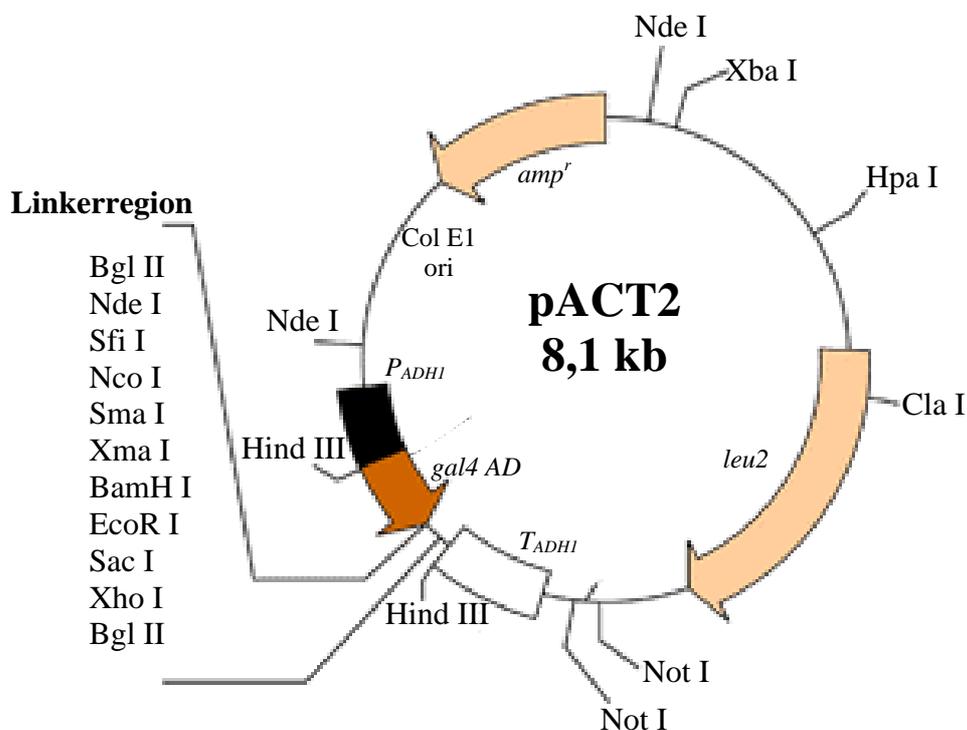


Abbildung 10: pACT2

Die Abbildung zeigt den Aufbau des zur Klonierung der Prostata cDNA-Bibliothek verwendeten Vektors pACT2 von Clontech.

Ergebnisse

Bakterien vermittelt dieses Plasmid eine Ampicillinresistenz (amp^r) und Hefen die Produktion des Enzyms β -Isopropylmalat-Dehydrogenase (*leu2*). Dieses Enzym ist essentiell für den Metabolismus der Aminosäure Leucin, einer zum Wachstum von Hefezellen notwendigen Aminosäure. Durch die Verwendung eines Leu-auxotrophen Hefestammes (*S. cerevisiae* CG1945) wurde ein Selektionsvorteil für plasmidtragende Hefezellen geschaffen.

Die Plasmide (pACT2) wurden durch den Hersteller (Clontech) bereits in den *E. coli*-Stamm BNN132 transformiert und die cDNA-Bibliothek auf Vollständigkeit überprüft.

Die Inserts hatten eine durchschnittliche Länge von 1,4 kb (0,4 - 4,5 kb), die Höhe des Titers betrug $>10^8$ cfu/ml und die Anzahl der unabhängigen Klone $3,2 \times 10^6$.

Die Expression von $\beta 4$ in Prostatagewebe konnte bereits nachgewiesen werden (Knox *et al.*, 1994). In dieser Arbeit wurde die cDNA-Bibliothek auf das Vorhandensein von $\beta 4$ -cDNA überprüft (siehe Abb.11). Dazu wurden Primer zu sechs verschiedenen Bereichen der Nukleotidsequenz der zytoplasmatischen Domäne der $\beta 4$ -Untereinheit generiert (FN2-5'; TAM-3'; TAM5'; FN3-3'; FN4-5'; CT-3'). Für den Nachweis der $\beta 4$ -cDNA wurde mit diesen Primern eine PCR durchgeführt. Anschließend wurde je $\frac{1}{5}$ des 50 μ l Ansatzes auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt und mittels des interkalierten Ethidiumbromids durch UV-Licht visualisiert.

Abbildung 11 zeigt, daß die cDNA-Bibliothek alle Bereiche der cDNA der zytoplasmatischen Domäne der $\beta 4$ -Untereinheit beinhaltet.

Ergebnisse

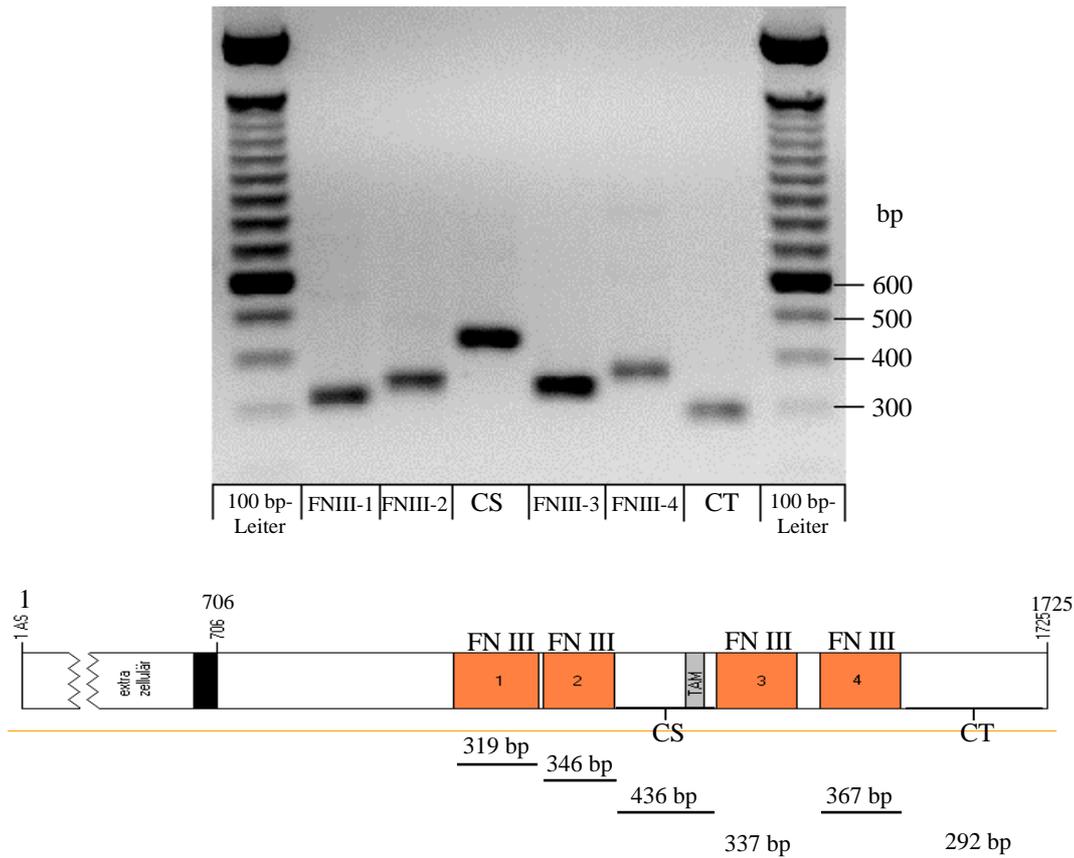


Abbildung 11: Spezifische Amplifikation von $\beta 4$ DNA-Fragmenten mit cDNA-Bibliothek

Die oben dargestellte PCR zeigt die einzelnen PCR-Amplifikate, aus der unteren graphischen Darstellung ist der Bezug der einzelnen Amplifikate zur $\beta 4$ -cDNA zu entnehmen.

Die cDNA-Bibliothek mußte amplifiziert werden, um genügend Plasmid-DNA für den Screen zu gewinnen. Die Bewahrung der Vollständigkeit der cDNA-Bibliothek nach Amplifikation und Plasmidisolierung machte es notwendig die Anzahl der unabhängigen Klone, die im Falle der Prostata-cDNA-Bibliothek $3,2 \times 10^6$ betrug, 2-3x zu vervielfältigen.

Um jedem Bakterienklon die Möglichkeit auf Wachstum zu geben, wurde zunächst eine Titerbestimmung der *E. coli* BNN132-Zellen, in welche die cDNA-Bibliothek transformiert worden war, durchgeführt. Dazu wurde eine $1:10^6$ Verdünnung der entsprechenden Bakterien hergestellt. Jeweils 50 μl und 100 μl wurden auf je 2 LB-Platten mit 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Ampicillin ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Anzahl der gewachsenen Kolonien bestimmt, dadurch konnten die kolonieformenden Einheiten pro ml (cfu/ml) errechnet werden (siehe Tab. 7).

Die Berechnung der kolonieformenden Einheiten pro ml erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Kolonienzahl} \times \text{Verdünnung} (10^6)}{\text{Plattierungsvolumen}}$$

Ergebnisse

	100 µl		50 µl	
Kolonieanzahl	752	670	152	333
Kolonieformende Einheiten/ml	7,11 x 10 ⁹ cfu/ml		4,85 x 10 ⁹ cfu/ml	
Mittelwert	5,98 x 10 ⁹ cfu/ml			

Tabelle 7: Bestimmung der kolonieformenden Einheiten (cfu) pro ml der cDNA-Bibliothek nach Plattierungsvolumen.

Die Amplifikation auf LB-Agarplatten wurde gewählt, da bei Aufzucht in Flüssigmedium ein Selektionsnachteil für einige Klone nicht ausgeschlossen werden konnte. Um die maximale Kolonienzahl pro LB-Agarplatte nicht zu überschreiten (laut Herstellerangaben 20000-40000 cfu), wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kolonienzahl pro Platte von 31250 cfu gewählt.

Insgesamt wurden in vier Schritten jeweils 100 LB-Platten mit 100 µg/µl Ampicillin mit je 31250 cfu beimpft und 18 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien vollständig mit einem Digalski-Spatel von den Platten entfernt und in je 4,5 ml LB-Flüssigmedium überführt. Die auf diese Weise von je 50 Platten gewonnene Zellsuspension wurde in insgesamt 225 ml LB-Medium vereint. Diese Zellsuspension wurde 20 Min. bei 5000 Upm. und 4°C zentrifugiert, das erhaltene Pellet zunächst in Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Für die präparative Plasmidisolierung (siehe 2.2.3.2.2) wurden die Pellets aufgetaut und jeweils eines auf vier Anionenaustauschersäulen (TIP500 der Firma Qiagen) aufgeteilt (siehe Abb. 12). Anschließend wurden die Nukleinsäuren in H₂O gelöst und alle Plasmidpräparationen vereint.

Tabelle 8 erfaßt die durch die Amplifikation gewonnenen Mengen an DNA.

Insgesamt konnten ~12,5 x 10⁶ Klone amplifiziert werden.

$$400 \times 31250 \text{ cfu} = 12.500.000 \text{ cfu.}$$

Die Anzahl der unabhängigen Klone wurde durch die Amplifikation ~3,9 mal vervielfältigt.

Ergebnisse

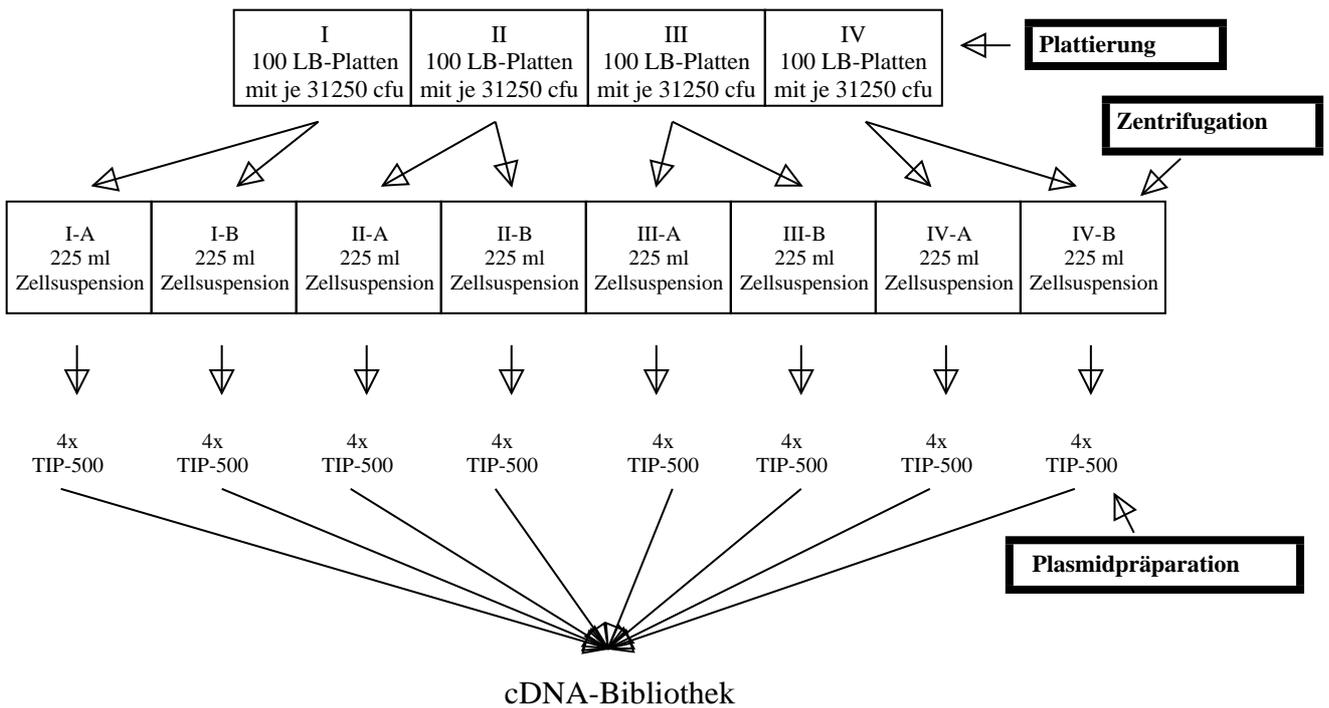


Abbildung 12: Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Diese Abbildung beschreibt die einzelnen Arbeitsschritte der Amplifikation (Plattierung, Zentrifugation, Plasmidpräparation).

	<i>Konzentration (mg DNA/ml)</i>	<i>Gesamtmenge (ml)</i>	<i>Gesamt-DNA (mg)</i>
I	3,67	3,5	12,85
II	3,35	3,55	11,89
III	3,08	3,6	11,09
IV	2,74	3,8	10,41
Gesamt	3,21	14,45	46,38

Tabelle 8: Resultate der präparativen Isolierung der Prostata cDNA-Bibliothek

3.4 Isolierung von β 4-Interaktionspartnern

Der Screen dient der Identifizierung der mit der β 4-Untereinheit interagierenden Proteine.

Screen: Für den Screen wurde das Baitplasmid pAS EcoRV/BamHI verwendet. Es wurden zwei Ansätze durchgeführt mit je 7,7 μ l Libraryplasmid mit einer Konzentration von 3,21 μ g/ μ l (49,43 μ g) und je 39,0 μ l pAS EcoRV/BamHI mit einer Konzentration von 1,25 μ g/ μ l. (97,5 μ g).

Die Ansätze wurden wie unter 2.2.2.4. beschrieben behandelt und in je 1,5 ml 1x TE-Puffer resuspendiert und zusammengeführt. Verdünnungen dieses Ansatzes von 1:20, 1:50 und 1:100 wurden mit je 100 μ l auf SD/-Trp/-Leu Platten ausgestrichen. Anschließend wurden insgesamt 16 SD/-Trp/-Leu/-His/+8 mM 3AT-Platten (\varnothing 150 mm) mit jeweils 300 μ l der vereinten Ansätze bestrichen.

Nach einem 5-tägigen Wachstum bei 30°C wurde die Transformationseffizienz anhand der inkubierten SD/-Trp/-Leu-Platten berechnet.

SD/-Trp/-Leu:	1:20	681 Klone	$8,5 \times 10^3$ cfu/ μ g
	1:50	275 Klone	$8,6 \times 10^3$ cfu/ μ g
	1:100	130 Klone	$7,9 \times 10^3$ cfu/ μ g
	Mittelwert		$8,3 \times 10^3$ cfu/ μ g

Mit Hilfe der berechneten Transformationseffizienz konnte die Anzahl der überprüften cDNA-Inserts der Library-Plasmide errechnet werden.

$$\frac{\text{Transformationseffizienz (} 8,3 \times 10^3 \text{ cfu/ } \mu\text{g)}}{\text{Eingesetzte Menge an Library-Plasmid (} 2 \times 7,7 \mu\text{l} \times 3,15 \mu\text{g/} \mu\text{l} = 49,43 \mu\text{g)}} = 410302$$

Damit lag die Anzahl der im Screen überprüften Library-Plasmide bei $\sim 0,4 \times 10^6$. Nach 7-tägiger Inkubation bei 30°C waren auf den 16 SD/-Trp/-Leu/-His/+8 mM 3AT-Platten insgesamt 119 His³⁺ Klone gewachsen (Nr. 442-561). Das Wachstum und die Größe der Kolonien wurde regelmäßig kontrolliert und protokolliert.

Ergebnisse

Als positiv erachtet wurden Kolonien, die eine Progredienz im Wachstum über 7 Tage zeigten und deren Koloniedurchmesser größer als 1,5 mm war.

Zur weiteren Charakterisierung und Analyse der Klone wurde jede Kolonie erneut plattiert und ein β -Gal-Assay sowie eine Plasmidextraktion durchgeführt.

Dazu wurde ein Teil jedes Klons von den Platten (\varnothing 150 mm) gelöst und in je 500 μ l 1x TE-Puffer gelöst. 100 μ l dieser Zellsuspension wurden auf einer SD/-Trp/-Leu/-His/+8 mM 3AT-Platte ausgestrichen. Eine weitere SD/-Trp/-Leu/-His/+8 mM 3AT-Platte wurde mit 100 μ l einer 1:50 Verdünnung der Zellsuspension beimpft.

Um die transkriptionelle Aktivierung des *lacZ*-Reporters nachzuweisen, wurde von jedem der 119 His³⁺-Klone ein β -Gal-Filterassay durchgeführt (siehe Abb.12 und 2.2.5). Die mit der verdünnten Zellsuspension bestrichene Platte diente nach fünftägigem Wachstum bei 30°C als Vorlage. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pCL verwendet, welches den natürlichen Aktivator der Reportergene, das *gal4*-Gen besitzt. Außerdem wurden die Plasmide pVA3-1 und pTD1-1 gemeinsam in Hefezellen transformiert und als Positivkontrolle benutzt. Diese beiden Plasmide kodieren für die Proteine p53 (pVA3-1) beziehungsweise T-Antigen (pTD1-1), die nachgewiesen eine starke Interaktion zeigen (Li und Fields, 1993).

Erfolgte die Aktivierung des *lacZ*-Reporters nicht (LacZ⁻), erkennbar durch ein Ausbleiben der Blaufärbung des Filterpapiers, wurde dieser Klon nicht für die weitere Analyse verwendet.

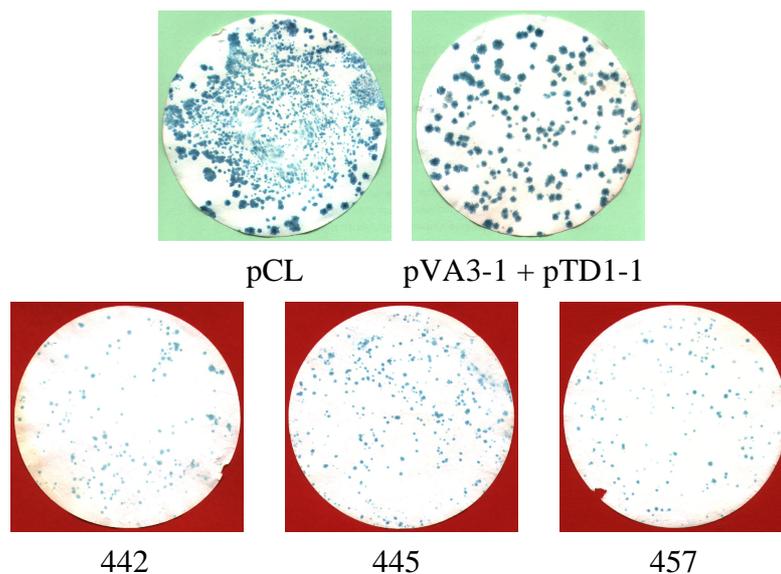


Abbildung 13: β -Gal-Filterassays

Hierbei stellen die beiden oberen Abbildungen (pCL und pVA3-1 + pTD1-1) Positivkontrollen und die drei unteren (442, 445, 457) His³⁺/LacZ⁻-Klone dar.

Zur Plasmidgewinnung wurden nach fünftägigem Wachstum bei 30°C von den mit unverdünnter Zellsuspension bestrichenen SD/-Trp/-Leu/-His/+8 mM 3AT-Platten zunächst 2 cm² der gewachsenen Kolonien entfernt und diese dann einer Phenol-Chloroform-Extraktion zugeführt (siehe 2.2.3.2.3). Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt und in H₂O resuspendiert.

Mit den durch die Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnenen Plasmidlösungen wurde eine PCR (siehe 2.2.3.6.5) mit außerhalb der Inserts lokalisierten Primern AD-5' und AD-3' durchgeführt, um die Länge des in pACT2 inklonierten cDNA-Fragments zu bestimmen. Dazu wurden alle Plasmidlösungen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Anschließend wurden 5 µl der PCR-Produkte auf einem 1%-igen Agarosegel analysiert und photographiert (siehe 2.2.3.1.1). Falls eine Amplifikation selbst nach mehrmaligen Veränderungen der Versuchsbedingungen (z. B. Templatekonzentration, Mg⁺-Konzentration) nicht gelang, wurde der entsprechende Klon nicht für die weitere Analyse verwendet. Es konnten insgesamt 114 der 119 His³/LacZ⁺-Klone amplifiziert werden. Abbildung 13 gibt Aufschluß über die Statistik der Insertgrößen. Die durchschnittliche Insertgröße betrug 1103 bp.

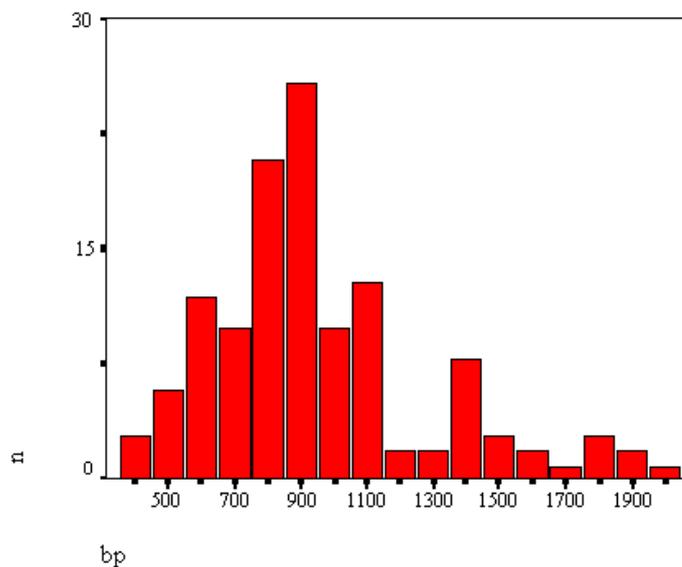


Abbildung 14: Insertlängenstatistik des Screens

Das Histogramm zeigt auf der x-Achse die Anzahl der Basenpaare [bp], auf der y-Achse deren Häufigkeit [n].

Alle PCR-Produkte wurden anschließend einer enzymatischen Restriktion unterzogen (siehe 2.2.3.6.1), um die Identität des Inserts nach der Transformation in HB101 zu sichern. Zum anderen diente die Analyse des Restriktionsmusters der Einordnung der Klone in möglicherweise vorhandene Familien, die sich durch vergleichbare Restriktionsmuster

kennzeichnen. Von allen PCR-Produkten wurde $\frac{1}{5}$ des Reaktionsansatzes mit der Restriktionsendonuklease AluI über Nacht bei 37°C gespalten. Anschließend wurde das Restriktionsmuster auf einem 1%-igen Agarosegel analysiert und photographiert.

Abbildung 15: Exemplarische Restriktionsanalyse

Dargestellt ist eine elektrophoretische Auftrennung einer Restriktionsspaltung mit AluI der Screenklone 462 bis 467.

Die Plasmidlösungen, welche durch die Phenol-Chloroform-Extraktionen aus den Hefezellen gewonnen wurden, besaßen beide Plasmide (Bait und Library) und waren zudem durch genomische DNA aus den Hefezellen verunreinigt. Um eine Isolierung des Libraryplasmids zu erreichen, wurden zunächst alle positiven Screenklone mittels Elektroporation in HB101 transformiert (siehe 2.2.2.2.1). Anschließend wurde die Zellsuspension auf mit Ampicillin versetztem M9-Medium, welchem die Aminosäure Leucin fehlte, ausgestrichen. Dadurch wurde ein Selektionsvorteil für das Libraryplasmid pACT2 geschaffen und so eine Trennung vom Baitplasmid erreicht.

Einige His³/LacZ⁺-Klone konnten nicht in HB101 transformiert werden und wurden deshalb nicht für die weiteren Analysen verwendet.

Um mit den Libraryplasmiden weiter arbeiten zu können, wurde eine analytische Plasmidpräparation durchgeführt (siehe 2.2.3.2.1).

Nach Inkubation der M9-Platten über Nacht bei 37°C wurden von jeder Platte 3 Kolonien abgenommen, um mit diesen je eine Übernachtskultur zu beimpfen.

Diese Übernachtskulturen wurden am nächsten Morgen für eine analytische Plasmidpräparation verwendet. Die Konzentrationen dieser Plasmidlösungen wurden anschließend mittels Photometrie bestimmt (siehe 2.2.3.5).

Ergebnisse

Um zu kontrollieren, ob die Länge des Inserts mit dem aus Hefe isolierten Plasmid übereinstimmte, wurden jeweils 10 ng der Plasmidlösungen in einer PCR mit den Primern AD-5' und AD-3' eingesetzt. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt, photographiert und mit denen aus Hefe verglichen (siehe Abb.15).

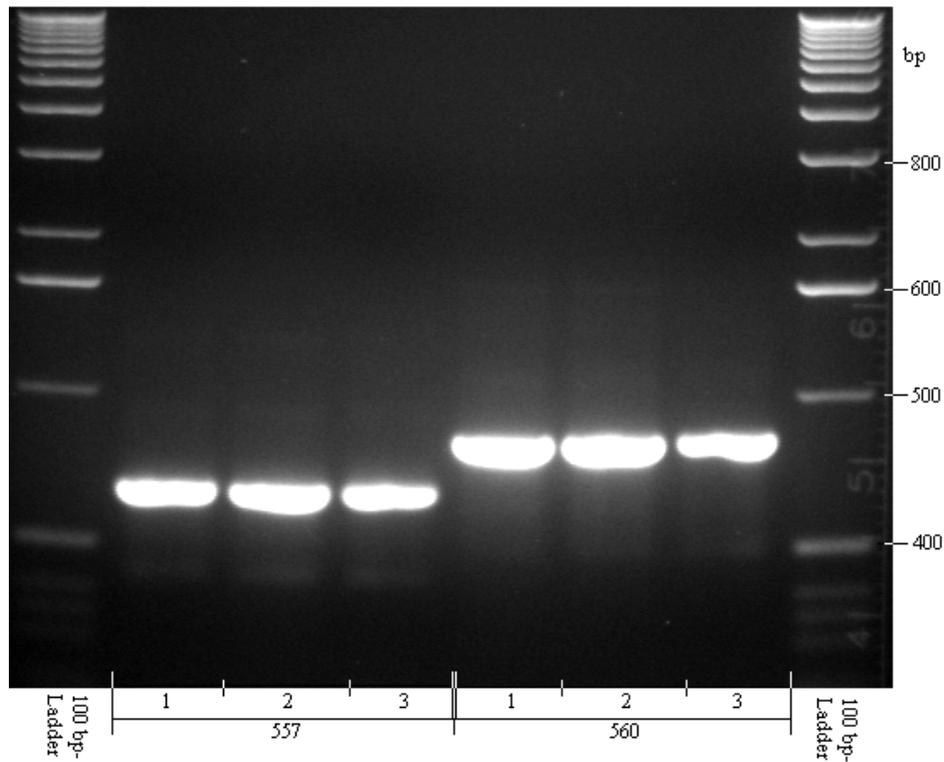


Abbildung 16: PCR aus HB101.

Die Abbildung zeigt eine elektrophoretische Auftrennung einer PCR aus HB101 (Klone 557; 560). Rechts und links ist jeweils ein 100 bp Größenstandard aufgetragen worden.

Insgesamt konnten 82 Klone erfolgreich in HB101 transformiert, erfolgreich selektioniert und isoliert werden.

Um die Identität der aus HB101 extrahierten His3⁺/LacZ⁺-Klone zu überprüfen, wurde 1/5 aller PCR-Produkte (siehe 3.2.2) in einer enzymatischen Restriktion mit jeweils 1 µl der Restriktionsendonuklease AluI eingesetzt. Dieser Ansatz wurde über Nacht inkubiert, auf einem 1%-igen Agarosegel analysiert und photographiert. Stimmt das Restriktionsmuster nicht mit dem aus Hefe überein, wurde die jeweilige Plasmidlösung aus HB101 nicht für die weitere Analyse verwendet, wie Abbildung 16 am Beispiel des Klons 477/2 verdeutlicht.

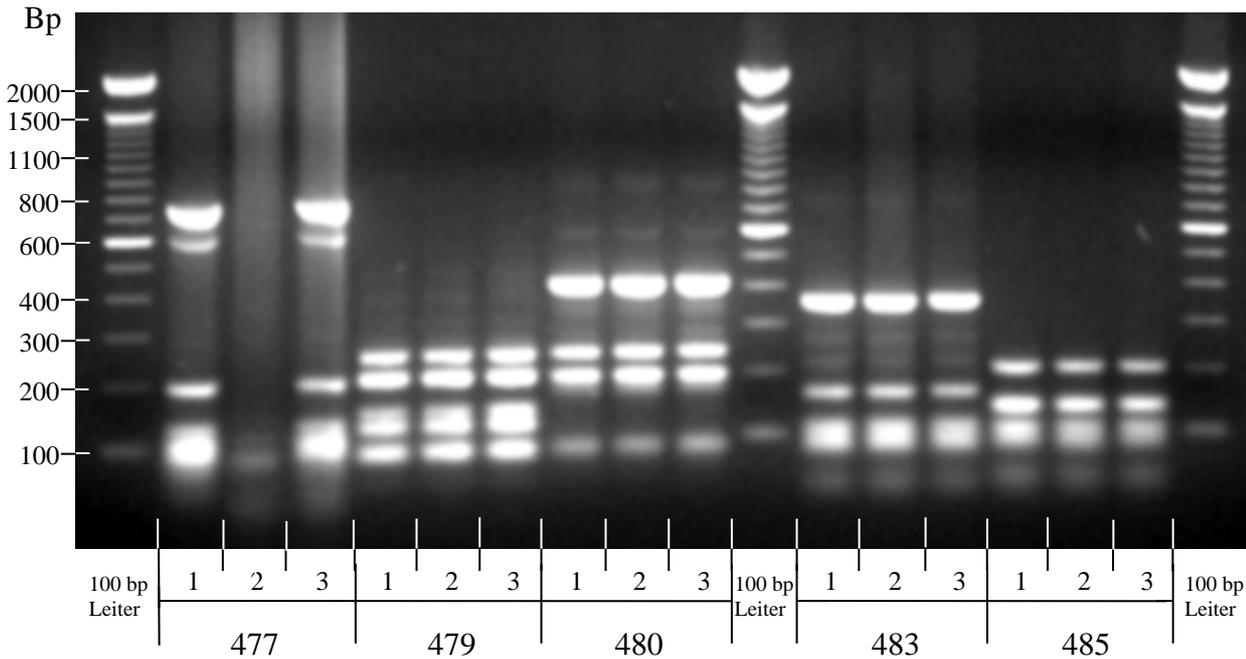


Abbildung 17: Restriktionsanalyse aus HB101

Dargestellt ist eine elektrophoretische Auftrennung einer Restriktionsspaltung mit AluI der PCR-Amplifikate 477, 479, 480, 483 und 485. Zusätzlich wurde 100 bp Größenstandard aufgetragen.

Einige Library-Proteine sind in der Lage, die Transkription der Reportergene direkt, d. h. ohne eine Interaktion mit dem β 4-Fusionsprotein, zu aktivieren. Um diese falsch positiven Klone zu eliminieren, wurden alle bisher positiven Screenklone in verschiedenen Kontrollkombinationen in Hefe retransformiert (siehe Tab. 8). Weiterhin wurde in den Retransformationen das Bait pAS PvuII/CT eingesetzt, um eine genauere Aussage über die an der Interaktion beteiligten Regionen der β 4-Untereinheit treffen zu können.

Als Positivkontrollen wurden die Plasmide pCL, pVA3-1 und pTD1-1 verwendet (siehe 3.3). Insgesamt waren 28 der 62 überprüften Screenklone in der Retransformation negativ, 23 zeigten eine autonome Transaktivierung der Reportergene.

Nur Klone, welche in den korrekten Kombinationen positiv oder negativ waren (siehe Tab. 8), wurden als endgültig positiv bestätigt.

Insgesamt traf dies auf 11 Klone zu, wie die Abbildungen 18 und 19 verdeutlichen.

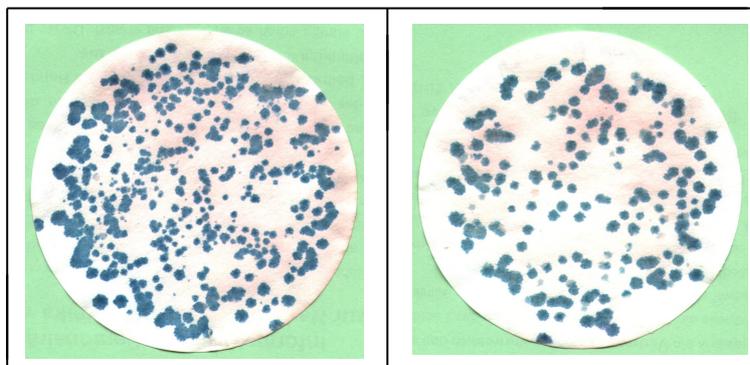
Positiv- und Negativkontrollen, die bei allen Retransformationen durchgeführt wurden, sind in Abbildung 18 exemplarisch dargestellt.

Ergebnisse

<i>Plasmid 1</i>	<i>Plasmid 2</i>	<i>Wachstum</i> (+/-)	<i>lacZ-Färbung</i> (+/-)	<i>Abbildung</i>
pAS2-1	pACT2	-	-	17
pAS EcoRV/BamHI	pACT2	-	-	17
pAS2-1	Libraryplasmid	-	-	18
pAS EcoRV/BamHI	Libraryplasmid	+	+	18
pAS PvuII/CT	Libraryplasmid	+/-	+/-	18
pLAM5'-1	Libraryplasmid	-	-	18

Tabelle 8: Retransformationen

Positivkontrollen



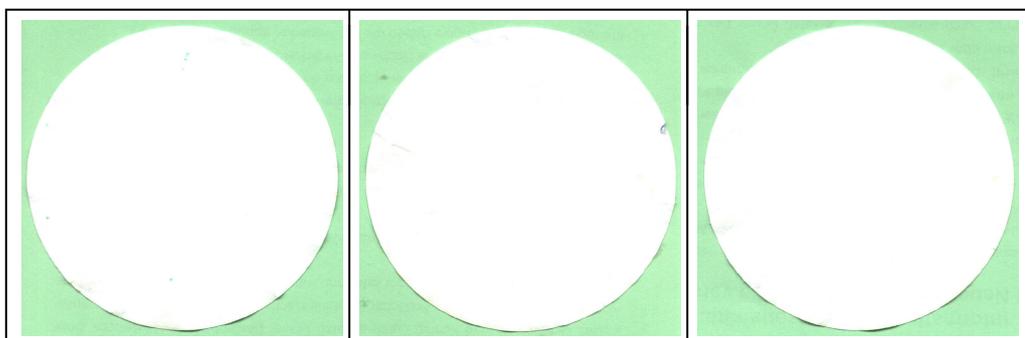
pCL1

pVA3-1

+

pTD1-1

Negativkontrollen



pAS2-1

pAS -EcoRV/BamHI

pAS-PvuII/CT

+

+

+

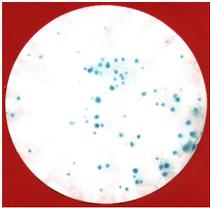
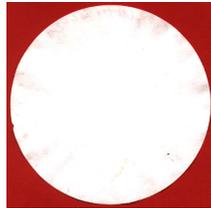
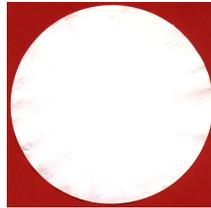
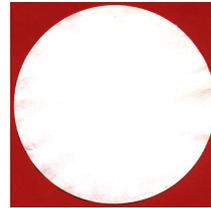
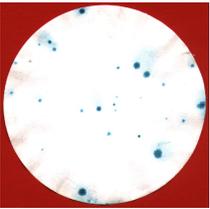
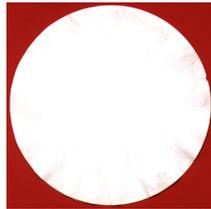
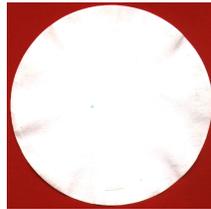
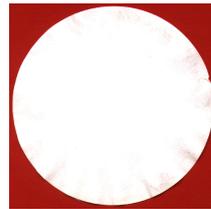
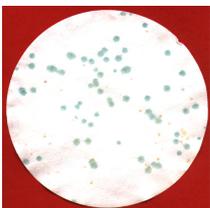
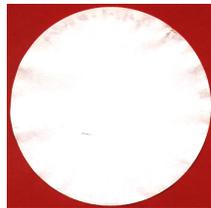
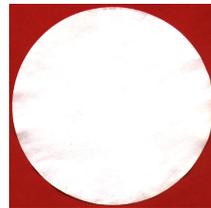
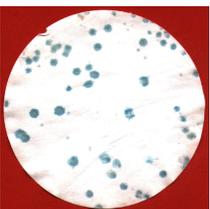
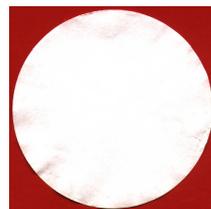
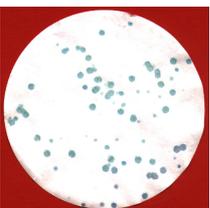
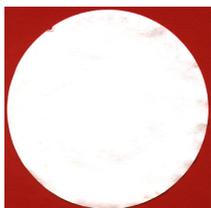
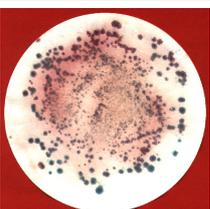
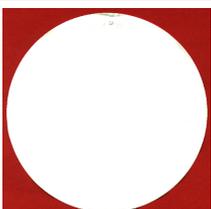
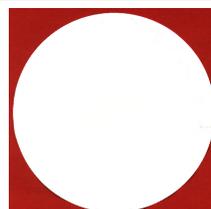
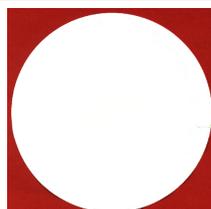
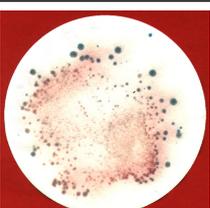
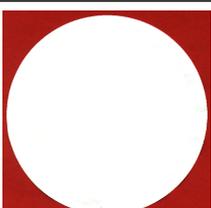
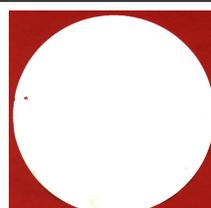
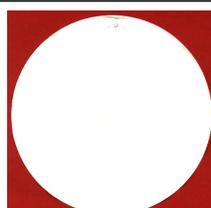
pACT2

pACT2

pACT2

Abbildung 18: Positiv- und Negativkontrollen der Retransformation.

Ergebnisse

<i>pAS EcoRV/BamHI</i> + <i>Libraryplasmid</i>	<i>pAS2-1</i> + <i>Libraryplasmid</i>	<i>pAS PvuII/CT</i> + <i>Libraryplasmid</i>	<i>pLAM5'</i> + <i>Libraryplasmid</i>	<i>Klonnummer</i>
				442-9
				445-1
				450-7
				455-3
				457-1
				486-1
				487-1

Ergebnisse

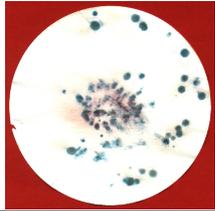
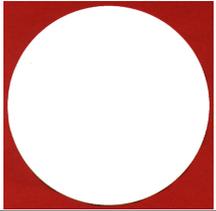
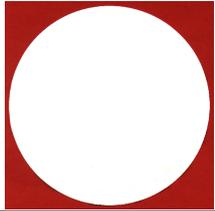
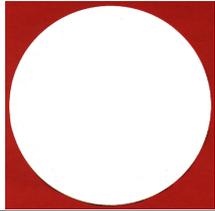
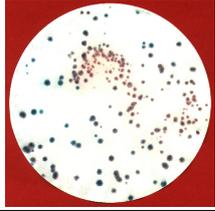
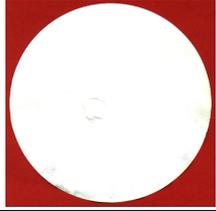
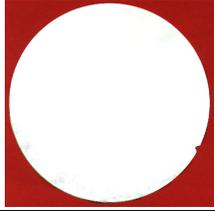
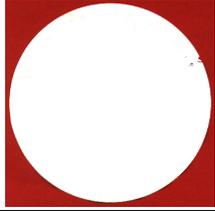
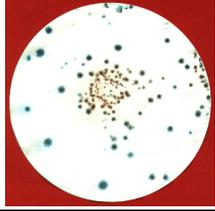
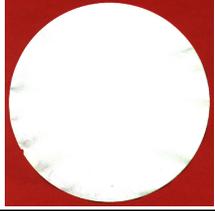
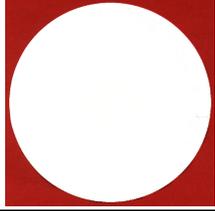
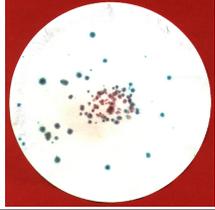
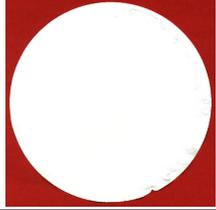
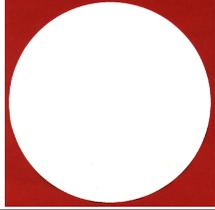
<i>pAS EcoRV/BamHI</i> + <i>Libraryplasmid</i>	<i>pAS2-1</i> + <i>Libraryplasmid</i>	<i>pAS PvuII/CT</i> + <i>Libraryplasmid</i>	<i>pLAM5'</i> + <i>Libraryplasmid</i>	<i>Klonnummer</i>
				501-1
				502-2
				512-3
				517-2

Abbildung 19: Positive Retransformationen.

3.5 Charakterisierung der isolierten β 4-Interaktionspartner

Von den 11 positiven Screenklonen wurde eine präparative Plasmidisolierung durchgeführt, um genügend Material für eine Sequenzierung zur Verfügung zu haben. Anschließend wurde die Identität der Klone mittels PCR und Restriktion mit AluI überprüft. Die Sequenzierungen wurden durch die Firma MWG mittels dye-Primern durchgeführt (Matoh *et al.*, 1993).

Alle 11 sequenzierten Klone wurden auf ihre Übereinstimmung mit bereits bekannten für Proteine kodierende Nukleotidsequenzen überprüft („*blast search*“). Dazu wurde das Internetprogramm der National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) genutzt. Dieses enthält eine Datenbank mit Nukleotidsequenzen aller bekannten Proteine und ermöglicht durch Eingabe einer Nukleotidsequenz einen Vergleich dieser mit sämtlichen in der Datenbank gespeicherten für Proteine kodierenden Nukleotidsequenzen (Altschul *et al.*, 1997).

Da dieses Verfahren keine Aussage über Lokalisation und Orientierung der Nukleotidsequenz des Screenklons zur Nukleotidsequenz des identifizierten Proteins treffen kann, wurde mit Hilfe des Programms der Internetseite der Laboratoire de Genetique Cellulaire, INRA Toulouse, Frankreich (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) ein Homologievergleich („*Alignment*“) beider Nukleotidsequenzen vorgenommen (Corpet, 1988; Combet *et al.*, 2000).

Aufgrund dieser beiden Analysen konnte nachgewiesen werden, daß alle für Proteine kodierenden Klone nur einen Teil des kompletten Gens trugen, einen 5'-kodierenden Bereich bis zum Stopp-Codon und einen 3'-nicht-kodierenden Bereich hinter dem Stopp-Codon (siehe Tab. 9).

Um kontrollieren zu können, ob der durch die Aktivierungsdomäne festgelegte Leserahmen des Libraryproteins mit der Aminosäurekodierung des Originalproteins identisch war, wurde das Programm DNA-Strider 1.1 angewandt, welches weiterhin die Möglichkeit der Übersetzung der Nukleotidsequenz in Protein bietet.

Die Ergebnisse dieser Recherchen faßt Tabelle 9 zusammen.

Ergebnisse

Screen- klon- nummer	Anzahl Basen- paare	Anzahl Amino- säuren	Homologie zu:
442/9	2044	175	Filamin B
445/1	546	142	Dipeptidylpeptidase 9
450/7	482	30	LanC-like-1 (LANCL1)
455/3	375	79	Proteinkinase C interacting Protein 1 (PKCI-1)
457/1	844	197	Xenolupus anterior gradient 2
486/1	1490	30	Human Chromosom 19 clone CTD-2331E11
487/1	1490	30	Human Chromosom 19 clone CTD-2331E11
501/1	675	166	Immunglobulin light kappa chain
502/2	636	31	Human Chromosom 11 Cosmid cSRI34e5
512/3	761	99	Junctional Adhesion Molecule
517/2	585	92	Zn-alpha2-Glycoprotein

Tabelle 9: Zusammenfassung der computergestützten Analyse der identifizierten DNA-Sequenzen.
Anzahl der Aminosäuren berechnet von der EcoRI-Schnittstelle bis zur BamHI-Schnittstelle der Linkerregion.

Drei Klone enthielten Sequenzen, die keinem bekannten Protein zugeordnet werden konnten (486/1; 487/1; 502/2). Diese Klone wurden nicht in der nachfolgend beschriebenen Coimmunopräzipitation eingesetzt.

Alle verbliebenen positiven sequenzierten Klone kodierten für bekannte Proteine und wurden in einer Coimmunopräzipitation kontrolliert.

In dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Transkription/Translation-System verwendet. Um eine *in vitro* Transkription zu ermöglichen (siehe 2.2.4.6), wurde den DNA-Sequenzen sowohl der Screenklone als auch der DNA-BD- β 4-Plasmide mittels PCR ein T7-Promotor angefügt. Mit Hilfe der Primer CoIp-BD-5' und CoIp-BD-3' wurde den DNA-BD- β 4-Plasmiden in derselben PCR zusätzlich ein Myc-Epitop und den Screenklonen mit Hilfe der Primer CoIp-AD-5' und CoIp-AD-3' ein HA-Epitop angefügt, welche die Erkennung durch spezifische Antikörper ermöglichten. Das Translations-Startcodon ATG ist unmittelbar vor der für das HA- bzw. Myc-Epitop kodierenden DNA-Sequenz lokalisiert. Abbildung 19 veranschaulicht dieses Vorgehen am Beispiel der Screenklone.

Ergebnisse

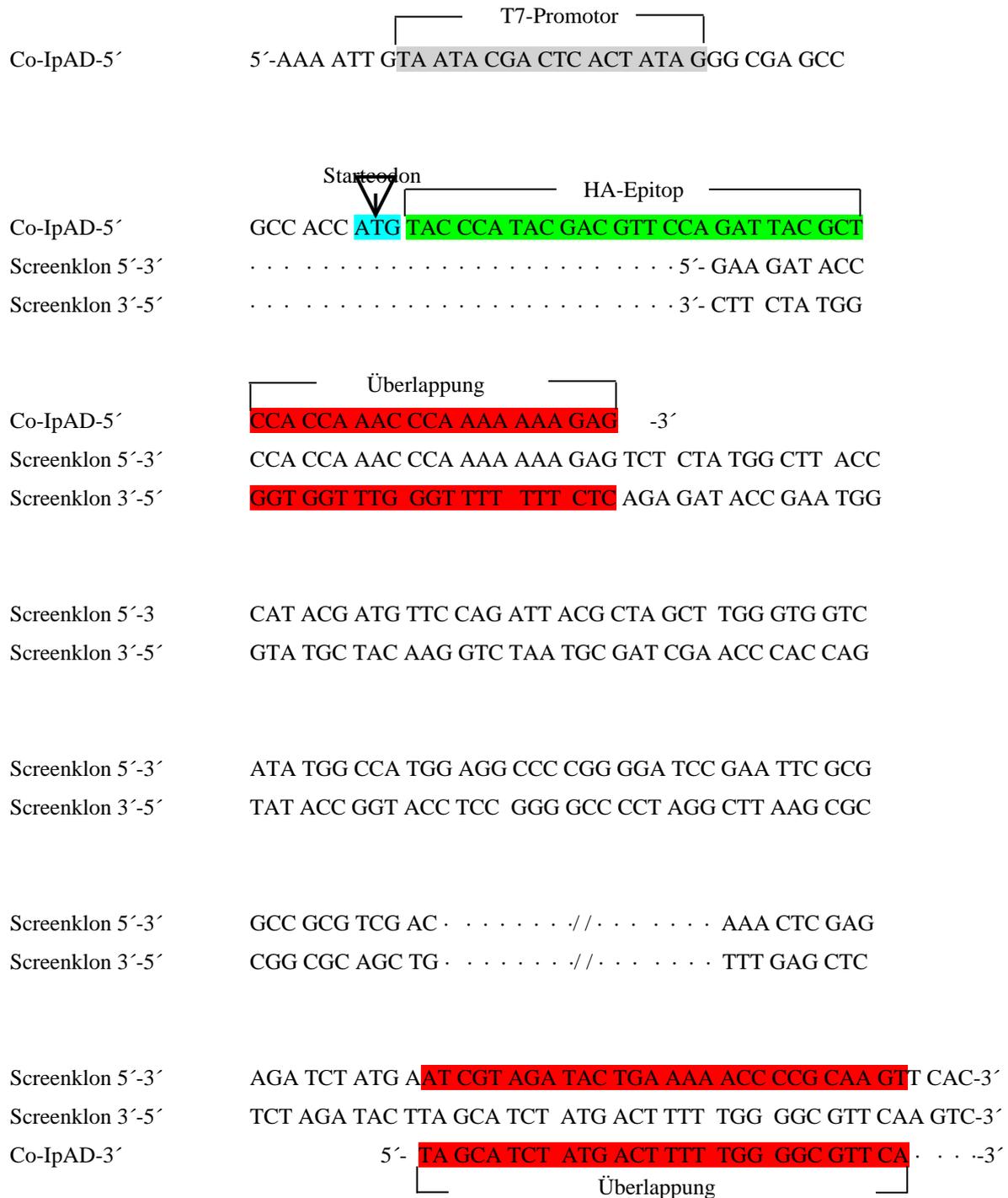


Abbildung 20: Gegenüberstellung der Nukleotidsequenzen der Screenklone mit den Primern Co-IPAD-5' und -3' türkis: angefügtes Start-Codon grün: angefügtes HA-Epitop rot : Die Überlappungssequenzen des Screenklons mit den beiden Primern

Ergebnisse

Die Molekulargewichte der sequenzierten Proteinsegmente wurden mit Hilfe des Computerprogramms DNA-Strider 1.1 sowie des durch die Internetseite <http://www.ultranet.com> (Gill und Hippel, 1989) zur Verfügung gestellten Programms theoretisch kalkuliert und mit den durch die elektrophoretische Auftrennung ermittelten Molekulargewichten verglichen. Tabelle 11 gibt Aufschluß über die Produkte der *in vitro* Translation.

<i>Klon</i>	<i>Anzahl der Aminosäuren (n)</i>	<i>theoret. Molekulargewicht (kDa)</i>	<i>apparentes Molekulargewicht (kDa)</i>
pAS EcoRV/BamHI	185	20,1	20
pAS PvuII/CT	131	13,8	14
442/9	201	21,1	21
445/1	178	18,7	19
450/7	66	9,9	10
455/3	115	12,1	12
457/1	233	24,5	24
501/1	202	21,2	21
512/3	135	14,2	14
517/2	128	13,4	13

Tabelle 10: IVT-Produkte
Anzahl der Aminosäuren ermittelt von ATG Start-Codon bis zu Stopp-Codon.

Durch die Verwendung von ^{35}S -Methionin in der *in vitro* Translation wurden die Proteine radioaktiv markiert.

Nach der *in vitro* Transkription wurden Bait- und Libraryprotein für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die spezifische Präzipitation der *in vitro* translatierten Proteine über das Myc- bzw. HA-Epitop mit den entsprechenden an die Dynabeads® gekoppelten Antikörper. Durch mehrere Waschschrte wurde ungebundenes Protein entfernt. Die Proteine wurden anschließend in einer Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf einem X-OMAT-Film (Kodak) visualisiert. Hatte eine Interaktion zwischen Bait- und Libraryprotein stattgefunden, waren zwei Proteinbanden sichtbar.

Als Positivkontrollen wurden wiederum p53 und T-Antigen verwendet (siehe 3.4), wie in Abbildung 21 exemplarisch dargestellt.

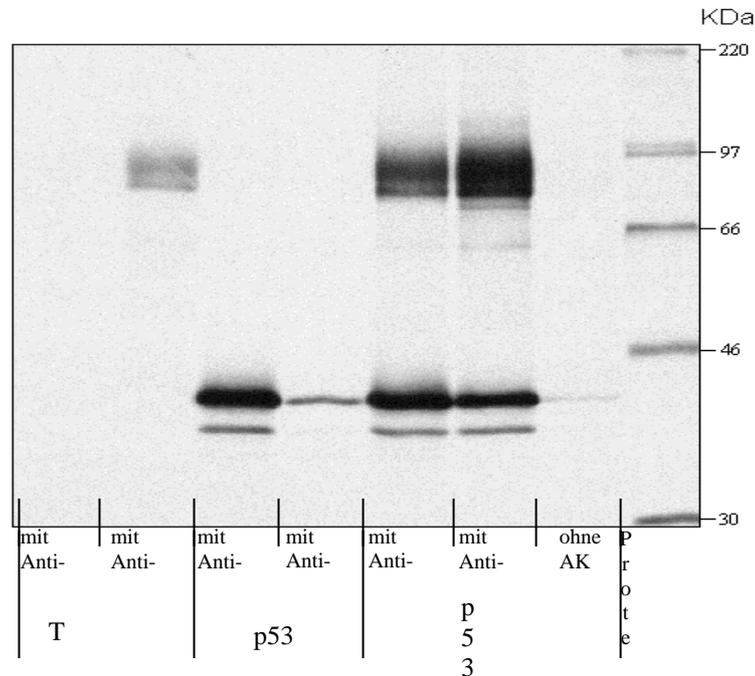


Abbildung 21: Positivkontrolle CoIp.

Die ersten beiden Bahnen zeigen das T-Antigen, welches nur mit Anti-HA präzipitiert werden kann. Die 3. und 4. Bahn stellen das Protein p53 dar, welches mit Anti-Myc, aber auch leicht unspezifisch mit Anti-HA präzipitiert. Auf den Bahnen 5,6 und 7 ist das T-Antigen zusammen mit p53 aufgetragen worden. Die 7. Bahn wurde ohne Antikörper aufgetragen.

In Abbildung 21 wird deutlich, daß p53 und T-Antigen in diesem *in vitro* System miteinander coimmunopräzipitiert werden können. Durch den Nachweis dieser bekannten Interaktion ist die korrekte Funktion des Systems anzunehmen.

Mittels des Proteinmolekulargewichtsstandards konnten die berechneten theoretischen Molekulargewichte aller *in vitro* translatierten Proteine bestätigt werden.

In den durchgeführten Coimmunopräzipitationen konnte keine signifikante Interaktion der Screenklone mit dem C-terminalen Ende der zytoplasmatischen Domäne des β 4-Integrins nachgewiesen werden (siehe Tab. 11). Allenfalls bei Screenklon 455/3 konnte eine schwache Interaktion mit dem Baitprotein pAS EcoRV/BamHI nachgewiesen werden (siehe Abb. 22). Dieses Ergebnis war in fünf Coimmunopräzipitationsversuchen reproduzierbar.

Abbildung 23 zeigt ein Beispiel für eine negative Interaktion.

Ergebnisse

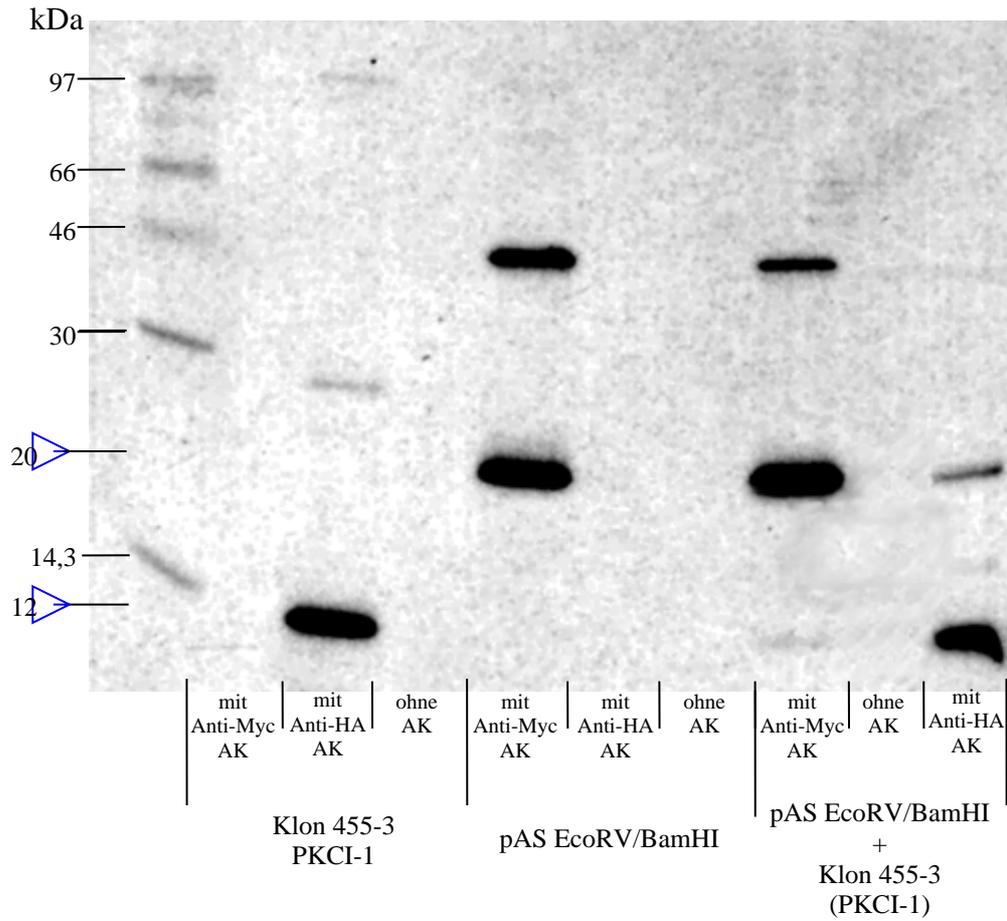


Abbildung 22: Darstellung der nachgewiesenen schwachen Interaktion von Klon 455/3 mit pAS EcoRV/BamHI.

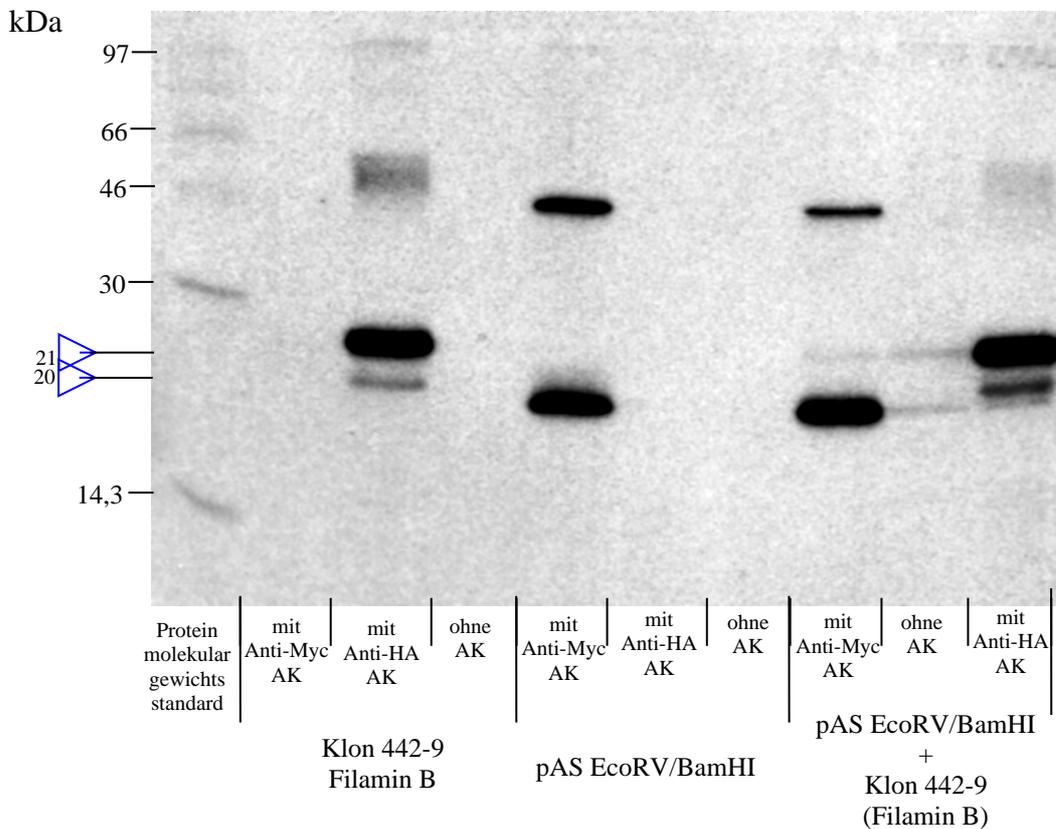


Abbildung 23: Darstellung einer fehlenden Interaktion in der Coimmunopräzipitation (Klon 442-9)

Ergebnisse

Tabelle 11 faßt die Screenklone und die jeweiligen Ergebnisse des Screens und der Coimmunopräzipitation zusammen.

<i>Screenklonnummer</i>	<i>Verifikation der Interaktion in YTH</i>	<i>in vitro Coimmunopräzipitation</i>
442/9	+	-
445/1	+	-
450/7	+	-
455/3	+	(+)
457/1	+	-
501/1	+	-
512/3	+	-
517/2	+	-

Tabelle 11: Zusammenfassung von Screen und Coimmunopräzipitation

4 Diskussion

Das Integrin $\alpha6\beta4$ ist ein Transmembranrezeptor dessen genaue biochemischen Interaktionsmechanismen bislang nicht vollständig aufgeklärt werden konnte.

Allerdings konnte gezeigt werden, daß verschiedene zelluläre Funktionen mit einer Aktivierung der zytoplasmatischen Domäne der $\beta4$ -Untereinheit des Integrins $\alpha6\beta4$ verbunden sind. Daher stellt diese einen interessanten Ansatz für eine genauere Betrachtung dar.

Für eine intensivere Betrachtung der Interaktionmechanismen der zytoplasmatischen Domäne der $\beta4$ -Untereinheit wurde das Yeast-Two Hybrid-System verwendet.

Das Yeast-Two Hybrid-System ist ein potentes Verfahren zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen. Seine Vorteile liegen insbesondere in der hohen Anzahl der überprüften möglichen Interaktionspartnern und deren Isolierung gegenüber nicht-interagierender Proteine. Das Yeast-Two Hybrid-System wurde bereits mehrfach erfolgreich eingesetzt für die Suche nach Interaktionspartnern von zytoplasmatischen Domänen von Integrinuntereinheiten. Zunächst wurden zur Durchführung einer Suche nach möglichen Interaktionspartnern zehn $\beta4$ -DNA-BD-Plasmide generiert. Nach Transformation und Expression zeigten acht dieser zehn $\beta4$ -DNA-BD-Proteine eine autonome Aktivierung der Reportergene und wurden für weitere Analysen nicht verwendet (Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far).

In dieser Arbeit wurden zwei $\beta4$ -Fusionsproteine (Bait) verwendet. Das Plasmid pAS EcoRV/BamHI trug ein Insert mit 456 Basenpaaren der zytoplasmatischen Domänen der $\beta4$ -Untereinheit, welches einen Teil der vierten Fibronektin TypIII-ähnlichen Domäne bis zum C-terminalen Ende enthielt. Das Plasmid pAS PvuII/CT trug 222 Basenpaare und enthielt nur Anteile der C-terminalen Region (CT).

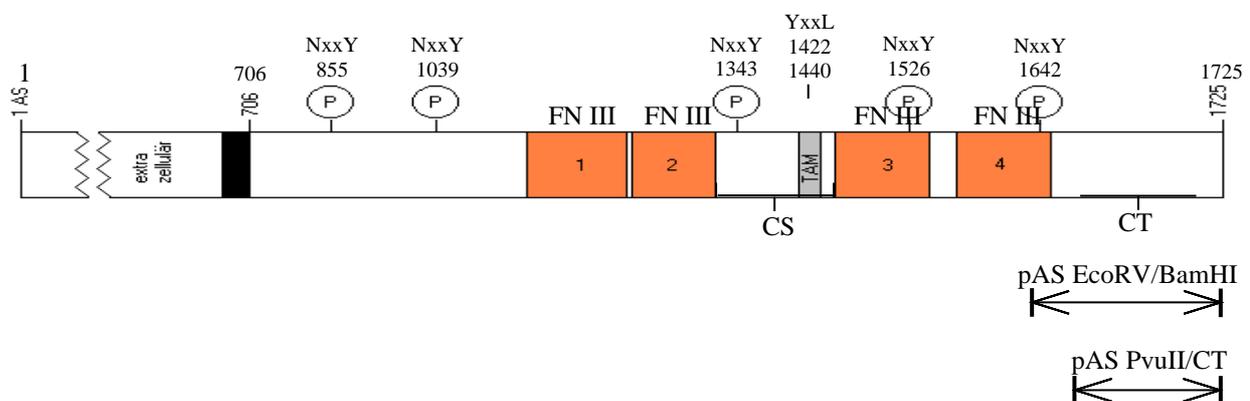


Abbildung 24: Die zytoplasmatische Domäne der β -Untereinheit

Mit dem Bait pAS EcoRV/BamHI wurde der Screen durchgeführt, in dem $0,4 \times 10^6$ cDNA-Library-Klone überprüft werden konnten. Durch diesen Screen wurden 119 His⁺/LacZ⁺-Klone gewonnen, von denen 114 mittels PCR amplifizierbar waren. Eine Transformation in HB101 war bei 82 dieser 114 Klone möglich. 62 His⁺/LacZ⁺-Klone wurden in einer Retransformation auf eine Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne der β 4-Untereinheit überprüft. Insgesamt konnten 11 positive Klone durch die Retransformation bestätigt werden. Alle diese 11 DNA-Segmente wurden sequenziert. Die Überprüfung der sequenzierten DNA-Segmente ergab, daß alle DNA-Sequenzen mit dem durch die Aktivierungsdomäne vorgeschriebenen Leserahmen des Originalproteins übereinstimmten.

Drei Klone wurden als chromosomalen Ursprunges identifiziert, die keinem Protein mittels "*blast search*" zugeordnet werden konnten. Drei Screenklone kodierten für Proteine mit extrazellulärer Lokalisation.

Da eine Interaktion mit vollständig extrazellulär lokalisierten Proteinen *in vivo* mit der zytoplasmatischen Domäne der β 4-Untereinheit nicht stattfindet, sollen nachfolgend nur die fünf als intrazellulär beziehungsweise transmembran identifizierten Proteine diskutiert werden.

4.1 Beschreibung und Darstellung der identifizierten Proteine

Die in diesem Kapitel angegebene Anzahl von Aminosäuren bezieht sich auf die Aminosäuren, die zwischen Screenklon und Originalprotein identisch sind.

4.1.1 Filamin B (Klon 442/9)

Die Nukleotidsequenz des Klons 442/9 bestand aus 2044 Basenpaaren. Die berechnete Anzahl an Aminosäuren betrug 175, was einem Molekulargewicht von ca. 18,4 kDa entsprach. Die Homologiesuche ergab, daß der Klon 442/9 für das Protein Filamin B kodiert. Filamin B trägt mehrere Synonyme, unter anderem β -Filamin (Takafuta *et al.*, 1998) und ABP278/276 (Xu *et al.*, 1998). Filamine besitzen im menschlichen Körper die Aufgabe, faserförmiges Actin (F-Actin) in entweder orthogonale oder parallele Bündel zu organisieren, abhängig vom relativen Verhältnis zwischen Actin und Filamin.

Filamin B besitzt am N-terminalen Ende eine Actin-Bindungs-Domäne (ABD), gefolgt von 24 „repeats“, d. h. Wiederholungen eines aus 100 Aminosäuren bestehenden Motivs. Van der Flier und Mitarbeiter konnten zeigen, daß Filamin B eine Bindung mit der zytoplasmatischen Untereinheit des β 1-Integrins eingeht und daß darüber hinaus mehrere „Splice“-Varianten des Filamin B mit den Integrinen β 3 und β 6 interagieren (van der Flier *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurde das C-terminale Ende des Filamin B nachgewiesen, welches den letzten Teil des 23. repeats, das 24. repeat und das Stopp-Codon enthielt.

4.1.2 Dipeptidylpeptidase-like Protein 9 (DPP9) (445/1)

Die Sequenzierung des Screenklons 445/1 ergab eine Nukleotidsequenz von 546 Basenpaaren. Die Anzahl der in der IVT translatierten Aminosäuren belief sich auf 142, was einem Molekulargewicht von etwa 14,9 kDa entsprach.

In Blast-Analysen zeigte Klon 445/1 eine Kodierung für das Protein Dipeptidylpeptidase-like Protein 9 (DPP9). DPP9 ist ein Homolog der Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) (Olsen und Wagtmann, 2002). DPP4, eine Serinprotease mit geringer Enzymaktivität, spielt eine entscheidende Rolle in verschiedenen Prozessen, wie zum Beispiel der Blutzuckerregulierung und der Immunantwort (Marguet *et al.*, 2000).

Northern Blot Analysen von DPP9 zeigten eine ubiquitäre Expression dieses Proteins, vor allem in Skelettmuskel, Herz und Leber. Olsen und Wagtmann vermuteten aufgrund der fehlenden Transmembranregion und Signalsequenz eine zytoplasmatische Lokalisation von DPP9 (Olsen und Wagtmann, 2002).

Die Funktion und Struktur dieses Proteins ist allerdings bislang völlig ungeklärt. Der Klon 445/1 kodiert für die 142 Aminosäuren des C-terminalen Bereichs dieses Proteins.

4.1.3 PKC-interacting Protein 1 (PKCI-1) (Klon 455/3)

Mittels Sequenzierung konnte der Klon 455/3 als eine 482 Basenpaare lange Nukleotidsequenz identifiziert werden, die einem 79 Aminosäuren langen Protein mit einem Molekulargewicht von 8,3 kDa entsprach. In Homologievergleichen fand sich eine Nukleotidsequenz mit Kodierung für das humane Protein PKC-interacting Protein 1 (PKCI-1).

Ursprünglich konnte PKCI-1 aus bovinem Hirngewebe isoliert werden (McDonald *et al.*, 1985). Hier zeigte es einen inhibitorischen Effekt auf die Proteinkinase C (Pearson *et al.*, 1990), die allerdings nicht bestätigt werden konnte. Ebenso konnte eine Interaktion von PKCI-1 mit dem Gruppe D Ataxia teleangiectasia Protein nachgewiesen werden (Brzoska *et al.*, 1995), einem wichtigen Protein bei der humanen Erbkrankheit Ataxia teleangiectatica. Weiterhin wurde in Cyanobakterien ein Homolog zu PKCI-1 gefunden, bei dessen Abwesenheit ein nur schwaches Wachstum der Bakterien stattfand (Bustos *et al.*, 1990). Mittels fluoreszierender Antikörper gegen PKCI-1 konnte dessen Lokalisation nahe zytoskelettaler Strukturen nachgewiesen werden (Brzoska *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse postulieren die Teilnahme von PKCI-1 in einem bisher unbekanntem Signaltransduktionsweg (Bustos *et al.*, 1990). Das Protein des PKCI-1 umfaßt 380 Aminosäuren vom Start- bis zum Stopp-Codon und beinhaltet an den Aminosäuren 110-114 ein sogenanntes HIT-Motiv. Dieses HIT-Motiv (Histidine Triad) (Seraphin, 1992) konnte als alpha-Phosphat Bindungsstelle für nukleotidbindende Domänen identifiziert werden (Brenner *et al.*, 1997). Der Klon 455/3 kodiert für die Aminosäuren 62-126 des PKCI-1 und besitzt ebenfalls das HIT-Motiv.

4.1.4 Junctional Adhesion Molecule (JAM) (Klon 512/3)

Die Sequenzierung ergab für den Klon 512/3 eine 761 Bp lange Nukleotidsequenz, die für ein Protein mit 135 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 14,2 kDa kodiert. In Blast-Analysen wurde das Junctional Adhesion Molecule (JAM) als Protein gefunden.

Erst 1998 wurde JAM entdeckt und in die Familie der membranständigen Immunglobuline eingeordnet. Das Protein besteht aus insgesamt 300 Aminosäuren, die sich aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembranregion und einer kurzen zytoplasmatischen

Region zusammensetzt (Liu *et al.*, 2000). Die Immunglobulin-domäne des JAM befindet sich an den Aminosäuren 123-205 des Polypeptids. Der Klon 512/3 kodiert für die Aminosäuren 136-271 des JAM, liegt also exakt in der Immunglobulin-domäne, die intrazellulär lokalisiert ist.

Martin-Padura und Mitarbeiter konnten das konzentrierte Vorkommen von JAM an Zell-Zell-Verbindungen von Epithel- und Endothelzellen nachweisen. Diese Arbeitsgruppe konnte außerdem einen inhibitorischen Effekt von JAM auf die Migration von Monozyten in entzündlichem Gewebe nachweisen (Martin-Padura *et al.*, 1998).

In Yeast-Two-Hybrid Analysen konnte gezeigt werden, daß JAM über eine Interaktion mit dem Integrin $\beta 2$ möglicherweise auch eine Rolle in der Transmigration von Leukozyten spielt (Ostermann *et al.*, 2002).

Weiterhin konnte JAM eine wichtige Aufgabe in der Assemblierung von tight junctions zugewiesen werden (Liu *et al.*, 2000).

In Immunopräzipitationsexperimenten wurde eine Verbindung zwischen JAM und dem actinbindenden Protein ZO-1 festgestellt (Itoh *et al.*, 2001).

4.1.5 Zn-alpha2-Glycoprotein (ZAG) (Klon 517/2)

Die Sequenzierung konnte eine 585 Basenpaare lange Nukleotidsequenz identifizieren, aus der 92 Aminosäuren in einer IVT translatiert wurden. Dies entsprach einem Molekulargewicht von etwa 9,6 kDa.

Die Homologiesuche zeigte eine Kongruenz zum C-terminalen Teil des Zn-alpha2-Glycoproteins (ZAG). Das Gen des ZAG setzt sich zusammen aus vier durch unterschiedlich lange Introns getrennte Exons, wobei der Klon 517/2 für das vierte Exons kodiert. Strukturen oder Bindungsmotive konnten bisher nicht identifiziert werden.

ZAG wurde ursprünglich aus Plasma isoliert. Sein Name beruht auf dem Wanderungsverhalten in der Serumelektrophorese (alpha 2-Region) und der Fähigkeit, freie Zink-Ionen zu binden (Burgi und Schmid, 1961). 1988 wurde durch Araki und Mitarbeiter die komplette Aminosäuresequenz offengelegt (Araki *et al.*, 1988). Diese weist Homologien zu den ersten vier Exons des MHC-Rezeptor Klasse I auf, wobei ZAG allerdings die typische transmembrane und zytoplasmatische Domäne fehlt (Freije *et al.*, 1993). Möglicherweise ist ZAG eine wichtige Rolle im Transport von nicht polymorphen Substanzen oder in intrazellulären Erkennungsprozessen zuzuschreiben.

4.2 Bewertung der aufgezeigten Interaktionen

Alle in der Retransformation bestätigten positiven Proteine wurden mittels Coimmunopräzipitation auf ihre Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne der β 4-Untereinheit überprüft. In dieser Arbeit wurden Coimmunopräzipitationen als Anschlußversuche genutzt, da dieses System sicher und komplikationslos etablierbar ist. Weitergehende Versuche, die *in vivo* Verhältnisse in höherem Maße widerspiegeln, hätten einen wesentlichen höheren Zeit- und Kostenaufwand gefordert und wären nicht in adäquatem Rahmen zu bewältigen gewesen.

In keiner der durchgeführten Coimmunopräzipitationen fanden sich Interaktionen dieser Proteine mit der zytoplasmatischen Domäne β 4-Untereinheit, die mit der Positivinteraktion (p53 und T-Antigen) vergleichbar gewesen wären. Allerdings zeigte Screenklon 455/3, der für PKCI-1 kodiert, eine schwache Interaktion (siehe Abb.22), die fünffach reproduzierbar war. Die vier anderen im Yeast-Two Hybrid-System beobachteten Interaktionen konnten dagegen eindeutig nicht *in vitro* per Coimmunopräzipitation verifiziert werden.

Zum einen könnten diese fehlenden Interaktionsnachweise in der Coimmunopräzipitation auf eine möglicherweise artifiziell bedingte Interaktion der oben beschriebenen Proteine mit dem C-terminalen Ende des β 4-Integrins im Yeast-Two-Hybrid Screen hinweisen. Bestimmte Ladungen und strukturelle Ähnlichkeiten, wie Domänen oder Faltungsmuster innerhalb der Proteine könnten für solche Artefakte verantwortlich sein. Aus diesem Grunde wurde eine umfassende Internetrecherche durchgeführt, um solche Homologien zu erkennen oder auszuschließen. Keine dieser Überprüfungen ergab Übereinstimmungen innerhalb der hier identifizierten Proteinfragmente. Die Wahrscheinlichkeit für eine artifiziell bedingte Interaktion scheint demnach zwar gering zu sein, kann allerdings nicht sicher ausgeschlossen werden.

Zum anderen muß die Affinität der interagierenden Proteine zueinander bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Zwar konnte eine regelgerechte Funktion des Coimmunopräzipitationssystems durch die Verwendung der Positivkontrollen p53 und T-Antigen nachgewiesen werden. Diese beiden Proteine besitzen aber eine sehr hohe Affinität zueinander. Ist eine derart hohe Affinität der identifizierten Proteinfragmente zu den β 4-Fragmenten nicht vorhanden, so kann die Coimmunopräzipitation negativ ausfallen. Möglicherweise reagiert das Yeast-Two Hybrid-System im Vergleich zur Coimmunopräzipitation wesentlich sensitiver auf etwaige Interaktionen.

Diskussion

Hieraus würde man folgern, daß die Coimmunopräzipitation eine wesentliche höhere Interaktionsstärke für ein positives Ergebnis benötigt.

Weiterhin muß aber auch darauf hingewiesen werden, daß selbst eine positive Coimmunopräzipitation keineswegs eine *in vivo* Interaktion beweist. Ein positives Ergebnis hätte jedoch darauf hindeuten können, daß eine Interaktion unter *in-vivo* Bedingungen wahrscheinlicher gewesen wäre.

Die in dieser Arbeit aufgezeigte Interaktion zwischen dem Bait pAS EcoRV/BamHI und dem Klon 455/3 weist auf eine solche *in vivo* Interaktion hin. Diese Interaktion könnte möglicherweise durch die Vermittlung stabilisierender, in Hefe vorhandener Proteine zustande kommen. So könnte das nur schwache Interaktionssignal in der Coimmunopräzipitation erklärbar sein.

Da in den Retransformationen die Interaktion von PKCI-1 mit dem Bait pAS PvuII/CT ungleich schwächer ausgefallen ist, spielt der Anteil der Fibronektin TypIII-ähnlichen Domäne des pAS EcoRV/BamHI für die Interaktion eventuell eine wichtige Rolle.

Genauere Aussagen über Mechanismen und Formen der Interaktion können allerdings nicht getroffen werden, da PKCI-1 ein noch weitgehend unbekanntes Protein ist, daß jedoch eine Rolle in Signaltransduktionswegen zu spielen scheint (Bustos *et al.*, 1990) und somit bei der Signalübertragung via der $\beta 4$ -Untereinheit des $\alpha 6\beta 4$ -Integrins beteiligt sein könnte.

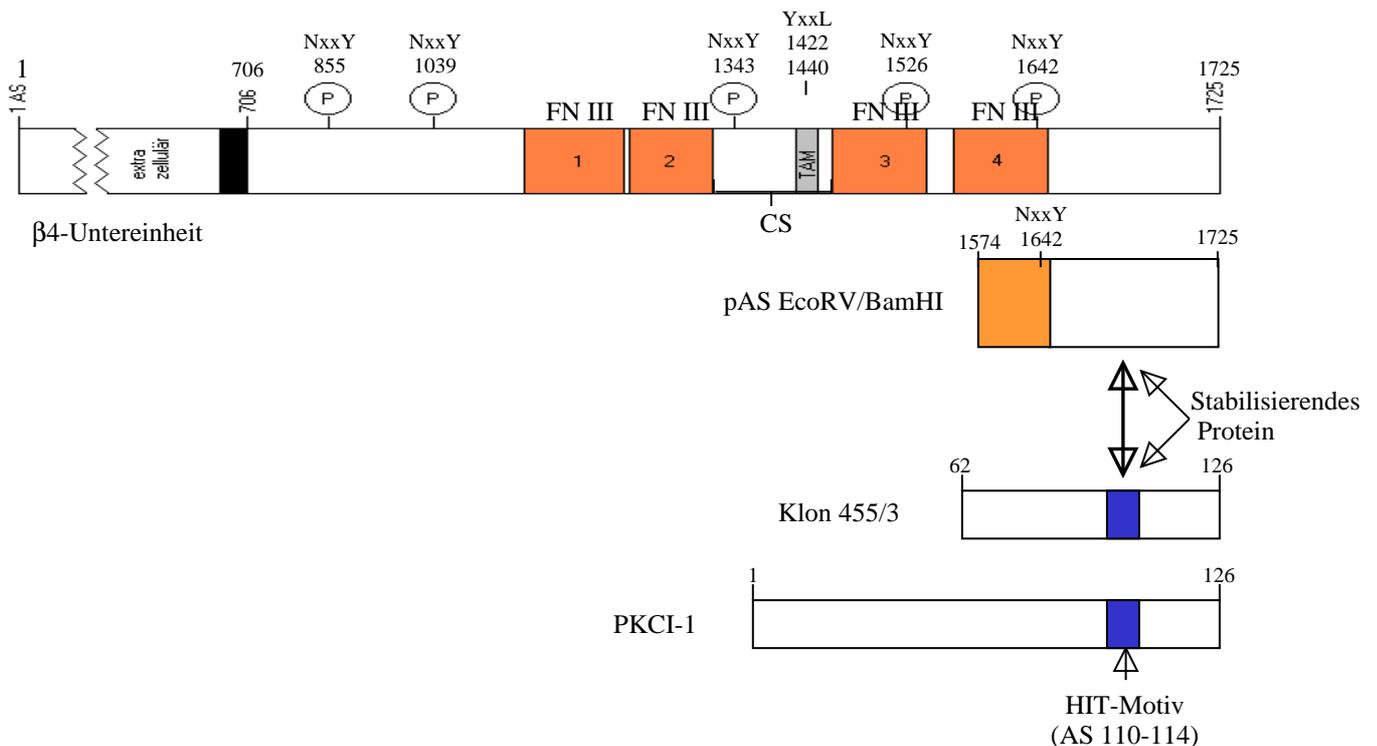


Abbildung 25: Interaktion von pAS EcoRV/BamHI mit Klon 455/3

4.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnten experimentelle Hinweise für *in vitro* Interaktionen mehrerer Proteine mit dem C-terminalen Bereich der $\beta 4$ -Untereinheit des Integrins $\alpha 6\beta 4$ aufgezeigt werden. Hierbei erscheint die Interaktion mit PKCI-1 am bedeutungsvollsten. Um eine signifikante Aussage über das Vorhandensein und die Bedeutung dieser Interaktionen unter *in vivo* Verhältnissen treffen zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich, für die mehrere Ansätze zur Verfügung stehen.

Zum einen könnte ein sogenannter „Pull-Down-Assay“ Verwendung finden. Hierfür wird eines der beiden interagierenden Proteine nach abgelaufener Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.1) auf einen Filter übertragen und fixiert. Anschließend wird der Filter mit dem zweiten Protein inkubiert und nachfolgend nicht gebundenes Protein abgespült. Die Detektion der Interaktion kann daraufhin über einen sekundären Antikörper oder eine radioaktive Markierung des zweiten Proteins erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit könnte die Verwendung eines Zelliniensystems bieten. Hierbei werden die Zellen mit den beiden Expressionvektoren transfiziert. Der Versuch des Nachweises einer Interaktion könnte dann durch eine Coimmunopräzipitationanalyse erfolgen (Phizicky und Fields, 1995).

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Interaktionspartnern der $\beta 4$ -Untereinheit des Integrins $\alpha 6\beta 4$. Dabei wurde die C-terminale Region der $\beta 4$ -Untereinheit als Zielprotein (Bait) in einem Yeast-Two-Hybrid Screen eingesetzt. Dazu wurden Fusionplasmide kreiert, die in Hefezellen transformiert wurden und so mit Proteinen einer Genbibliothek Interaktionen eingingen. Diese wurden mittels in das Hefegenom eingefügten Reportergenen detektierbar. Auf diese Weise wurden elf Fusionplasmide identifiziert, die in diesem Yeast-Two-Hybrid System Interaktionen mit dem C-terminalen Ende der $\beta 4$ -Untereinheit eingingen. Mittels Computeranalysen konnten acht dieser Fusionplasmide Nukleotidsequenzen von humanen Proteinen zugeordnet werden. Diese Fusionplasmide wurden daraufhin in Coimmunopräzipitationsexperimenten eingesetzt. Keine der durchgeführten Coimmunopräzipitationsexperimente zeigte eine Interaktion in der Intensität der als Positivkontrolle verwendeten Interaktion zwischen p53 und T-Antigen. Allerdings konnte eine schwache Interaktion zwischen PKC-interacting Protein 1 und dem C-terminalen Ende der $\beta 4$ -Untereinheit nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Intensität kann jedoch keine sichere Aussage über ein Vorhandensein dieser Interaktion in *in vivo* Verhältnissen getroffen werden. Inwiefern eine Interaktion zwischen PKC-interacting Protein 1 und dem C-terminalen Ende der $\beta 4$ -Untereinheit stattfindet und ob dieser eine Bedeutung in der Signaltransduktion zukommt, sollte in weiteren kontrollierten Studien überprüft werden.

6 Anhang

6.1 Verwendete Geräte

Minigelkammer GNA 100	Pharmacia LKB, Freiburg
Horizontalelektrophoresekammer	Biorad Laboratories, München
UV-Transluminator	Sigma, Heidelberg
Vakuumblotter	Pharmacia LKB, Freiburg
Power Pac 300	Biorad Laboratories, München
Proteinelektrophoresekammer	GibcoBRL, Eggenstein
Semi-Dry Blotter	Hofer, Heidelberg
Kühlzentrifuge Roxica 120R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Sigma 1115	Braun, Melsungen
Tischzentrifuge Microfuge [®] Lite R	Beckman, München
Kühlzentrifuge Avant J-25	Beckman, München
Thermomixer 5436	Eppendorf, Heidelberg
pH-Meter	WTW, Weilheim
PCR-Cycler Hybaid Omnigene HB-TR3SM1	MWG Biotech, Ebersberg
PCR-Cycler Uno II	Biometra, Hamburg
Spektralphotometer Ultraspec 2000	Shimadzu, Japan, Kyoto
Gene Quant II	Pharmacia LKB, Freiburg
Photometer DU-640	Beckman, München
Brutschränke	Heraeus, Hannover
Hybridisierungsöfen	Biometra, Hamburg
Szintillationszähler	Pharmacia LKB, Heidelberg
Sterilbank BSK4	Antair, Italien, Genua
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Osterode
Dismembrator	Braun, Melsungen
Mikrowelle	Bosch, Wernau
PAA-Gelkammer	Biometra, Hamburg
Elektroporationsgerät	Biorad Laboratories, München
Magnetrührer	Ikamag, Genf, Schweiz
Vortexer	Ikamag, Genf, Schweiz
Feinwaage	Sartorius, Göttingen

Autoklav	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Kühlschränke	Former Scientific Bosch, Wernau
Kamera	PHASE, Lübeck
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH, Medingen
Inkubationschüttler	INFORS AG, Bottmingen Gerhardt, Bonn

6.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Select Peptone 140	Gibco BRL, Eggenstein
Select Yeast Extract	Gibco BRL, Eggenstein
Yeast nitrogen base w/o amino acids	Difco/Becton Dickinson, MA, USA
Bacto Agar	Difco/Becton Dickinson, MA, USA
Yeast Extrakt	Difco/Becton Dickinson, MA, USA
3-AT	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Promega, Heidelberg
LiAc	Clontech Laboratories, Palo Alto, USA
PEG	Clontech Laboratories, Palo Alto, USA
Yeastmaker Carrier DNA (Heringssperma)	Clontech Laboratories, Palo Alto, USA
Dropout-Mix	Clontech Laboratories, Palo Alto, USA
DMSO	Sigma, Deisenhofen
Dynabeads®	Deutsche Dynal GmbH, Hamburg
TNT-Mastermix	Promega, Heidelberg

Alle anderen Standardchemikalien und Verbrauchsmittel in der Reinheitsstufe p.a. (pro analysis) wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Buchler, Braunschweig
Amicon, Witten
Beckman, München
Becton Dickinson, MA, USA
BIO101, Carlsbad, USA

Biomol Feinchemikalien GmbH, Ilvesheim
Biorad Laboratories, München
Biozym Diagnostik, Hameln
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Clontech Laboratories, Palo Alto, USA
Dianova, Hamburg
Eppendorf-Netheler-Hinz, Heidelberg
Gibco BRL, Eggenstein
Greiner, Frickenhausen
Hartmann Analytika, Braunschweig
Hermann Biermann GmbH, Bad Nauheim
Invitrogen, Niederlande
Merck, Darmstadt
Millipore, MA, USA
MWG Biotech, Ebersberg
Pharmacia LKB, Freiburg
Promega, Heidelberg
Qiagen, Hilden
Sarstedt, Langenhagen
Saxon, Hannover
Schleicher&Schüll, Dassel
Seromed, Berlin
Serva Feinbiochemikalien, Heidelberg
Sigma, Deisenhofen
Stratagene, Heidelberg
Transduction Laboratories, Nottingham, UK

7 Literaturverzeichnis

- Adams JC, Watt FM: Expression of β 1, β 3, β 4, and β 5 integrins by human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes. *J Cell Biol* 115, 829-841 (1991).
- Aho S, Uitto J: Direct interaction between the intracellular domains of bullous pemphigoid antigen 2 (BP180) and β 4 integrin, hemidesmosomal components of basal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 694-699 (1998).
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman J: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402 (1997).
- Ammerer G: Expression of genes in yeast using the ADCl promoter. *Methods Enzymol* 101, 192-201 (1983).
- Araki T, Gejyo F, Takagaki K, Haupt H, Schwick HG, Bürgi W, Marti T, Schaller J, Rickli E, Brossmer R, Atkinson PH, Putnam FW, Schmid K: Complete amino acid sequence of human plasma Zn- α 2-glycoprotein and its homology to histocompatibility antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 679-683 (1988).
- Bartel P, Chien C-T, Sternglanz R, Fields S: Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14, 920-924 (1993).
- Borradori L, Koch PJ, Niessen CM, Erkeland S, van Leusden MR, Sonnenberg A: The localization of bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in hemidesmosomes is mediated by its cytoplasmic domain and seems to be regulated by the β 4 integrin subunit. *J Cell Biol* 136, 1333-1347 (1997).
- Brenner C, Garrison P, Gilmour J, Peisach D, Ringe D, Petsko GA, Lowenstein JM: Crystal structures of HINT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins. *Nat Struct Biol* 4, 231-238 (1997).

- Brown TA, Gil SG, Sybert VP, Lestringant GG, Tadini G, Caputo R, Carter WG: Defective integrin $\alpha 6\beta 4$ expression in the skin of patients with junctional epidermolysis bullosa and pyloric atresia. *J Invest Dermatol* 3, 384-391 (1996).
- Brzoska PM, Chien H, Zhu Y, Levin NA, Disatnik M-H, Mochly-Rosen D, Murnane JP, Christman MF: The product of the ataxia-telangiectasia group D complementing gene, ATDC, interacts with a protein kinase C substrate and inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7824-7828 (1995).
- Brzoska PM, Chen H, Levin NA, Kuo W-L, Collins C, Fu KK, Gray JW, Christman MF: Cloning, mapping and in vivo localization of a human member of the PKCI-1 protein family (PRKCNH1). *Genomics* 36, 151-156 (1996).
- Bürgi W, Schmid K: Preparation and properties of Zn- $\alpha 2$ -glycoprotein of normal human plasma. *J Biol Chem* 236, 1066-1074 (1961).
- Bustos SA, Schaefer MR, Golden SS: Different and rapid responses of four cyanobacterial *psbA* transcripts to changes in light intensity. *J Bact* 172, 1998-2004 (1990).
- Carter WG, Kaur P, Gil SG, Gahr PJ, Wayner EA: Distinct functions for integrins $\alpha 3\beta 1$ in focal adhesions and $\alpha 6\beta 4$ /Bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: Relation to hemidesmosomes. *J Cell Biol* 111, 3141-3154 (1990).
- Chien C-T, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S: The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9578-9582 (1991).
- Clark EA, Brugge JS: Integrins and signal transduction pathways: The road taken. *Science* 268, 233-239 (1995).
- Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deléage G: NPS@: Network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 25, 147-150 (2000).
- Corpet F: Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16, 10881-10890 (1988).

- Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ: Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation in NIH 3T3 cells. *Cell* 77, 841-852 (1994).
- Dedhar S, Williams B, Hannigan G: Integrin-linked kinase (ILK): a regulator of integrin and growth-factor signaling. *Cell Biol* 9, 319-323 (1999).
- DiPersio CM, Hodivala-Dilke KM, Jaenisch R, Kreidberg JA, Hynes RO: $\alpha 3\beta 1$ integrin is required for normal development of the epidermal basement membran. *J Cell Biol* 137, 729-742 (1997).
- Dowling J, Yu Q, Fuchs E: $\beta 4$ integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J Cell Biol* 134, 559-572 (1996).
- Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA: Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363, 45-51 (1993).
- Einheber S, Milner TA, Giancotti F, Salzer JL: Axonal Regulation of Schwann cell integrin expression suggests a role for $\alpha 6\beta 4$ in myelination. *J Cell Biol* 123, 1223-1236 (1993).
- Falk-Marzillier J, Domanico SZ, Pelletier A, Mullen L, Quaranta V: Characterization of a tight molecular complex between integrin $\alpha 6\beta 4$ and laminin-5 extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 49-55 (1998).
- Feilotter HE, Hannon GJ, Ruddell CJ, Beach D: Construction of an improved host strain for two-hybrid screening. *Nucleic Acids Res* 22, 1502-1503 (1994).
- Fields S, Song O: A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246 (1989).
- Fornaro M, Languino LR: Alternatively spliced variants: A new view of the integrin cytoplasmic domain. *Matrix Biol* 16, 185-193 (1997).
- Freije JP, Fueyo A, Uría JA, Velasco G, Sánchez LM, López-Boado YS, López-Otin C: Human Zn- $\alpha 2$ -glycoprotein: Complete genomic sequence, identification of a related

- pseudogene and relationship to class I major histocompatibility complex genes. *Genomics* 18, 575-587 (1993).
- Gagnaux-Palacios L, Gache Y, Ortonne J-P, Meneguzzi G: Hemidesmosome assembly assessed by expression a wild-type integrin $\beta 4$ cDNA in junctional epidermolysis bullosa kerationcytes. *Lab Invest* 77, 459-468 (1997).
- Gambaletta D; Marchetti A, Benedetti L, Mercurio AM, Sacchi A, Falcioni R: Cooperative signaling between $\alpha 6\beta 4$ integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion. *J Biol Chem* 275, 10604-10610 (2000).
- Gaudernack G, Leivestad T, Ugelstad J, Thorsby E: Isolation of pure functionally active CD8⁺ T cells. Positive selection with monoclonal antibodies directly conjugated to monosized magnetic microspheres. *J Immunol Methods* 90, 179-187 (1986).
- Giancotti FG: Signal transduction by the $\alpha 6\beta 4$ integrin: charting the path between laminin binding and nuclear events. *J Cell Sci* 109, 1165-1172 (1996).
- Giancotti FG, Stepp MA, Suzuki S, Engvall E, Ruoslahti E: Proteolytic processing of endogenous and recombinant $\beta 4$ integrin subunit. *J Cell Biol* 118, 951-959 (1992).
- Giancotti FG, Maniero F: Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1198, 47-64 (1994).
- Giancotti FG, Ruoslahti E: Integrin signaling. *Science* 285, 1028-1032 (1999).
- Giniger E, Ptashne M: Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 382-386 (1988).
- Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA: Cloning and primary structural analysis of the bollous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol* 99, 243-250 (1992).
- Guo L, Degnestein L, Dowling J, Yu Q-C, Wollmann R, Perman B, Fuchs E: Gene targeting of BPAG1: Abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell* 81, 233-243 (1995).

- Hall PA, Watt FM: Stern cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106, 619-633 (1989).
- Hanahan D: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580 (1983).
- Hannigan GE, Dedhar S: Protein kinase mediators of integrin signal transduction. *J Mol Med* 75, 35-44 (1997).
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of C1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816 (1993).
- Hieda Y, Nishizawa Y, Uematsu J, Owaribe K: Identification of a new hemidesmosomal protein, HD1: A major, high molecular mass component of isolated hemidesmosomes. *J Cell Biol* 116, 1497-1506 (1992).
- Hintermann E, Bilban M, Sharabi A, Quaranta V: Inhibitory role of $\alpha 6\beta 4$ -associated erbB-2 and phosphoinositide 3-kinase in keratinocyte haptotactic migration dependent on $\alpha 3\beta 1$ integrin. *J Cell Biol* 153, 465-478 (2001).
- Hirako Y, Owaribe K: Hemidesmosomes and their unique transmembrane protein BP180. *Microsc Res Tech* 43, 207-217 (1998).
- Hogervorst F, Kuikman I, von dem Borne AEG, Sonnenberg A: Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *EMBO* 9, 765-770 (1990).
- Hopkinson SB, Riddelle KS, Jones JCR: Cytoplasmic domain of the 180-kd bullous pemphigoid antigen, a hemidesmosomal component: Molecular and cell biologic characterization. *J Invest Dermatol* 99, 264-270 (1992).
- Hopkinson SB, Baker SE, Jones JCR: Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen (the 180-kd bullous pemphigoid antigen/BP180): Identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and evidence for an interaction between BP180 and $\alpha 6$ integrin. *J Cell Biol* 130, 117-125 (1995).

- Hopkinson SB, Findlay K, deHart GW, Jones JCR: Interaction of BP180 (Type XVII collagen) and $\alpha 6$ integrin is necessary for stabilization of hemidesmosome structure. *J Invest Dermatol* 111, 1015-1022 (1998).
- Hopkinson SB, Jones JCR: The N terminus of the transmembrane protein BP180 interacts with the N-terminal domain of BP230, thereby mediating keratin cytoskeleton anchorage to the cell surface at the site of the hemidesmosome. *Mol Biol Cell* 11, 277-286 (2000).
- Hynes RO: Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 48, 549-554 (1987).
- Hynes RO: Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25 (1992).
- Hynes RO: Integrins: Bidirectional allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687 (2002).
- Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukati S: Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: A possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 154, 491-497 (2001).
- Iwabuchi K, Li B, Bartel P, Fields S: Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8, 1693-1696 (1993).
- Jones JCR, Asmuth J, Baker SE, Langhofer M, Roth SI, Hopkinson SB: Hemidesmosomes: Extracellular Matrix/Intermediate filament connectors. *Exp Cell Res* 213, 1-11 (1994).
- Jones JCR, Hopkinson SB, Goldfinger LE: Structure and assembly of hemidesmosomes. *BioEssays* 20, 488-494 (1998).
- Kajiji S, Tamura RN, Quaranta V: A novel integrin ($\alpha_E\beta_4$) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors. *EMBO* 8, 673-680 (1989).
- Kavanaugh WM, Turck CW, Williams LT: PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science* 268, 1177-1179 (1995).

- Kimmel KA, Carey TE: Altered expression in squamous carcinoma cells of an orientation restricted epithelial antigen detected by monoclonal antibody A9.
Cancer Res 46, 3614-3623 (1986).
- Knox JD, Cress AE, Clark V, Manriquez L, Affinito KS, Dalkin BL, Nagle RB: Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha6-integrins in the normal and neoplastic prostate. Am J Pathol 145, 167-174 (1994).
- Kyhse-Andersen J: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J Biochem Biophys Methods 10, 203-209 (1984).
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970).
- LaFlamme SE, Homan SM, Bodeau AL, Mastrangelo AM: Integrin cytoplasmic domains as connectors to the cell's signal transduction apparatus. Matrix Biol 16, 153-163 (1997).
- Lee EC, Lotz MM, Steele GD, Mercurio AM: The integrin $\alpha 6\beta 4$ is a laminin receptor.
J Cell Biol 117, 671-678 (1992).
- Li L, Elledge SJ, Peterson CA, Bales ES, Legerski RJ: Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1.
Proc Natl Acad Sci USA 91, 5012-5016 (1994).
- Li B, Fields S: Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. FASEB J 7, 957-963 (1993).
- Liu Z, Diaz LA, Swartz SJ, Troy JL, Fairley JA, Giudice GJ: Molecular mapping of a pathogenically relevant BP180 epitope associated with experimentally induced murine bullous pemphigoid. J Immunol 155, 5449-5454 (1995).
- Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA: Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia.
J Cell Sci 113, 2363-2374 (2000).

- McDonald JR, Walsh MP: Ca²⁺-binding proteins from bovine brain including a potent inhibitor of protein kinase C. *Biochem J* 232, 559-567 (1985).
- Maniero F, Pepe A, Wary KK, Spinardi L, Mohammadi M, Schlessinger J, Giancotti FG: Signal transduction by the $\alpha 6\beta 4$ integrin: distinct $\beta 4$ subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *EMBO J* 14, 4470-4481 (1995).
- Maniero F, Murgia C, Wary KK, Curatola AM, Pepe A, Blumemberg M, Westwick JK, Der CJ, Giancotti FG: The coupling of $\alpha 6\beta 4$ integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *EMBO* 16, 2365-2375 (1997).
- Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard A-M, Pierres M, Nielsen PF, Ribet U, Watanabe T, Drucker DJ, Wagtmann N: Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6874-6879 (2000).
- Martín-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E: Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142, 117-127 (1998).
- Mulder NJ, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Binns D, Biswas M, Bradley P, Bork P, Bucher P, Copley R, Courcelle E, Durbin R, Falquet L, Fleischmann W, Gouzy J, Griffith-Jones S, Haft D, Hermjakob H, Hulo N, Kahn D, Kanapin A, Krestyaninova M, Lopez R, Letunic I, Orchard S, Pagni M, Peyruc D, Ponting CP, Servant F, Sigrist CJ: Interpro: an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Brief Bioinform* 3, 225-235 (2002).
- Niessen CM, Hulsman EHM, Rots ES, Sanchez-Aparicio P, Sonnenberg A: Integrin $\alpha 6\beta 4$ forms a complex with the cytoskeletal protein HD1 and induces its redistribution in transfected COS-7 cells. *Mol Biol Cell* 8, 555-566 (1997).

- Niessen CM, van der Raaij-Helmer LMH, Hulsman EHM, van der Neut R, Jonkman MF, Sonnenberg A: Deficiency of the integrin β 4 subunit in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia: consequences for hemidesmosome formation and adhesion properties. *J Cell Sci* 109, 1695-1706 (1996).
- Nievers MG, Schnaapveld RQJ, Oomen LCJM, Fontao L, Geerts D, Sonnenberg A: Ligand-independent role of the β 4 integrin subunit in the formation of hemidesmosomes. *J Cell Sci* 111, 1659-1672 (1998).
- O'Donovan C, Martin MJ, Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A, Apweiler R: High-quality protein knowledge resource: SWISS-PROT and TrEMBL. *Brief Bioinform* 3, 275-284 (2002).
- O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH: Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 124, 1047-1059 (1994).
- Okumura M, Uematsu J, Hirako Y, Nishizawa Y, Shimizu H, Kido N, Owaribe K: Identification of the hemidesmosomal 500 kDa protein (HD1) as plectin 1. *J Biochem* 126, 1144-1150 (1999).
- Olsen C, Wagtmann N: Identification and characterization of human DPP9, a novel homologue of dipeptidyl peptidase IV. *Gene* 299, 185-193 (2002).
- Ostermann G, Weber KSC, Zerneck A, Schröder A, Weber C: JAM-1 is a ligand of the β 2 integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immu* 3, 151-158 (2002).
- Pawson T: Protein modules and signaling networks. *Nature* 373, 573-579 (1995).
- Pearson JD, DeWald DB, Mathew WR, Mozier NM, Zürcher-Neely HA, Henrikson RL, Morris MA, McCubbin WD, McDonald JR, Fraser ED, Vogel HJ, Kay CM, Walsh MP: Amino acid sequence and characterization of a protein inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 265, 4583-4591 (1990).
- Phizicky EM, Fields S: Protein-Protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 59, 94-123 (1995).

- Rezniczek GA, de Pereda JM, Reipert S, Wiche G: Linking integrin $\alpha 6\beta 4$ -based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: Direct interaction between the $\beta 4$ subunit and plectin at multiple molecular sites. *J Cell Biol* 141, 209-225 (1998).
- Sanchez–Aparicio P, de Velasco AMM, Niessen CM, Borradori L, Kulkmann I, Hulsman EHM, Fässler R, Owaribe K, Sonnenberg A: The subcellular distribution of the high molecular mass protein, HD1, is determined by the cytoplasmatic domain of the integrin $\beta 4$ subunit. *J Cell Sci* 110, 169-178 (1997).
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467 (1977).
- Sawamura D, Li KH, Sugita Y, Christiano AM, Uitto J: Bullous pemphigoid antigen: cDNA cloning, cellular expression, and evidence for polymorphism of the human gene. *J Invest Dermatol* 96, 908-915 (1991).
- Schnaapveld RQJ, Borradori L, Geerts D, van Leusden MR, Kuikman I, Nievers MG, Niessen CM, Steenbergen RDM, Snijders PJF: Hemidesmosome formation is initiated by the $\beta 4$ integrin subunit, requires complex formation of $\beta 4$ and HD1/Plectin, and involves a direct interaction between $\beta 4$ and the bullous pemphigoid antigen 180. *J Cell Biol* 142, 271-284 (1998).
- Schofield O, Kist D, Lucas A, Wayner E, Carter W, Zachary C: Abnormal expression of epiligrin and $\alpha 6\beta 4$ integrin in basal cell carcinoma. *Dermatol Surg* 24, 555-559 (1998).
- Seraphin B: The HIT protein family: a new family of proteins present in prokaryotes, yeast and mammals. *DNA Seq* 3, 177-179 (1992).
- Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HHH, Toker A, Mercurio AM: Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the $\alpha 6\beta 4$ integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 91, 949-960 (1997).
- Silver PA, Keegan LP, Ptashine M: Amino terminus of the yeast GAL4 gene product is sufficient for nuclear localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 5951-5955 (1984).

- Sonnenberg A, Linders CJT, Daams JH, Kennel SJ: The $\alpha\beta 1$ (VLA-6) and $\alpha\beta 4$ protein complexes: tissue distribution and biochemical properties. J Cell Sci 96, 207-217 (1990).
- Spinardi L, Einheber S, Cullen T, Milner TA, Giancotti FG: A recombinant tail-less integrin $\beta 4$ subunit disrupts hemidesmosomes, but does not suppress $\alpha\beta 4$ -mediated cell adhesion to laminins. J Cell Biol 129, 473-487 (1995).
- Spinardi L, Ren Y-L, Sanders R, Giancotti FG: The $\beta 4$ subunit cytoplasmic domain mediates the interaction of $\alpha\beta 4$ integrin with the cytoskeleton of hemidesmosomes. Mol Biol Cell 4, 871-884 (1993).
- Steinböck FA, Wiche G: Plectin: A cytolinker by design. Biol Chem 380, 151-158 (1999).
- Stepp MA, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Elwell J, Gipson IK: $\alpha\beta 4$ integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. Proc Natl Acad Sci USA 87, 8970-8974 (1990).
- Suzuki S, Naitoh Y: Amino acid sequence of a novel integrin $\beta 4$ subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells. EMBO J 9, 757-763 (1990).
- Takafuta T, Wu G, Murphy GF, Shapiro SS: Human β -filamin is a new protein that interacts with the cytoplasmic tail of glycoprotein Iba α . J Biol Chem 273, 17531-17538 (1998).
- Tamai K, Sawamura D, Do HC, Tamai Y, Li K, Uitto J: The human 230-kd bullous pemphigoid antigen gene (BPAG1). J Clin Invest 92, 814-822 (1993).
- Tornow J, Santangelo GG: Efficient expression of *Saccharomyces cerevisiae* glycolytic gene *ADHI* is dependent upon a cis-acting regulatory element (UAS_{PRG}) found initially in genes encoding ribosomal proteins. Gene 90, 79-85 (1990).
- van der Flier A, Kuikman I, Kramer D, Geerts D, Kreft M, Takafuta T, Shapiro SS, Sonnenberg A: Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, and determine binding to integrin β subunits. J Cell Biol 156 (2), 361-376 (2002).

- van der Neut R, Krimpenfort P, Calafat J, Niessen CM; Sonnenberg A: Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin $\beta 4$ null mice. *Nature Genetics* 13, 366-373 (1996).
- van Waes C, Surh DM, Chen Z, Kirby M, Rhim JS, Brager R, Sessions RB, Poore J, Wolf GT, Carey TE: Increase in suprabasilar integrin adhesion molecule expression in human epidermal neoplasm accompanies increased proliferation occurring with immortalization and tumor progression. *Cancer Res* 55, 5434-5444 (1995).
- Wadsworth S, Halvorson MJ, Coligan JE: Developmentally regulated expression of the $\beta 4$ integrin on immature mouse thymocytes. *J Immu* 149, 421-428 (1992).
- Wary KK, Maniero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG: The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 87, 733-743 (1996).
- Xu W, Xie Z, Chung D, Davie EW: A novel human actin-binding protein homologue that binds to platelet glycoprotein Iba. *Blood* 92, 1268-1276 (1998).

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Sczakiel möchte ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes, die Möglichkeit zum eigenständigen Arbeiten sowie die wertvollen Ratschläge danken.

Weiterhin möchte ich vor allem Frau Dr. R. Kretschmer-Kazemi Far danken, die mich während der gesamten Zeit des Projekts unterstützt hat, mir in vielen schwierigen Fragen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne die diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Atmosphäre und die Toleranz, wenn mal wieder das Chaos ausgebrochen ist.

Ganz besonders möchte ich mich bei Traute v. Postel, Gabi Kreuzfeldt und Kirsten Franke bedanken für ihre hervorragende technische Unterstützung.

Ebenfalls geht mein ausdrücklicher Dank an Winni Wünsche, nicht nur für den technischen Support oder die Korrektur mehrerer Versionen dieser Arbeit, sondern auch für die sportliche Ablenkung in der ganzen Zeit.

Weiterer herzlicher Dank gilt Anne und Markus für Korrekturen und das vergnügliche und freundschaftliche Büroklima, ohne das die vielen Stunden wesentlich länger geworden wären.

Vor allem und abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die mir durch ihre jahrelange und liebevolle Unterstützung sowohl das Studium als auch diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

9 Lebenslauf

Name: Jan Leppert
Geburtsdatum: 08.04.1976
Geburtsort: Aachen
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1982-1986 Grundschule Lichte-Kammer
1986-1995 Märkisches Gymnasium Iserlohn
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/ 1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Medizinischen Universität zu Lübeck
03/ 1998 Ärztliche Vorprüfung
03/ 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/ 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/ 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit Mai 2003 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik für Neurochirurgie des
Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.