

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



Untersuchung von Interaktionen intrazellulärer Signalkaskaden

von

Katharina Hennecke

aus Arnsberg

2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Alexander Pfeifer betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 22. November 2007

Katharina Hennecke

Dissertation eingereicht am	22. November 2007
1. Gutachter	Prof. Dr. A. Pfeifer
2. Gutachter	Prof. Dr. M. Biel
mündliche Prüfung am	21. Dezember 2007

Für meine Eltern

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern, meiner Familie und Martin danken. Sie haben mich in allem unterstützt und sind immer für mich da.

Danke, Mama, Papa, Fabian, Anneliese, Xaver und Martin!

Bei Herrn Prof. Dr. Alexander Pfeifer bedanke ich mich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, und die Betreuung der Arbeit. Die vielen, anregenden Diskussionen werden mir sicher in guter Erinnerung bleiben.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel ein herzliches Dankeschön für die unkomplizierte Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Fässler und Herrn Dr. Ramin Massoumi gilt mein herzlicher Dank für die gelungene Zusammenarbeit. Bei Herrn Prof. Dr. Martin Lehr und seiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die spontane Hilfe bei den Aktivitäts-Assays.

Meinem Laborpartner Dr. Andreas Hofmann danke ich für einfach alles, ganz besonders jedoch für das Hirner-Erlebnis. Schade, dass er nicht mehr passt. Dank auch an Susi für den einen Tipp, hast eben doch Recht behalten, gell?

Meinem Arbeitskollegen Bodo Haas danke ich für die lustigen Stunden am Tisch gegenüber (hab ich unter'm geschrieben?) und die Expression von α -Ville, stimmt's Dani? (Daten auf Anfrage).

Mein besonderer Dank gilt Andrea Kabermann, Daniela Scholz, Heidi Sebald, Regina Müller und Steffi Kippschull für ihren unermüdlichen Einsatz weit über das Labor hinaus.

Meinen ehemaligen Kollegen Diana Messow, Saba Al-Khadra, Martha Weidinger, Maïke Schulte und im Besonderen Dr. Heidi Geiger, Dr. Christian Eckert und Dr. Ludwig Baumann sage ich ein Riesen-Dankeschön für 4 Jahre Humor am Stück sowie die ein oder andere feuchtfröhliche Außer-Haus-Veranstaltung.

Bei meinen Freunden und besonders Dr. Ioannis Sapountzis sowie den Schatzis Dr. Constance Vogler, Eveline Lancon, Dr. Brigitte Stein-Schaller und Markus Körner möchte ich mich einfach für die Zeit mit Euch und Eure supi Unterstützung bedanken!

Martin, Dir danke ich von Herzen, dass es immer egal war, ob München, svK, Zürich oder wo sonst-

Du bist immer für mich da.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE NO-CGMP-SIGNALKASKADE	1
1.2 DIE STRUKTUR UND FUNKTION DER CGMP-ABHÄNGIGEN KINASEN	3
1.3 BAT – BRAUNES FETTWEGEBE.....	7
2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	10
3 MATERIAL UND METHODEN.....	11
3.1 CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER.....	11
3.1.1 CHEMIKALIEN.....	11
3.2 BIOLOGISCHES MATERIAL	13
3.2.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> STÄMME	13
3.2.2 HEFESTÄMME.....	13
3.2.3 HEK293-ZELLEN.....	13
3.2.4 PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE	13
3.2.5 ENZYME.....	14
3.2.6 STANDARDS UND KITS	15
3.2.7 SONSTIGES MATERIAL	15
3.3 METHODEN ZUR ARBEIT MIT DNA.....	16
3.3.1 AMPLIFIKATION UND ISOLIERUNG VON PLASMIDEN	16
3.3.1.1 Präparation chemisch kompetenter <i>E.coli</i>	16
3.3.1.2 Transformation von <i>E.coli</i>	17
3.3.1.3 Präparation elektrokompeter <i>E.coli</i>	17
3.3.1.4 Transformation von <i>E.coli</i> durch Elektroporation.....	18
3.3.1.5 Kultivierung von <i>E.coli</i>	19
3.3.1.6 Alkalische Lyse – Schnelltest (Mini-Präparation)	19
3.3.1.7 Alkalische Lyse – präparativ (Maxi-Präparation)	19
3.3.2 ENZYMATISCHE MODIFIKATIONEN VON DNA	20
3.3.2.1 Restriktionsverdau durch Restriktionsendonukleasen	20
3.3.2.2 Auffüllung kohäsiver Enden und Phosphorylierung von DNA	20
3.3.2.3 Dephosphorylierung von DNA durch alkalische Phosphatase.....	20
3.3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten	20
3.3.3 ELEKTROPHORESE.....	21
3.3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese	21
3.3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	22
3.3.4 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	22
3.3.4.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	23
3.3.4.2 Sequenzierung.....	24
3.4 METHODEN ZUR ARBEIT MIT PROTEINEN.....	25
3.4.1 PROTEIN-ISOLATION AUS ZELLEN.....	25
3.4.2 PROTEIN-ISOLATION AUS GEWEBE	26
3.4.3 QUANTIFIZIERUNG VON PROTEINEN (BRADFORD).....	26
3.4.4 WESTERN BLOT.....	26
3.4.5 CO-IMMUNOPRÄZIPITATION.....	29
3.4.6 PULLDOWN-ASSAYS	30

3.4.6.1	3xFLAG-Pulldown-Assay	30
3.4.6.2	Myc-/HA-Tag-Pulldown-Assay.....	30
3.4.7	³² P-PHOSPHORYLIERUNGSASSAY.....	30
3.4.8	PHOSPHOLIPASE-AKTIVITÄTS-ASSAY.....	31
3.5	METHODEN ZUR ARBEIT MIT RNA.....	32
3.5.1	ISOLIERUNG VON RNA	32
3.5.2	RNA-GLYOXAL-GELELEKTROPHORESE	32
3.5.3	ERSTELLUNG EINER CDNA-BIBLIOTHEK AUS BRAUNEM FETTGEWEBE	33
3.5.3.1	Isolierung von RNA nach Chomczynski und Sacchi.....	33
3.5.3.2	Isolierung von Poly(A)-mRNA.....	34
3.5.3.3	Erstellung der cDNA-Bibliothek.....	34
3.6	METHODEN ZUR ARBEIT MIT HEFE IM ZWEI-HYBRID-SYSTEM.....	35
3.6.1	DAS YEAST-TWO-HYBRID-SYSTEM	35
3.6.2	GENOTYPEN DER VERWENDETEN HEFESTÄMME	37
3.6.3	PLASMIDE IM Y2H.....	38
3.6.4	NÄHRMEDIEN UND LÖSUNGEN.....	38
3.6.5	KULTIVIERUNG DER HEFEN	40
3.6.6	KONSTRUKTION DES BAITTS	40
3.6.7	KONSTRUKTION DES PREYS.....	40
3.6.8	VORVERSUCHE MIT DEN VERWENDETEN BAITTS	40
3.6.9	TWO-HYBRID-SCREEN DER BAT-CDNA-BIBLIOTHEK.....	41
3.6.9.1	Quick and Easy TRAF0 Protokoll	41
3.6.9.2	Two-Hybrid-System TRAF0 Protokoll (Bibliothekstransformation).....	42
3.6.9.3	Detektion positiver Klone.....	42
3.6.9.4	Rescreen zur Bestätigung der Interaktion	43
3.6.9.4.1	Plasmid-DNA-Isolation aus Hefe.....	43
3.6.9.4.2	Vermehrung der Plasmid-DNA in <i>E.coli</i>	43
3.6.9.4.3	Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA	44
3.6.9.4.4	Small Scale Transformation Protokoll für den Rescreen	44
3.6.10	TESTS ZUR B-GALAKTOSIDASE-AKTIVITÄT.....	44
3.6.10.1	ONPG-Assay.....	44
3.6.10.2	CLFA-Assay.....	45
3.7	KULTUR EUKARYOTISCHER ZELLEN.....	46
3.7.1	PRÄADIPOZYTEN - BAT	46
3.7.1.1	Medien.....	46
3.7.1.2	Differenzierung der BAT	47
3.7.1.3	Triglycerid-Assay.....	47
3.7.2	PRIMÄRE CHONDROZYTEN.....	48
3.7.3	HEK293 ZELLEN	49
3.7.3.1	Kultivierung.....	49
3.7.3.2	Transiente Transfektion	49
4	<u>ERGEBNISSE</u>.....	50
4.1	EXPRESSION DER cGMP-ABHÄNGIGEN KINASEN IN PRÄADIPOZYTEN UND BAT	50
4.2	Y2H.....	51
4.2.1	ERSTELLUNG DER CDNA-BIBLIOTHEK	51
4.2.2	KLONIERUNG DES BAITTS	54
4.2.3	VORVERSUCHE MIT DEN BAITTS	56
4.2.4	YEAST-TWO-HYBRID-SCREEN	56
4.3	PR65.....	58
4.3.1	KLONIERUNG VON PR65	58
4.3.2	INTERAKTIONSSSTUDIEN IN HEFE	60

4.3.3	PULLDOWN-ASSAYS	62
4.4	PLAA	63
4.4.1	KLONIERUNG VON PLAA.....	64
4.4.2	INTERAKTIONSSUDIEN IN HEFE	65
4.4.3	PULLDOWN-ASSAYS	66
4.4.4	ERSTE UNTERSUCHUNGEN ZUR <i>IN VITRO</i> PHOSPHOLIPASE-AKTIVITÄT	69
4.5	ERK2.....	70
4.5.1	KLONIERUNG VON ERK2.....	71
4.5.2	INTERAKTIONSSUDIEN IN HEFE	71
4.5.3	PULLDOWN-ASSAYS	73
4.5.4	CO-IMMUNOPRÄZIPITATIONEN	76
4.5.4.1	BAT.....	76
4.5.4.2	Chondrozyten	77
4.5.5	CGKII-ERK2 INTERAKTION – <i>IN VIVO</i> UNTERSUCHUNG.....	78
4.6	INTERAKTIONSSUDIEN AN DEN PROTEINEN BCL-3 UND CYLD.....	81
4.6.1	KLONIERUNG DER ENTSPRECHENDEN BAITS UND PREYS	82
4.6.2	WACHSTUM AUF SELEKTIONSMEDIUM UND A-GALAKTOSIDASEAKTIVITÄT	82
4.6.3	B-GALAKTOSIDASEAKTIVITÄT IM ONPG-ASSAY.....	83
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>85</u>
5.1	BEKANNTE SUBSTRATE DER CGMP-ABHÄNGIGEN PROTEINKINASEN.....	85
5.1.1	CGKI	85
5.1.2	CGKII	86
5.2	NO-CGMP-SIGNALING IN BRAUNEM FETT (BAT).....	86
5.3	CGKII UND PR65	88
5.4	CGKII UND PLAA	89
5.5	CGKII UND ERK2	91
5.6	NO-CGMP-SIGNALING IN CHONDROZYTEN / CGKII UND ERK2	95
5.7	BCL-3 UND CYLD.....	96
5.8	AUSBLICK.....	97
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>98</u>
7	<u>ANHANG</u>	<u>100</u>
7.1	ÜBERSICHT DER VERWENDETEN PRIMER.....	100
7.2	ÜBERSICHT DER WICHTIGSTEN, VERWENDETEN PLASMIDE.....	102
7.3	ÜBERSICHT DER VERWENDETEN ORIGINALKONSTRUKTE.....	104
7.4	ANTIKÖRPER	105
7.4.1	PRIMÄRE ANTIKÖRPER	105
7.4.2	SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER.....	105
8	<u>LEBENS LAUF UND PUBLIKATION.....</u>	<u>106</u>
9	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>107</u>

Abkürzungsverzeichnis

ad	bis zum genannten Volumen auffüllen
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-Triphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BAT	braune Fettzellen
BCIP	8-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat
BES	<i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
BBS	Bes Buffered Saline, Transfektions-Puffer
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
cDNA	copy DNA (einzelnsträngige DNA)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynucleotid-Triphosphat Mix
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ES	embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol p.A.
FBS	fötales Rinderserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
HA	Hämagglutinin
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution, physiologischer Salzpuffer
HCN3	Hyperpolarisations-aktivierter zyklonukleotid-gesteuerter Kationenkanal Typ 3
HEK293T	human embryonic kidney, immortalisierte humane Zelllinie
kB	Kilo-Basen
kD	Kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
ko	knockout
LacZ	Gen der β-Galaktosidase
LB	Luria-Bertani Medium
LEU2	β-Isopropylmalat-Dehydrogenase (Protein d. Leucin-Biosynthese)
LV-CMV	lentiviraler Vektor mit CMV-Promotor

MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCS	multiple cloning site
MeOH	Methanol p.A.
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NBT	Nitrotetrazolium Blau
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline, physiologischer Salzpuffer
pCPT	8-(4-Chlorophenylthio)-guanosin-3',5'-cyclomonophosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SS-DNA	Einzelstrang-DNA (hochmolekular aus Testis)
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris Buffered Saline, Salzpuffer
TE	Tris-EDTA Puffer
Tris	Tris-(hydroxyethyl)aminomethan
Tris HCl	Tris-(hydroxyethyl)aminomethan-Hydrochlorid
TRP1	Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (Protein d. Tryptophan-Biosynthese)
UV	Ultraviolett
VASP	Vasodilator-A-kinase stimuliertes Phosphoprotein
well	Loch; 24-well-Platte = Platte mit 24 Löchern
wt	Wildtyp
X-α-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-α-D-galaktopyranosid
X-β-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galaktopyranosid

1 Einleitung

1.1 Die NO-cGMP-Signalkaskade

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine wichtige Rolle als Botenstoff in vielen physiologischen Prozessen wie der Muskelrelaxation¹, dem Immunsystem^{2,3} und ist das Initiator-molekül der NO-cGMP-Kaskade.

Die gefäßrelaxierende Wirkung von NO/cGMP wurde in den frühen 80er Jahren durch Furchgott⁴ und Ignarro⁵ entdeckt. Die Bedeutung dieser Pionierarbeiten wurde durch die Vergabe des Medizin-Nobelpreises 1998 an Furchgott, Ignarro und Murad gewürdigt⁶. Murad, einer der Preisträger, war es auch, dem erstmals die Isolation einer löslichen Guanylatcyclase (sGC), dem Zielprotein von NO, gelang^{7,8}.

Die lange Zeit für unmöglich gehaltene Funktion eines Radikals als intrazellulärer Botenstoff ist auf die ungewöhnlich hohe Halbwertszeit des Moleküls zurückzuführen⁹. Diese erlaubt es NO, wenn man von einer punktförmigen Dissoziationsquelle ausgeht, eine Diffusionsstrecke von ca. 200 µm intrazellulär zurückzulegen.

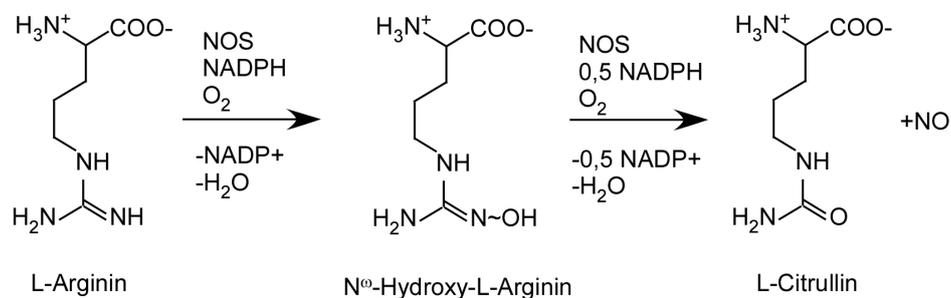


Abbildung 1: NO-Synthese.

Nach oxidativer Abspaltung von NO aus der terminalen Guanidingruppe des L-Arginins¹⁰, durch eine von NO-Synthase katalysierte Reaktion, diffundiert das ungeladene, gasförmige Radikal in die Zelle. Dort erfolgt die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) und die Synthese von cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP)¹¹. Neben der sGC kann auch die partikuläre Guanylatcyclase cGMP nach Aktivierung durch die natriuretischen Peptide (ANP = atrial natriuretic peptide, BNP = brain natriuretic peptide und CNP = C-type natriuretic peptide) bereitstellen¹².

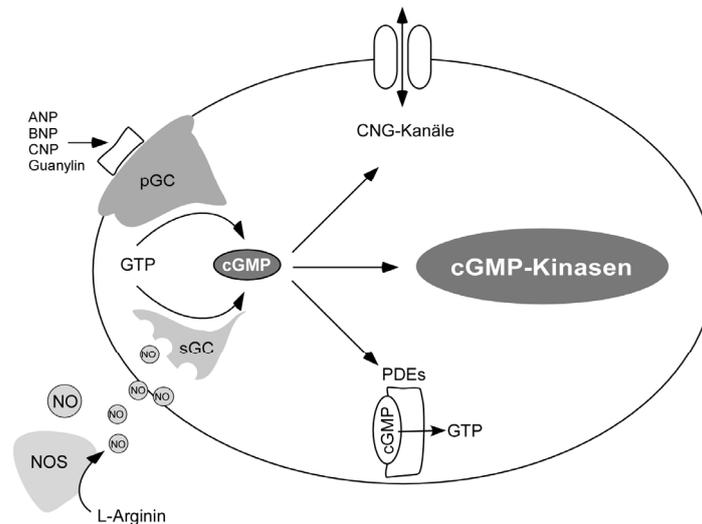


Abbildung 2: Schematische Darstellung des NO-cGMP-Signalweges (nach Feil *et. al*¹³).

Der sekundäre Botenstoff (*second messenger*) cGMP reguliert die Funktion von drei Haupteffektorproteinfamilien: den von zyklischen Nucleotiden gesteuerten Ionenkanälen („Cyclic nucleotide gated channels“: CNG-Kanäle)¹⁴, den Phosphodiesterasen¹⁵ (PDEs) und den cGMP-abhängigen Proteinkinasen¹⁶ (cGMP-Kinasen). Dabei hängt der zur Verfügung stehende cGMP-Spiegel von der Aktivität der Guanylatzyklasen (s.o.) und der Hydrolysetätigkeit der Phosphodiesterasen ab¹⁷. Bisher sind elf verschiedene Phosphodiesterase-Familien charakterisiert, die durch alternatives Spleißen über 50 verschiedene Isoformen umfassen. Alle besitzen C-terminal eine hochkonservierte, katalytische Domäne.

PDE-Familie	Typ	Gene
PDE 1	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängig	1A, 1B, 1C
PDE 2	cGMP-stimuliert	2A
PDE 3	cGMP-inhibiert	3A, 3B
PDE 4	cAMP-spezifisch	4A, 4B, 4C, 4D
PDE 5	cGMP-spezifisch	5A
PDE 6	Photorezeptor	6A, 6B, 6C
PDE 7	cAMP-spezifisch	7A, 7B
PDE 8	cAMP-spezifisch	8A, 8B
PDE 9	cGMP-spezifisch	9A
PDE 10	cAMP/cGMP-abhängig	10A
PDE 11	cAMP/cGMP-abhängig	11A

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Phosphodiesterase-Familien¹⁸.

Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihres Vorkommens, ihrer Regulation und ihrer Substrat- und Inhibitorspezifität¹⁹. Die unterschiedliche Spezifität ermöglicht die Einteilung in drei Klassen: die cGMP-abhängigen, die cAMP- und cGMP-abhängigen sowie die nur cAMP-abhängigen Phosphodiesterasen. In braunem Fett wird die cAMP- und cGMP-abhängige PDE3B exprimiert²⁰.

Die CNG-Kanäle sind nichtselektive Ionenkanäle, die durch cGMP und auch cAMP aktiviert werden. CNG-Kanäle sind in sensorischen Systemen wie den Photorezeptoren der Retina^{21,22} und olfaktorischen Neuronen des Riechepithels^{23,24} exprimiert. Eine Übersicht darüber und weitere CNG-Kanäle-exprimierende Gewebe findet sich bei Kaupp & Seifert²⁵ (2002).

Die Eigenschaften und Funktionen der cGMP-Kinasen sollen im Folgenden detaillierter erläutert werden.

1.2 Die Struktur und Funktion der cGMP-abhängigen Kinasen

Kuo und Greengard beschrieben 1970 als erste die cGMP-abhängigen Kinase oder cGK²⁶. Dieses cytosolische, zuerst nur in Invertebraten identifizierte Enzym konnte 1972 von Hofmann und Sold aus Rattenhirn isoliert und charakterisiert werden²⁷. De Jonge gelang 1981 die Isolation einer cGMP-Kinase, die aber membranständig und im Epithel exprimiert war. Man unterscheidet seither zwei cGMP-Kinasen: cGMP-Kinase I (cGKI) und cGMP-Kinase II (cGKII)²⁸.

Die Klonierung von cGKI und cGKII zeigte, dass zwei Isoformen der cGKI (α und β) existieren, die durch alternatives Spleißen eines Exons zustande kommen²⁹. Im Gegensatz dazu gibt es von der cGKII nur eine Form³⁰.

Die cGMP-Kinasen gehören zur Familie der Serin- und Threoninkinasen und bilden Homodimere, deren Untereinheiten 76 kD (cGKI) und 86 kD (cGKII) groß sind.

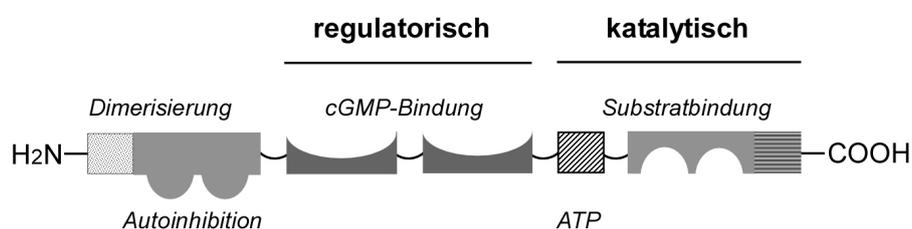


Abbildung 3: Strukturschema der cGMP-Kinasen (mod. nach Pfeifer *et al.*¹⁶).

Die Struktur der cGMP-abhängigen Kinasen I und II lässt sich in N-Terminus, regulatorische und katalytische Domäne einteilen. Der N-Terminus ist für die Dimerisierung und Autoinhibition zuständig. Die regulatorische Domäne bewirkt durch cGMP-Bindung die Aktivierung der Kinasen, die katalytische Domäne ist für Substratbindung und Katalyse verantwortlich.

Die Dimerisierung erfolgt über N-terminale, hydrophobe Leucin-/Isoleucincipper³¹, die aus 5 bis 6 Heptad-Sequenzen bestehen. Die Dimerisierung ist jedoch keine Voraussetzung für die katalytische Funktionalität der Kinasen¹⁶. Durch die Bindung zweier cGMP-Moleküle in der regulatorischen Domäne wird eine Konformationsänderung und die katalytische Aktivität induziert^{32,33}.

Bis dahin ist die Substratbindungsstelle durch Anlagerung einer N-terminalen Pseudosubstratsequenz blockiert (=Autoinhibition)³⁴ (Abbildung 4). Darüberhinaus erleichtert diese Konformationsänderung die Autophosphorylierung in der Nähe der Pseudosubstratsequenz. Die Bindungsaffinität für cGMP-Moleküle wird wiederum durch die Autophosphorylierung reguliert und verstärkt³⁵. Erst eine autophosphorylierte, durch cGMP-aktivierte Kinase überträgt die γ -Phosphatgruppe des ebenfalls gebundenen ATP auf ihr Substrat.

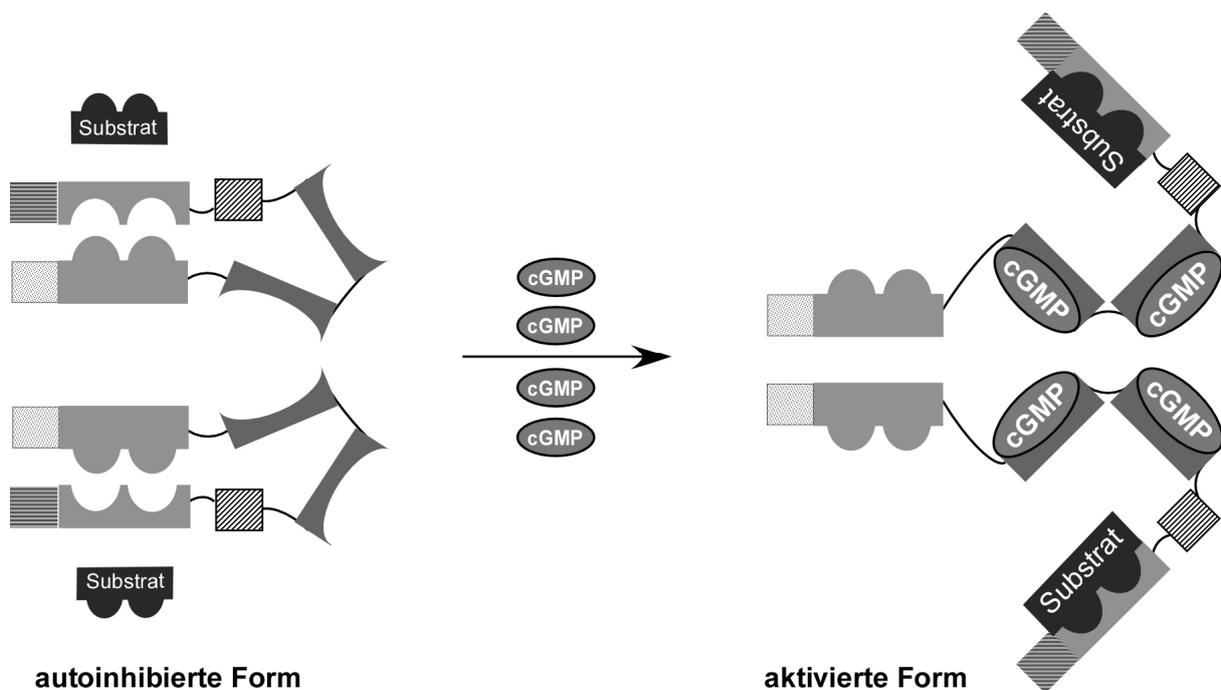


Abbildung 4: Strukturschema der Autoinhibition und Aktivierung der cGMP-Kinasen (mod. nach Pfeifer *et al.*¹⁶).

Die inaktive Form der cGMP-Kinasen wird durch die Bindung von zwei cGMP-Molekülen aufgehoben und die katalytische Domäne für die Bindung und Phosphorylierung des Substrates geöffnet.

Die meisten Substrate der cGMP-Kinasen enthalten ein für die cAMP-Kinase (cAK) typisches RRXS/TX- bzw. RKXS/TX-Motiv^{36,37} und dennoch unterscheiden sich die Kinasen in ihrer Selektivität: Substrate, wie z.B. IRAG werden nicht gleichermaßen von cGKI α und cGKI β ³⁸, der CFTR-Kanal wiederum nur von der cGKII phosphoryliert³⁹.

Die cAMP-Kinase (cAK oder PKA) ist das am besten charakterisierte Mitglied der Serin-/Threonin-Kinase-Familie. Im inaktiven Zustand liegt sie als Tetramer aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten vor. Die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten führt zur Dissoziation und Aktivierung der katalytischen Untereinheiten. Sie diffundieren in den Zellkern und aktivieren dort u.a. den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP-responsive element binding protein)⁴⁰.

Die cGMP-Kinase I

Die cGMP-Kinase I existiert aufgrund alternativen Spleißens in zwei Varianten α und β , die sich nur in ihren N-Termini unterscheiden³⁰. Die resultierenden Monomere haben eine Größe von 76 kDa. Aus positiver Kooperativität mit diesem alternativen N-Terminus erwächst bei der cGKI α eine erhöhte cGMP-Affinität einer der beiden Bindungstaschen. Bei der cGKI β , wie auch bei der cGKII, besitzen beide cGMP-Bindungsstellen dieselbe Affinität⁴¹.

Die cGKI wird in erster Linie in der glatten Muskulatur, den Thrombozyten, Teilen des Hirns und der Niere exprimiert. Die cGKI α findet sich vor allem in Herz, Lunge und neuronalen Geweben, während die cGKI β vermehrt in Aorta, Uterus und Trachea auftritt (s. Tabelle 2).

Gewebe	Isoform	Referenz
Herz, Lunge	cGKI α >> cGKI β	Hofmann <i>et al.</i> ⁴²
Cerebellum	cGKI α > cGKI β	Lohmann <i>et al.</i> ⁴³
Aorta, Trachea, Uterus	cGKI α << cGKI β	Keilbach <i>et al.</i> ⁴⁶ , Geiselhöringer <i>et al.</i> ⁴⁴
Thrombozyten	cGKI α << cGKI β	Waldmann <i>et al.</i> ⁴⁵
glatte Muskulatur	cGKI α = cGKI β	Keilbach <i>et al.</i> ⁴⁶
neuronaies Gewebe	cGKI α = cGKI β	Quian <i>et al.</i> ⁴⁷ , Chao <i>et al.</i> ⁴⁸ , Feil <i>et al.</i> ⁴⁹
Hippocampus	cGKI α = cGKI β	Kleppisch <i>et al.</i> ⁵⁰
Niere	cGKI α = cGKI β	Joyce <i>et al.</i> ⁵¹

Tabelle 2: Übersicht über die Expression der cGKI und ihrer Isoformen in Geweben.

Die Bedeutung der cGKI bei der Relaxation glatter Muskelzellen zeigte sich deutlich im Knockout-Mausmodell, das 1998 von Pfeifer *et al.*⁵² veröffentlicht wurde: Mäuse dieses Genotyps besitzen eine nur unzureichend funktionierende glatte Muskulatur. Die Folge sind schwerwiegende intestinale und kardiovaskuläre Defekte, auf welche die hohe Lethalitätsrate von 50% zurückzuführen ist. Die Untersuchung der cGKI-ko-Mäuse ergab, dass infolge der gestörten Muskelrelaxation die aufgenommene Nahrung durch die Darmperistaltik nur langsam transportiert

werden kann⁵². An präparierten Muskelstreifen des Magen und Pylorus konnte eine verminderte Relaxationsfähigkeit nachgewiesen werden. Die Folgen, die zur hohen Lethalitätsrate führen, sind intestinale Probleme und entzündliche Peritonitis¹⁶. Die Auswirkung des cGKI-Knockouts in glatten Muskelzellen äußert sich in Hypertonie infolge der ausbleibenden NO/cGMP-vermittelten Muskelrelaxation (s. unten)⁵². Der Blutdruck und der Tonus der glatten Muskulatur werden durch $[Ca^{2+}]_i$ reguliert. Dabei gibt es bisher drei Wege, auf denen die cGKI durch Phosphorylierung von Substraten den Ca^{2+} -Gehalt senken kann: 1. Durch Phosphorylierung des IP3-Rezeptors^{53,54} und von IRAG^{38,55}, einem mit dem IP3-Rezeptor assoziierten Protein, hemmt die cGKI die IP3-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarcoplasmatischen Retikulum, 2. Die cGKI aktiviert die Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle^{56,57} und sorgt für Hyperpolarisation an der Zellmembran. Infolgedessen sinkt die Öffnungswahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Calciumkanäle und damit der Ca^{2+} -Einstrom⁵⁶, 3. Die cGKI phosphoryliert die Myosin-Phosphatase und inaktiviert damit indirekt das Myosin-Leichte-Kette-Protein⁵⁸. Das wiederum hat eine Ca^{2+} -Desensitivierung zu Folge⁵⁹. Der cGKI kommt mit der Hemmung der Thrombozytenaggregation neben der muskelrelaxierenden Wirkung eine weitere wichtige, physiologische Funktion zu⁶⁰. Die Kollagen-induzierte Aggregation ist in Wildtyp- und cGKI-knockout Thrombozyten gleichermaßen zu beobachten. Auf eine Preinkubation mit dem cGMP-Kinase-Aktivator 8-Br-pCPT-cGMP reagieren aber nur die Wildtyp-Thrombozyten: In ihnen sind Formänderung (93%), Aggregation (68%) und Serotoninausstoß (85%) im Vergleich zu nicht-behandelten Thrombozyten gehemmt. Hinzu kommt, dass in cGKI-knockout-Thrombozyten auch keine Phosphorylierung von VASP⁶¹ (s. unten), einem wichtigen Substrat der cGMP-Kinase, nachzuweisen ist⁶². Das Protein VASP (Vasodilator-Stimuliertes Phospho-Protein) ist mit dem Cytoskelett von Thrombozyten assoziiert und wird dort im Bereich fokaler Kontakte gefunden⁶³.

Die cGMP-Kinase II

Die cGKII, ein Protein deren Monomer 86 kD groß ist, ist im Gehirn⁶⁴, der intestinalen Mucosa⁶⁵, der Lunge und der Niere^{66,67} sowie in Chondrozyten⁶⁸ exprimiert.

Die cGKII ist aufgrund ihres myristoylierten N-Terminus membranassoziiert^{69,39} und z.B. in der apikalen Membran von Enterozyten im Dünndarm exprimiert. Es gab bereits Hinweise, dass die cGKII in Interaktion mit dem CFTR-Kanal an der Sekretion von Chloridionen und Wasser in den Darm beteiligt ist⁷⁰ und möglicherweise die Effekte des Diarrhoe-induzierenden *E.coli* Enterotoxins STa⁷¹ vermittelt.

Durch das cGKII-knockout-Mausmodell, das 1996 von Pfeifer *et al.* in Science veröffentlicht wurde, wurde die Funktion dieser Kinase *in vivo* aufgeklärt⁶⁸. In den cGKII-Knockout-Tieren ist die STa-induzierte Sekretion von Chloridionen und Wasser fast vollständig gehemmt. Auch die 8-Br-cGMP-stimulierte Chlorid-Sekretion ist im Knockout gehemmt. Beide Genotypen reagieren jedoch gleich auf die Stimulation mit cAMP oder dem Diarrhoe-induzierendem Cholera-toxin, so dass eine Beeinträchtigung des cAMP-Signalwegs durch den Knockout ausgeschlossen werden kann.

Anhand des Knockout-Modells konnte die von He *et al.*⁷² gemachte Beobachtung, dass die Expression von Renin durch endotheliales NO inhibiert wird, bestätigt werden. Die Expression und Sekretion des renalen Proteins Renin ist im cGKII-Knockout im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht⁷³. Dieser Effekt konnte in den cGKI-Knockouts nicht beobachtet werden. Die cGMP-Kinase II ist also ein direkter, negativer Regulator der Renin-Synthese und -Sekretion.

Darüber hinaus entwickelte die cGKII-knockout-Maus noch einen anderen, überraschenden Phänotyp: Die cGKII^{-/-}-Mäuse besitzen eine ausgeprägte Störung im Längenwachstum der Röhrenknochen⁶⁸. Ihre Gesamtkörperlänge und ihr Gesamtkörpergewicht sind um 16% bzw. 14% geringer als bei den Wildtypen. In Bezug auf die Länge der Röhrenknochen ist der Knockout um 23-30% reduziert. Immunhistochemische Untersuchungen der Wachstumsfuge zeigten die Lokalisation der cGKII an der Grenze zwischen den proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten. In den cGKII-Knockouts war eine klare räumliche Trennung von proliferierenden und hypertrophen Zellen nicht zu sehen.

Da auch die cGKI-Expression durch den Knockout unbeeinflusst blieb, ließen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die cGKII eine entscheidende Rolle im Reifungsprozess der Röhrenknochen, der endochondralen Ossifikation spielt⁶⁸. Chikuda *et al.*⁷⁴ gelang es später, Sox9, einen Inhibitor der hypertrophen Differenzierung, als Substrat der cGKII zu identifizieren und der cGKII die Rolle eines Umschalters („switch“) zwischen Proliferation und Hypertrophie zuzuweisen.

1.3 BAT – Braunes Fettgewebe

In Säugetieren werden zwei Arten von Fettgewebe unterschieden: weißes (WAT = white adipose tissue) und braunes (BAT = brown adipose tissue) Fettgewebe.

Weißes Fettgewebe fungiert als Energiespeicher des Organismus, während braunes Fettgewebe Energie in der zitterfreien Thermogenese (NST = non shivering thermogenesis) verbraucht^{75,76}.

Die beiden Gewebe unterscheiden sich auch morphologisch. WAT speichert die Lipide in Form eines großen, zellausfüllenden Lipidvesikels (unilokular), das braune Fett hingegen verfügt über

viele kleinere Lipidvesikel (multilokular)⁷⁷. Darüberhinaus besitzt braunes Fett eine hohe Anzahl an Mitochondrien (Cristastruktur) und ist stärker innerviert und vaskularisiert als weißes Fett. Die starke Durchblutung und der hohe Mitochondriengehalt verleihen dem braunen Fett seine charakteristische Färbung.

Die zitterfreie Thermogenese ist ein auf BAT beschränktes Phänomen, das auf die Expression von UCP1 (UCP1 = uncoupling protein 1) zurückzuführen ist. UCP1 ist ein Protein der inneren Mitochondrienmembran und in der Lage, den Protonengradienten der Atmungskette für die Synthese von Wärme zu nutzen. Dabei „entkoppelt“ UCP1 die eigentlich am Gradienten stattfindende ATP-Synthese, indem der Protonenfluss nun durch UCP1 gelenkt wird und nicht länger über die ATP-Synthase geht⁷⁸.

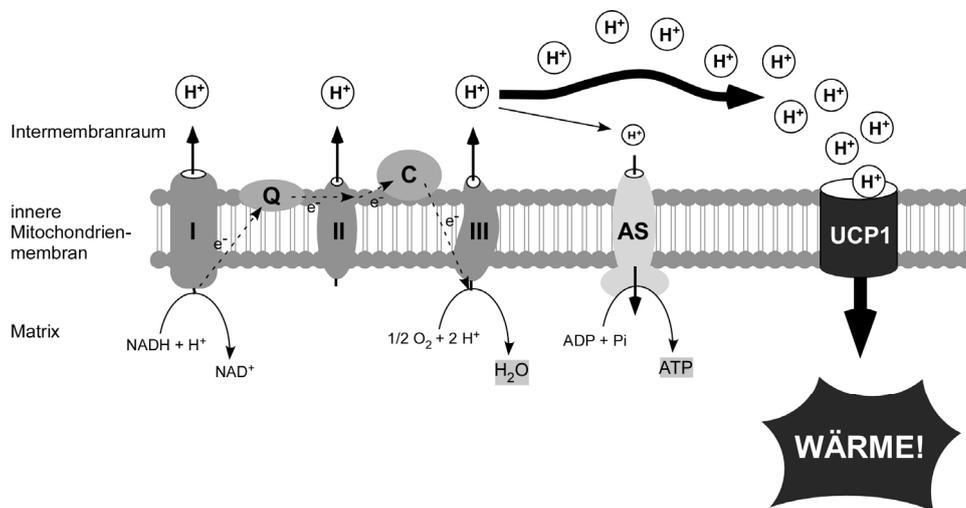


Abbildung 5: Entkopplung der ATP-Synthese der mitochondrialen Atmungskette durch UCP1 (modifiziert nach Palou *et al.*⁷⁹).

I: NADH-Dehydrogenase-Komplex, II: b/c1-Komplex, III: Cytochrom-Oxidase-Komplex, Q: Ubichinon, C: Cytochrom C, AS: ATP-Synthase-Komplex.

NO beeinflusst die Atmungskette z.B. durch Inhibition der Cytochrom C Oxidase⁸⁰. Dabei können die Auswirkungen auf die Zelle sowohl pro- als auch antiapoptotisch sein⁸¹. Für kultivierte braune Fettzellen (Prädipozyten) wurde gezeigt, dass NO ihre Differenzierung zu reifen Fettzellen stimuliert⁸² und darüberhinaus die Biogenese der Mitochondrien induziert⁸³.

Das braune Fett entstammt wie Knorpel dem Mesenchym. Aus determinierten, tripotenten Vorläuferzellen entwickeln sich abhängig von Transkriptionsfaktoren *in vivo* bzw. Kultivierungsbedingungen *in vitro* Adipozyten^{84,85}, Chondrozyten⁸⁶ und Osteoblasten⁸⁷.

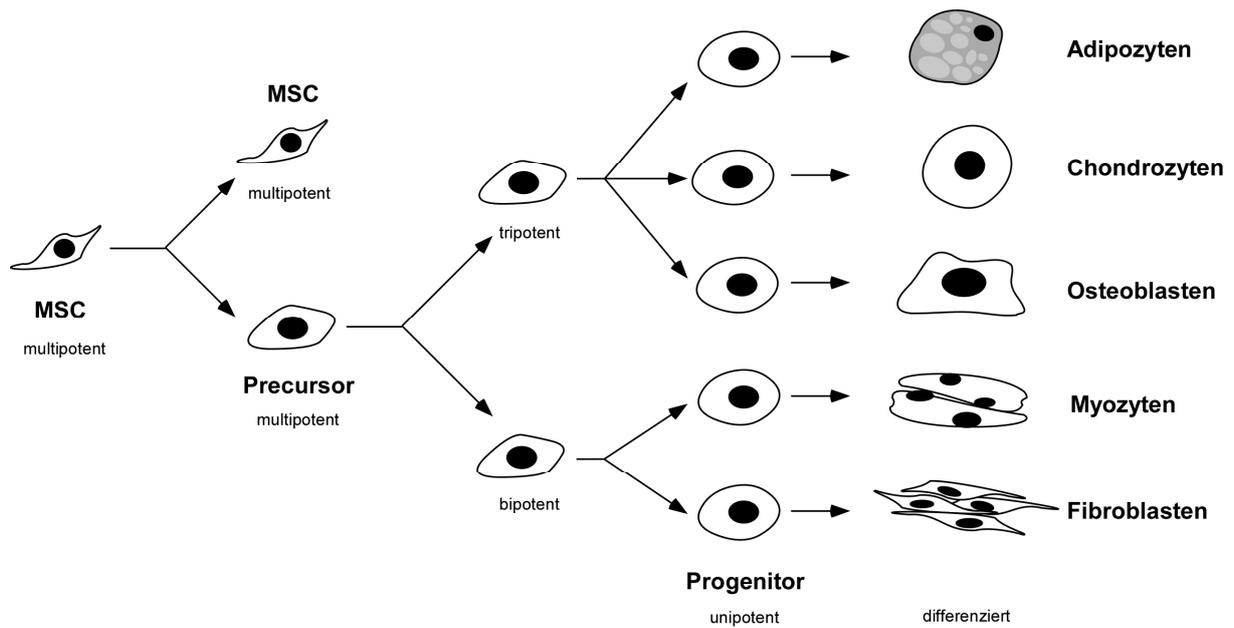


Abbildung 6: Differenzierungsschema des Mesenchyms nach Baksh *et al.*⁸⁸.

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) besitzen Selbsterneuerungspotential („self-renewal“ potential). Es sei denn, dass transkriptionelle Änderungen eine Differenzierung zu Precursor-Zellen bewirken, die sich dann nur noch in bi- bzw. tripotenten Zellen entwickeln können.

Anders als Chondrozyten und Osteoblasten ist das braune Fett leicht zugänglich. Bei neugeborenen Mäusen finden sich zwei große Gewebelappen BAT oberhalb der Schulterblätter. Aus diesen lassen sich leicht Zellen der verschiedenen Differenzierungsstufen gewinnen: mesenchymale Stammzellen (MSCs)⁸⁸, Präadipozyten und differenzierende Adipozyten⁸².

2 Fragestellung und Zielsetzung

Um herauszufinden, ob die cGKII an der terminalen Differenzierung der BAT beteiligt ist, sollten die Interaktionen mit anderen Proteinen untersucht werden. Es sollten die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Werden die cGKs im braunen Fettgewebe exprimiert?
2. Mit welchen Partnern interagiert die cGKII?
3. Welcher Art sind die Interaktionen, welche Relevanz könnten sie für die Differenzierung des braunen Fettgewebes haben?

Neue, potentielle Interaktionspartner der cGKII in BAT sollten in einem Yeast-Two-Hybrid-Assay identifiziert werden. Um Interaktionspartner speziell in BAT zu finden, sollte eigens dafür eine cDNA-Bibliothek aus braunem Fettgewebe erstellt und im Hefe-Assay gemustert werden.

Die Analyse neuer Interaktionen und die Bewertung ihrer Relevanz für die Differenzierung von BAT sollte abschließend mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden und biochemischen Assays *in vitro* und *in vivo* erfolgen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Die verwendeten Chemikalien waren, wenn nicht anders angegeben, von *p.A.* Qualität bzw. als „für molekularbiologische Zwecke“ geeignet gekennzeichnet.

Alle Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und die Aufbewahrung erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur. Nährmedien, sowie Lösungen für sensible Anwendungen, wurden autoklaviert oder steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Die Zusammensetzungen der Lösungen, Puffer und Nährmedien finden sich bei den jeweiligen Methoden.

3.1.1 Chemikalien

Agarose, Peqlab, Erlangen.

Ammoniumperoxodisulfat, Roth, Karlsruhe.

Ammoniumsulfat, Prolabo VWR, Darmstadt.

Ampicillin, Roth, Karlsruhe.

β-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, Seelze.

Bacto Trypton, Prolabo VWR, Darmstadt.

Bacto Hefeextrakt, Prolabo VWR, Darmstadt.

8-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat (BCIP), Sigma-Aldrich, Seelze.

Borsäure, Prolabo VWR, Darmstadt.

Bromphenolblau, Roth, Karlsruhe.

Calciumchlorid*2 H₂O, Prolabo VWR, Darmstadt.

Coomassie Brilliant Blau R250, Merck, Darmstadt.

2'-Desoxy-Cytosin-5'-α-[³²P]-Triphosphat (³²P-dCTP), GE Healthcare, England.

Dexamethason, Sigma-Aldrich, Seelze.

Diethylpyrocarbonat (DEPC), Roth, Karlsruhe.

Dimethylformamid (DMF), Roth, Karlsruhe.

Dimethylsulfoxid (DMSO), Roth, Karlsruhe.

Dinatriumhydrogenphosphat, Prolabo VWR, Darmstadt.

Dithiothreitol (DTT), Roth, Karlsruhe.

Desoxycholat (DOC), Roth, Karlsruhe.

Essigsäure, Roth, Karlsruhe.

Ethidiumbromid, Roth, Karlsruhe.

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Roth, Karlsruhe.

Ficoll 400, Roth, Karlsruhe.

Glukose, Prolabo VWR, Darmstadt.

Glycerol, Roth, Karlsruhe.

Glycin, Roth, Karlsruhe.

Glyoxal, Roth, Karlsruhe.

Guanidiniumthiocyanat, Roth, Karlsruhe.

Harnstoff, Roth, Karlsruhe.

HEPES, Prolabo VWR, Darmstadt.

3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), Sigma-Aldrich, Seelze.

Igepal CA-630, Sigma-Aldrich, Seelze.

Insulin, Sigma-Aldrich, Seelze.

Kaliumacetat, Roth, Karlsruhe.

Kaliumchlorid, Prolabo VWR, Darmstadt.

Kaliumdihydrogenphosphat, Prolabo VWR, Darmstadt.

Kanamycin, Roth, Karlsruhe.

Lauroylsarcosinat, Sigma-Aldrich, Seelze.

Lithiumacetat, Roth, Karlsruhe.

Magnesiumchlorid, Prolabo VWR, Darmstadt.

Magnesiumsulfat, Prolabo VWR, Darmstadt.

Mangandichlorid*4 H₂O, Roth, Karlsruhe.

3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS), Roth, Karlsruhe.

N,N,N',N'-Tetramethylethylenethyamin (Temed), Roth, Karlsruhe.

Natriumacetat, Prolabo VWR, Darmstadt.

Natriumcarbonat, Roth, Karlsruhe.

Natriumchlorid, Prolabo VWR, Darmstadt.

Natriumcitrat, Roth, Karlsruhe.

Natriumfluorid, Roth, Karlsruhe.

Natriumorthovanadat, Roth, Karlsruhe.

Natriumlaurylsulfat (SDS), Roth, Karlsruhe.

Nitroblau-Tetrazolsalz (NBT), Sigma-Aldrich, Seelze.

NP40, Roth Karlsruhe.

Penicillin/Streptomycin (PenStrep), Biochrom AG, Berlin.

Polyethylenglycol 600 (PEG600), Roth, Karlsruhe.

Poly-L-Lysin, Sigma-Aldrich, Seelze.

Polyoxyethylen-sorbitan-monolaureat (Tween20), Roth, Karlsruhe.

Trichloressigsäure (TCA), Roth, Karlsruhe.

Triiodothyronin-Na, Sigma-Aldrich, Seelze.

Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris HCl), Roth, Karlsruhe.

TRIS-Base, Roth, Karlsruhe.

Triton-X 100, Roth, Karlsruhe.

Xylencyanol, Roth, Karlsruhe.

3.2 Biologisches Material

3.2.1 *Escherichia coli* Stämme

Als Rezipienten für rekombinante DNA und zur Vermehrung und Isolierung von Plasmiden wurde der *E.coli*-Stamm *Escherichia coli* XL-1 Blue MRF (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

3.2.2 Hefestämme

Im Rahmen des Yeast-Two-Hybrid-Systems wurden folgende Hefestämme verwendet:

S. cerevisiae AH109 (BD Biosciences, Heidelberg)

S. cerevisiae Y187 (BD Biosciences, Heidelberg).

3.2.3 HEK293-Zellen

Zur Expression verschiedener Fusionsproteine wurde die Zelllinie HEK293 (human embryonic kidney cells, ATCC® Nr.CRL 1573) verwendet. Diese humane Nierenzelllinie wurde initial durch stabile Transfektion mit dem humanen Adenovirus Typ 5 immortalisiert.

3.2.4 Plasmide und Oligonukleotide

Die verwendeten Plasmide sind im Folgenden aufgeführt. Lediglich die Kontrollplasmide des Yeast-Two-Hybrid-Systems, die ausschließlich auch dort verwendet wurden, finden sich bei den entsprechenden Methoden (s. 3.6.3).

Plasmid	Selektionsmarker	Verwendung	Referenz
pBluescript II KS+	Amp ^R	Klonierungsvektor	Invitrogen
pcDNA3.1MycHis	Amp ^R , Neo ^R	Expressionsvektor	Invitrogen
pFLAGCMV2	Amp ^R	Expressionsvektor	Sigma
pGADT7	Amp ^R	Expressionsvektor	BD Biosciences
pGBKT7	Kan ^R	Expressionsvektor	BD Biosciences
pUC18	Amp ^R	Klonierungsvektor	Pharmacia
p156rrlsinPPTCMVPRE	Amp ^R	Expressionsvektor	Inder Verma

Tabelle 3: Verwendete Plasmide.

Im Anhang finden sich die entsprechenden Plasmidschemata, Amp: Ampicillin, Kan: Kanamycin, Neo: Neomycin.

Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von der Fa. MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert, HPSF (high purified saltfree) gereinigt und in lyophilisierter Form geliefert. Primer, die für Klonierungen verwendet wurden, finden sich samt Erläuterungen bei den entsprechenden Klonierungsstrategien, eine Gesamtübersicht findet sich im Anhang.

3.2.5 Enzyme

Alle Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, nach der Empfehlung des Herstellers verwendet und gelagert.

Alkalische Phosphatase (CIP), New England Biolabs, Frankfurt.

DNase I, Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

Gelase, Epicentre, Hess. Oldendorf.

Kollagenase Typ II, Worthington, Cellsystems, St. Katharinen.

Lysozym, Sigma-Aldrich, Seelze.

Pfu-Polymerase, Metabion, Martinsried.

Polynukleotidkinase (PNK), New England Biolabs, Frankfurt.

Restriktionsendonukleasen, New England Biolabs, Frankfurt.

RNAse A, Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

RNAse H, Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

RNeasy Mini Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe.
Superscript II RT, Invitrogen GmbH, Karlsruhe.
T4-DNA-Ligase, New England Biolabs, Frankfurt.
T4-DNA-Polymerase, New England Biolabs, Frankfurt.
Taq-Polymerase, Q-Biogene, Heidelberg.

3.2.6 Standards und Kits

Alle Standards und Kits wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Empfehlung des Herstellers verwendet und gelagert.

ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, USA.
Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit, GE Healthcare, England.
DNA-Molekulargewichtsmarker (1 kB ladder), Invitrogen GmbH, Karlsruhe.
Free Glycerol Reagent (FGR) Kit, Sigma-Aldrich, Seelze.
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, England.
MATCHMAKER 3 GAL4 Two Hybrid System, BD Biosciences, Heidelberg.
Protein-Molekulargewichtsmarker Precision Plus Protein All Blue, Biorad, München.
Protein-Molekulargewichtsmarker Precision Plus Protein Kaleidoscope, Biorad, München.
Plasmid Purification Kit Nucleobond PC500, Macherey-Nagel, Düren.
Poly(A) Quik® mRNA Isolation Kit, Stratagene, Heidelberg.
RNA-Isolation Kit, Qiagen, Hilden.
RNA-Molekulargewichtsmarker, Invitrogen GmbH, Karlsruhe.
Superscript Choice System for cDNA Synthesis, Invitrogen GmbH, Karlsruhe.
Taq Core Kit, Q-Biogene, Heidelberg.

3.2.7 Sonstiges Material

10 cm, 6- u. 24-well Plates, Sarstedt, Nümbrecht.
3xFLAG® Beads, Sigma-Aldrich, Seelze.
Autoradiographie-Filme, GE Healthcare, München.
Blottingmembran Immobilon P, Milipore, Schwalbach.
Cryoröhrchen 2 ml, Nunc, Wiesbaden.
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Gibco, Heidelberg.
Elektroporationsküvetten (0,2 cm), MolecularBioProducts, USA.

Flagpeptid, Sigma-Aldrich, Seelze.
 Faltenfilter, Schleicher und Schuell, Dassel.
 Hyperfilm ECL™, GE Healthcare, München.
 Low-melting Agarose, SeaPlaque, Biozym, Oldendorf.
 Lumasafe (Szinti), Lumac Lsc B.V., Groningen, Niederlande.
 Petrischalen, Sarstedt, Nümbrecht.
 Proteaseinhibitoren Complete™, Roche Applied Science, Heidelberg.
 Protein A Sepharose Beads, Amersham Biosciences, Freiburg.
 Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml, Brand, Wertheim.
 RNase Away, Roth, Karlsruhe.
 Rotiphorese Gel 29:1 (30%), Roth, Karlsruhe.
 Rundfilter, Schleicher und Schuell, Dassel.
 Schraubröhren 13, 15 und 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht.
 Sterilfilter, VWR, Karlsruhe.
 SuRE Cut Buffers, Roche, Heidelberg.
 TRIfast, Peqlab, Erlangen.
 Whatman Filterpapier, VWR, Karlsruhe.

3.3 Methoden zur Arbeit mit DNA

3.3.1 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden

3.3.1.1 Präparation chemisch kompetenter *E.coli*

Die Kompetenz der Bakterien beruht auf der vorübergehenden Permeabilität der Zellmembran, die durch einen CaCl₂-haltigen Resuspensionspuffer herbeigeführt wird. So können Makromoleküle wie z.B. Plasmide eingeschleust werden.

<u>Puffer A</u>		<u>Puffer B</u>	
KAc	30 mM	MOPS pH 7,0	10 mM
CaCl ₂	10 mM	CaCl ₂	75 mM
KCl	100 mM	KCl	10 mM
MnCl ₂	50 mM	Glycerol	15%
Glycerol	15%		

Von einem Verdünnungsausstrich (auf Tetracyclin-Agar 12 µg/ml) eines *E.coli* XL1 Blue Glycerolstocks wurde eine 7 ml LB-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Von dieser Kultur wurde dann 1 ml in 100 ml LB(-)-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4°C für 6 Minuten bei 5000x g abgetrennt, in 25 ml Puffer A resuspendiert und eine Stunde auf Eis gelagert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 4°C für 5 Minuten bei 5000x g und die Resuspension in 4 ml Puffer B. Die Bakteriensuspension wurde in 100 µl Aliquots in vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßen schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz wurde durch eine Testtransformation mit 1 ng pUC18 bestimmt.

3.3.1.2 Transformation von *E.coli*

Ein 100 µl Aliquot chemisch kompetenter *E.coli* wurde auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde die Bakteriensuspension für 45 Sekunden im Wasserbad auf 42°C erhitzt und wiederum auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurden die Bakterien durch Zentrifugation abgetrennt und in einem kleinem Volumen (100-150 µl) LB-Medium zum Ausplattieren resuspendiert.

3.3.1.3 Präparation elektrokompenter *E.coli*

Von einem Verdünnungsausstrich (auf Tetracyclin-Agar 12 µg/ml) eines *E.coli* XL1 Blue MRF Glycerolstocks wurde eine 7 ml LB-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Von dieser Kultur wurde dann je 1 ml in 2x 500 ml LB(-)-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5–0,7 bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde eine halbe Stunde auf Eis abgekühlt und bei 4000x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Es folgten drei Resuspensions- und Zentrifugationsschritte:

- (1) Resuspension in je 10 ml eiskaltem Wasser + 430 ml Wasser
Zentrifugation 4000x g bei 4°C für 15 Minuten
- (2) Resuspension in je 10 ml eiskaltem Wasser + 240 ml Wasser
Zentrifugation 4000x g bei 4°C für 15 Minuten
- (3) Resuspension in je 10 ml 10%igen eiskalten Glycerol
(Überführung in 13 ml Schraubröhren)
Zentrifugation 4000x g bei 4°C für 15 Minuten

Der Überstand wurde abgossen, die Zellpellets in der Restflüssigkeit resuspendiert und jeweils um das gleiche Volumen 10% Glycerol ergänzt. Die Bakteriensuspension wurde in 50 µl Aliquots in vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einer EtOH/Trockeneis-Mischung schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz wurde durch eine Test-Elektroporation mit pUC18 bestimmt (s. 3.3.1.4) und lag in der Regel bei 10⁷ Kolonien/µg pUC18.

3.3.1.4 Transformation von *E.coli* durch Elektroporation

Die Elektroporation stellt eine sehr effiziente Methode zur Transformation von *E.coli* dar und wurde sowohl bei der Erstellung der cDNA-Bibliothek (s. 3.5.3.3) als auch beim Re-Screen des Yeast-Two-Hybrid-Systems (s. 3.6.9.4) verwendet. Die kurzfristig angelegte Spannung bewirkt eine Poreninduktion und den kurzzeitigen Verlust der Semipermeabilität in deren Folge die DNA leicht in die Zelle eingeschleust werden kann. Entscheidend für den Erfolg ist die Reinheit der zu transformierenden DNA, da Salze und andere Verunreinigungen zu einem Kurzschluss führen können. Daher wurde die DNA im Vorfeld per Präzipitation gereinigt und in Wasser resuspendiert: Die DNA wurde durch Zugabe von 5 µg t-RNA als Carrier, sowie 0,5 Volumen Ammoniumacetat 7,5 M und 2,5 Volumen EtOH bei RT präzipitiert. Das Pellet wurde zweifach mit 70% EtOH gewaschen, in der Speedvac lyophilisiert und in 2 bis 5 µl Wasser gelöst.

Die DNA wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis vorgelegt und 40 µl elektrokompente *E.coli* dazu pipettiert. Nach 45 Sekunden wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm) in der Elektroporationsanlage (Gene Pulser II, Biorad) überführt und nach Auslösen des elektrischen Impulses (2,5 kV/cm Feldstärke) sofort mit 1 ml SOC+-Medium aufgefüllt. Nach einstündiger Schüttelinkubation bei 37°C und 145 rpm wurde wie gewohnt (s.3.3.1.2) ausplattiert.

SOC+-Medium

Hefeextrakt	5 g
Pepton	20 g
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	20 mM
Glucose	20 mM
H ₂ O	ad 1000 ml

Ammoniumacetat 7,5 M

(NH ₄)OAc	57,75 g
H ₂ O	ad 100 ml

Die Transformationseffizienz wurde wie schon unter 3.3.1.2 beschrieben durch eine Test-Transformation mit pUC18 bestimmt und lag in der Regel bei 10^8 Kolonien/ μg pUC18.

3.3.1.5 Kultivierung von *E.coli*

Die *E.coli*-Kultivierung erfolgte in mit Glukose angereichertem Luria-Bertani (LB) Nährmedium (LB(+)) oder auf LB(+)-Agar in Petrischalen.

<u>LB(+)-Nährmedium</u>		<u>LB(+)-Agar</u>	
Pepton	10 g	Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g	NaCl	5 g
Glukose	1 g	Glukose	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml	Agar	15 g
		H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,5		pH 7,5	

Zur Selektion plasmidtragender *E.coli* Kolonien wurden je nach Resistenzgen auf dem Plasmid das Antibiotikum Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. Kanamycin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt. Flüssig-Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und 225 rpm geschüttelt, Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Trockenschrank inkubiert und waren bei 4°C vier Wochen haltbar. Zur Langzeiterhaltung der Kulturen wurden Glycerolstocks (1:1 Gemisch mit 85% Glycerol) angelegt und bei -80°C gelagert.

3.3.1.6 Alkalische Lyse – Schnelltest (Mini-Präparation)

Zur Überprüfung der transformierten Plasmid-DNA wurde die alkalische Lyse nach dem Protokoll von Sambrook und Russell (2001) durchgeführt⁸⁹. Dieses Verfahren erlaubte eine schnelle Isolation von Plasmid-DNA und lieferte einen Reinheitsgrad, der für Restriktionsverdau und Sequenzierung ausreichend war.

3.3.1.7 Alkalische Lyse – präparativ (Maxi-Präparation)

Für die präparative Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde eine 100 ml Übernachtskultur des entsprechenden Klons abzentrifugiert und mit dem Plasmid Purification Kit von Macherey-

Nagel nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Identität des isolierten Plasmids wurde durch Restriktionsverdau überprüft und die DNA bei -20°C gelagert.

Sie eignete sich aufgrund ihres hohen Reinheitsgrades für alle Anwendungen.

3.3.2 Enzymatische Modifikationen von DNA

3.3.2.1 Restriktionsverdau durch Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in SuRE-Cut-Puffern (Roche) bei empfohlenen Temperatur- und Zeitoptima. Analytische Restriktionen wurden mit 200 bis 500 ng, präparative mit bis zu 5 μg DNA durchgeführt. Ein Restriktionsverdau mit zwei verschiedenen Enzymen wurde nur, wenn für beide Enzyme derselbe Puffer empfohlen war, simultan angesetzt. Ansonsten erfolgte die Restriktion sequentiell, d.h. es wurde ein Aufreinigungsschritt in Form eines präparativen Agarosegels oder einer GFX-Aufreinigung eingefügt. Grundsätzlich wurde das Enzym nach beendeter Reaktion durch schockfrosteten bei -80°C inaktiviert.

3.3.2.2 Auffüllung kohäsiver Enden und Phosphorylierung von DNA

Dazu wurden bis zu 200 ng DNA im Fall des Inserts mit 1,5 U T4-DNA-Polymerase und 20 U T4-PNK und im Fall des Plasmids mit 1,5 U T4-DNA-Polymerase für 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte durch Erhitzen auf 75°C für 10 Minuten.

3.3.2.3 Dephosphorylierung von DNA durch alkalische Phosphatase

Ein im präparativen Maßstab linearisiertes Plasmid wurde dazu mit 10 U CIP für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Da die CIP in allen Puffern des SuRE-Cut-Systems aktiv ist, konnte sie direkt im Anschluss an einen Restriktionsverdau zupipettiert werden. Ihre Inaktivierung erfolgte durch zehnmütiges Erhitzen bei 75°C oder durch schockfrosteten bei -80°C .

3.3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Für eine Ligation wurde das linearisierte Plasmid und ein zwei- bis vielfacher Überschuss der zu insertierenden DNA in einem Gesamtvolumen von 15 μl mit Ligase und ATP-haltigem Ligationspuffer bei 16°C über Nacht oder bei RT für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden 10 μl des Ligationansatzes in *E.coli* transformiert (s. 3.3.1.2).

3.3.3 Elektrophorese

Die analytische Auftrennung von DNA per Elektrophorese wurde genutzt, um Fragmentgrößen restringierter DNA sowie von PCR-Produkten zu ermitteln. Des Weiteren diente sie zur Überprüfung der Integrität präparierter Plasmid-DNA.

Die Analyse und Dokumentation erfolgte durch Fluoreszenzanregung (Wellenlänge 302 nm, Geldoc 2000, Biorad) des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids. Dieses wurde der Gelmatrix bei der Agarose-Gelelektrophorese vorher zugesetzt bzw. bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachträglich beigebracht. Durch Vergleich mit einem DNA-Standard (1 kb ladder, Invitrogen) ließen sich Größe und Menge der DNA abschätzen. Zur Isolierung der DNA aus dem Gel wurden die entsprechenden DNA-Banden mit einem Skalpell herausgeschnitten und unter Verwendung des GFX-Kits (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers eluiert.

10x TBE

Tris HCl	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA pH 8,0	20 mM

6x Auftragspuffer (6x dye)

10x TBE	60%
Ficoll Typ 400	18%
EDTA pH 8,0	0,12 mM
Bromphenolblau	0,15%
Xylencyanol FF	0,15%

3.3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 500 bp und 10 kB wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Für präparative Zwecke kamen 0,6-1%ige, bei analytischen Fragestellungen 0,6-3%ige Agarosegele zum Einsatz. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE unter Aufkochen in der Mikrowelle geschmolzen, im Wasserbad auf 50°C abgekühlt und mit 800 ng/ml Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml, Roth) versetzt. Die DNA wurde vor der Elektrophorese mit der entsprechenden Menge 6x dye versetzt, so dass der Migrationsfortschritt anhand der beiden blauen Farbstoffe nachvollzogen werden konnte. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 bis 130 V in 1x TBE und je nach Größe des Gels für 20 bis 90 Minuten.

3.3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Analyse sehr kleiner DNA-Fragmente (< 500 bp) wurde die vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) verwendet. PAGE-Gele wurden 5%ig in einer Stärke von 0,75 mm verwendet. Laufpuffer für die Elektrophorese war auch hier 1x TBE. Für ein 5%iges PAGE-Gel (Stärke 0,75 mm) wurden 3,75 ml Rotiphorese Gel (Acrylamid/N,N'-Bisacrylamid = 29:1, 40%ige wässrige Lösung) und 3 ml 10x TBE mit Wasser auf 30 ml ergänzt. Durch die Zugabe von 20 µl Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) als Katalysator und 70 µl 20% APS (Ammoniumperoxodisulfat) als Radikalstarter polymerisierte das Gel innerhalb von 20 Minuten. Die Elektrophorese der mit 6x dye versetzten DNA erfolgte in 1x TBE bei 100 V für 10 Minuten, dann bei 260 V für 50 Minuten. Anschließend wurde das Gel für 10 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (0,6 µg/ml) geschwenkt, überschüssiges Ethidiumbromid durch zweimaliges Waschen entfernt und das Gel unter UV-Licht analysiert.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde für die Klonierung von DNA-Fragmenten verwendet. Die eingesetzten Primer enthielten zumeist integrierte Schnittstellen für die Insertion in den Zielvektor. Die maximale Annealing-Temperatur für die Primer berechnete sich nach folgender Faustformel:

$$T_A = [4^\circ\text{C} \times (\text{C} + \text{G}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{A} + \text{T})]$$

T_A entspricht dabei der maximalen Annealing-Temperatur, oberhalb dieser Temperatur „schmelzen“ die Primer und eine Bindung an das DNA-Template ist nicht mehr gewährleistet. Hierbei kann die Faustformel lediglich zur Orientierung dienen. Die optimale Annealing-Temperatur wurde letztlich für jede Zielsequenz ausgehend vom Basisprogramm empirisch ermittelt.

Basisprotokoll, nach welchem sämtliche PCRs durchgeführt wurden:

Denaturierung (initial)	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 s	22 bis 40 Zyklen
Annealing	50 bis 55°C	40 s	
Extension	72°C	30 s bis 6 min	
Extension (final)	72°C	10 min	

Basisansatz nach welchem sämtliche PCRs pipettiert wurden:

DNA (10 bis 100 ng)	0,5 – 4 µl (je nach Konzentration)
Primer 1 (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	2,5 µl
dNTPs (1,25 mM je dNTP)	8,0 µl
10x PCR Puffer (je nach Polymerase)	5,0 µl
Polymerase (Taq oder Pfu, 5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	ad 50,0 µl

Bei den verwendeten Puffern handelte es sich um die von der jeweiligen Firma mitgelieferten Puffer, d.h. 10x Taq Polymerase Puffer (QBiogene) und 10x Pfu Polymerase Puffer (Metabion).

3.3.4.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Zur Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene wurde die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) verwendet. Bei dieser Methode wird mRNA mit Hilfe eines Kits (Superscript™ First strand synthesis system for RT-PCR, Invitrogen) quantitativ durch Reverse Transkriptase in einzelsträngige DNA (copy DNA = cDNA) umgeschrieben und anschließend einer PCR unterzogen. Der Einsatz des Kits erfolgte nach Herstellerangaben. Die erhaltene cDNA wurde in 3 µl Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Die Quantifizierung der PCR (1µl cDNA pro PCR) erfolgte durch Vergleich mit einem ubiquitär exprimierten Gen als Standard (z.B. GAPDH).

3.3.4.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der von Sanger *et al.*⁹⁰ (1977) beschriebenen Methode, die auf dem zufälligen Einbau fluoreszenzmarkierter 2',3'-Dideoxynukleotide (vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems) und dem damit verbundenen statistischen Kettenabbruch aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe beruht. Ein günstiges Verhältnis von ddNTPs zu dNTPs lässt alle möglichen Fragmentlängen entstehen, die dann nach kapillarphoretischer Auftrennung mit Laser detektiert werden (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Die Auswertung erfolgt über eine Software. Diese Methode erlaubte eine Identifikation von bis zu 400 bp, für längere Sequenzen wurden mehrere überlappende Sequenzierungen durchgeführt.

Basisansatz nach welchem sämtliche Sequenzieransätze für den Genetic Analyzer pipettiert wurden:

DNA (150-300 ng)	0,5 – 4 µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Big Dye Ready Reaction Mix	2,5 µl
H ₂ O	ad 12 µl

Standard-PCR-Programm für Sequenzierungen:

Denaturierung (initial)	95°C	2 min	45 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	50 bis 55°C	40 s	
Elongation	72°C	4 min	

Vor der Analyse im Sequenzierautomaten wurden überschüssige ddNTPs durch Ethanol/Natriumacetat-Präzipitation (Reaktionsansatz ad 100 µl H₂O, 250 µl 100% EtOH, 10 µl Natriumacetat 7,5 M, pH 5,2) abgetrennt, das resultierende Pellet einmal mit 70% EtOH gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde dann in 30 µl Wasser resuspendiert, die DNA für drei Minuten bei 95 °C im PCR-Block denaturiert und im Genetic Analyzer sequenziert. Alternativ erfolgte die Sequenzierung kurzer Fragmente bis 400 bp durch die Fa. Seqlab (Göttingen) und größerer Fragmente durch die Fa. MWG Biotech (Ebersberg).

3.4 Methoden zur Arbeit mit Proteinen

Um Proteinlysate hoher Qualität zu erhalten und die proteolytische Spaltung durch Proteasen zu unterbinden, wurden sämtliche Arbeiten an Proteinen bei 4°C unter Zugabe von Proteasehemmern (Complete™, Roche) durchgeführt. Die Wahl des verwendeten Lysepuffers hing von der geplanten Verwendung ab und ist bei den jeweiligen Methoden erwähnt. Die Aufbewahrung von Proteinlysaten erfolgte nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -196°C oder auf Trockeneis bei -80°C, die Lagerung erfolgte im Tiefkühlschrank bei -80°C.

Verwendete Lysepuffer und Proteaseinhibitoren:

Triton® X-Lysepuffer

Triton® X-100	0,5%
NaCl	150 mM
CaCl ₂ *2H ₂ O	2 mM

FLAG-Lysepuffer

Tris-HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Triton® X-100	1%

RIPA-Lysepuffer

Tris HCl pH 7,4	10 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1%
DOC	1%
SDS	0,1%

Proteaseinhibitoren (Complete™)

Complete® (1 St.)	ad 1 ml H ₂ O
in Aliquots bei -20°C lagern	
40 µl Complete®/ml Lysepuffer	

3.4.1 Protein-Isolation aus Zellen

Die Zellen wurden nach einem Waschschrift mit PBS direkt auf dem 6-Well bzw. der 10 cm-Zellkulturschale durch Zugabe von 300 µl bzw. 1 ml Lysepuffer lysiert. Es folgte die Überführung des Lysats in 1,5 ml Reaktionsgefäße und die Zentrifugation zur Abtrennung unlöslicher Membranüberstände bei 13200 rpm für 15 Minuten (Kühlzentrifuge 5415R, Eppendorf). Mit 2 µl des Lysates wurde dann die Bradford-Quantifizierung (s. 3.4.3) vorgenommen.

3.4.2 Protein-Isolation aus Gewebe

In der Regel wurde das Gewebe für die Protein-Isolation frisch präpariert und direkt verwendet. In Ausnahmefällen wurde auf in Ethanol/Trockeneis schockgefrorenes und bei -80°C aufbewahrtes Gewebe zurückgegriffen. Das Gewebe wurde dazu mit 100 bis 750 μl Lysepuffer versetzt und mit einem Homogenisator (Ultra-Turrax, T8) auf Eis zerkleinert. Dabei galt es, ein Aufschäumen des Lysats unbedingt zu verhindern (kleine Drehzahl, Eis!). Nach Sichtkontrolle folgte ein Zentrifugationsschritt von 13200 rpm für 15 Minuten (Kühlzentrifuge 5415R, Eppendorf) zur Abtrennung von Geweberückständen. Die Quantifizierung fand auch hier mit 2 μl des Lysats via Bradford statt (s. 3.4.3).

3.4.3 Quantifizierung von Proteinen (Bradford)

Der Proteingehalt der Lysate wurde mit BSA als Standard nach der Methode von Bradford⁹¹ (1976) spektrometrisch bestimmt. Dazu wurden 2 μl Lysat mit 98 μl einer 0,15 M NaCl-Lösung und 1 ml Coomassie-Lösung für zwei Minuten bei RT inkubiert und mit einem Wasserwert als Referenz die Absorption bei 595 nm bestimmt (Biophotometer, Eppendorf). Eine im Gerät gespeicherte BSA-Standardreihe von 1 – 30 μg ermöglichte die Quantifizierung.

Coomassie-Lösung

Coomassie brilliant blue G250	50 mg
EtOH 95%	25 ml
Phosphorsäure 85%	50 ml
H ₂ O	ad 500 ml
lichtgeschützt, bei 4°C aufbewahren	

3.4.4 Western Blot

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli⁹² (1970) mit einem Puffersystem angewendet, das von Fling & Gregerson⁹³ (1986) vorgeschlagen wurde. Die Gele bestehen aus einem Sammelgel, das der Fokussierung aller Proteine dient, sowie einem Trenngel zur Größenauftrennung. Die verwendeten Gele (6- bis 10%ige Trenngele, 0,75 mm oder 1,5 mm) wurden in einer Mini-Gel Apparatur (Protean 3, Biorad) gegossen. Die Proteine wurden vor dem Auftragen mit der entsprechenden Menge 6x Laemmli-Puffer (Auftragspuffer) versetzt und für

fünf Minuten bei 97°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V in 1x Elektrophorese-Puffer und dauerte zwischen 90 und 180 Minuten. Als Größenstandard und Orientierung für den Migrationsfortschritt diente eine Protein Ladder (Precision Protein Kaleidoscope oder All Blue Standard, Biorad).

Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese f. Proteine:

4x Trenngel-Puffer

Tris	1,5 M
SDS	0,4%
pH 8,8	

6% Trenngel

Rotiphorese Gel 30	2,0 ml
4x Trenngel-Puffer	2,5 ml
H ₂ O	5,3 ml
20% APS	100 µl
TEMED	8 µl

10% Trenngel

Rotiphorese Gel 30	3,3 ml
4x Trenngel-Puffer	2,5 ml
H ₂ O	4,0 ml
20% APS	100 µl
TEMED	4 µl

6x Laemmli-Puffer

Sammelgel-Puffer	7 ml
Glycerol	3 ml
SDS	10%
DTT	0,93 g
Bromphenolblau	1,2 mg
H ₂ O	ad 10 ml

4x Sammelgel-Puffer

Tris	0,5 M
SDS	0,4%
pH 6,8	

8% Trenngel

Rotiphorese Gel 30	2,7 ml
4x Trenngel-Puffer	2,5 ml
H ₂ O	4,6 ml
20% APS	100 µl
TEMED	6 µl

Sammelgel

Rotiphorese Gel 30	0,33 ml
4x Trenngel-Puffer	0,25 ml
H ₂ O	1,4 ml
20% APS	20 µl
TEMED	2 µl

10x Elektrophorese-Puffer

Tris	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Der Transfer der Proteine vom PAGE auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membran wurde mit dem Tank Blot System (Mini Trans Blot, Biorad) durchgeführt. Die Proteine werden dabei durch ein vertikal zur Elektrophorese-Richtung ausgerichtetes Feld auf die Membran transferiert, wo sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben.

1x Transfer-Puffer

10x Elektrophorese-Puffer	100 ml
MeOH 100%	200 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Die Membran (7 cm x 9 cm) wurde 15 s in MeOH permeabilisiert, in Wasser gewaschen und für 15 Minuten in Transfer-Puffer equilibriert. Der Transfer erfolgte unter Kühlung für 60 bis 90 Minuten (je nach Proteingröße) bei 300 mA (max. 100 V). Nach Abbau der Blot-Apparatur wurde die Membran kurz in MeOH geschwenkt und über mindestens eine Stunde bei RT oder über 30 Minuten bei 37°C getrocknet.

Zunächst wurde die trockene Membran wieder mit MeOH permeabilisiert, dann folgte die Inkubation in Blockierlösung für eine Stunde bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST für je fünf Minuten wurde die Membran mit einer Lösung des primären Antikörpers inkubiert. Die Konzentration und die zugehörigen Inkubationszeiten der Primärantikörper finden sich im Anhang. Die Antikörper-Lösungen wurden unter Zusatz von Natriumazid (0,05%) bei 4°C gelagert und konnten ohne Qualitätseinbußen für die Detektion mehrerer Blots eingesetzt werden. Auf die Primärantikörper-Inkubation folgten wiederum drei fünfminütige Waschschrte mit 1x TBST. Anschließend wurde die Membran mit einer Lösung des entsprechenden Sekundärantikörpers für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrten erfolgte abhängig vom Konjugat des sekundären Antikörpers die Detektion:

HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelte Antikörper wurden mittels Chemilumineszenz (ECL-Kit, Amersham) detektiert und auf einem Film (Hyperfilm ECL, Amersham) sichtbar gemacht.

*Lösungen für die Detektion:***10x TBS**

Tris	12,1 g
NaCl	80,23 g
pH 8,0	

1x TBST

10x TBS	100 ml
Tween® 20	1 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Blockierlösung

Milchpulver	5 g
1x TBST	ad 100 ml

AP (Alkalische Phosphatase)-gekoppelte Antikörper wurden direkt auf der Membran durch Umsetzung von BCIP (8-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat) und NBT (Nitroblau

Tetrazoliumsalz) durch die Alkalische Phosphatase visualisiert. Die Membran wurde dazu in einer aus Inkubationspuffer, BCIP und NBT frisch hergestellten Lösung bis zum Sichtbarwerden von Banden geschwenkt. Das Waschen in Stopp-Lösung beendete die Umsetzung und der Blot konnte eingescannt werden.

Lösungen für die Detektion der AP-gekoppelten Antikörper

BCIP-Lösung

BCIP	250 mg
DMF 100%	ad 5 ml

Inkubationspuffer

Tris	100 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	100 mM
pH	9,5

NBT-Lösung

NBT	250 mg
DMF 70%	ad 5 ml

Stopp-Lösung

EDTA	20 mM
	in 1xPBS

3.4.5 Co-Immunopräzipitation

Für Co-Immunopräzipitationen wurden ausschließlich frisch präparierte Proteinlysate verwendet und sämtliche Arbeitsschritte bis zur Denaturierung bei 4°C durchgeführt.

Das entsprechende Lysat (1 mg) wurde dazu über Nacht bei 4°C mit Antikörper, der gegen eines der beiden vermeintlich interagierenden Proteine gerichtet war, und Protein-A-Sepharose Beads inkubiert. Das Gesamtvolumen variierte abhängig von der Konzentration des Lysats zwischen 500 und 1000 µl und wurde ggf. mit FLAG-Puffer aufgefüllt. Neben den auch beim Western Blot verwendeten Proteaseinhibitoren (Complete™) wurden bei Co-IPs auch Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) und Natriumfluorid (NaF) als Phosphataschemmer zugegeben. Um unspezifische Interaktionen zu eliminieren, wurden die Beads nach der Inkubation dreimal abzentrifugiert und mit je 500 µl HNTG-Puffer (inkl. Complete™) gewaschen. Alternativ, und um unspezifische Bindungen von vornherein auszuschließen, erfolgte ein sog. Pre-clearing. Das heißt, das Lysat wurde im Vorfeld mit den Beads und ohne Antikörper für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Beads verworfen und die Co-IP mit frischen Beads angesetzt. Die Elution von den Beads erfolgte durch den Denaturierungsschritt im Vorfeld der Elektrophorese, d.h. die Beads wurden nach dem letzten Waschschrift mit 30 µl FLAG-Puffer und 6 µl 6x Laemmli-Auftragspuffer versetzt und für fünf Minuten auf 97°C erhitzt. Das auf diese Weise co-immunopräzipitierte Protein wurde dann im Western Blot detektiert.

Puffer für die Co-Immunopräzipitation

<u>HNTG-Puffer</u>		<u>FLAG®-Puffer (f. Co-IP)</u>	
HEPES pH 7,5	50 mM	Complete™	40 µl
NaCl	150 mM	Na ₃ VO ₄ (200 mM)	10 µl
Glycerol	10%	NaF (200 mM)	10 µl
EDTA pH 8,0	5 mM	FLAG-Puffer	ad 1 ml
Triton® X-100	0,1%		

3.4.6 Pulldown-Assays

Anders als bei einer herkömmlichen Co-Immunopräzipitation wird bei einem Pulldown-Assay der interagierende Komplex durch ein angeheftetes Fusionsprotein (tag) präzipitiert. Diese Methode erlaubt die Co-IP zweier überexprimierter Proteine (über eines ihrer tags) sowie die Co-IP eines überexprimierten mit einem endogen exprimierten Protein. Die Überexpression der Proteine fand bei allen Experimenten nach transienter Transfektion in HEK293 Zellen für 48 Stunden statt (s. 3.7.3.2).

3.4.6.1 3xFLAG-Pulldown-Assay

Das entsprechende Lysat (1 mg) wurde dazu mit Anti-FLAG®-Beads versetzt und nach Anleitung des Herstellers inkubiert, gewaschen und eluiert. Es folgte der Denaturierungsschritt und anschließend die Gelelektrophorese.

3.4.6.2 Myc-/HA-Tag-Pulldown-Assay

Das Vorgehen bei einem Myc-Tag- bzw. HA-Tag-Pulldown war dasselbe wie bei einer herkömmlichen Co-IP mit dem Unterschied, dass der eingesetzte Antikörper sich nicht gegen einen der Interaktionspartner sondern gegen ein C- oder N-terminales Tag richtete. Die Elution erfolgte ebenfalls durch den finalen Denaturierungsschritt vor der Elektrophorese.

3.4.7 ³²P-Phosphorylierungsassay

Die aktive Phosphorylierung eines Proteins in einer Zelle sollte durch Verwendung von radioaktiv-markiertem Phosphat nachgewiesen werden.

Voraussetzung ist, den natürlichen Phosphathaushalt der Zelle und des sie umgebenden Mediums so stark zu senken, dass in erster Linie das zugegebene ^{32}P -markierte Phosphat in die Zelle eingeschleust und u.a. bei Phosphorylierungen eingebaut wird. Anschließend bedient man sich der Immunpräzipitation, um das gewünschte Protein aus dem Pool nun radioaktiv-markierter Proteine zu selektieren und weist es dann autoradiographisch im Western Blot nach.

Bei den verwendete Zellen handelte es sich ausschließlich um transient transfektierte HEK293 Zellen (s. 3.7.3 und 3.7.3.2). Die Standard-Kulturbedingungen dafür finden sich unter 3.7.3 . Der Versuch startete 48 Stunden nach Transfektion, indem das Kulturmedium entfernt und nach dreimaligem Waschen mit phosphatfreien Puffer ($-\text{PO}_4^{3-}$ -HEPES) durch 6 ml desselben ersetzt wurde. Die Inkubation dauerte drei Stunden bei 37°C und 10% CO_2 -Sättigung an, bevor ^{32}P -markiertes Phosphat zugegeben und die Phosphorylierung durch Stimulation initiiert wurde. Abschließend wurde der radioaktive Überstand entfernt, wiederum dreimal mit $-\text{PO}_4^{3-}$ -HEPES gewaschen und die Zellen durch Zugabe eines Lyse-Puffer auf Eis lysiert. Es folgte die entsprechende Präzipitation (s. 3.4.5), die Gelelektrophorese und die autoradiographische Detektion durch einen β -Strahlungs-sensitiven Film im Western Blot.

$-\text{PO}_4^{3-}$ - HEPES

HEPES	25 mM
NaCl	125 mM
KCl	4,8 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,3 mM
Glukose	5,55 mM
pH 7,4, steril filtrieren	

3.4.8 Phospholipase-Aktivitäts-Assay

Die Untersuchungen zur Phospholipase-Aktivität in Gesamtprotein-Lysaten wurde freundlicherweise durch die AG Lehr, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, an Lysaten gleichen Proteingehalts durchgeführt⁹⁴.

Die dazu verwendeten Lysate wurden wie unter 3.4 hergestellt, ihr Proteingehalt bestimmt und in ready-to-use Aliquots auf Trockeneisbasis nach Münster verbracht. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte ebenfalls dort mittels einer Chromatographie-Software, die statistische Auswertung dieser Daten erfolgte selbstständig.

3.5 Methoden zur Arbeit mit RNA

Grundsätzlich wurden für die Arbeiten mit RNA steril verpackte Einmalwaren verwendet bzw. im Fall von Glaswaren wurden diese vorher durch Backen (250°C für 8 h) sterilisiert. Alle weiteren Geräte etc. wurden vor der Verwendung mit RNase Away™ (Roth) gereinigt. Zum Lösen der RNA sowie für alle Lösungen, die in Kontakt mit Gewebe oder RNA kommen, wurde ausschließlich DEPC-behandeltes Wasser ($\text{H}_2\text{O}^{\text{DEPC}}$) verwendet.

$\text{H}_2\text{O}^{\text{DEPC}}$

H_2O 1000 ml

DEPC 1 ml

60 Minuten bei RT rühren, dann autoklavieren

3.5.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte im Fall von Chondrozyten mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) und ansonsten, wenn nicht anders angegeben, mit peqGOLD TriFast™ nach Herstellerprotokoll. Die Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf) gegen $\text{H}_2\text{O}^{\text{DEPC}}$ als Referenz, die Überprüfung der RNA-Integrität gegebenenfalls durch eine Glyoxal-Gel-Analyse.

3.5.2 RNA-Glyoxal-Gelelektrophorese

Um die Integrität der isolierten RNA zu überprüfen wurden Aliquots der RNA-Isolationen stichprobenartig mittels denaturierender Glyoxal-Gel-Elektrophorese analysiert.

Ein Aliquot der RNA wurde mit $\text{H}_2\text{O}^{\text{DEPC}}$ auf 10 μl aufgefüllt und nach Zugabe von 30 μl Denaturierungslösung bei 50°C für eine Stunde denaturiert. Nach Zusatz von 6 μl 6x dye wurde die Elektrophorese gegen einen RNA-Größenstandard bei 50 V und 4°C gestartet. Das verwendete 1%ige Agarosegel wurde mit 1x Phosphatpuffer (+ EtBr) hergestellt, der gleichzeitig auch Laufpuffer war.

*Lösungen für die RNA-Glyoxal-Gelelektrophorese:***1x Phosphatpuffer**

NaH ₂ PO ₄ 1M	3,9 ml
Na ₂ HPO ₄ 1M	6,1 ml
H ₂ O ^{DEPC}	ad 1000 ml

20x SSC

NaCl	350,6 g
Na ₃ -Citrat*2H ₂ O	176,4 g
H ₂ O	ad 2000 ml

Denaturierungslösung

Glyoxal 40% (deion.)	100 µl
DMSO 100%	400 µl
Phosphatpuffer 1M	10 µl

Phosphatpuffer 1M

NaH ₂ PO ₄ 1M	3,9 ml
Na ₂ HPO ₄ 1M	6,1 ml

Während der vierstündigen Elektrophorese wurde das Gel stündlich umgedreht, um das Entstehen eines pH-Gradienten im Laufpuffer zu vermeiden. Die Analyse und Dokumentation erfolgte am Geldoc 2000 (Biorad).

3.5.3 Erstellung einer cDNA-Bibliothek aus braunem Fettgewebe

Eine cDNA-Bibliothek (cDNA-Library) repräsentiert und enthält cDNA Kopien einer bestimmten mRNA-Population, in diesem Fall die des braunen Fettgewebes. Um die Integrität der Bibliothek zu maximieren, ist es unerlässlich, nur RNA höchster Qualität einzusetzen und die quantitative Umsetzung zu cDNA zu überprüfen (s. 3.5.2 u. s. 3.5.3.3).

3.5.3.1 Isolierung von RNA nach Chomczynski und Sacchi

Zur Isolierung von totaler RNA aus murinem, braunem Fettgewebe wurde die von Chomczynski und Sacchi⁹⁵ (1987) beschriebene Methode verwendet. Dazu wurde das Gewebe mit sterilisiertem Besteck aus neugeborenen Mäusen (zwischen den Schulterblättern) entnommen und umgehend auf Trockeneis schockgefroren. Mehrere dieser Fettpellets (15 bis 20 Stück) wurden dann zusammen in einer Reibschale mit Pistill auf Trockeneis und unter Zufuhr von flüssigem Stickstoff zerrieben und anschließend in 2 ml Chomczynski-Lösung aufgenommen. Es folgte ein kurzer Homogenisationsschritt (Ultra-Turrax) bevor durch Zugabe von 0,2 ml Natriumacetat-Lösung 2M, 2,0 ml Phenol und 0,4 ml Chloroform DNA und Proteine präzipitiert und durch Zentrifugation bei 10000x g und 4°C für 20 Minuten abgetrennt wurden. Die im Überstand enthaltene RNA wurde nun mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und für eine Stunde bei -20°C präzipitiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 0,5 ml

Chomczynski-Lösung resuspendiert und erneut, diesmal durch Zugabe von zwei Volumen EtOH, für eine Stunde bei -20°C präzipitiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde nach einem Waschschrift (70% EtOH) an der Luft getrocknet und in $100\ \mu\text{l H}_2\text{O}^{\text{DEPC}}$ gelöst. Der RNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt (BioPhotometer, Eppendorf), die RNA in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Lösungen für die RNA-Isolation (nach Chomczynski und Sacchi):

<u>Chomczynski-Lösung</u>		<u>Natriumacetat-Lösung 2 M</u>	
Guanidiniumthiocyanat	4 M	Natriumacetat	1,64 g
Natriumcitrat	25 mM	H ₂ O	ad 10 ml
β -Mercaptoethanol	100 mM		
Lauroylsarcosinat	0,5%		
H ₂ O ^{DEPC}	ad 100 ml		

3.5.3.2 Isolierung von Poly(A)-mRNA

Die Aufreinigung von Poly(A)-mRNA aus totaler RNA erfolgte mit dem Poly(A) Quik Kit (Stratagene) via Säulenchromatographie nach Angaben des Herstellers. Die Quantifizierung wurde photometrisch vorgenommen (BioPhotometer, Eppendorf) und die Integrität der RNA ggf. per Glyoxal-Gelelektrophorese überprüft (s.3.5.2).

3.5.3.3 Erstellung der cDNA-Bibliothek

Zur Erstellung wurde das SuperScript™ Choice System for cDNA synthesis (Invitrogen) verwendet. Es bietet die Möglichkeit den Fortschritt der Synthese und die erhaltene Menge cDNA zu quantifizieren und wurde dem Herstellerprotokoll folgend verwendet. Das Protokoll sieht vor, in zwei parallelen Ansätzen zu arbeiten, um einmal bei der cDNA-Synthese und zum anderen bei der Synthese des zweiten Stranges α -³²P-markiertes dCTP zur Quantifizierung der cDNA-Ausbeute zu verwenden. Die Synthese der cDNA erfolgte durch die RT II, eine Reverse Transkriptase, unter Verwendung von random-hexamer-Primern (5'- XhoI- BamHI-NNNNNN- 3', N=A, N=T, N=C, oder N=G s.7.1). Der zweite Schritt, eine Nick-Translations-Reaktion nach Okayama und Berg⁹⁶ (1982), wurde durch die Enzyme *E.coli* DNA-Ligase, DNA-Polymerase I und RNase H vollzogen. Letztlich wurde die fertige DNA durch T4 DNA Polymerase von überhängenden Enden befreit, die Ausbeute quantifiziert und die beiden Ansätze

vereint. Da die Ligationseffizienz kohäsiver Enden deutlich größer ist als die von „blunt“ Enden wurde die DNA mit Adaptoren flankiert, deren überhängendes 5'-Ende einer aufgeschnittenen EcoRI-Schnittstelle entsprach. Durch einen im übernächsten Schritt erfolgten XhoI-Restriktionsverdau wurden nun DNA-Fragmente erhalten, die im Idealfall durch zwei kohäsive Enden flankiert waren. Vorher wurde die DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion von Enzymen gereinigt. Es folgte eine Agarose-Gelelektrophorese in einem 1% low melting Agarosegel (SeaPlaque, BMA), um überschüssige dNTPS, Adaptoren und beim Verdau entstandene Kleinstfragmente abzutrennen. DNA-Fragmente größer als 300 bp wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und durch Verdau mit Gelase (Biozym) freigesetzt. Nach Präzipitation wurden die DNA-Fragmente in mehreren Ligationen in den linearisierten pGADT7 Bibliotheksvektor inseriert. Nach erneuter Präzipitation wurden die Ligationsansätze in elektrokompente *E.coli* XL1 Blue durch Elektroporation transformiert und der Ansatz als Glycerolstock bei -80°C gelagert. Die erzielte Ligations-/Transformationseffizienz wurde jeweils mit einem 5 µl Aliquot der *E.coli* Zellsuspension bestimmt. Als theoretisch genügend Klone repräsentiert waren, wurden die Glycerolstocks in 2x 300 ml LB-Medium überführt und für 30 Minuten bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden je 300 µl Ampicillin zugesetzt und die Kultur über Nacht bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Bevor die Plasmidisolation wie unter 3.3.1.7 beschrieben vorgenommen wurde, wurden zur Sicherung 10 Aliquots von 2 ml entnommen und als Glycerolstocks bei -80°C gelagert.

3.6 Methoden zur Arbeit mit Hefe im Zwei-Hybrid-System

3.6.1 Das Yeast-Two-Hybrid-System

Das Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H) nach Fields und Song⁹⁷ (1989) ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. Es kann nicht nur für die Interaktionsanalyse zweier bekannter Proteine verwendet werden, sondern erlaubt auch die Suche nach einem unbekanntem Interaktionspartner in einer cDNA-Bibliothek. Die Basis des Systems bildet die Entdeckung von Ma und Ptashne⁹⁸ (1987), dass sich manche transkriptionsaktivierende Faktoren in eine DNA-bindende Domäne (BD) und eine transkriptionsaktivierende Domäne (AD) zerlegen lassen, ohne dass diese ihre Funktionalität einbüßen. GAL4 und GAL80 sind regulatorische Proteine in Hefen, die die Transkription der für den Galaktose-Stoffwechsel benötigten Gene aktivieren bzw. inhibieren⁹⁹. GAL4 aktiviert die Transkription, indem es an sogenannte „upstream activating sequences“ (UAS), konservierte, palindromförmige Sequenzen bindet. GAL80 hingegen bewirkt die Hemmung der Transkription. Diese UAS sind cis-aktive

Faktoren, die vor der für die basale Transkription verantwortlichen TATA-Box liegen. Im MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid Systems 3 (Clontech) sind diese cis-aktiven Faktoren in den Promotorregionen von vier Reporterregionen integriert. Deren Transkriptionslevel steht somit indirekt unter der Kontrolle von GAL4. Des Weiteren sind im verwendeten System die DNA-bindende Domäne (BD) und die transkriptionsaktivierende Domäne (AD) von GAL4 auf zwei verschiedenen Plasmiden kodiert (pGBKT7 bzw. pGADT7). Diese Plasmide dienen nun als Expressionsvektoren für die zu untersuchenden Proteine X und Y und liefern nach Ko-Transformation in Hefe die Fusionsproteine X-BD und Y-AD. Um auf positive Transformanden selektionieren zu können, kodieren die beiden Plasmide zusätzlich für TRP1 (pGBKT7) und LEU2 (pGADT7). Hefestämme, die durch Deletion auxotroph für Tryptophan und Leucin sind, können dann nach Transformation auf Mangelmedium, das kein Tryptophan bzw. Leucin enthält, selektioniert werden. Das Fusionsprotein X-BD bindet in *S. cerevisiae* AH109 an die GAL4-abhängigen UAS und bringt durch Interaktion mit Protein Y auch die AD-Domäne des GAL4 in die Nähe des entsprechenden Promotors (s. Abbildung 7). Die erfolgreiche Rekonstitution der beiden GAL4-Domänen resultiert dann in der Aktivierung des Promotors und der Transkription eines oder mehrerer Reporterogene.

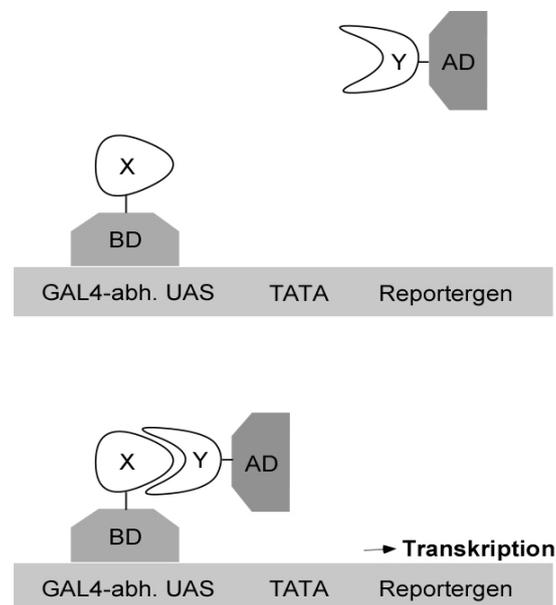


Abbildung 7: Das Prinzip des Yeast-Two-Hybrid-Systems.

X, Y: potentiell interagierende Proteine, AD: aktivierende GAL4-Domäne, BD: DNA-bindende GAL4-Domäne, UAS: upstream activating sequences, TATA: TATA-Elemente.

ADE2, HIS3, LacZ und MEL1 sind die vier Reportergene in AH109 und kodieren für folgende Proteine: ADE2 und HIS3 sind Proteine der Adenin- bzw. Histidin-Proteinbiosynthese und überwinden im Falle einer Interaktion die Auxotrophie von AH109, d.h. eine Interaktion der Proteine X und Y kann auf Adenin- bzw. Histidin-Mangelmedium durch auxotrophes Wachstum detektiert werden. LacZ und MEL1 sind β - bzw. α -Galaktosidasen, die aus X- β -Gal bzw. X- α -Gal durch Hydrolyse einen blauen Indigofarbstoff (4-Chlor-3-Brom-Indigo) abspalten. Im Fall von MEL1 ist diese Blaufärbung auch auf X- α -Gal-haltigen Agarplatten sichtbar, da die α -Galaktosidase sezerniert wird. Die Reportergene sind durch drei verschiedene Promotoren reguliert (s. Abbildung 8), so dass die Zahl der falsch-positiven Interaktionspartner mit der Anzahl untersuchter Reportergene abnimmt.

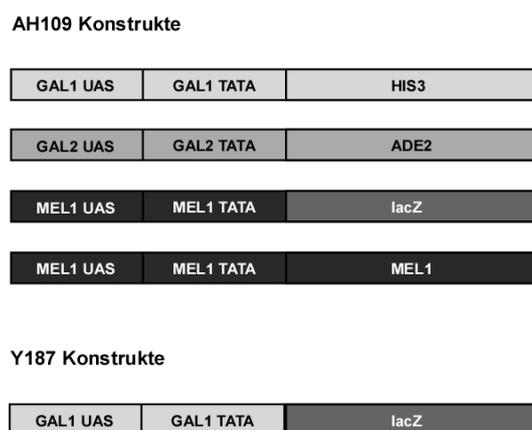


Abbildung 8: Reportergenkonstrukte in *S. cerevisiae* AH109 und Y187.
(nach MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid-System 3 & Libraries User Manual, Clontech).

3.6.2 Genotypen der verwendeten Hefestämme

Hefestamm	Genotyp	Referenz
AH109	MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2 : : GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3, GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} -ADE2, URA3 : : MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ	James <i>et al.</i> (1996) ¹⁰⁰
Y187	MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met-, gal80 Δ , URA3 : : GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ	Harper <i>et al.</i> (1993) ¹⁰¹

Tabelle 4: Genotypen der Hefestämme des Yeast-Two-Hybrid-Systems (Clontech).

3.6.3 Plasmide im Y2H

Plasmid	Selektion	(Fusions)-Protein	Verwendung
pGADT7	LEU2	AD/Bibliothek	Klonierungsvektor f. cDNA-Bibliothek
pGBKT7	TRP1	BD/Bait-DNA	Klonierungsvektor f. Bait
pGADT7-T	LEU2	AD/T-antigen	Positivkontrolle (kotransformiert)
pGBKT7-53	TRP1	BD/p53	
pGBKT7-Lam	TRP1	BD/Lamin C	Negativkontrolle ¹⁰²
pCL1	LEU2	GAL4	Positivkontrolle

Tabelle 5: Plasmide des Yeast-Two-Hybrid-Systems MATCHMAKER 3 (Clontech).

3.6.4 Nährmedien und Lösungen

YPD Medium*

Hefe-Extrakt	10 g
Pepton	20 g
H ₂ O	ad 950 ml
Glukose 40%	50 ml

YPDA-Medium*

Hefe-Extrakt	10 g
Pepton	20 g
Adeninhemisulfat	30 mg
H ₂ O	ad 950 ml
Glukose 40%	50 ml

SD-Medium*

YNB	1,7 g
H ₂ O	ad 850 ml
10x DO-Supp.	100 ml
Glukose 40%	50 ml

10x DO Supplements

10x DO -L	3,45 g
10x DO -W	3,70 g
10x DO -LW	3,20 g
10x DO -HLW	3,10 g
10x DO -AHLW	3,00 g
jeweils	ad 500 ml

Die Zugabe der steril-filtrierten Glukose und des 10x DO-Supplements erfolgte stets nach dem Autoklavieren.

*Für die Herstellung von Agarplatten wurden jeweils 15 g Agar vor dem Autoklavieren zugegeben und das Medium in sterile Petrischalen gegossen.

10x LiAc

Lithiumacetat 1M
pH 7,5 m. Essigsäure

PEG/LiAc-Lösung

PEG 4000 50% 8 ml
10x LiAc 1 ml
10x TE 1 ml

Z-Puffer

Na₂HPO₄*7 H₂O 60 mM
NaH₂PO₄*H₂O 40 mM
KCl 10 mM
MgSO₄ 1 mM
β-ME 50 mM
pH 7,0

Z- X-β-Gal-Lösung

Z-Puffer 100 ml KH₂PO₄
β-ME 0,27 ml pH 7,5
X-β-Gal 1,67 ml

ONPG

ONPG 40 mg
Z-Puffer ad 10 ml
Lagerung bei -20°C

Lytikase (5 U/μl)

Lytikase 4,2 mg
Lytikase-Puffer 2 ml
in 240 μl Aliquots aufteilen
Lagerung bei -20°C

10x TE

Tris HCl 0,1 M
EDTA 10 mM
pH 7,5

SS-DNA (Carrier-DNA)

SS-DNA 200 mg
1x TE ad 100 ml

X-α-Gal*

X-α-Gal 20 mg
DMF 100% 1 ml

X-β-Gal*

X-β-Gal 20 mg
DMF 100% 1 ml

*Lagerung bei -20°C

DNA-Extraktions-Puffer

KH₂PO₄
pH 7,5

1 M NaCO₃

NaCO₃ 28,6 g
H₂O ad 100 ml
sterilfiltrieren

Lytikase-Puffer

Na₂HPO₄ 0,01 M
Glycerol 50%
pH 7,5

3.6.5 Kultivierung der Hefen

Die Kultivierung der Hefen erfolgte aerob im entsprechenden Medium und je nach Kulturvolumen in 2 ml Reaktionsgefäßen, 15 ml Schraubröhrchen oder Erlenmeyerkolben bei 30°C und 200 rpm. Agarplatten wurden für mehrere Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert und konnten anschließend für bis zu sechs Wochen bei 4°C gelagert werden.

3.6.6 Konstruktion des Baits

Als Baits werden im Weiteren alle pGBKT7-Konstrukte bezeichnet, die für den Yeast-Two-Hybrid-Screen wie auch für die Folgeversuche in Hefen verwendet wurden.

Die entsprechende DNA wurde dazu über die MCS des Plasmids integriert, sequenziert und in die Hefen transformiert. Die Expression in Hefe lieferte dann das Fusionsprotein bestehend aus dem zu untersuchenden Protein und der GAL4-BD-Domäne.

3.6.7 Konstruktion des Preys

Als Prey werden im Weiteren alle pGADT7-Konstrukte bezeichnet, die für den Yeast-Two-Hybrid-Screen wie auch für die Folgeversuche in Hefen verwendet wurden. Die Integration der DNA erfolgte wie beim Bait über die MCS des Plasmids, anschließend wurde das Konstrukt nach erfolgreicher Sequenzierung in Hefe transformiert. Das exprimierte Fusionsprotein bestand dann aus dem zu untersuchenden Protein und der GAL4-AD-Domäne.

3.6.8 Vorversuche mit den verwendeten Baits

Bevor ein Bait im Yeast-Two-Hybrid eingesetzt wurde, musste eine Autoaktivierung der Reportergene sowie eine unspezifische Interaktion zwischen Bait und AD-Domäne ausgeschlossen werden. Dazu wurde AH109 entsprechend der folgenden Tabelle transformiert und auf verschiedenen Platten ausplattiert:

Bait-Test auf Autoaktivierung:

Transformanten	Selektionsmedium	Phänotyp
X-BD (= X-pGBKT7)	SD/-Trp	Wachstum
X-BD	SD/-Trp/+X- α -Gal	Wachstum, aber keine Blaufärbung
X-BD + pGADT7	SD/-Leu/-Trp	Wachstum
X-BD + pGADT7	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp	kein Wachstum

Tabelle 6: Übersicht zum Bait-Test auf Autoaktivierung.

3.6.9 Two-Hybrid-Screen der BAT-cDNA-Bibliothek

Für den Two-Hybrid-Screen der cDNA-Bibliothek wurde *S. cerevisiae* AH109 mit Bait und Prey kotransformiert und auf SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp selektioniert. Um die höchste Effizienz bei der Transformation der wertvollen cDNA-Bibliothek zu gewährleisten, wurde die Methode der sequentiellen Transformation verwendet. Dazu wurde zunächst *S. cerevisiae* AH109 nach dem Quick and Easy TRAF0 Protokoll von Gietz & Woods¹⁰³ (1994) mit dem Bait transformiert.

3.6.9.1 Quick and Easy TRAF0 Protokoll

Von einer Agarplatte des entsprechenden Hefestammes wurde mit einem abgeflamten Zahnstocher oder einer Impföse eine Kolonie (\varnothing 2-5 mm, ca. 25 μ l Zellvolumen pro Transformation) abgenommen und in 1 ml Wasser resuspendiert. Durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Galaxy Mini, 5s bei rpm_{max}) wurden die Hefezellen abgetrennt, in 1 ml 100 mM LiAc aufgenommen und für fünf Minuten bei 30°C inkubiert. Das entsprechende Zellvolumen wurde dann in einem 2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, die Flüssigkeit durch erneute Zentrifugation abgetrennt und der Transformationsmix (240 μ l 50% PEG + 36 μ l LiAc 1 M + 50 μ l SS-DNA + x μ l DNA (1 μ g) + (25-x) μ l Wasser) auf das Zellpellet pipettiert. Die Hefezellen wurden nun sorgfältig im dickflüssigen Mix resuspendiert und dann für 20 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 150 μ l Wasser aufgenommen und auf der entsprechenden Agarplatte zur Selektion ausplattiert. Nach zwei bis vier Tagen bei 30°C waren Klone gewachsen.

3.6.9.2 Two-Hybrid-System TRAF0 Protokoll (Bibliothekstransformation)

Zur Vorbereitung der Bibliothekstransformation wurde eine $\bar{u}N$ -Vorkultur der bait-transformierten Hefe angesetzt: Dazu wurde eine Kolonie (\varnothing 5 mm) mit einem abgeflamnten Zahnstocher in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, durch Vortexen in 1 ml Wasser resuspendiert und in 30 ml SD/-Trp überimpft. Nach Inkubation bei 30°C und 200 rpm über Nacht wurde diese Vorkultur in 300 ml SD/-Trp gegeben und für ungefähr vier Stunden bei 30°C geschüttelt. Ausschlaggebend für die Dauer war das Erreichen einer OD_{600} von 0,5.

Die Zellen wurden dann in mehrere 50 ml Falcons abgefüllt und bei 1000x g für fünf Minuten pelletiert. Die Pellets wurden vereint in insgesamt 50 ml Wasser aufgenommen, erneut abzentrifugiert und durch Vortexen in 1,5 ml 100 mM LiAc resuspendiert.

In einem gebackenen 100 ml Erlenmeyerkolben wurden nun 180 μ g cDNA-Bibliothek zusammen mit 1 ml SS-DNA vorgelegt und durch Vortexen mit 1 ml der Hefezellen vermenget. Nach Zugabe von 6 ml PEG/LiAc-Lösung wurde erneut gevortext und für eine halbe Stunde bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 700 μ l DMSO zugegeben, durch Schwenken (an dieser Stelle nicht mehr vortexen!) gemischt und für 15 Minuten bei 42°C transformiert. Die Transformation wurde durch kurze Inkubation (1-2 Minuten) auf Eis beendet und die Zellen abzentrifugiert. Zum Ausplattieren wurde das Pellet in 8 ml 1x TE aufgenommen und je 500 μ l Zellsuspension mit einem abgeflamnten Drygalski-Spatel auf 38 Stück SD/-His/-Leu/-Trp-Agarplatten verteilt. Die Transformationseffizienz wurde sowohl durch das Ausplattieren von Verdünnungen (1:10, 1:100 und 1:1000) auf SD/-Leu/-Trp, als auch durch parallel durchgeführte Kotransformationen der Positivkontrolle pCL1 bestimmt. pCL1 wurde dazu in einem separaten Ansatz zu einem Aliquot der Vorkultur transformiert (s. 3.6.9.1) und auf SD/-Leu/-Trp ausgestrichen. Alle Platten wurden vor der Verwendung 60 Minuten unter der Sterilbank (Herasafe HS12, Heraeus) getrocknet und nach dem Ausplattieren mit Parafilm verschlossen. Die Inkubation bei 30°C im Brutschrank dauerte bis zum Sichtbarwerden der ersten Klone vier Tage und wurde nach weiteren sechs Tagen beendet.

3.6.9.3 Detektion positiver Klone

Die Platten der Bibliothekstransformation wurden täglich auf neu gewachsene Klone überprüft. Diese wurden dann mit einem abgeflamnten Zahnstocher gepickt und zum Heranziehen auf SD/-Leu/-Trp-Agarplatten überführt. Die Ausstriche wiederum wurden nach einigen Tagen zur weiteren Selektion auf X- α -Gal-haltige SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp-Agarplatten aufgetragen und für mehrere Tage bei 30°C inkubiert.

Alle nach dieser Prozedur noch verbliebenen Klone (= Wachstum und Blaufärbung auf SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp + X- α -Gal) wurden nun dem sogenannten Rescreen unterzogen. Gleichzeitig wurden von allen, entsprechend dem long-term storage protocol (Clontech), Glycerolstocks angelegt und bei -80°C aufbewahrt.

3.6.9.4 Rescreen zur Bestätigung der Interaktion

Die erhaltenen positiven Klone wurden zur Verifikation der Interaktion einem Rescreen unterzogen. Dabei wird die cDNA des vermeintlich interagierenden, unbekanntes Proteins auf seine Größe hin analysiert und durch High efficiency TRAF0 erneut zusammen mit dem Bait transformiert. Wenn durch diese erneute Transformation nicht derselbe Phänotyp erzeugt werden konnte, wurde der Klon verworfen.

3.6.9.4.1 Plasmid-DNA-Isolation aus Hefe

Eine Hefekolonie (\varnothing 5 mm) des entsprechenden Klons wurde dazu in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in 70 μ l DNA-Extraktionspuffer durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 10 μ l Lytikase (5 U/ μ l) wurde nochmals gevortext und für 90 Minuten bei 37°C und 300 rpm im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l einer 20%igen SDS-Lösung zugesetzt, eine Minute durch Vortexen gemixt und bei -20°C für wenige Minuten eingefroren. Es folgte die Plasmid-DNA-Isolation wie unter 3.3.1.6 beschrieben.

3.6.9.4.2 Vermehrung der Plasmid-DNA in *E.coli*

Da die Anzahl von Plasmid-DNA in Hefen weit unter der in *E.coli* liegt, reichte die isolierte DNA nicht für eine sofortige Restriktionsanalyse aus und musste vorher in *E.coli* amplifiziert werden (s.3.3.1). In den meisten Fällen konnte die DNA erfolgreich in chemisch kompetente *E.coli* transformiert werden (s.3.3.1.2). Sehr gering konzentrierte Plasmid-DNA wurde durch die effizientere, aber aufwendigere Elektroporation in *E.coli* transformiert. Das pGADT7-Plasmid enthält ein Ampicillinresistenzgen und so erfolgte die Selektion auf Ampicillin-haltigen Agarplatten auf positive Transformanten. Die erhaltenen Bakterienklone, jeweils zwei pro Transformation, wurden anschließend einer Mini-Prep (s.3.3.1.6) unterzogen.

3.6.9.4.3 Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA

Um die cDNA des vermeintlichen Interaktionspartners zu analysieren, wurde sie über die zur Insertion verwendeten Schnittstellen für EcoRI und XhoI aus dem Vektor herausgetrennt, und via Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Die Ansatzgröße des Verdauung wurde so gewählt, dass auf einem ersten, 2%igen Agarosegel eine Erstanalyse erfolgen und anschließend gegebenenfalls eine PAGE gemacht werden konnte.

3.6.9.4.4 Small Scale Transformation Protokoll für den Rescreen

Für die Transformation von bis zu 15 Konstrukten auf einmal wurde das Small Scale Protokoll (Clontech) verwendet. Anders als beim Quick and Easy TRAF0 Protokoll wurden dabei bereits bait-transformierte Hefezellen in einer üN -Vorkultur generiert und dann nach der PEG/LiAc-Methode (s. 3.6.9.1) transformiert. Zuerst erfolgte die Anzucht positiver Transformanten auf SD/-Leu/-Trp-Agarplatten, anschließend die Verifikation der Interaktionen auf SD/(-Ade)/-His/-Leu/-Trp mit und ohne X- α -Gal.

3.6.10 Tests zur β -Galaktosidase-Aktivität

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion wurde die β -Galaktosidase-Aktivität positiver Klone untersucht. Da die β -Galaktosidase von den Hefezellen nicht sezerniert wird (s. 3.6.1), werden diese im Folgenden beschriebenen Assays mit Hefezell-Lysaten durchgeführt.

3.6.10.1 ONPG-Assay

Im ONPG-Assay wird die Hydrolyse von ONPG quantifiziert. β -Galaktosidase spaltet dabei die β -glykosidische Bindung zwischen Zucker und Aromat und setzt gelbes Nitrophenol frei, welches photometrisch quantifiziert werden kann.

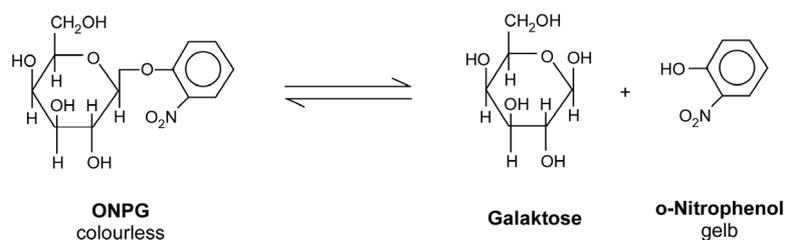


Abbildung 9: Schema der ONPG-Hydrolyse durch β -Galaktosidase.

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers (Clontech): Aus einer Kolonie des entsprechenden Klons wurde eine 4 ml $\bar{u}N$ -Kultur in SD/-Leu/-Trp-Medium angeimpft und bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Am anderen Morgen wurden 2 ml der Vorkultur in 2 ml YPDA-Medium überführt und für weitere zwei bis drei Stunden bei 30°C geschüttelt. Nach Bestimmung der OD_{600} wurden 1,5 ml der Kultur bei 10000x g für eine Minute zentrifugiert und das Zellpellet in 1,5 ml Z-Puffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension in nun 100 μ l Z-Puffer folgten drei *freeze-thaw*-Zyklen (-196°C/N₂ bzw. 37°C/Wasserbad) für je 30 Sekunden. Anschließend wurden 700 μ l Z-Puffer + β ME hinzugegeben und die Zeitmessung bei Zugabe von 160 μ l ONPG gestartet. Die Reaktion wurde beim Auftreten der charakteristischen Gelbfärbung (Nitrophenol) durch Zugabe von 400 μ l 1M NaCO₃ gestoppt und eventuelle Niederschläge bei 10000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Die Quantifizierung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach photometrischer Bestimmung der A_{420nm} (gegen einen Blank, der Z-Puffer anstelle des Lysats enthielt) durch Einsetzen in die Formel nach Miller¹⁰⁴ (1972) und Miller¹⁰⁵ (1992).

$$U^{\beta\text{-Gal}} = 1000 \cdot OD_{420} / t \cdot V \cdot OD_{600}$$

$$\begin{aligned} t &= \text{Reaktionszeit in Minuten} \\ V &= \text{Aufkonzentration (=15, 1,5 ml auf 100 } \mu\text{l)} \\ OD_{600} &= OD_{600} \text{ von 1ml Kultur} \end{aligned}$$

Danach entspricht eine Einheit β -Galaktosidase genau der Menge, die 1 μ mol ONPG pro Minute und Zelle zu *ortho*-Nitrophenol und D-Galaktose hydrolysiert.

3.6.10.2 CLFA-Assay

Beim CLFA werden die Hefen nicht vorher lysiert, sondern von der Agarplatte auf einen Whatman-Filter übertragen und auf diesem haftend durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff permeabilisiert und mit X- β -Gal inkubiert. Dazu wurden entsprechende Agarplatten (SD/-Leu/-Trp) vorbereitet, d.h. die verschiedenen zu vergleichenden Klone wurden in Reihen zu je drei 1 cm² Kästchen darauf ausgestrichen und drei bis vier Tage herangezogen. Auf jede Platte wurde ein Whatman-Rundfilter aufgelegt und mit einer Pinzette vorsichtig angedrückt, um die Kolonien gleichmäßig zu übertragen. Gleichzeitig wurde der Filter durch Kanüleneinstiche für die spätere Orientierung markiert. Nach dreimaligem Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurde der aufgetaute Filter mit der Kolonieseite nach oben in einer Petrischale auf einen mit X- β -Gal-getränkten Filter aufgelegt und bis zum Sichtbarwerden der Blaufärbung bei 30°C inkubiert.

Die Reaktion konnte durch einfaches Trocknen des Filterpapiers gestoppt werden. Die Dokumentation erfolgte mit einem handelsüblichen Scanner (HP Scanjet, Hewlett-Packard).

3.7 Kultur eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Herasafe Sterilbank HS12 (Heraeus) durchgeführt und die verwendeten Medien und Waschpuffer soweit nicht anders angegeben auf 37°C erwärmt. Die Anzucht und die Kulturfortführung aller Zellen wurde mit Dulbecco's modified eagle Medium (DMEM mit 4500 mg/l D-Glukose, GlutaMAX™-I, Gibco) unter Zugabe von hitzeinaktiviertem, fötalem Rinderserum (FBS) und Penicillin/Streptomycin (PenStrep) durchgeführt.

Zellmedium

DMEM GlutaMAX-I	500 ml
FBS 100%	50 ml
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
bei 4°C aufbewahren	

3.7.1 Präadipozyten - BAT

Die BAT-Zellen wurden von Herrn Bodo Haas in unserem Labor als stabile Zelllinie etabliert¹⁰⁶. Die Isolation der Zellen erfolgte nach der von Nisoli *et al.*⁸² beschriebenen Methode.

3.7.1.1 Medien

Die Anzucht der Zellen und die Kulturfortführung erfolgte mit Zellmedium (s. 3.7) in einem mit 5% CO₂ begasten Brutschrank. Für die Differenzierung der BAT zu reifen Fettzellen wurden die beiden im Folgenden beschriebenen Medientypen verwendet.

<u>DM (Differenzierungsmedium)</u>		<u>IM (Induktionsmedium)</u>	
DMEM	445 ml	Dexamethason	1 μ M
FBS 100%	50 ml	IBMX	0,5 mM
Penicillin	100 U/ml	DM	ad 500 ml
Streptomycin	100 μ g/ml		
Insulin	20 nM		
Triiodothyronin-Na	1 nM		

3.7.1.2 Differenzierung der BAT

Die Differenzierung der BAT zu Fettzellen erfolgte nach dem unten dargestellten Differenzierungsschema¹⁰⁶. Das Protokoll sieht eine insgesamt 13-tägige Kultivierung vor, während der das Medium nach folgendem Modus gewechselt wird:

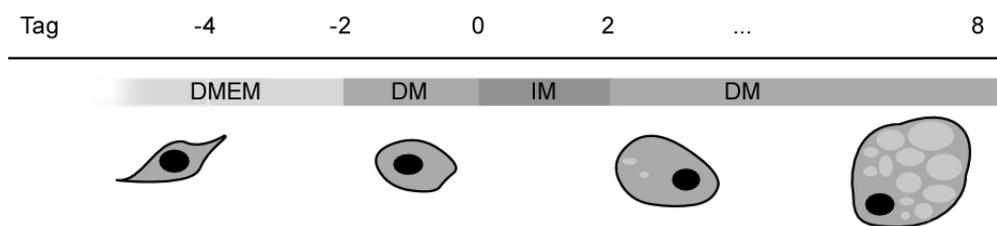


Abbildung 10: Adipogenes Differenzierungsschema der BAT.
Der Mediumwechsel erfolgt alle zwei Tage.

3.7.1.3 Triglycerid-Assay

Der Differenzierungsgrad der BAT bzw. der reifen Adipozyten wurde in einem Triglycerid-Assay unter Verwendung des Free Glycerol Reagent (Sigma) bestimmt.

Lösungen für den Triglycerid-Assay:

<u>TG-Tx-Lysepuffer</u>		<u>FGR</u>	
Triton® X-100	0,1%	Free Glycerol Reagent (FGR)	lyophilisiert
NaCl	150 mM		
Tris-HCl	10 mM		nach Herstellerangaben in 40 ml H ₂ O gelöst
pH 8,0			bei 4°C 60 Tage haltbar

<u>1000x Glycerol</u>		<u>Glycerol-Standard</u>	
Glycerol	2,6 g	1000x Glycerol	100 µl
H ₂ O	ad 10 ml	H ₂ O	ad 100 ml

Die entsprechenden Zellen waren zur Vorbereitung auf 24-well-Platten ausgesät worden. Die Zellen wurden am letzten Tag des Differenzierungsprotokolls mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 50 µl TG-Tx-Lysepuffer lysiert. Die Suspension wurde im Well mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze durch Passagieren homogenisiert und zweimal für je eine Minute in einem Ultraschallwasserbad behandelt. Als Blank wurden 50 µl TG-Tx-Lysepuffer und als Standard 10µl Glycerol-Standard + 40 µl TG-Tx-Lysepuffer in zwei freien Wells vorgelegt. Anschließend wurden 800 µl FGR zugegeben, mit der Pipettenspitze gemischt und bei 37°C im Wasserbad fünf Minuten inkubiert. Dann wurde der gesamte Inhalt eines Wells in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellreste durch kurze Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde letztlich bei 540 nm spektrometrisch (BioPhotometer) gegen Blank und Standard vermessen.

Der absolute Glycerolgehalt einer Probe berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Glycerolgehalt} = (A_{\text{Probe}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{Standard}} - A_{\text{blank}}) * \text{Konzentration}_{\text{Standard}}$$

3.7.2 Primäre Chondrozyten

Primäre Chondrozyten wurden aus Knorpeln der Längenknochen von neugeborenen Mäusen gewonnen und über einen Zeitraum von zwei bis sechs Tagen bei 37°C und 10%CO₂ in Kultur gehalten. Dazu wurden die entsprechenden Knochen steril unter einem Lichtmikroskop entnommen und die Knorpel drei Stunden mit Kollagenase II verdaut, um die Zellen zu vereinzeln. Anschließend wurden die Zellen gezählt und entsprechend ausgesät.

Kollagenase II-Medium

Kollagenase Typ II	6 mg
FBS	2%
DMEM	3 ml
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
frisch ansetzen!	

3.7.3 HEK293 Zellen

3.7.3.1 Kultivierung

Die Kultivierung der HEK293 Zellen erfolgte in Monolayerkultur auf 10 und 15 cm Zellkulturschalen (Sarstedt) bei 37°C und 10% CO₂. Zum Ernten und Splitten der Zellen wurde 0,05%iges Trypsin in PBS verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, dann für einige Minuten mit 1 bis 1,5 ml Trypsin im Brutschrank inkubiert und anschließend mit der entsprechenden Menge Zellmedium aufgenommen. Das Zellmedium wurde während der Kulturfortführung alle zwei bis drei Tage gewechselt. Zur dauerhaften Kulturerhaltung wurden Zellstocks in 10%iger DMSO-Zellmedium-Lösung angelegt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.7.3.2 Transiente Transfektion

Die HEK293 wurden zur heterologen Expression mit der Calciumphosphat-Methode transient transfektiert. Dazu wurden Zellen bis zur 50-60%igen Konfluenz auf Poly-L-Lysin-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Pro Transfektion wurden 10 µg des entsprechenden Plasmids mit Wasser auf 400 µl verdünnt und mit 100 µl CaCl₂ 2,5 M versetzt. Nach Vortexen wurden 500 µl 2x BBS tropfenweise zugegeben und 10 bis 15 Minuten bei RT stehen gelassen. Der Ansatz wurde auf die Platten pipettiert und durch Schwenken verteilt. Anschließend wurden die Zellen 16 h bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Am Morgen folgte ein Mediumwechsel, danach wurde die Kultivierung bis zur Ernte der Zellen bei 37°C und 10%CO₂ fortgesetzt. Die Qualität der Transfektion bzw. die Expression der Konstrukte wurde ggf. durch Kotransfektion eines gfp-tragenden Plasmids (1 µg) und anschließende Analyse unter UV-Licht bestimmt.

CaCl₂ 2,5 M

CaCl ₂ *2 H ₂ O	7,35 g
H ₂ O	ad 20 ml
steril filtrieren, bei 4°C aufbewahren	

2x BBS (2x BES buffered solution)

BES	0,533 g
NaCl	0,818 g
Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	0,013 g
H ₂ O	ad 50 ml
pH 6,95	
steril filtrieren, bei 4°C aufbewahren	

4 Ergebnisse

4.1 Expression der cGMP-abhängigen Kinasen in Präadipozyten und BAT

Zunächst wurde die Expression der cGMP-abhängigen Kinasen I und II in braunen Fettzellen (BAT) untersucht. Dazu wurde die mRNA von Präadipozyten (entspricht Tag -4 bis Tag -2) sowie von BAT während der Differenzierung (entspricht Tag -1 bis Tag 8) via RT-PCR auf Transkripte der cGKI und cGKII untersucht.

Beide Kinasen konnten, wie die in Abbildung 11 dargestellte Agarose-Gelelektrophorese zeigt, mehrfach detektiert werden. Durch eine GAPDH-PCR wurde die Integrität der verwendeten cDNA und (grob) die Menge der mRNA überprüft.

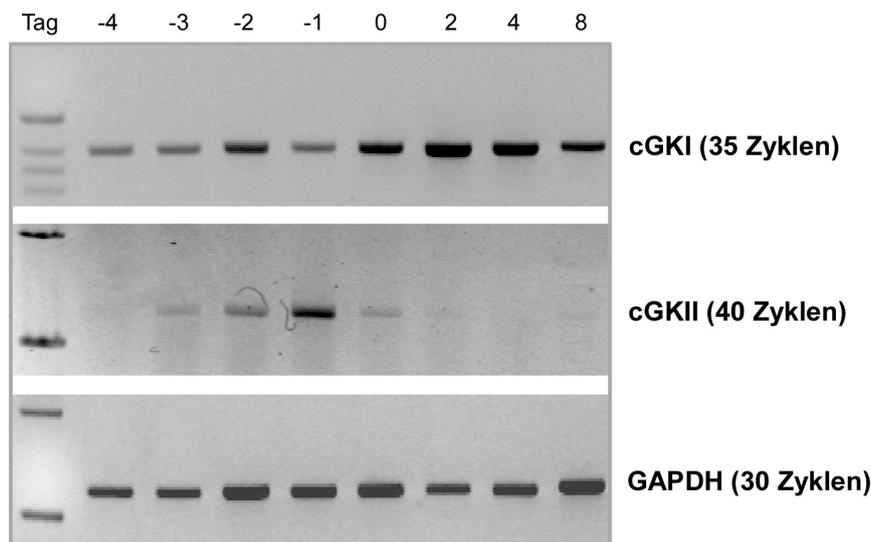


Abbildung 11 Expression der cGMP-abhängigen Kinasen in BAT.

Präadipozyten (Tag -4/-3/-2), differenzierende BAT (Tag -1/0/2/4/8).

Dargestellt ist die Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR: cGKI 300 bp, cGKII 598 bp, GAPDH 597 bp.

Die Untersuchung der cGK mRNA Expression ergab, dass die cGKI während des gesamten Differenzierungsprozesses exprimiert wird (s. Abbildung 11). Die cGKII wird in der frühen Phase der Differenzierung exprimiert (s. Abbildung 11, Tag -3 bis Tag 0) und ist in ausgereiften Fettzellen nicht mehr nachzuweisen (s. Abbildung 11, Tag 4 und Tag 8). Für die weitere Arbeit von entscheidender Bedeutung war die Detektion der cGKII sowohl in undifferenzierten BAT (Tag -3 und Tag -2) wie auch in differenzierenden BAT (Tag -1 bis Tag 2).

4.2 Y2H

Das Y2H-System eignet sich zur Identifikation neuer Bindungspartner eines Proteins sowie zur Untersuchung der Interaktion zwischen zwei bekannten Proteinen. Mehrere der cGKI-Interaktionspartner, wie z.B. IRAG, wurden bereits auf diese Weise identifiziert⁵⁵. Die eukaryotische Expression gewährleistet die richtige Faltung der Proteine und macht das Y2H zu einem praktischen Werkzeug bei der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen. In dieser Arbeit wurde das Y2H-System sowohl zur Identifikation neuer Interaktionspartner (der cGKII, s. 4.2.1) als auch in Interaktionsstudien zweier bekannter Proteine (Bcl-3 und Cyld, s. 4.6) verwendet.

4.2.1 Erstellung der cDNA-Bibliothek

Da keine cDNA-Bibliothek aus braunem Fettgewebe kommerziell verfügbar war, wurde sie eigens für den Yeast-Two-Hybrid-Screen hergestellt. Dafür wurde in mehreren Ansätzen totale RNA aus Fettpellets gewonnen. Ihre Qualität wurde stichprobenartig mittels eines denaturierenden Glyoxal-Gels untersucht. Die Gewinnung von Poly(A)-mRNA erfolgte ebenfalls in mehreren Ansätzen, insgesamt wurden 16 µg Poly(A)-mRNA aus 1,5 mg total RNA erhalten. Ausgehend von je 5 µg Poly(A)-mRNA wurde in zwei parallelen Ansätzen cDNA hergestellt. Dazu wurde ein sogenannter „random-hexamer“-Primer verwendet, der eine integrierte XhoI-Schnittstelle enthält. Auf diese Art wurde cDNA erhalten, die am 3'-Ende eine XhoI-Schnittstelle aufweist.

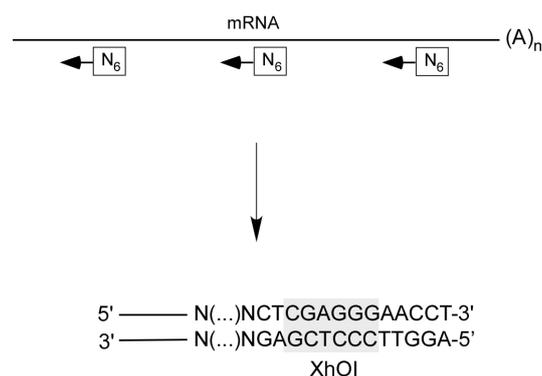


Abbildung 12: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese unter Verwendung eines „random-hexamer“-Primers (N₆).
(A)_n kennzeichnet das Poly(A)-Ende der mRNA.

Die Ausbeute wurde über die Quantifizierung des integrierten α -³²P-dCTPs bestimmt. Die Umsetzung der Poly(A)-mRNA aus zwei Syntheseansätzen lieferte insgesamt 3,7 µg cDNA.

Diese „blunt“ cDNA wurde nun durch Ligation eines kohäsiven Adapters sowie durch Restriktionsverdau mit XhoI in sticky-end Fragmente umgewandelt.

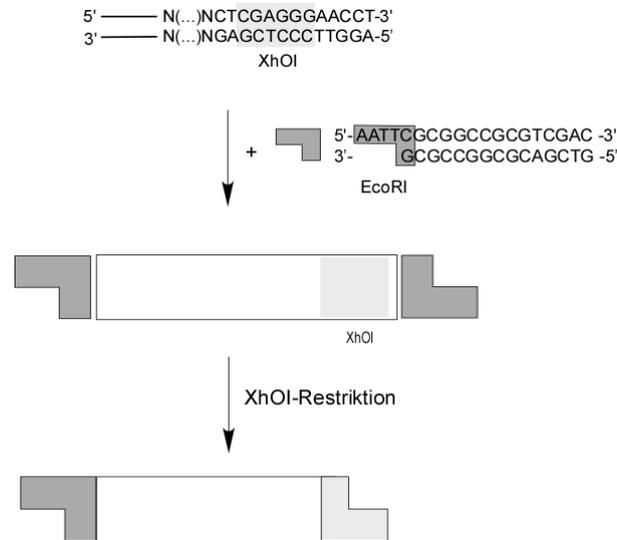


Abbildung 13: Schema der Adapterligation und des anschließenden XhoI-Verdau.

Zur Abtrennung überschüssiger Adapter-Oligonukleotide sowie zur Größenauftrennung wurde die cDNA auf ein low-melting Agarosegel aufgetragen. Die zwischen 300 bp und 12 kB befindlichen DNAs wurden mit einem Skalpell in Form von Quadranten aus dem Gel herausgeschnitten und diese separat der Gelase-Elution unterzogen.

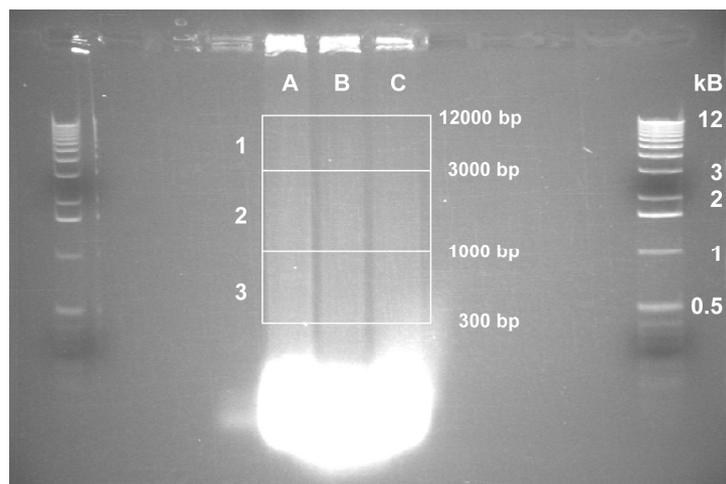


Abbildung 14: LMP-Agarosegel mit Quadranten.

Dargestellt ist die Auftrennung der cDNA und die Aufteilung in neun Quadranten (1A bis 3C).

Nach Präzipitation wurde die Ausbeute erneut bestimmt und die DNA in Wasser resuspendiert. Je 20 bis 50 ng der DNA wurden anschließend in 20 ng des sog. Bibliotheksvektors pGADT7 (Prey-Vektor) ligiert, der zuvor mit EcoRI und XhoI linearisiert worden war.

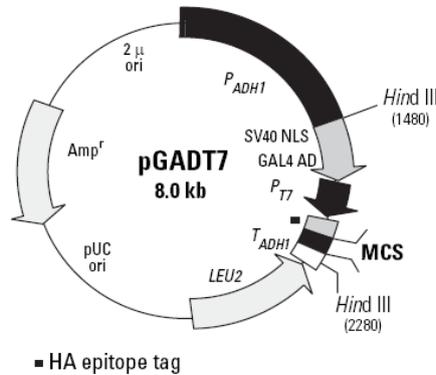


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Prey-Vektors pGADT7 (Clontech).

MCS: multiple cloning site, Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen, pUC ori: Replikationsursprung, P_{ADH1}: ADH1-Promoter, P_{T7}: T7-Promoter, T_{ADH1}: Terminierungssignal, LEU2: Leucin-Gen, GAL4 AD: Polypeptid mit SV40 Nucleus-Lokalisierungssignal (SV40 NLS), HindIII: Schnittstellen des Restriktionsenzym HindIII.

Nach Ligation wurden die Ansätze präzipitiert und anschließend durch Elektroporation in *E.coli* transformiert. Dabei wurde jede Ligation auf zwei Elektroporationen aufgeteilt. Die Transformationseffizienz wurde durch Ausplattieren eines 5 µl Aliquots bestimmt, die Klone durch Mini-Prep analysiert und so die Anzahl unabhängiger Klone errechnet. Die verbleibenden 995 µl des Transformationsansatzes wurden in Form von Glycerolstocks bei -80°C gelagert.

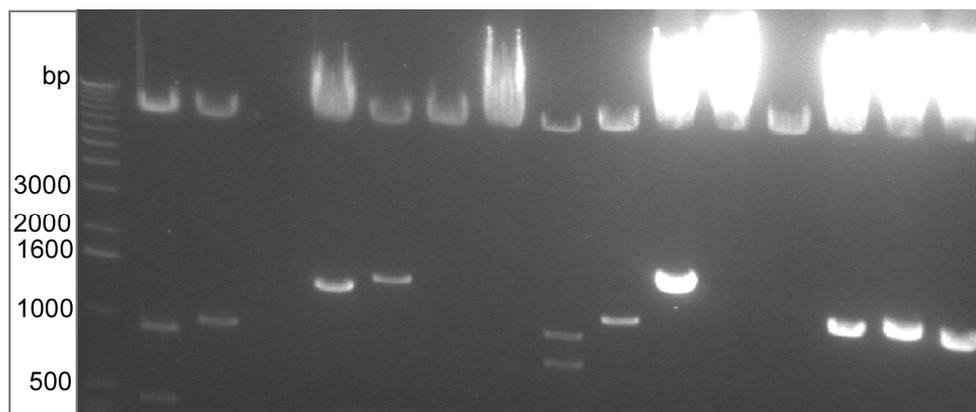


Abbildung 16: Repräsentatives Gel für die Analyse von Bibliotheks-Klonen durch einen Restriktionsverdau.

Die exemplarisch dargestellten Klone entstammen den Ligationen von cDNA-Fragmenten aus dem Quadranten 2C; links DNA-Größenmarker in bp.

Nach mehreren Ligationen bzw. Transformationen waren schließlich $7,5 \times 10^5$ Klone erreicht und die gesammelten Glycerolstocks wurden vereint und einer Maxi-Prep unterzogen. Die Ausbeute betrug $360 \mu\text{g}$ cDNA in pGADT7.

4.2.2 Klonierung des Baits

Alle im Weiteren als Bait bezeichneten Konstrukte basieren auf dem Bait-Vektor pGBKT7 des MATCHMAKER 3- Systems.

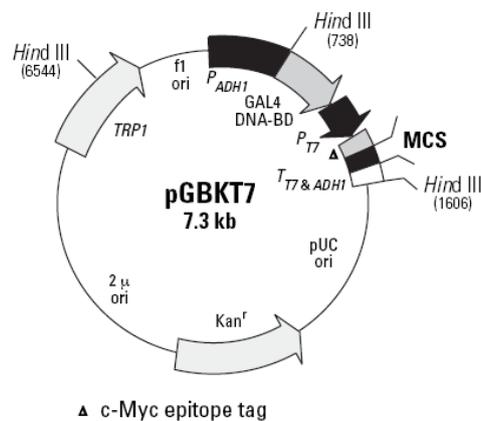


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Baitvektors pGBKT7 (Clontech).

MCS: multiple cloning site, Kan^r: Kanamycin-Resistenzgen, pUC ori: Replikationsursprung, P_{ADH1}: trunktierter ADH1-Promoter, P_{T7}: T7-RNA-Polymerase-Promoter, T_{T7 & ADH1}: Transkriptionsterminations-signale, TRP1: Tryptophan-Gen, GAL4 DNA-BD: Gal4-DNA-bindendes Polypeptid, HindIII: Schnittstelle des Restriktionsenzym HindIII.

Als Bait sollte der C-terminale Teil der katalytischen Untereinheit der cGKII (nur Substratbindungsdomäne, nicht ATP-bindende Domäne) verwendet werden¹⁶. Durch die Trunkation sollte außerdem eine Lokalisation an der Membran (hervorgerufen durch den N-terminalen Myristoylierungsanker) verhindert werden.

Basierend auf dem full-length-Konstrukt wurde durch PCR das entsprechende Fragment cGKIIc amplifiziert: die verwendeten Primer K2cKozEcoF und cGK2cR lieferten ein 400 bp großes Fragment, das von den zwei Schnittstellen EcoRI und Xho flankiert wurde.



Abbildung 18: Vereinfachte Darstellung des cGKII mRNA Schemas zur Klonierung des cGKIIc Baits.

Leu Zip: Leuzinzipper Motiv; cG-Bdg: cGMP-bindende Domänen; catalytic: katalytische, (ATP und Substrat) bindende Domäne; cGKIIc: Substratbindene Subdomäne der katalytischen Domäne.

Nach Verdau mit EcoRI und XhoI konnte die katalytische Untereinheit cGKIIc in den Baitvektor pGBKT7 insertiert werden. Dieser war zuvor mit den Enzymen EcoRI und Sall linearisiert worden. Sall erzeugt kohäsive Enden, die kompatibel zu denen von XhoI sind. Die Richtigkeit der Sequenz sowie des Leserahmens wurde durch Sequenzierung bestätigt.

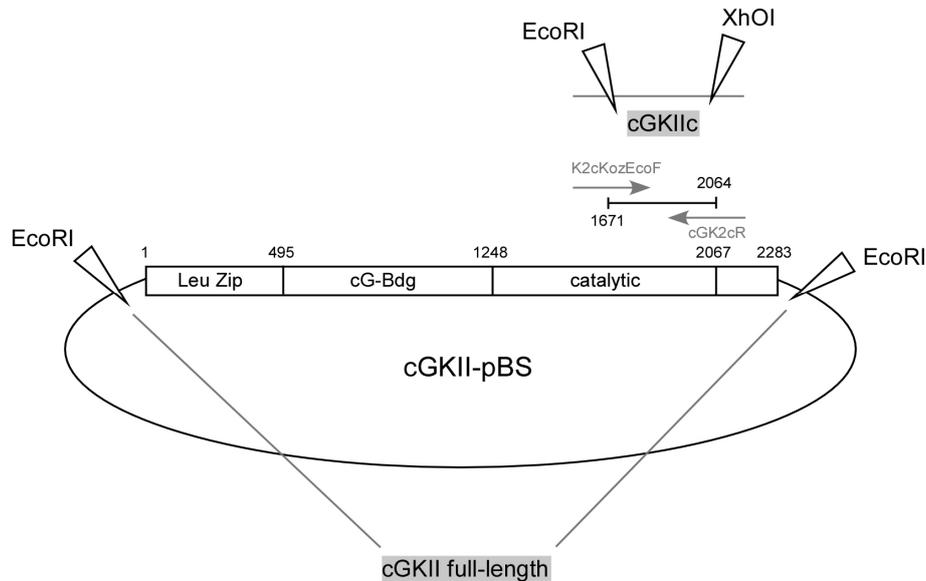


Abbildung 19: Klonierung der cGKII-Baits.

Schematische Darstellung der Klonierungen des cGKIIc-Baits und des cGKII-full-length-Baits basierend auf dem ursprünglichen Konstrukt cGKII-pBS.

Für weitere Untersuchungen im Y2H wurde auch eine full-length-Variante kloniert: Dazu wurde die gesamte cGKII mit EcoRI aus dem vorhandenen full-length-Konstrukt herausgeschnitten, und in pGBKT7 kloniert. Nach Transformation in *E.coli* wurde die richtige Orientierung des Fragments (aufgrund der gleichen Schnittstellen 5' wie 3' war auch die umgekehrte Insertion denkbar) durch einen BamHI-Verdau überprüft. Leserahmen und Sequenz wurde wieder durch Sequenzierung bestätigt. Beide Konstrukte wurden in einer Maxi-Prep amplifiziert.

4.2.3 Vorversuche mit den Baits

Beide pGBKT7-Konstrukte wurden in Vorversuchen in Hefe auf ihre Autoaktivierungs-Aktivität getestet. Für die verwendeten Baits muss ausgeschlossen werden, dass sie selbst bereits das Y2H-System aktivieren bzw. durch Toxizität das Wachstum der Hefen inhibieren.

Dazu wurden beide mit dem leeren Preyvektor pGADT7 in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert und auf SD/-Leu/-Trp-Agarplatten ausgestrichen. Durch die Aufnahme der Vektoren sollten die Hefen in der Lage sein, wie die Positivkontrolle, auf dem Mangelmedium zu wachsen. Die Toxizität eines Baits würde sich in vermindertem oder komplett inhibiertem Wachstum zeigen. Darüber hinaus wurden die kontransformierten Hefen auf SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp +/- X- α -Gal ausplattiert, um ihre Autoaktivierungs-Aktivität zu testen. Sollte die Expression eines Baits bereits das System autoaktivieren, so würde das durch auxotrophes Wachstum und eventuell auch α -Galaktosidaseaktivität angezeigt werden.



Abbildung 20: Autoaktivierungs-Test der verwendeten Baits.

Test auf Toxizität auf SD/-Leu/-Trp, Test auf Autoaktivierung der Galaktosidase auf SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp + X- α -Gal; rechts: Positivkontrolle des Y2H; sie zeigt den Hefe-Phänotypen, der im Falle positiver und spezifischer Interaktion zweier Proteine, in diesem Fall von p53 und SV40, entsteht. Die Hefen wachsen auxotroph auf Selektionsmedium und sezernieren α -Galaktosidase.

Beide Konstrukte zeigten weder Toxizität (SD/-Leu/-Trp) noch Autoaktivierungs-Aktivität (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp + X- α -Gal) und konnten daher in den folgenden Assays verwendet werden.

4.2.4 Yeast-Two-Hybrid-Screen

Der Screen wurde durch sequentielle Transformation gestartet und die auf Selektionsmedium erhaltenen Klone gepickt. Insgesamt wurden 161 Klone gepickt, wovon 59 nach dem Umsetzen auf X- α -Gal-haltige Selektionsplatten eine spezifische Blaufärbung zeigten. Diese 48 Klone wurden der DNA-Extraktion unterzogen und die erhaltene Plasmid-DNA in *E. coli* transformiert.

Die aus *E.coli* gewonnene Plasmid-DNA wurde per Restriktionsanalyse untersucht, um die Fragmentgröße der insertierten cDNA zu bestimmen. Die Insertgrößen lagen bei den meisten Klonen zwischen 300 und 3000 bp. Die Klone, bei denen per Restriktionsanalyse kein Insert detektiert werden konnte, wurden verworfen, alle restlichen dem Re-Screen unterzogen. Nach dem Re-Screen auf SD/-His/-Leu/-Trp X- α -Gal blieben 27 Klone übrig, deren Identität durch Sequenzierung bestimmt wurde.

Die folgende Tabelle bietet eine Übersicht der erhaltenen 27 Klone:

Tabelle 7: Übersicht über die Klone des Yeast-Two-Hybrid-Screens.

BLASTN 2.2.1.1-Abgleich mit den Gen-Datenbanken GenBank, EMBL, DDBJ, PDB.

Klon	Insertgröße [bp]	Accession-Nr.	Identität	Leserahmen
7	950	NM_007953	Estrogen related receptor alpha	falsch
8	1200	NM_016874	Deformed epidermal autoregulatory factor	richtig
11	1100	NM_008212	Hydroxyacyl-Co A- Dehydrogenase (short chain)	falsch
13	300, 800	AF375597	Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (med.chain)	richtig
19	1000	NM_172695	Phospholipase A2 activating protein (PLAA)	richtig
21	1500	NM_028072	Sulfatase 2	richtig
22	1000	BC006606	Protein Phosphatase 2 subunit A (PR65)	richtig
64	2000	BC053066	Adaptor-related protein complex 3	richtig
92	1500	-	-	
98	480	AB086819	Resistin-like molecule gamma	falsch
100	350, 750, 1100	-	-	
105	350, 800	-	-	
120	800, 1200, 2000	NM_010271	Glycerol-3-phosphat dehydrogenase 1	richtig
124	900	XM_111232	FGAR Amidotransferase	richtig
125	1700	-	-	
128	600	BC058258	Mitogen activated protein kinase 1 (ERK2)	richtig
132	1500	-	-	
142	300	-	-	
148	300	-	-	

Die in grau unterlegten Klone 19, 22 und 128 wurden für die weiteren Studien ausgewählt und werden im Folgenden kurz charakterisiert.

Klon 19 enthielt ein 1000 bp Fragment des **Phospholipase A2 aktivierenden Proteins** (PLAA = phospholipase A2 activating protein). PLAA reguliert die Aktivität der Phospholipase und spielt somit eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel der Zelle. Ein wesentlicher Aspekt in der Differenzierung ist die Bildung von Lipidvesikeln in der Zelle.

Die potentielle Interaktion könnte einen Zusammenhang zwischen cGMP-Signalweg, Lipidstoffwechsel und dem Differenzierungsprozeß der Adipozyten herstellen.

Im **Klon 22** fand sich ein 1000 bp großes Fragment der **Proteinphosphatase PP2A** Untereinheit A (**PR65**). PP2A stellt eine der wichtigsten Serin-/Threonin-Phosphatasen der Zelle dar¹⁰⁷. Ihre Interaktion mit PDE3b, einer in Adipozyten exprimierten cGMP-hydrolysierenden Phosphodiesterase, wurde bereits 1999 beschrieben¹⁰⁸.

Klon 128 enthielt ein 600 bp Fragment der zur Familie der MAP Kinasen gehörenden **ERK2** (ERK2 = extracellular regulated protein kinase 2). MAP Kinasen sind an vielfältigen Prozessen in der Zelle beteiligt, dazu gehören im Besonderen Proliferations- und Differenzierungsprozesse. Eine Interaktion zwischen cGKII und ERK2 könnte eine potentielle Verbindung zwischen cGMP-Signalweg und der Transkriptionskontrolle während der Differenzierung darstellen.

4.3 PR65

PR65 ist eine Untereinheit der ubiquitären Proteinphosphatase PP2A. PP2A ist eine der wichtigsten Serin-/Threoninkinasen der Zelle¹⁰⁹. PR65 übernimmt dabei die Aufgabe eines Strukturproteins, auf dessen Basis katalytische und regulatorische Untereinheiten der Phosphatase zu Heterotrimeren aufgebaut werden¹¹⁰. Die dabei eingebauten regulatorischen Proteinuntereinheiten sind variabel, verleihen der Phosphatase unterschiedliche Substratspezifität und bestimmen ihre Lokalisation¹¹¹. Es gibt Hinweise, dass PP2A an der Regulation zweier Ionenkanäle beteiligt ist, die durch cGMP-abhängige Kinasen aktiviert werden (CFTR- und Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanal)^{112,113}. PR65 interagiert spezifisch mit der regulatorischen Domäne des CFTR-Kanals und dephosphoryliert diesen *in vitro*¹¹². Der mesangiale Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanal (BK_{Ca}) wird durch ein enzymatisches Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung durch die cGMP-Kinase und Dephosphorylierung durch PP2A reguliert¹¹³.

4.3.1 Klonierung von PR65

Im Klon 22 fand sich der C-Terminus von PR65, einer Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (PP2A):

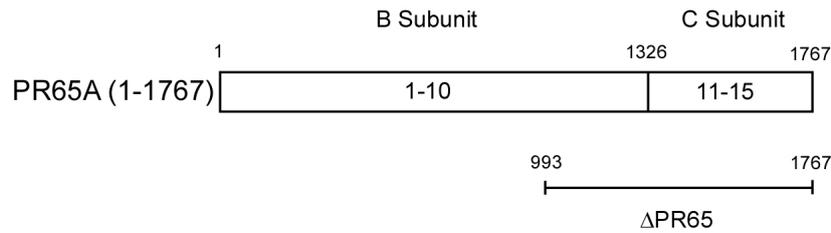


Abbildung 21: cDNA Schema von PR65A.

B Subunit: B Untereinheit, C Subunit: C Untereinheit, 1-10 bzw. 11-15: HEAT-Motive¹¹⁴.

Die Klonierung des full-length-Konstrukts, sowie weiterer Trunkationsmutanten erfolgte aus dem Original PR65-pCS2+ (pBTM116), das freundlicherweise von Dr. David Virshup bereitgestellt wurde¹¹⁴, sowie durch PCR-Amplifikation. Im Folgenden ist zur Vereinfachung eine Klonierungsübersicht der verschiedenen Preys dargestellt. Die Schnittstellen der Inserts finden sich jeweils am 3' bzw. 5'-Ende, der entsprechend linearisierte Prey-Vektor steht in der rechten Spalte.

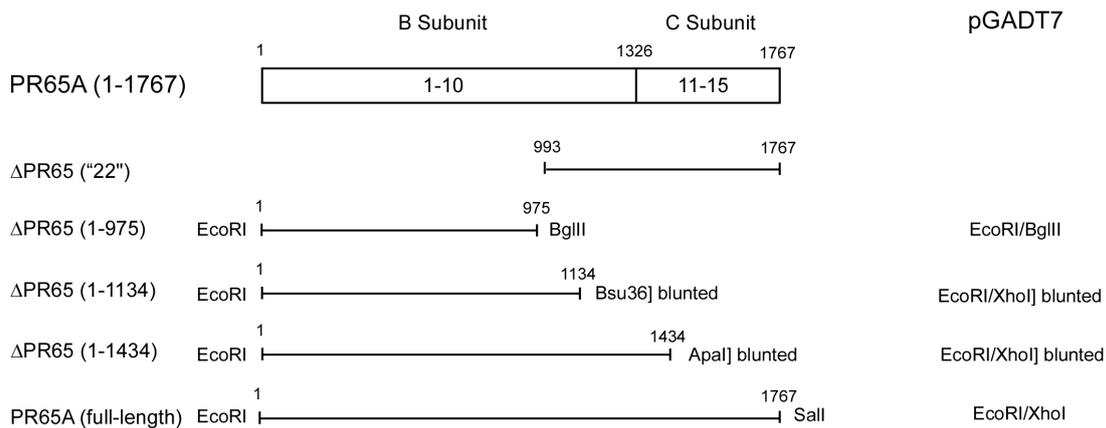


Abbildung 22: Klonierungsschema der N-terminalen PR65-Trunkationen.

Dargestellt sind die entsprechenden mRNA-Fragmente und die zur Klonierung verwendeten N- und C-terminalen Restriktionsendonukleasen (blunted = die entsprechende Schnittstelle wurde unter Einsatz der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und im Falle der Inserts zusätzlich mit der T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert).

Das Fragment ΔPR65(1-975) wurde durch parallelen Restriktionsverdau des Originalkonstrukts mit EcoRI und BglII erhalten und in den EcoRI/BglII-geöffneten pGADT7 ligiert. Das nächstlängere Fragment ΔPR65(1-1134) wurde zunächst C-terminal mit Bsu36I herausgeschnitten und "gebluntet". Unter Verwendung der N-terminalen EcoRI-Schnittstelle wurde ΔPR65(1-1134) dann in den ebenfalls C-terminal geglätteten pGADT7 über EcoRI/XhoI(blunted) inseriert. Das dritte Trunkationskonstrukt wurde ähnlich, nämlich über eine C-terminale, "gebluntete" ApaI-Schnittstelle in den EcoRI/XhoI(blunted) pGADT7 ligiert. Des Weiteren wurde sowohl das im Y2H erhaltene PR65-Fragment, sowie die full-length-cDNA

in den Baitvektor pGBKT7 kloniert. Ersteres konnte leicht durch Verwendung der „Bibliotheks“-Schnittstellen EcoRI/XhoI in den mit EcoRI/SalI geöffneten pGBKT7 umklont werden. Das zweite wurde durch EcoRI und SalI aus dem Originalkonstrukt geschnitten und nach Aufreinigung in den mit EcoRI/SalI geöffneten Baitvektor ligiert.

4.3.2 Interaktionsstudien in Hefe

Sowohl der im Hefe-Screen ermittelte, als auch die im Re-Screen erhaltenen homologen Klone, zeigen spezifische α - und β -Galaktosidaseaktivität. Dazu wurden die entsprechenden Klone auf Selektionsmedium und X- α -Gal-haltigem Medium ausplattiert.

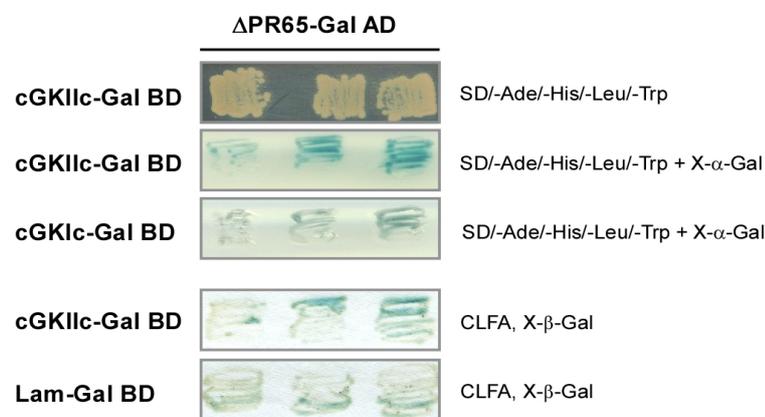


Abbildung 23: Interaktion zwischen PR65 und cGKII in Hefe.

Auxotrophes Wachstum auf Selektionsmedium (SD/-Ade/-His/Leu/-Trp und spezifische α - und β -Galaktosidase-Aktivität (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp + X- α -Gal bzw. CLFA), cGKIIC: katalytische Domäne cGKII, cGKIc: katalytische Domäne cGKI, Lam: Lamin C, Negativkontrolle des Systems (keine Interaktion mit anderen Proteinen bekannt).

Ihr auxotrophes Wachstum und die Blaufärbung ihrer Kolonien beweist die spezifische Interaktion zwischen Δ PR65 und cGKIIC in Hefe. Die Untersuchung der β -Galaktosidaseaktivität in einem Colony Lift Filter Assay untermauerte diesen Befund, da die Negativkontrolle keinerlei Blaufärbung zeigte. Um die Spezifität der Interaktion in einem weiteren Assay zu verifizieren, wurde Klon 22 einem ONPG-Assay unterzogen. Der Assay bestätigte die spezifische Interaktion zwischen cGKIIC und Δ PR65. Im Vergleich zur Negativkontrolle war eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität messbar.

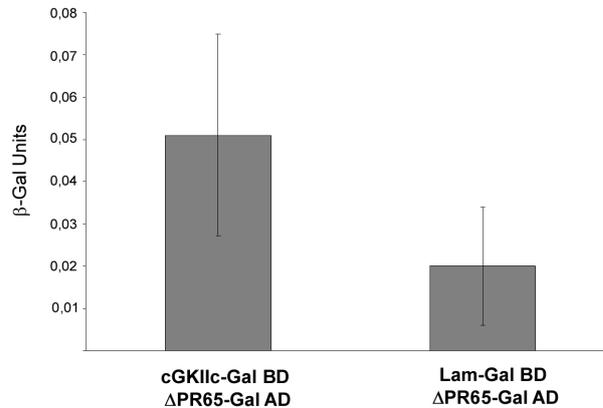


Abbildung 24: Interaktion zwischen PR65 und cGKII in Hefe.

ONPG-Assay zur spezifischen Interaktion zwischen cGKIIC als Bait und ΔPR65 als Prey (n=3 +/- S.E.M.). Dazu wurden Lysate der entsprechend transformierten Hefen einem ONPG-Assay unterzogen. Durch die Interaktion zwischen ΔPR65 und cGKIIC wird β-Galaktosidase exprimiert, die wiederum durch Hydrolyse von ONPG gelbes o-Nitrophenol entstehen lässt. Im Vergleich zur Negativkontrolle (Interaktion zwischen Lamin C und ΔPR65) wurde eine erhöhte Nitrophenol-Bildung nachgewiesen. Die Quantifizierung des freiwerdenden Nitrophenols erfolgte durch photometrische Messung bei 540 nm.

Aufgrund dieser vielversprechenden Resultate wurde als nächstes versucht, die Interaktion per Co-Immunopräzipitation nachzuweisen. Parallel wurden die Trunktionsmutanten von PR65 kloniert und in einem ersten ONPG-Assay (mit Kontrollen) auf ihre spezifische Interaktion mit cGKII getestet.

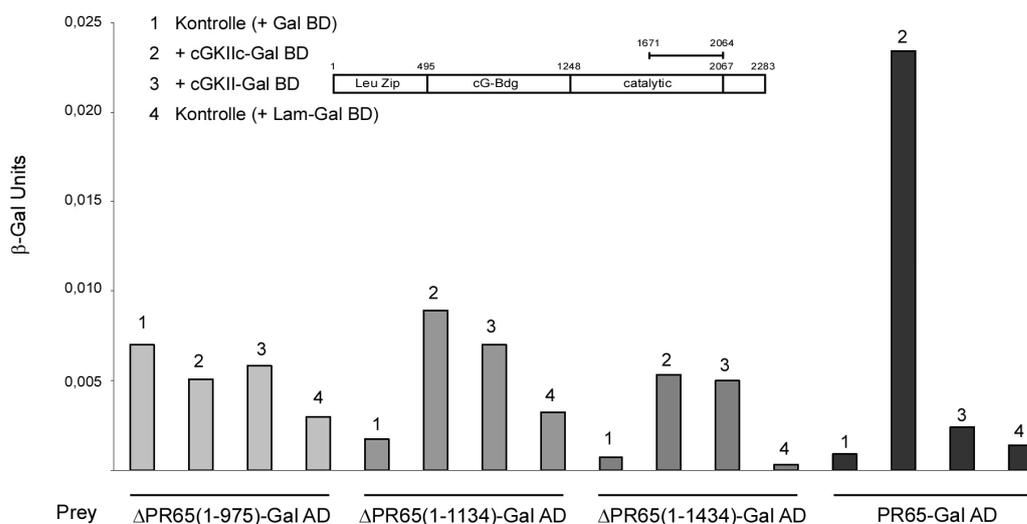


Abbildung 25: Interaktion zwischen PR65 und cGKII in Hefe.

ONPG-Assay (n=1) zur Interaktion zwischen drei Trunktionsmutanten und der full-length-Version von PR65 und cGKIIC/cGKII (jeweils Säulen 2 und 3). Dargestellt sind auch die dazugehörigen Kontrollen (jeweils Säulen 1 und 4).

Diese ersten Daten bestätigten das Ergebnis des Y2H, und deuteten darauf hin, dass der C-Terminus von PR65 eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit cGKII spielen könnte. Sämtliche Trunkationen zeigten ein verringertes Interaktionspotential im Vergleich zum full-length-PR65-Konstrukt. Dieser Effekt war sowohl mit der trunkierten cGKIIC („2“ in Abbildung 25) als auch mit der full-length-cGKII („3“ in Abbildung 25) zu beobachten. Die Interaktion zwischen PR65 und cGKII schien demnach hauptsächlich über den C-Terminus von PR65 vermittelt zu werden.

4.3.3 Pulldown-Assays

Als nächstes sollte die Interaktion von PR65 mit cGKII durch Immunpräzipitation (Pulldown-Assays) untersucht werden. Für diese Versuche wurde ein pcDNA3.1-PR65-mycHis-Konstrukt und ein C-terminal-fusioniertes cGKII-FLAG-Expressionsplasmid verwendet.

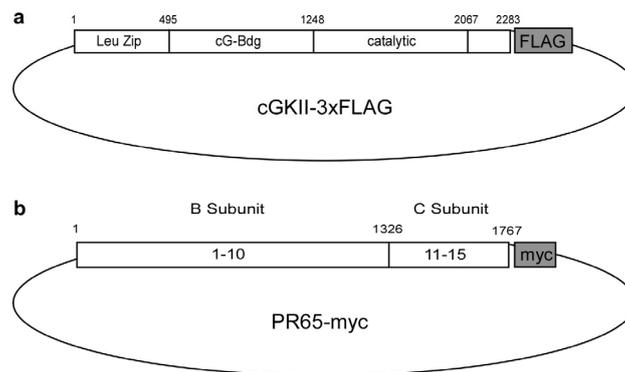


Abbildung 26: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskonstrukte.

a, „cGKII-3xFLAG“ für cGKII-3xFLAG in einem Expressionsvektor mit CMV-Promoter

b, „PR65-myc“ für pcDNA3.1-PR65-myc.

Zur Expression der Konstrukte wurden HEK Zellen mit den Konstrukten transfektiert und die Fusionsproteine für 24 Stunden exprimiert. HEK Zellen exprimieren endogen keine cGKII. Nach Lyse der Zellen wurde die cGKII anhand ihres 3xFLAG-Tags präzipitiert und versucht, sowohl überexprimiertes, als auch endogenes PR65 (~ 65 kd) im Western Blot zu detektieren.

Über die Art und Weise der Aktivierung sowie die genaue Zuordnung, welche Lipasen aktiviert werden, herrscht noch Unklarheit. Es gibt Hinweise, dass einige Subtypen der Phospholipase A2 die Differenzierung von Präadipozyten beeinflussen¹¹⁶.

4.4.1 Klonierung von PLAA

Der im Y2H-Screen erhaltene Klon 19 enthielt, wie die Sequenzierung zeigte, einen 1295 bp großen Bereich aus der Mitte der full-length-cDNA:

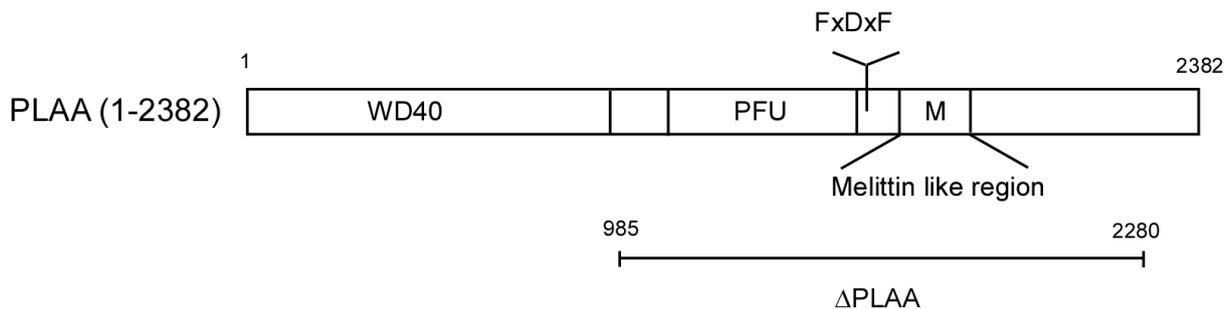


Abbildung 28: cDNA Schema von PLAA.

WD40: WD40 repeat motif, PFU: PLAA family ubiquitin binding, FxDxF: FxDxF motif, M: melittin like region^{117, 118, 119, 120}.

Die Klonierung eines full-length-PLAA-Konstrukts gelang durch PCR-Amplifikation aus braunem Fettgewebe. Die verwendeten Primer mPLAA_KpnI_for und mPLAA_EcoRI_rev lieferten nach PCR auf BAT-cDNA das gewünschte ca. 2300 bp große Fragment. Dieses wurde nun nach präparativer Agarosegelelektrophorese mit KpnI bzw. Acc65I (Isoschizomer KpnI) und EcoRI restringiert. Der Zielvektor pcDNA3.1mycHis wurde ebenfalls mit Acc65I und EcoRI linearisiert. Nach erfolgreicher Ligation, Transformation und Mini-Prep wurde die Richtigkeit der Sequenz per Restriktionsanalyse und Sequenzierung nachgewiesen.

Aus diesem wiederum konnte die PLAA cDNA in zwei weitere Expressionsvektoren kloniert werden. PLAA wurde mittels Acc65I (blunted) und XhoI in einen mit BamHI (blunted) und XhoI geöffneten Expressionsvektor (C-terminales myc-Tag), sowie in den mit HindIII (blunted) und Sall linearisierten pFLAG-CMV2 eingeschleust. Auch hier wurde die Richtigkeit der Sequenz per Restriktionsanalyse und Sequenzierung belegt.

4.4.2 Interaktionsstudien in Hefe

Der im Y2H erhaltene Klon 19, sowie die homologen, im Rescreen erzeugten Klone, zeigten eine spezifische Interaktion in Hefe. Sie konnte durch auxotrophes Wachstum, sowie durch eine starke α -Galaktosidaseaktivität detektiert werden.

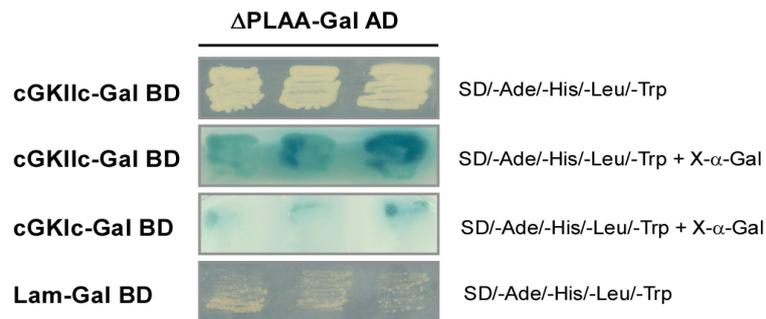


Abbildung 29: Interaktion zwischen PLAA und cGKII in Hefe.

Auxotrophes Wachstum auf Selektionsmedium und spezifische Galaktosidase-Aktivität. cGKIIc und Δ PLAA interagieren spezifisch miteinander, wie der Vergleich mit der Negativkontrolle des Systems (Lam: Lamin C) zeigt. Die Interaktion zwischen cGKIIc und Δ PLAA ist sehr schwach im Vergleich zu GKIIC und Δ PLAA.

Um die Spezifität der Interaktion zwischen PLAA und cGKII näher zu analysieren, wurde die resultierende β -Galaktosidaseaktivität im ONPG-Assay bestimmt. Das Ergebnis verifiziert die spezifische Interaktion in Hefe: Die β -Galaktosidaseaktivität ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht.

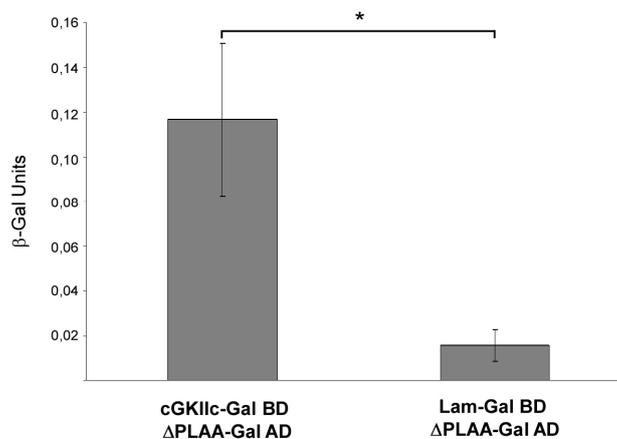


Abbildung 30: Interaktion zwischen PLAA und cGKII in Hefe.

ONPG-Assay zur spezifischen Interaktion zwischen cGKIIc als Bait und Δ PLAA als Prey. ($n=3$ +/- S.E.M., * $p > 0,05$, Erläuterungen s. Abbildung 24).

4.4.3 Pulldown-Assays

Für diese Versuche wurde das erwähnte pFLAG-CMV2-PLAA-Konstrukt, sowie die cGKII in Form der C-terminal-fusionierten cGKII-HA und cGKII-myc verwendet, mit einem HA- bzw. myc-Tag .

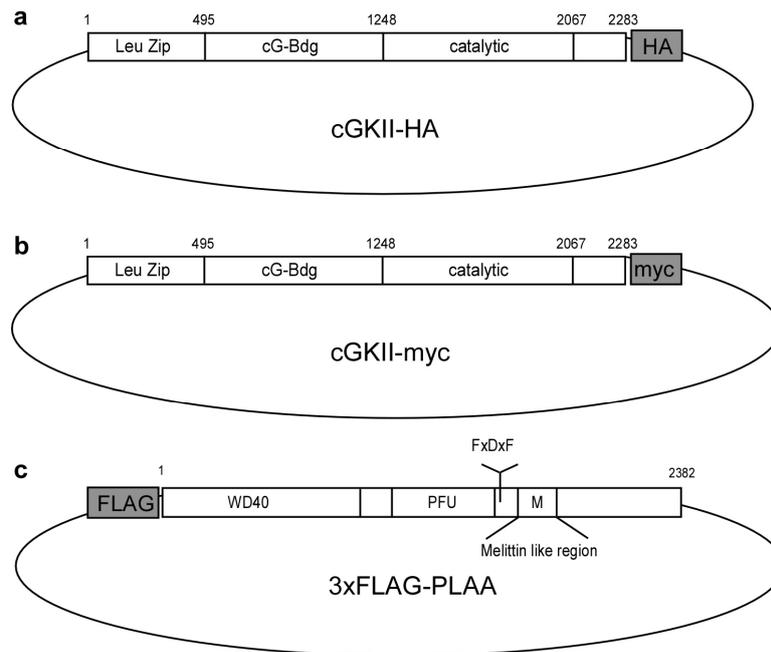


Abbildung 31: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskonstrukte.

a, „cGKII-HA“ für cGKII-HA in einem Expressionsvektor mit CMV-Promoter,
b, „cGKII-myc“ für cGKII-myc in einem Expressionsvektor mit CMV-Promoter,
c, „3xFLAG-PLAA“ für pFLAG-CMV2-PLAA.

Die Konstrukte wurden, jeweils einzeln und in Ko-Transfektion, transient transfektiert und die Fusionsproteine für 24 Stunden koexprimiert. Zunächst wurde versucht, die cGKII anhand ihres HA-Tags zu präzipitieren und die PLAA (~ 75 kD) mittels ihres FLAG-Tags im Western Blot zu detektieren.

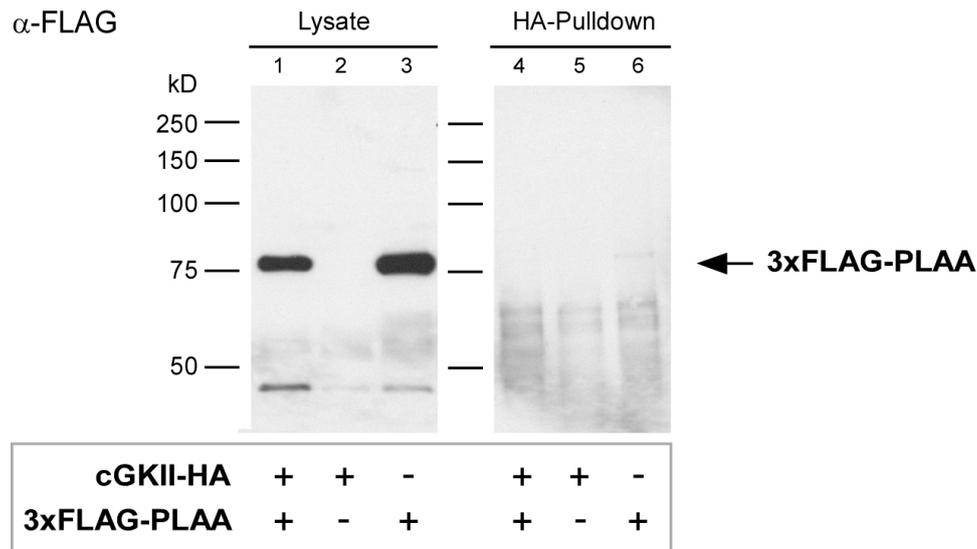


Abbildung 32: Pulldown von cGKII und PLAA aus transfektierten HEK Zellen.

Der HA-Pulldown wurde mit 1 mg Totalprotein durchgeführt. Dargestellt ist der anschließende Western Blot mit α -FLAG-Antikörper. Die Überexpression des 3xFLAG-PLAA ist in Lane 1 und 3 deutlich zu erkennen (Lanes 1-3 = 10 μ g Totalprotein zur Expressionskontrolle, Lane 4 = Pulldown, Lane 5+6 = Kontrollen f. 4).

Die Expression der 3xFLAG-PLAA ist in den Lysaten deutlich zu erkennen (s. Abbildung 32, Lanes 1 und 3). Sie konnte dennoch nicht auf diese Weise, auch nicht nach Variation von Wasch- und Inkubationsbedingungen, co-präzipitiert werden (s. Abbildung 32, Lane 4). Im nächsten Pulldown wurde die Präzipitation über das cGKII-myc-Fusionsprotein versucht.

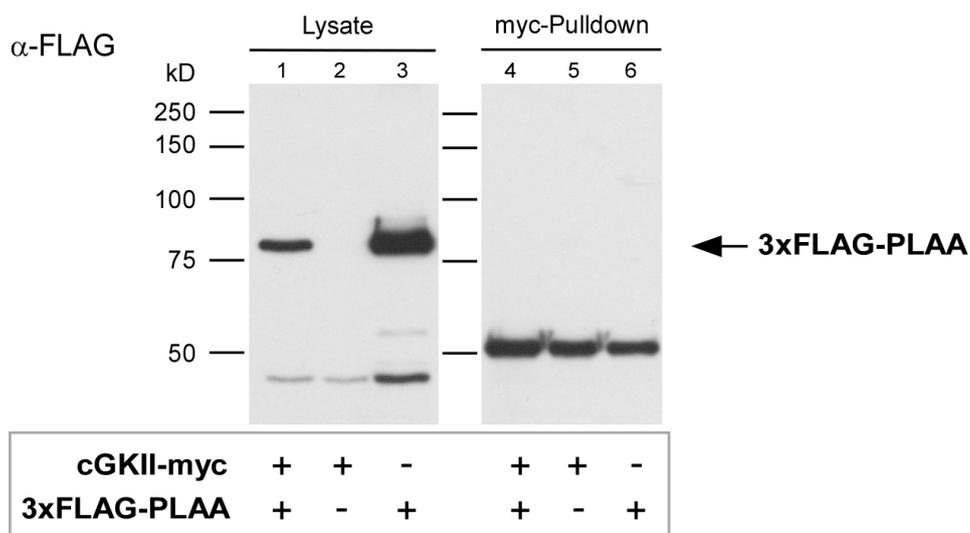


Abbildung 33: Pulldown von cGKII und PLAA aus transfektierten HEK Zellen.

Der myc-Pulldown wurde mit 1 mg Totalprotein durchgeführt. Dargestellt ist der anschließende Western Blot mit α -FLAG-Antikörper. Die Überexpression des 3xFLAG-PLAA ist in Lane 1 und 3 deutlich zu erkennen (Lanes 1-3 = 10 μ g Totalprotein zur Expressionskontrolle, Lane 4 = Pulldown, Lane 5+6 = Kontrollen f. 4).

In den Lanes 1 und 3 in Abbildung 33 ist die Überexpression des PLAA-Konstruktes deutlich zu erkennen. Die Ko-Präzipitation von cGKII-myc und PLAA-3x-FLAG gelang auch über dieses Tag nicht (s. Abbildung 33, Lane 4). Als nächste Möglichkeit wurde der Pulldown mittels eines FLAG-Tags (3xFLAG-PLAA) versucht.

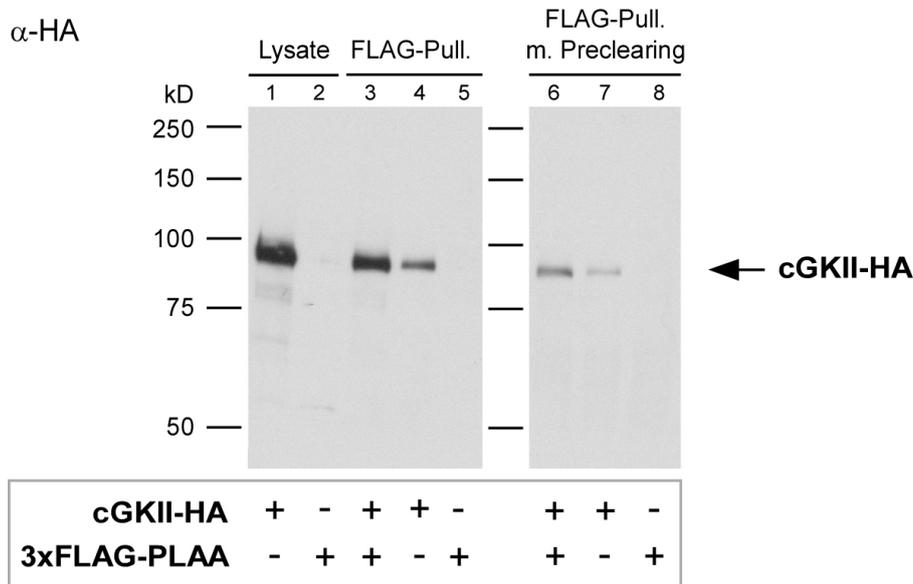


Abbildung 34: Pulldown von cGKII und PLAA aus transfektierten HEK Zellen.

Der FLAG-Pulldown wurde mit 1 mg Totalprotein durchgeführt. Dargestellt ist der anschließende Western Blot mit α -HA-Antikörper. Zusätzlich wurde in diesem Versuch ein Preclearing durchgeführt (Lanes 6-8). In den Lanes 3 und 6 ist die co-präzipitierte cGKII-HA deutlich zu erkennen. Die in Lane 4 sichtbare unspezifische Interaktion zwischen cGKII-HA und den FLAG-beads konnte auch durch ein Preclearing nicht unterbunden werden (Lane 7). (Lanes 1+2 = 10 μ g Totalprotein zur Expressionskontrolle, Lane 3 = Pulldown, Lane 4+5 = Kontrollen f. 4, Lane 6 = Pulldown nach Preclearing, Lane 7+8 = Kontrollen f. 6).

Dazu wurden HEK-Zellen wie beschrieben mit pFLAGCMV2-PLAA und cGKII-HA transfektiert und für einen FLAG-Pulldown verwendet. Tatsächlich konnte nun die co-präzipitierte cGKII anhand ihres HA-Tags detektiert werden (Lane 3 und 6). Trotz verschiedener Änderungen im Protokoll, wie z.B. längeres Waschen oder kürzere Inkubationszeit, konnte die unspezifische Präzipitation der cGKII-HA nicht unterbunden werden (Lane 4 und 7). Das in der Abbildung 34 dargestellte Preclearing verbesserte das Resultat nicht (Lane 7). Der Versuch einer endogenen Co-Immunopräzipitation scheiterte am nicht erhältlichen Antikörper für PLAA, so dass momentan nur Pulldown-Assays und die Detektion eines PLAA-Fusionsproteins möglich sind.

4.4.4 Erste Untersuchungen zur *in vitro* Phospholipase-Aktivität

Parallel zu den Co-Immunoprecipitationsversuchen wurde die *in vitro* Phospholipase-Aktivität untersucht. Dazu wurden wt und cGKII-ko BAT aus braunem Fettgewebe isoliert und ihre Lysate in einem Phospholipase-Aktivitäts-Assay eingesetzt.

Beim Phospholipase-Aktivitäts-Assay handelt es sich um einen UV-spektrometrischen Assay, in welchem die Umsetzung eines Substrats durch Phospholipase anhand des entstehenden, fluoreszierenden Spaltprodukts quantifiziert werden kann. Die Versuche wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Lehr der Universität Münster an den Lysaten durchgeführt. Die Daten wurden in Form von Spektren übermittelt.

Es galt, einen möglichen Unterschied in der Phospholipase-Aktivität von wt und cGKII-/- BAT zu detektieren, der auf die spezifische Interaktion von cGKII und PLAA zurückzuführen ist. Und tatsächlich zeigten diese ersten, preliminären Untersuchungen einen signifikanten Unterschied im basalen Aktivitäts-Level der Phospholipase.

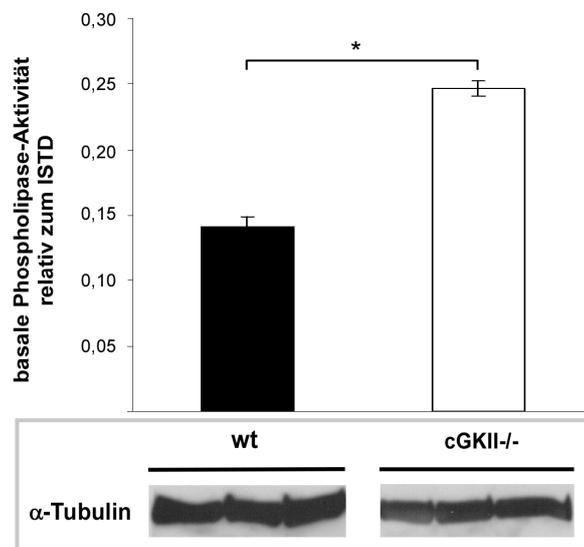


Abbildung 35: Auswertung der Phospholipase-Aktivitäts-Assay.

Dargestellt ist die statistische Auswertung von drei Phospholipase-Aktivitäts-Assays (oben). Darunter ist ein α -Tubulin-Western der verwendeten Lysate abgebildet. Alle sechs Lysate waren demnach von gleicher Konzentration. Diese Kontrolle wurde zusätzlich zur Bradford-Quantifizierung durchgeführt. (n=3 +/- S.E.M., * p > 0,0005).

Die Phospholipase-Aktivität ist in den cGKII-Knockout-Lysaten signifikant erhöht. Der gezeigte α -Tubulin-Western Blot belegt zusätzlich zum Bradford-Assay, dass die gleichen Mengen Totalprotein im Aktivitäts-Assay eingesetzt wurden. Die dazugehörigen spektrometrischen Rohdaten sollen an dieser Stelle nur exemplarisch dargestellt werden.

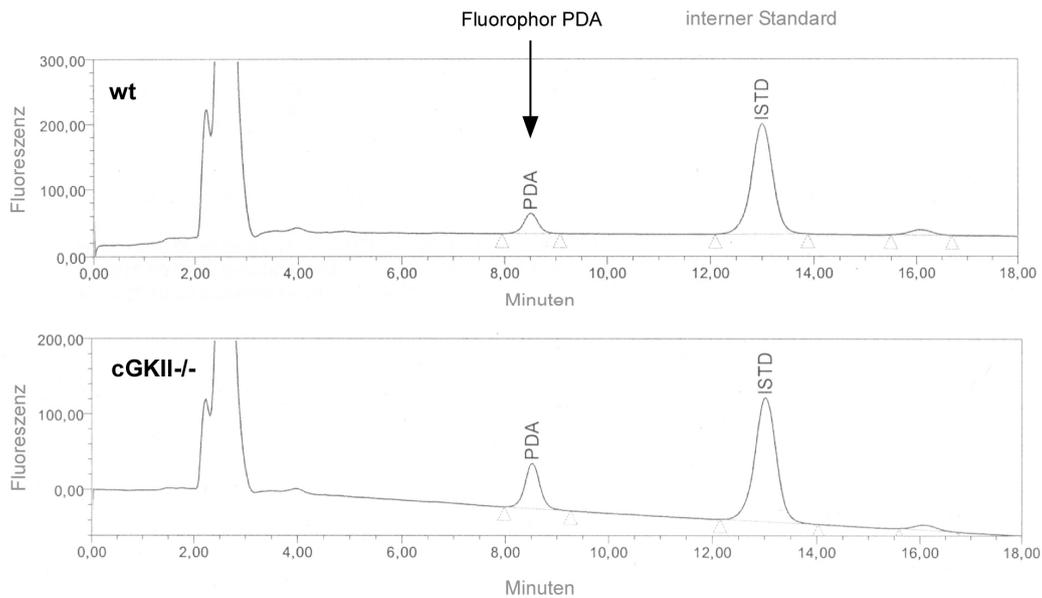


Abbildung 36: Fluoreszenz-Spektrogramme, AG Lehr, Münster.

Bei den Abbildungen handelt es sich exemplarisch dargestellte Fluoreszenz-Spektrogramme für die Phospholipase-Aktivität von wt und cGKII^{-/-} BAT Lysaten.

Der Assay misst die Aktivität der Phospholipase cPLA₂. Da mehrere PLA₂s bekannt und in Fettzellen exprimiert sind¹¹⁶, kann der Assay nicht spezifisch die Aktivität der durch PLAP aktivierten PLA₂ widerspiegeln. Es handelt sich um präliminäre Daten, die durch weitere Untersuchungen untermauert werden müssen.

4.5 ERK2

Die Serin-/Threoninkinase ERK2 (ERK = extracellular signal regulated kinase) gehört zur in Eukaryoten ubiquitär exprimierten Familie der MAP-Kinasen und ist Teil der MAPK-Signalkaskade¹²¹. Extrazelluläre Signale stimulieren ERK2 vom Cytoplasma in den Zellkern zu wandern. Die Aktivität der Kinase hängt vom eigenen Phosphorylierungszustand und der Interaktion mit sog. Ankerproteinen ab. Erst die Phosphorylierung von ERK2 löst die Kinase aus der Verankerung im Cytosol und ermöglicht nach Homodimerisierung die aktive Translokation¹²². ERK2 seinerseits phosphoryliert Substrate im Cytoplasma wie auch im Kern^{123,124}. Es existieren verschiedene Hinweise, dass ERK2 eine Rolle in der Differenzierung und/oder Proliferation von Präadipozyten spielt. Eine direkte Interaktion mit einem Effektorprotein der NO-cGMP-Kaskade ist bisher nicht beschrieben.

4.5.1 Klonierung von ERK2

Die vollständige Sequenzierung des im Y2H erhaltenen Klons 128 ergab folgendes cDNA Schema:

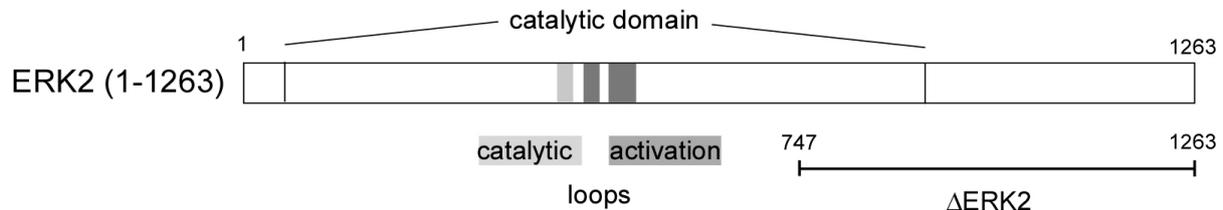


Abbildung 37: cDNA Schema von ERK2

Catalytic domain: katalytische Domäne, catalytic/activation loops: katalytische und aktivierende Subdomänen.

Die PCR-Amplifikation mit den Primern mERK2_ATG_for und mERK2_XhoI_rev auf cDNA aus MSCs ergab ein 1263 bp Fragment. Die Primer enthalten Schnittstellen für BamHI (N-Terminus) und XhoI (C-Terminus), so dass die cDNA von ERK2 nach sequentiellem Restriktionsverdau mit BamHI und XhoI in den zuvor linearisierten Preyvektor pGADT7 eingeschleust werden konnte. Die Richtigkeit der Klonierung wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt. Darüber hinaus stand ein durch Dr. Melanie Cobb mir zur Verfügung gestelltes Konstrukt bereit, das ERK2 aus *rattus norvegicus* im p3xFLAG-CMV7.1 enthielt. Die Aminosäuresequenzen von ERK2 aus *mus musculus* und *rattus norvegicus* sind identisch. Daher konnte dieses Konstrukt für weitere Untersuchungen mit Mauszellen verwendet werden.

4.5.2 Interaktionsstudien in Hefe

Sowohl der im Y2H-Screen erhaltene Klon 128, wie auch die im Re-Screen erhaltenen homologen Klone, zeigten eine spezifische Interaktion zwischen der katalytischen Domäne der cGKII und dem C-terminalen Fragment von ERK2 (abgebildet ist der Ausstrich eines Klons aus dem Re-Screen).

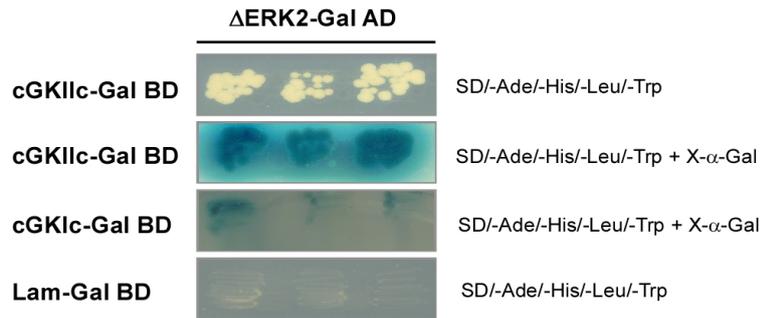


Abbildung 38: Interaktion zwischen ERK2 und cGKII in Hefe.

Auxotrophes Wachstum auf Selektionsmedium und spezifische Galaktosidase-Aktivität.

cGKIIC und Δ ERK2 interagieren spezifisch miteinander, wie der Vergleich mit der Negativkontrolle des Systems (Lam: Lamin C) zeigt. Die Interaktion zwischen cGKIIC und Δ ERK2 ist sehr schwach im Vergleich zu cGKIIC und Δ ERK2.

Um die Spezifität der Interaktion zwischen ERK2 und cGKII genauer zu untersuchen, wurden ONPG-Assays durchgeführt. Das Resultat des ONPG-Assays zeigt die spezifische Interaktion zwischen Δ ERK2 und der katalytischen Domäne der cGKII.

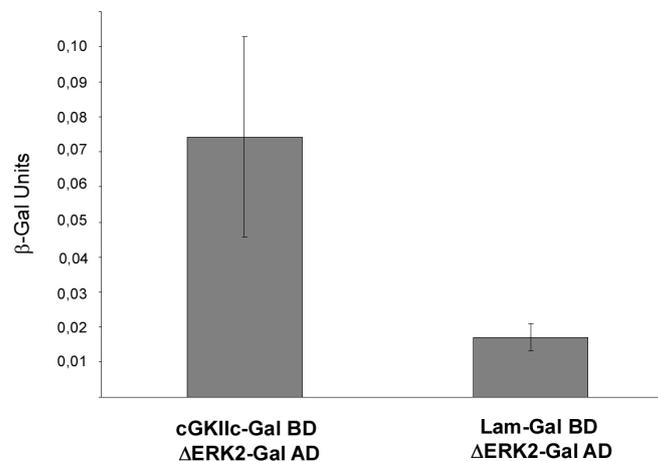


Abbildung 39: Interaktion zwischen PR65 und cGKII in Hefe.

ONPG-Assay zur spezifischen Interaktion zwischen cGKIIC als Bait und Δ ERK2 als Prey (n=3 +/- S.E.M., Erläuterungen s. Abbildung 24).

Aus den drei durchgeführten Versuchen resultierte zwar keine Signifikanz, dennoch gaben sie Anlass für die folgenden Versuche, nämlich die Interaktion auch außerhalb des Hefesystems nachzuweisen

4.5.3 Pulldown-Assays

Für diese Versuche wurden die im Folgenden dargestellten Expressionskonstrukte verwendet und transient in HEK Zellen transfektiert. Die cGKII wurde mit einem C-terminalen myc-Tag exprimiert, ERK2 mit einem N-terminalen 3xFLAG-Tag. Als Transfektionskontrolle wurde ein mit dem gleichen Promoter versehenes Konstrukt verwendet, das GFP trägt (CMVgfp).

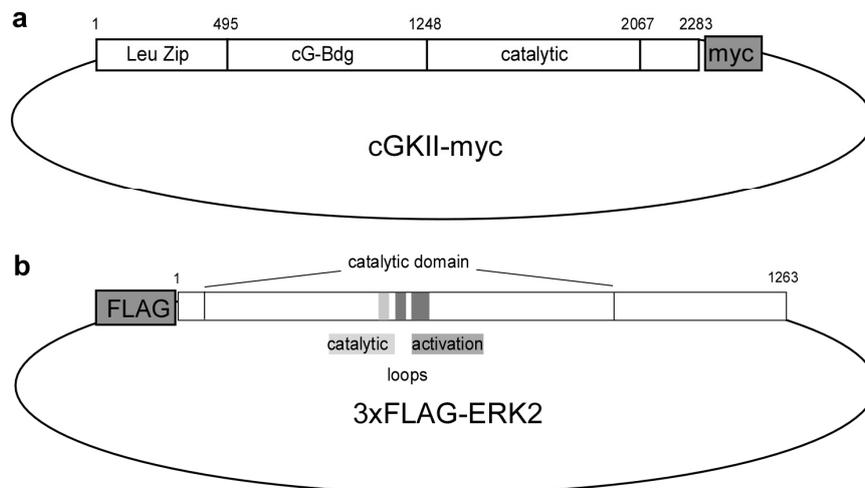


Abbildung 40: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskonstrukte.

a, „cGKII-myc“ für cGKII-myc-Expressionskonstrukt mit CMV-Promoter,
b, „3xFLAG-ERK2“ für p3xFLAG-CMV7.1-ERK2.

Die Fusionsproteine wurden für 24 Stunden in den HEK Zellen exprimiert. Nach Lyse der Zellen folgten die beiden Pulldown-Assays: der FLAG- und der myc-Pulldown. Für den FLAG-Pulldown wurden die Lysate mit FLAG-Beads behandelt und anschließend einem α -myc-Western Blot unterzogen.

In diesem konnte die myc-fusionierte cGKII (86 kD) als spezifischer Interaktionspartner von ERK2 identifiziert werden (s. Abbildung 41, Lane 4).

Die Kontrolle (Lane 5, nur cGKII-myc exprimierend) wies nur eine schwache Bande auf. Es handelt sich offenbar um eine unspezifische Interaktion zwischen der überexprimierten cGKII und den 3xFLAG-beads. Da die cGKII in HEK Zellen nicht endogen exprimiert wird (s. Lane 3, nur 3xFLAG-ERK2 exprimierenden Lysat), wurde im entsprechenden Pulldown ebenfalls keine Bande detektiert.

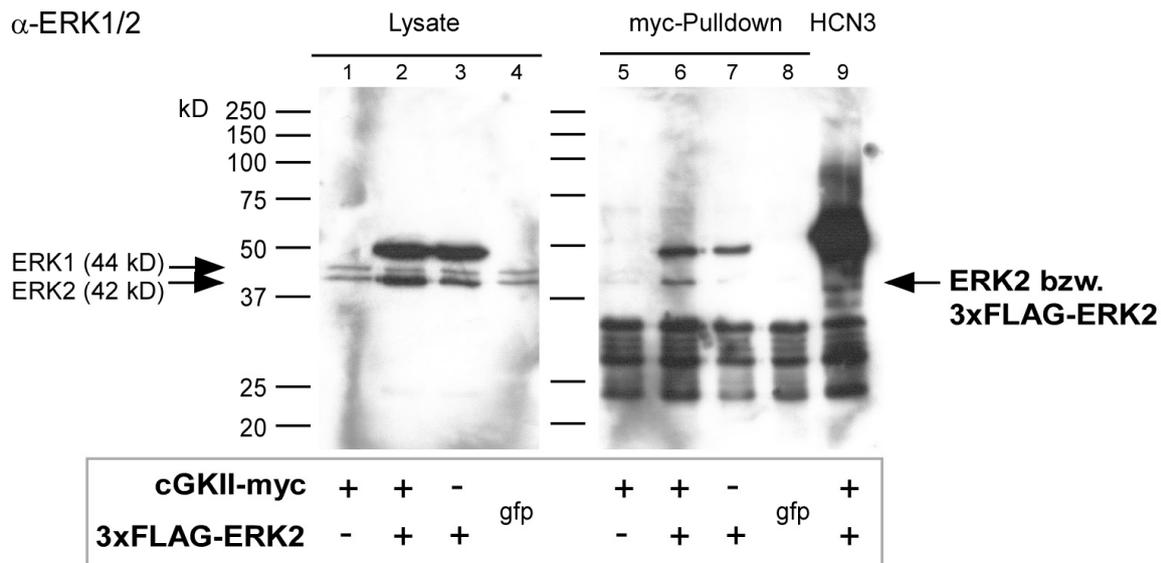


Abbildung 42: Co-Immunopräzipitation von ERK2 und cGKII aus transient transfektierten HEK Zellen.

Der myc-Pulldown wurde mit jeweils 1 mg Totalprotein durchgeführt. Dargestellt ist der α -ERK1/2 Western Blot nach erfolgreichem Pulldown. In Lane 6 ist das co-präzipitierte ERK2 deutlich zu erkennen und durch die Expressionkontrolle in den Lanes 1 bis 4 leicht zu identifizieren. Darüberhinaus zeigt Lane 5, dass auch das endogene ERK2 der HEK Zellen co-präzipitiert wurde (Lanes 1-4 = 10 μ g Totalprotein zur Expressionskontrolle, Lane 5 = Pulldown des endogenen ERK2, Lane 6 = Pulldown des überexprimierten 3xFLAG-ERK2, Lane 7 = Kontrolle f. 6, Lane 8 = Kontrolle f. 5, Lane 9 = Kontrolle f. 5+6) α -ERK1/2 Western Blot nach myc-Pulldown, Lysate: 10 μ g Totalprotein, Pulldown mit 1 mg, gfp: Transfektionskontrolle, HCN3: Kontroll-Pulldown mit α -HCN3).

Die Kontrolle, die nur 3xFLAG-ERK2 überexprimiert (Lane 7), weist nur eine sehr geringe Bande im Pulldown auf und ist zu vernachlässigen. Darüber hinaus ist keine unspezifische Interaktion zwischen ERK2 und den ProteinA-Sepharose-Beads feststellbar, da der α -HCN3-Pulldown mit selbigen Beads keine Bande aufweist (Lane 9). Der α -HCN3-Antikörper richtet sich gegen den Hyperpolarisations-aktivierten und Zyklonukleotid-gesteuerten Kationenkanal Typ 3. Da weder eine Interaktion zwischen HCN3 und cGKII noch zwischen HCN3 und ERK2 bekannt ist, fungierte dieser Pulldown als Negativkontrolle.

Diese Experimente in HEK Zellen mit myc-Tag-fusionierter cGKII und FLAG-Tag-fusionierter ERK2 untermauern die Ergebnisse des Yeast-Two-Hybrid und gehen sogar darüber hinaus:

Die cGKII interagiert spezifisch nicht nur mit überexprimiertem 3xFLAG-ERK2, sondern auch mit dem endogenen ERK2 der HEK Zellen.

4.5.4 Co-Immunopräzipitationen

4.5.4.1 BAT

Nachdem die Interaktion zwischen cGKII und ERK2 in transient transfektierten HEK Zellen gezeigt werden konnte, sollte nun die endogene Interaktion in braunem Fettgewebe durch Co-IP belegt werden. Dazu wurde aus Gewebe Protein extrahiert und jeweils 1 mg frisch eingesetzt. Nach Präzipitation mit α -ERK1/2-Antikörper und ProteinA-Sepharose-Beads konnte die cGKII im Western Blot tatsächlich detektiert werden.

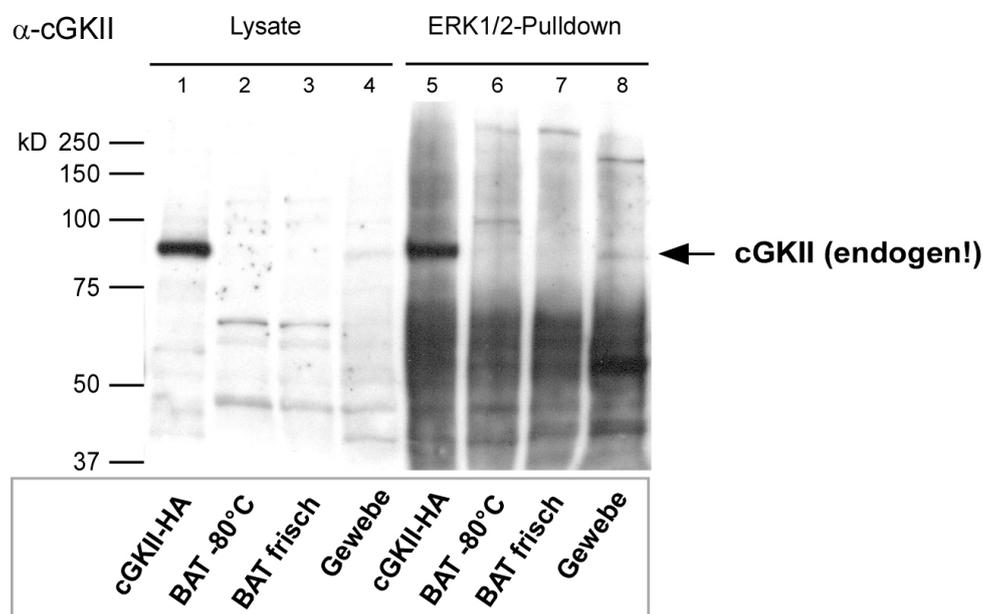


Abbildung 43: Endogene Co-IP cGKII und ERK2 aus braunem Fettgewebe.

Die endogene Co-Präzipitation unter Einsatz des α -ERK1/2-Antikörpers wurde mit jeweils 1 mg Totalprotein durchgeführt. Dargestellt ist der α -cGKII Western Blot. In Lane 8 ist die endogene Co-Immunopräzipitation der cGKII durch ERK2 deutlich zu erkennen. Als Positivkontrolle fungierte die Co-Präzipitation in Lane 5, die mit cGKII-HA-enthaltenden Lysat durchgeführt wurde. (cGKII-HA: Lysat aus mit cGKII-HA transfektierten HEK Zellen, BAT -80°C: Lysat aus bei -80°C in Lysepuffer aufbewahrten BAT, BAT frisch: Lysat aus kultivierten BAT, Gewebe: Lysat aus braunem Fettgewebe).

Sowohl im Lysat des braunen Fettgewebes (4. Lane v. links/Lysate) wie auch im Eluat der Präzipitation ist die Bande der 86 kD großen cGKII sichtbar (4. Lane v. links/Co-IP). Als Positivkontrolle fungierte Lysat aus cGKII-HA überexprimierenden HEK Zellen. In diesem Experiment konnte die Expression der cGKII in braunem Fettgewebe (BATissue) ein weiteres Mal gezeigt und ihre spezifische Interaktion mit ERK2 verifiziert werden. In MSCs konnte, wie schon bei der RT-PCR, keine Expression der cGKII und demzufolge auch keine Interaktion nachgewiesen werden.

4.5.4.2 Chondrozyten

Die obigen Experimente zeigten eine Interaktion der cGKII mit ERK2 in Adipozyten. Als Nächstes sollte diese Interaktion in anderen Zellen mesenchymalen Ursprungs untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde diese potentielle Interaktion auch an Chondrozyten, die ebenfalls aus mesenchymalen Stammzellen hervorgehen untersucht⁸⁸. Auch hier gelang der Nachweis der spezifischen Interaktion: In Abbildung 44 Lane 4 ist die erfolgreiche Co-IP als 86 kD-Bande der cGKII zu sehen. Zur Expressionkontrolle wurden auch das verwendete Lysat sowie eine weitere Probe Chondrozytenprotein aufgetragen (Lanes 1 und 5).

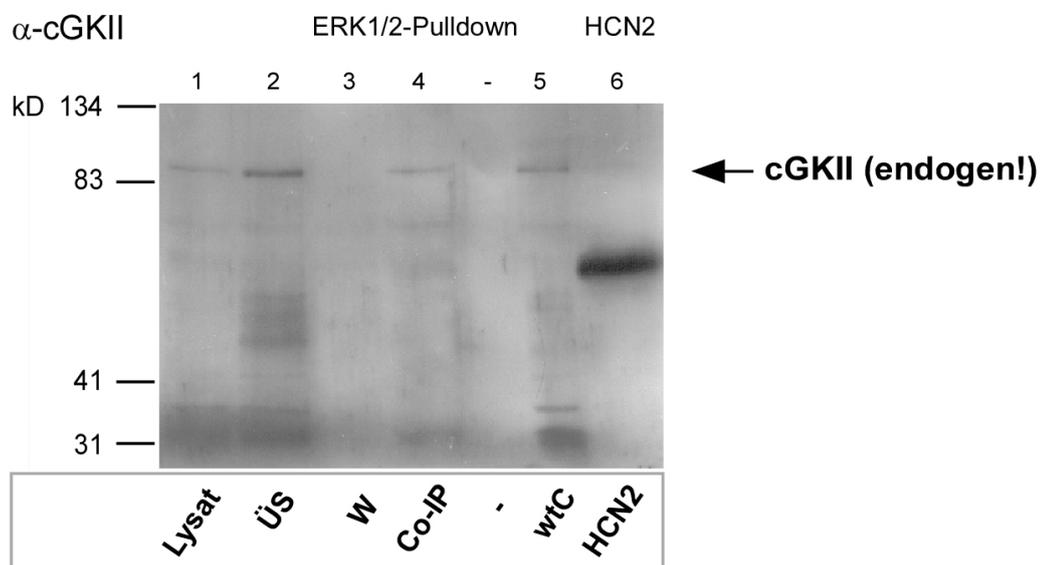


Abbildung 44: Endogene Co-IP von cGKII und ERK2 aus Chondrozyten.

Der ERK1/2-Pulldown wurde mit je 1 mg Totalprotein durchgeführt. Dargestellt ist der anschließende α -cGKII Western Blot. In Lane 4 ist die co-präzipitierte cGKII deutlich zu erkennen. Da die Kontrolle (Lane 6) keine Bande in dieser Höhe aufweist, muss es sich um eine spezifische Interaktion zwischen ERK2 und cGKII handeln (Lysat: 10 μ g des eingesetzten Totalproteins, ÜS: Überstand der Beads nach Inkubation, W: Waschüberstand, Co-IP: Eluat der Beads, wtC: Protein aus Chondrozyten, HCN2: Kontroll-Pulldown mit α -HCN2).

Eine unspezifische Interaktion zwischen cGKII und Beads kann ausgeschlossen werden, da der α -HCN2-Pulldown mit selbigen Beads keine Bande aufweist (Lane 6). Der α -HCN2-Antikörper richtet sich gegen den Hyperpolarisations-aktivierten und Zyklonukleotid-gesteuerten Kationenkanal Typ 2. Da weder eine Interaktion zwischen HCN2 und cGKII noch zwischen HCN2 und ERK2 bekannt ist, fungierte dieser Pulldown als Negativkontrolle. Desweiteren wurde auch der ÜS der Beads sowie ein Teil des Waschpuffers aufgetragen, um den Verbleib der cGKII während des Protokolls nachvollziehen zu können (Lanes 2 und 3).

Abschließend ist festzustellen, dass die im Y2H erstmals detektierte Interaktion zwischen cGKII und ERK2 in Gewebe und differenzierenden Zellen mesenchymalen Ursprungs verifiziert werden konnte.

Als Nächstes sollte untersucht werden, welche Funktion die Interaktion der beiden Kinasen cGKII und ERK2 hat.

4.5.5 cGKII-ERK2 Interaktion – *in vivo* Untersuchung

Es galt zu klären, ob die Interaktion zwischen cGKII und ERK2 in Gewebe und Zellen mesenchymalen Ursprungs eine rein strukturelle Interaktion ist, oder ob es sich um einen Phosphorylierungsprozess handelt. Mittels eines radioaktiven Assays sollte die Phosphorylierung *in vivo* in transfizierten HEK Zellen nachgewiesen werden.

Um die Integrität des Assays zu gewährleisten, wurde zunächst eine Positivkontrolle, die Phosphorylierung von VASP (Vasodilator-A-kinase stimuliertes Phosphoprotein) durch cGKII, untersucht.

cGKII Phosphorylierungsassay

Beim Phosphorylierungsassay werden die zu untersuchenden Proteine in HEK Zellen exprimiert und unter Stimulation für eine gewisse Zeit mit einer radioaktiven Phosphatquelle inkubiert. Die Phosphorylierungsaktivität der Kinase wird anschließend anhand des nun radioaktiv-phosphorylierten Substrates bestimmt.

VASP ist ein bekanntes Substrat der cGKI¹²⁵ und kann zur Überprüfung der Phosphorylierungsaktivität der cGKII in transfizierten Zellen verwendet werden¹²⁶. Die cDNA von murinem VASP wurde per PCR amplifiziert und in einen Expressionsvektor eingeschleust. Die beiden Primer mVASP_BamHI_for und mVASP_XhoI_rev lieferten ein knapp 1200 bp großes Transkript, das durch BamHI und XhoI Verdau in den mit denselben Enzymen linearisierten pcDNA3.1mycHis ligiert wurde. Nach Sequenzierung und Maxi-Prep konnte das Konstrukt für die Transfektionen verwendet werden.

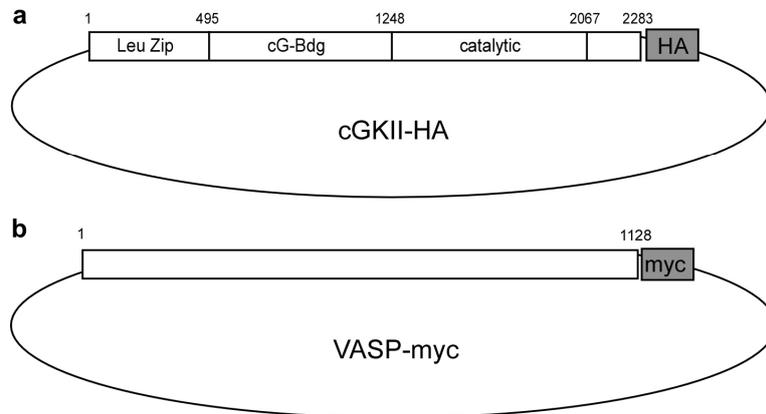


Abbildung 45: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskonstrukte.

a, „cGKII-HA“ für cGKII-HA in einem Expressionsvektor mit CMV-Promoter,
b, „VASP-myc“ für pcDNA3.1-VASP-myc.

Das neu klonierte VASP-Expressionskonstrukt wurde sowohl einzeln als auch in Kombination mit cGKII-HA in HEK transfektiert und für 24 h exprimiert. Die Zellen wurden im Phosphorylierungsassay eingesetzt, entsprechend mit einem α -VASP-Antikörper präzipitiert und das Eluat der Beads per SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Das radioaktiv-markierte, phosphorylierte VASP konnte anschließend auf einem Autoradiographie-Film sichtbar gemacht werden.

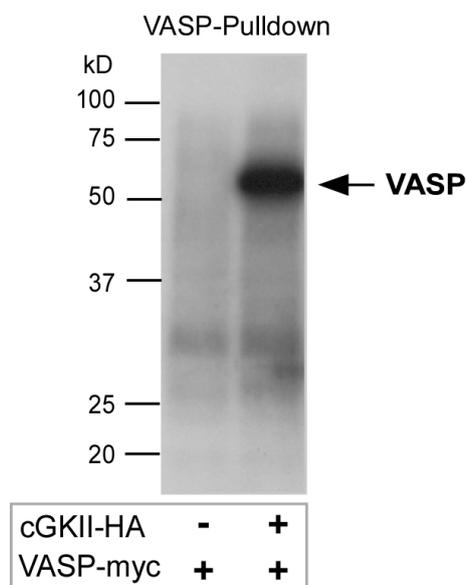


Abbildung 46: Kontrolle des Phosphorylierungsassays.
VASP wird durch cGKII phosphoryliert (Autoradiographie).

Die Expressionskonstrukte HA-cGKII und 3xFLAG-ERK2 wurden zusammen und einzeln in HEK Zellen transfektiert und die Zellen nach 24 stündiger Expression dem Phosphorylierungsassay unterzogen.

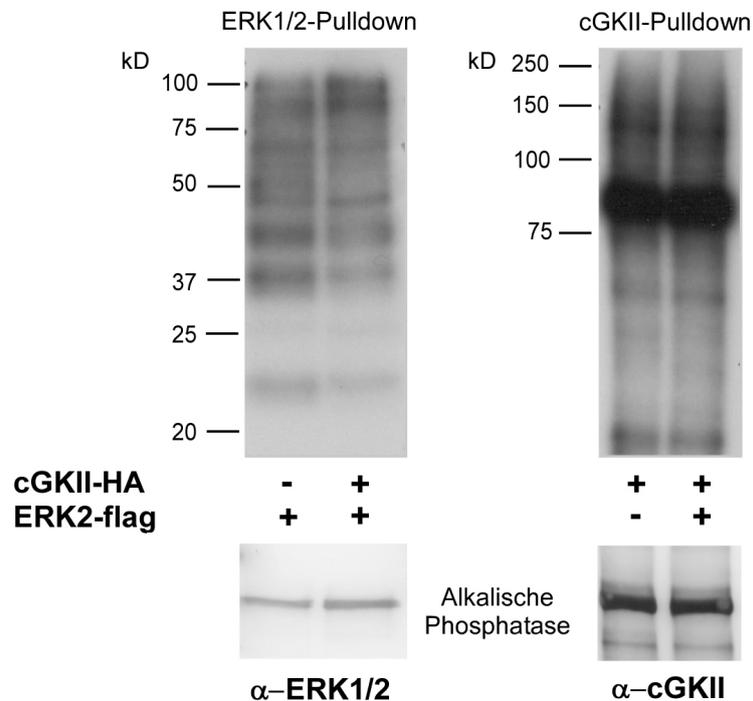


Abbildung 47: Phosphorylierungsassay von cGKII und ERK2 in transient transfektierten HEK Zellen.

ERK1/2 bzw. cGKII-Pulldown, Autoradiographie-Detektion; als Expressionskontrolle erfolgte Western Blot per AP-Detektion.

Die Analyse erfolgte nach SDS-PAGE und Blotting auf PVDF-Membran per Autoradiographie-Film. Weder im cGKII- noch im ERK2-Pulldown konnte eines der beiden Proteine als stärker phosphoryliert nachgewiesen werden. Um eine unterschiedliche Expression in den HEK Zellen als Ursache für die nicht messbare Phosphorylierung auszuschließen, wurden die Membranen im Anschluss einem Western Blot unterzogen. Dieser belegte, dass die Expression der Konstrukte in beiden Transfektionsansätzen in gleicher Intensität erfolgte.

Die Interaktion zwischen cGKII und ERK2, die in den vorangegangenen Experimenten zweifelsfrei verifiziert werden konnte, führt demnach nicht zur Phosphorylierung eines der beiden Proteine.

4.6 Interaktionsstudien an den Proteinen Bcl-3 und Cyld

Das Yeast-2-Hybrid-System wurde in dieser Arbeit auch für die Untersuchung des NF κ B-Signalweges eingesetzt. Der NF κ B-Signalweg, d.h. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B erfolgt indirekt durch Degradation des Inhibitorproteins I κ B bzw. seiner Homologen p100 und p105 (kanonischer und nicht-kanonischer Weg). Das Onkogen Bcl-3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in ubiquitiniertes Form in den Zellkern wandert. Dort interagiert es mit Proteinen der NF- κ B-Familie, p50 und p52 (Proteinen, die aus den Precursorproteinen p100 und p105 hervorgehen), und regt die Zellproliferation und Onkogenese an. Cyld wurde als Tumorsuppressorgen der Zylindromatose identifiziert¹²⁷, ist eine Deubiquitinase und ein Negativ-Regulator der NF- κ B-Aktivität¹²⁸. Indem Cyld Proteine der NF- κ B-Signalkaskade deubiquitiniert, hemmt es die nukleäre Aktivierung von NF- κ B und verhindert die Tumorzellproliferation^{129,130}. Es stellte sich die Frage, ob die beiden Protein Bcl-3 und Cyld interagieren und ob Bcl-3 infolgedessen deubiquitiniert und an der Translokation in den Zellkern gehindert wird.

Um zu belegen, dass es sich bei der Deubiquitinierung um eine spezifische Interaktion zwischen Bcl-3 und Cyld handelt, wurde neben Co-Immunopräzipitationsversuchen auch die Interaktion im Y2H untersucht.

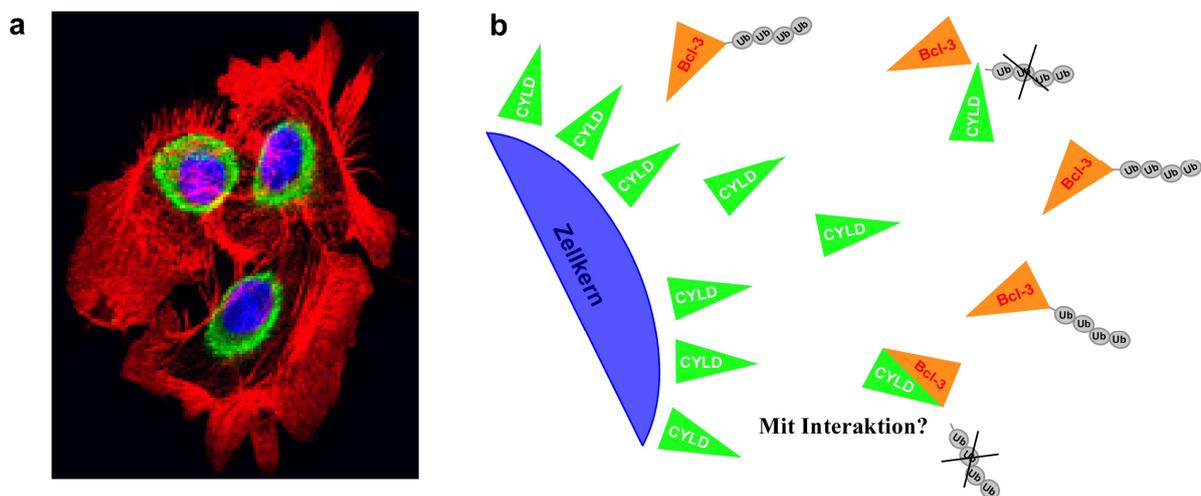


Abbildung 48: Bcl-3 und CYLD.

a, Lokalisierung von überexprimiertem Cyld an der Zellkernmembran von Cyld/-Keratinocyten, angefertigt von R. Massoumi (EGFP-Cyld (grün), DAPI (blau) und F-Aktin/Zytoskelett (rot),

b, Cyld deubiquitiniert Bcl-3 in der Nähe des Zellkerns und inhibiert damit die Translokation von Bcl-3 in den Zellkern.

4.6.1 Klonierung der entsprechenden Baits und Preys

Die full-length-cDNAs von CYLD und Bcl-3 wurden sowohl als Prey in pGADT7 als auch als Bait in pGBKT7 kloniert. Darüber hinaus wurde auch die im Folgenden dargestellte Trunktionsmutante von CYLD als Bait verwendet.

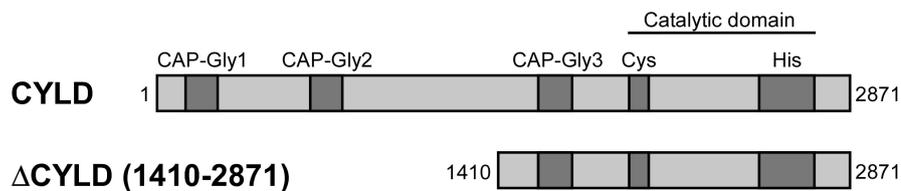


Abbildung 49: CYLD cDNA.

Schematische Darstellung von CYLD und der C-terminalen Trunktionsmutante Δ CYLD.

Die Klonierung erfolgte im Fall der Bcl-3 full-length-Variante aus den Originalkonstrukten: dazu wurde zuerst Bcl-3 durch EcoRI und BglIII aus Bcl-3-pRcRSV heraus geschnitten, anschließend wurden die Enden mit DNA-Polymerase aufgefüllt (ge-, „blunted“) und mit T4-PNK phosphoryliert. Der Zielvektor pGADT7 wurde mit NcoI linearisiert und die Enden mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Nach erfolgreicher Ligation und Sequenzierung des fertigen Preys konnte Bcl-3 anschließend via EcoRI und BamHI erneut heraus geschnitten und in den mit EcoRI/BamHI behandelten Baitvektor pGBKT7 ligiert werden. Das CYLD full-length-Bait wurde aus einem 2056 bp langen PCR-Fragment und dem C-Terminus des Originals zusammengesetzt. Nach PCR-Amplifikation mit den Primern h_CYLD_1_for und h_CYLD_684_rev wurde das Fragment mit NcoI und EcoRI ausgeschnitten und in den Baitvektor ligiert. Nach Überprüfung der Sequenz erfolgte die Insertion des fehlenden C-Terminus über EcoRI und XhoI aus dem Original. Das Prey konnte anschließend durch NcoI und NotI basierend auf dem fertigen Bait kloniert werden. Alle Konstrukte wurden vor der Verwendung durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Kontrollen zur Autoaktivität finden sich bei den jeweiligen Versuchen.

4.6.2 Wachstum auf Selektionsmedium und α -Galaktosidaseaktivität

Nach erfolgreicher Transformation wurden die verschiedenen Kombinationen der Preys und Baits auf ihre Interaktion überprüft. Dazu wurden sie auf Selektionsmedium mit und ohne X- α -Gal ausplattiert.

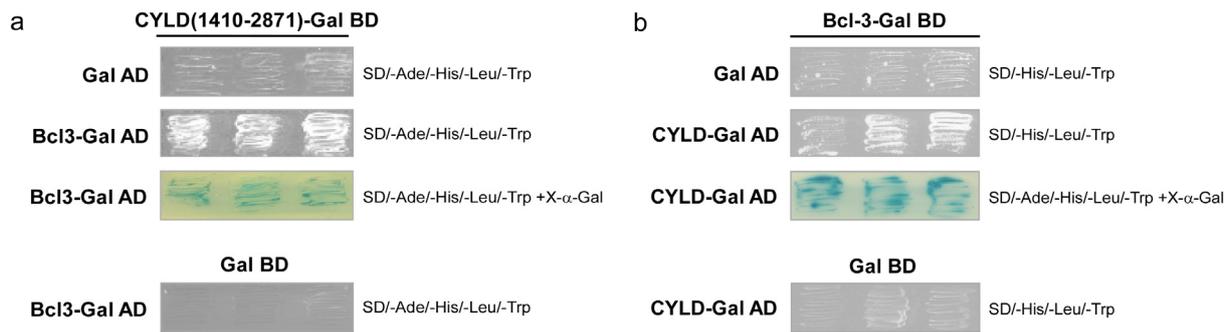


Abbildung 50: Interaktion zwischen Bcl-3 und CYLD in Hefe.

Auxotrophes Wachstum und spezifische α -Galaktosidase-Aktivität auf Selektionsmedium.

a. CYLD(1410-2781) als Bait und Bcl-3 als Prey, b. CYLD als Prey und Bcl-3 als Bait.

CYLD und Bcl-3 interagieren spezifisch miteinander¹³¹. Der Unterschied zu den beigebrachten Negativkontrollen ist im Test auf auxotrophes Wachstum im Hinblick auf die α -Galaktosidase-Aktivität deutlich sichtbar. Die C-terminale Trunktionsmutante von Cyld interagiert als Bait spezifisch mit Bcl-3 als Prey. Auch die umgekehrte Variante mit Bcl-3 als Bait und Cyld als full-length-Prey zeigt auxotrophes Wachstum auf Selektionsmedium und spezifische α -Galaktosidase-Aktivität. Um die Ergebnisse zu untermauern, wurden beide Varianten zusätzlich auch im ONPG-Assay untersucht.

4.6.3 β -Galaktosidaseaktivität im ONPG-Assay

Neben der Aktivierung der Wachstumsreportergene und des MEL1-Gens wurde zur weiteren Quantifizierung auch die β -Galaktosidase-Aktivität mittels ONPG-Assay untersucht.

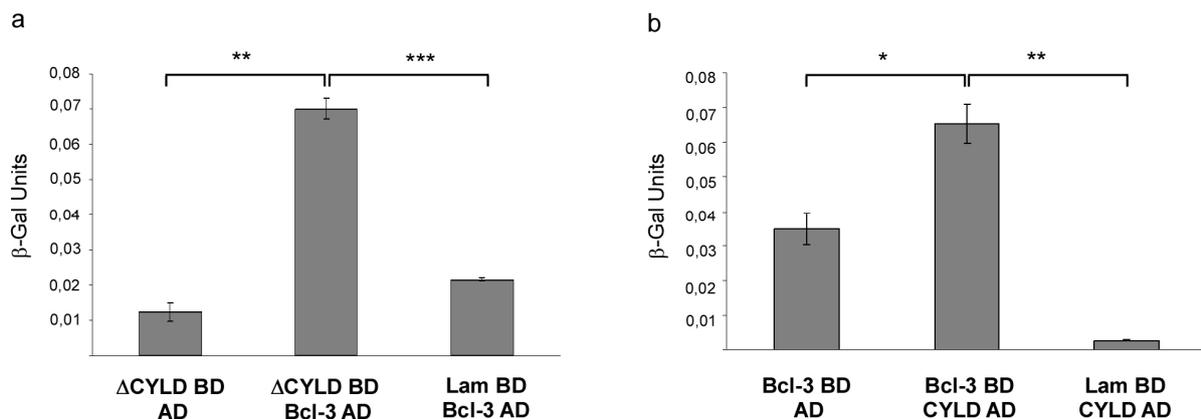


Abbildung 51: Interaktion zwischen Bcl-3 und CYLD in Hefe (ONPG-Assays).

a. CYLD(1410-2781)-Gal BD und Bcl-3-Gal AD m. Kontrollen, (n=3, +/- S.E.M.),

** p > 0,0005, *** p > 0,00005.

b. Bcl-3-Gal BD und CYLD-Gal AD m. Kontrollen, (n=5, +/- S.E.M.),

* p > 0,05, ** p > 0,0005.

Die erzielten Ergebnisse im ONPG verifizieren die Interaktion zwischen Bcl-3 und CYLD ein weiteres Mal. Die β -Galaktosidase-Aktivität in mit Bcl-3 und CYLD bzw. Δ CYLD(1410-2781) transformierten Hefen ist im Vergleich zu den Kontrollen signifikant ($p < 0,00005$ bzw. $p < 0,0005$) erhöht.

Des Weiteren zeigen die Studien in Hefe, dass die Interaktion zwischen Bcl-3 und CYLD unabhängig ist vom N-Terminus des CYLD-Proteins, denn auch die trunkierte Baitvariante zeigt eine signifikant erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität. Das heißt, die beiden Proteine interagieren über den C-Terminus von Cyld.

In dieser Arbeit konnte somit nicht nur gezeigt werden, dass der Tumorsuppressor Cyld spezifisch mit Bcl-3 im Hefesystem interagiert, sondern auch, dass die Interaktion über die C-terminale, katalytische Untereinheit von Cyld vermittelt wird. Bei der Interaktion mit NEMO, der katalytischen Untereinheit der I κ B-Kinase, ist ebenfalls diese Domäne von Cyld involviert, während für die Interaktion mit TRAF2 (TNFR-assoziierter Faktor 2) auch die zentrale Domäne von Cyld benötigt wird¹²⁸.

5 Diskussion

5.1 Bekannte Substrate der cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen I und II sind in eine Vielzahl physiologischer Signalwege involviert, wie z.B. die Relaxation glatter Muskelzellen, die intestinale und renale Sekretion, die Thrombozytenaggregation und die endochondrale Ossifikation⁴². Dennoch konnten bisher nur wenige Substrate der cGMP-Kinasen identifiziert und physiologischen Prozessen zugeordnet werden. Arg/Lys-Arg/Lys-X-Ser/Thr wurde als die ideale Substrat-Konsensus-Sequenz für cGMP-Kinasen identifiziert¹⁶. Die unterschiedliche Substratselektivität der Kinasen bei gleichem Substrat-Konsensusmotiv ist auf Unterschiede in der Aminosäuresequenz der katalytischen Domänen zurückzuführen¹³². Offenbar sind basische Aminosäuren in N-terminaler Nachbarschaft der Substratbindungsstelle in der cGKI für die im Vergleich zur cGKII erhöhte Substrataffinität verantwortlich¹³³.

5.1.1 cGKI

Neben der Hemmung der Thrombozytenaggregation ist die cGKI insbesondere am Relaxationsprozess der glatten Muskulatur beteiligt⁵². Zu den Substraten der cGKI in den glatten Muskelzellen zählen der IP3-Rezeptor und IRAG³⁸. Durch die Phosphorylierung der beiden Proteine reguliert die cGKI den Calciumgehalt und damit die Relaxation der Zelle. Erst die Phosphorylierung von IRAG führt zur Bildung eines trimeren Komplexes bestehend aus cGKI, IP3 und IRAG an der Membran des endoplasmatischen Retikulums und unterbindet die Calciumfreisetzung^{38,55}. Durch die Bindung zwischen cGKI und IRAG über die Substratbindungsdomäne der cGKI (innerhalb der katalytischen Domäne) wird das Phosphorylierungsmotiv Arg/Lys-Arg/lys-X-Ser/Thr in IRAG phosphoryliert^{55,134}.

Diese Beobachtung wiederholt sich bei weiteren Substraten der cGKI: MYPT1⁵⁸ („myosin targeting subunit of phosphatase I“), Troponin T¹³⁵ und GKAP42¹³⁶ werden von der Substratbindungsseite der cGKI gebunden und dann an ihrer cGKI-Substrat-Konsensus-Sequenz phosphoryliert.

5.1.2 cGKII

Obwohl die cGKII in verschiedenen Geweben, wie z.B. Hirn, Lunge, Niere, Mucosa und Chondrozyten exprimiert wird, gibt es bislang nur zwei bekannte *in vivo* Substrate.

In der intestinalen Mucosa ist das der CFTR-Kanal^{68,70} und in Chondrozyten Sox9⁷⁴. Beide enthalten das typische Phosphorylierungsmotiv^{74,137}. Die Phosphorylierung des CFTR-Kanals wurde *in vitro* gezeigt⁷⁰, die Bedeutung der cGKII für seine Funktionalität *in vivo* wurde im cGKII-knockout-Mausmodell deutlich^{68,68}. Die ko-Mäuse leiden unter einem intestinalen Sekretionsdefekt. Die Chloridsekretion kann nicht via cGMP aktiviert werden. Das zweite bekannte Substrat, Sox9, ist ein Inhibitor der hypertrophen Differenzierung von Chondrozyten¹³⁸. cGKII hemmt Sox9 *in vivo*, indem sie den Transkriptionsfaktor im Cytosol verankert und die Translokation in den Zellkern verhindert⁷⁴. cGKII kommt demnach die Funktion eines „Umschalters“ an der Schnittstelle zwischen proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten zu⁷⁴. Die Phosphorylierung von Sox9 durch cGKII spielt dabei keine Rolle und wurde lediglich *in vitro* an transfektierten Hepatoma-Zellen nachgewiesen⁷⁴. Bei den von Sox9 regulierten Genen COL9, COL11 und CD-Rap spielt die kooperative Dimerisierung von Sox9 eine entscheidende Rolle¹³⁹. Da *in vitro* exprimiertes Sox9 nicht in der Lage ist eigenständig zu dimerisieren, müssen Cofaktoren existieren, die die Dimerisierung herbeiführen¹⁴⁰. Möglicherweise beeinflusst cGKII indirekt das Dimerisierungspotential von Sox9, indem sie mit diesen Cofaktoren interagiert.

5.2 NO-cGMP-Signaling in braunem Fett (BAT)

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des NO-cGMP-Signalweges in braunem Fettgewebe zu untersuchen. Das braune Fett, das stark vaskularisiert und innerviert ist, ist der Hauptort der adaptiven Thermogenese^{77,141,142}. In den Mitochondrien des braunen Fetts kann die Energie des aus der Atmungskette resultierenden Protonengradienten statt in ATP in Wärme umgewandelt werden. Auslöser für die Entkopplung der Atmungskette ist Kälte¹⁴³. Sie induziert die Expression des spezifisch im braunen Fett exprimierten Entkopplerproteins UCP1¹⁴⁴. Es schleust die Protonen am ATP-Synthase-Komplex vorbei zurück ins Mitochondrium und ermöglicht die sog. „non-shivering“ = zitterfreie Thermogenese (anders als die Thermogenese der Skelettmuskulatur, die durch Kontraktion (Zittern) erzeugt wird).

Stickstoffmonoxid, das Initiator-molekül der NO-cGMP-Signalkaskade, beeinflusst die Differenzierung und Proliferation von Präadipozyten *in vitro*^{82,145,146} und kontrolliert die mitochondriale Biogenese via cGMP-Signaling in braunen Fettzellen⁸³. Bisher ist nichts über die

Expression der cGMP-abhängigen Kinasen in BAT bekannt. Daraus ergab sich die Fragestellung dieser Arbeit, welche Rolle die cGMP-abhängige Kinase II in braunem Fett hat und mit welchen Proteinen sie interagiert.

In dieser Arbeit konnte erstmals die Expression der cGKII in braunem Fettgewebe nachgewiesen werden. Dabei wurde sie sowohl in Gewebe wie auch in daraus kultivierten Präadipozyten detektiert. Diese Vorläuferzellen der BAT wurden nach Literaturangaben aus braunem Fettgewebe isoliert und konnten *in vitro* in reife, braune Adipozyten differenziert werden⁸². Die cGKII ist dabei während der frühen Phase der Differenzierung detektierbar. Aber welche Rolle spielt sie dort? In den, wie die BAT, aus dem Mesenchym stammenden Chondrozyten reguliert die cGKII offenbar den Übergang von Proliferation zu Differenzierung⁷⁴. In Chondrozyten wurde die Interaktion zwischen der cGKII und dem die Differenzierung inhibierenden Transkriptionsfaktor Sox9 beschrieben⁷⁴. Um die Rolle der cGKII in der Differenzierung brauner Fettzellen zu untersuchen, wurde dort nach einem Interaktionspartner gesucht. Zu diesem Zweck wurde eine cDNA-Bibliothek aus braunem Fett erstellt und in einem Yeast-Two-Hybrid Screen auf potentielle Interaktionspartner untersucht. Der Vorteil dieser Bibliothek ist, dass sie die Genexpression sämtlicher Differenzierungsstadien widerspiegelt, da das braune Fettgewebe MSCs, Präadipozyten und ausgereifte Adipozyten enthält. Als Bait wurde die katalytische Domäne der cGKII („cGKIIc“) eingesetzt.

Die Entscheidung, nicht die full-length cGKII zu verwenden, fiel aus zwei Gründen: erstens befindet sich am N-Terminus der cGKII ihre Myristoylierungsdomäne, die für die Membranständigkeit der cGKII verantwortlich ist⁶⁹. Ein derartiges Lokalisierungssignal würde eine Interaktionsuntersuchung im Zellkern der Hefen stören. Zweitens sollte diese *offene*, weil nicht autoinhibierte, Form der cGKII für potentielle Interaktionspartner einfacher zugänglich sein.

Von 161 erhaltenen Klonen im Yeast-Two-Hybrid konnten schließlich 27 im Rescreen bestätigt werden. Die 27 Klone zeigten kontinuierlich auxotrophes Wachstum und behielten diese Eigenschaft auch trotz mehrmaligen Umsetzens. Bei den ausgeschlossenen Klonen handelte es sich zu einem großen Teil um Falsch-Positive und in einigen wenigen Fällen um redundante Klone. Die Identität und Richtigkeit des Leserahmens wurden für alle 27 Klone per Sequenzanalyse überprüft. Für die weiteren Untersuchungen wurden drei Kandidaten ausgewählt:

PR65, eine Untereinheit der PP2A Phosphatase

PLAA (phospholipase A2 activating protein),

ERK2 (extra-cellular regulated kinase 2).

5.3 cGKII und PR65

PR65 stellt eine Untereinheit der Phosphatase PP2A dar. Die Phosphatase PP2A ist eine der wichtigsten Serin-/Threonin-Phosphatasen der Zelle und an vielfältigen Prozessen in der Zelle beteiligt¹⁴⁷. PP2a setzt sich zusammen aus PR65 und der katalytischen Untereinheit PP2Ac¹⁴⁸.

PR65 besteht seinerseits aus 15 aufeinander folgenden HEAT-Motiven¹⁴⁹, die in zwei Untereinheiten, Subunit B (1-10) und Subunit C (11-15) unterteilt werden. HEAT-Motive sind Leucin-reiche Domänen, die oft tandemartig hintereinander positioniert sind und Protein-Protein Interaktionen vermitteln¹¹⁰.

Die Untersuchung der Proteinstruktur von PR65 ergab eine potentielle cGKII-Phosphorylierungsstelle am N-Terminus im ersten HEAT-Motiv.

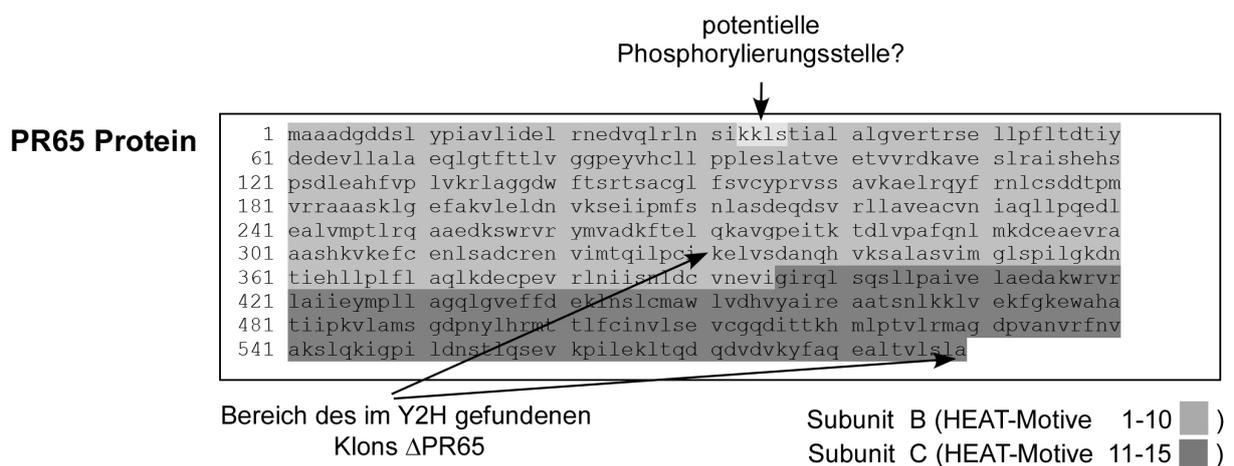


Abbildung 52: Proteinsequenz von PLAA (murine).

Grau unterlegt sind die zehn N-terminalen HEAT-Motive = Subunit B, sowie die C-terminalen HEAT-Motive 11-15 = Subunit C. Außerdem sind die potentielle Phosphorylierungsstelle KKLS sowie der Start des im Y2H gefundenen Klons ΔPR65 angezeigt.

Dieser zunächst viel versprechende Befund wurde durch die auf den Yeast-Two-Hybrid folgenden Pulldown-Versuche entkräftet: in keinem der durchgeführten Pulldown-Assays gelang es, die Interaktion zwischen PR65 und cGKII zu verifizieren. Eine vermeintliche PR65-Bande im Western Blot nach Pulldown der 3xFLAG-cGKII entpuppte sich als unspezifische Interaktion, da sie auch in der Negativkontrolle zustande kam (ohne 3xFLAG-cGKII). Da auch Protokollveränderungen kein besseres Resultat brachten, wurden die Untersuchungen an dieser Stelle eingestellt.

5.4 cGKII und PLAA

Das Phospholipase A₂ aktivierende Protein (PLAA oder PLAP) ist ein erstmals 1987 von Clark *et al.* beschriebenes Enzym, das spezifisch die Phospholipase A₂ aktiviert¹⁵⁰.

PLAA besitzt eine hohe Homologie zu Melittin, das sich als Stimulator der PLA₂ im Stachelgift von Bienen findet und dort die Phospholipaseaktivität reguliert^{118,151}. Die Proteinstruktur von PLAA verfügt über sieben WD40-tandem-repeats (Protein-Protein Interaktionsdomänen, die eine Vielzahl verschiedener Proteine binden können)¹¹⁷, eine FxDxF-Domäne, die in Enzymen der Endozytose vorkommt¹¹⁹, und eine potentielle Ubiquitin-Bindungsdomäne¹²⁰.

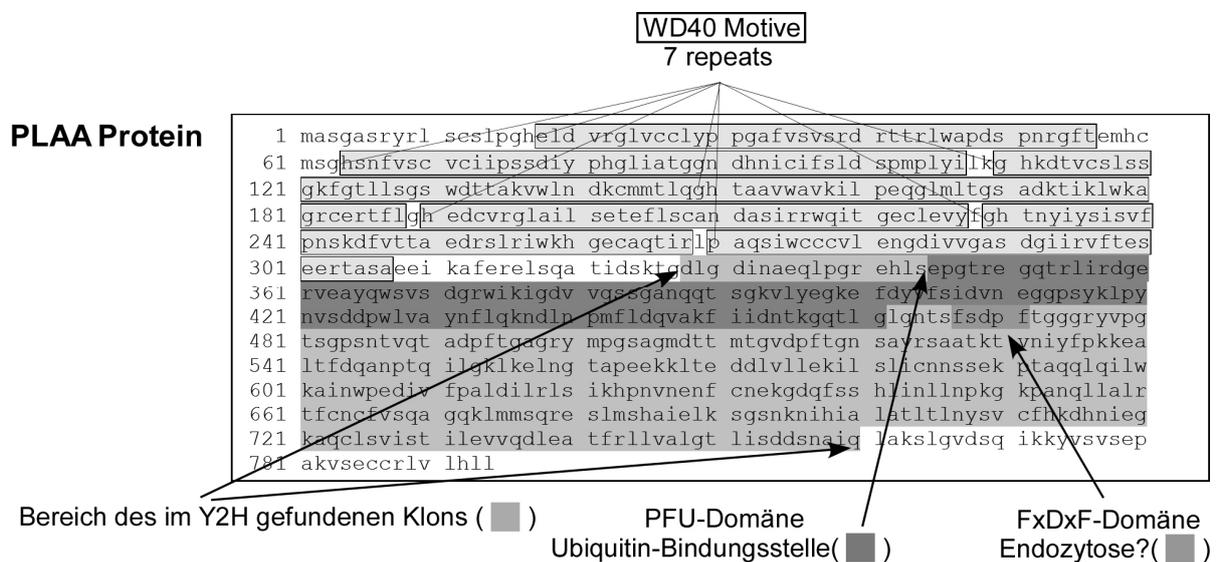


Abbildung 53: Proteinsequenz von PLAA (murine).

Grau unterlegt sind die N-terminalen WD40-Motive (7 repeats), die FxDxF- und die PFU-Domäne sowie der im Y2H erhaltene C-terminale Klon der PLAA.

Weder ergab die Untersuchung von PLAA auf potentielle cGKII-Substratmotive Übereinstimmungen, noch fanden sich wissenschaftliche Untersuchungen zur Modifizierung von PLAA durch andere Kinasen. Die weiteren Versuche sollten nun, auch ohne eindeutiges Phosphorylierungsmotiv, die Interaktion zwischen cGKII und PLAA verifizieren. In Ermangelung eines kommerziellen PLAA-Antikörpers wurden verschiedene Konstrukte (PLAA + Tag) für die Pulldown-Assays entworfen und kloniert. Nach transienter Transfektion in HEK Zellen wurden dann die entsprechenden myc- und FLAG-Pulldowns durchgeführt und ausgewertet: In den beiden ersten Pulldown-Varianten konnte keine Interaktion detektiert werden. In einer dritten Variante (pFLAGCMV2-PLAA / cGKII-HA, FLAG-Pulldown, α -HA Western Blot) war die co-präzipitierte cGKII schließlich anhand ihres HA-Tags detektiert (s. Abbildung 34). Es sind weitere Varianten (z.B. PLAA-myc) in Planung, die spezifische

Interaktion vollständig zu verifizieren. Parallel zu den Pulldown-Assays stellte sich die Frage, welche Auswirkung eine mögliche Interaktion der cGKII mit PLAA haben könnte, vor allem in Hinblick auf die Aktivität der Phospholipase A₂.

Die Familie der Phospholipasen ist für die Regulation des Phospholipid-Metabolismus zuständig¹⁵². Sie katalysieren die hydrolytische Abspaltung von ungesättigten Fettsäuren aus Membranphospholipiden¹⁵². So liefern sie den Grundstoff für verschiedene Wege der Lipid-Signaltransduktion und für die Synthese von Molekülen der Entzündungsreaktion (Prostaglandine, Thromboxane, Prostacycline und Leukotriene)^{153,154}.

Es sind drei Unterklassen der Phospholipase A₂ bekannt: Die beiden calciumabhängigen sPLA₂¹⁵⁵ (sekretorische PLA₂, ~14 kD) und cPLA₂¹⁵⁶ (cytosolische PLA₂, ~85-110 kD), sowie eine calciumunabhängige iPLA₂¹⁵⁷ (Ca²⁺-independent PLA₂, ~85-88 kD). Die Bedeutung der drei Unterklassen, sowie ihre Aktivierung durch PLAA werden kontrovers diskutiert.

Es gab bisher keine Hinweise auf eine Interaktion der iPLA₂ mit PLAA¹⁵⁷. Die beiden anderen Phospholipasen werden durch PLAA bzw. Melittin aktiviert^{150,158}. Der erste Hinweis auf Phospholipase-Expression in Adipozyten und adipogenen Zelllinien findet sich bei Gao und Serrero (1990)¹⁵⁹. Sie stellten eine 20-24fach erhöhte Aktivität der PLA₂ in differenzierenden Adipozyten im Vergleich zu Präadipozyten fest. Allerdings unterschieden sie in ihrer Untersuchung nicht zwischen den drei Unterklassen der PLA₂s. Die Produkte der Phospholipaseaktivität, Arachidonsäure und Prostaglandine, wirken *in vitro* inhibierend auf die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten^{160,161}. Su *et al.* (2004) weisen der bisher im Hintergrund stehenden iPLA₂ eine zentrale Rolle in der Adipogenese zu: Sie beobachteten einen Expressionsrückgang der Differenzierungsregulatoren PPAR γ und CEB/P α in Abhängigkeit von der iPLA₂ β oder iPLA₂ γ -Expression in 3T3-L1 Präadipozyten¹⁶².

Aufgrund der Ergebnisse des Pulldowns wurden in einer präliminären Versuchsreihe Wildtyp- und cGKII-knockout BAT einem photometrischen Phospholipase-Assay unterzogen⁹⁴. Dieser Assay misst hauptsächlich die cPLA₂-Aktivität.

Die Aktivität der PLA₂ ist in den cGKII-knockout BAT signifikant erhöht. Nach Su *et al.*, die die Aktivität der PLA₂ für den Differenzierungsfortschritt von 3T3-L1 Präadipozyten verantwortlich sehen, müssten die knockout-Zellen demnach stärker differenzieren als der Wildtyp¹⁶². Eine erhöhte Phospholipase-Aktivität bedeutet aber auch ein größeres Vorkommen an Lipid-Metaboliten und möglicherweise eine verstärkte z.B. Prostaglandinsynthese. Nach Miller *et al.* und Casimir *et al.* hätte das eine Hemmung der Differenzierung der cGKII-ko-Zellen zur Folge^{160,161}.

Basierend auf diesen ersten Ergebnissen sollen nun weitere Untersuchungen klären, welcher Typ Phospholipase *in vitro* vorrangig vertreten ist und welchen Einfluss die cGKII auf ihre Aktivität nimmt. Mit PLAA wurde ein interessanter Interaktionspartner der cGKII in braunem Fett gefunden.

5.5 cGKII und ERK2

ERK2 ist eine MAP-Kinase und gehört wie ihre Isoform ERK1 zur großen Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen. Sie ist eine Serin-/Threonin-Kinase¹²¹ und wird als letztes Glied der sog. ERK/MAPK-Kaskade von zellexternen Stimuli (wie z.B. Wachstumsfaktoren) aktiviert¹⁶³. Diese ERK/MAPK-Kaskade besteht aus zwei weiteren MAP-Kinasen (MEK1/2 und Raf bzw. Mos), die z.B. durch Liganden oder G-Protein-vermittelt aktiviert wurden¹²³. Auf diese Art verbindet ERK2 Signale von Membranrezeptoren mit deren regulatorischen Targets im Zellkern¹⁶⁴. Zur Aktivierung von ERK2 bedarf es zwei konsekutiver Phosphorylierungen^{165,166}. Erst die zweite Phosphorylierung am sog. TEY-Motiv (TEY = Threonin/Glutamin/Tyrosin) im *activation loop* ermöglicht die Dissoziation und Translokation in den Zellkern. Bis dahin ist ERK2 durch sogenannte Ankerproteine, u.a. MEK1, im Cytosol fixiert^{167,168,169}. Im Kern werden Transkriptionsfaktoren und nukleäre Proteine durch ERK phosphoryliert bevor ERK selbst dephosphoryliert und wieder ins Zytosol transportiert wird^{170,171}.

Die Sequenzuntersuchung des ERK2-Proteins ergab, dass das von Tegge *et al.* 1995 als optimal beschriebene Substratmotiv KRKKSL³⁷ für die Phosphorylierung durch cGKII in der ERK2 Sequenz nicht vorhanden ist. Lediglich ein KKIS-Motiv findet sich N-terminal.

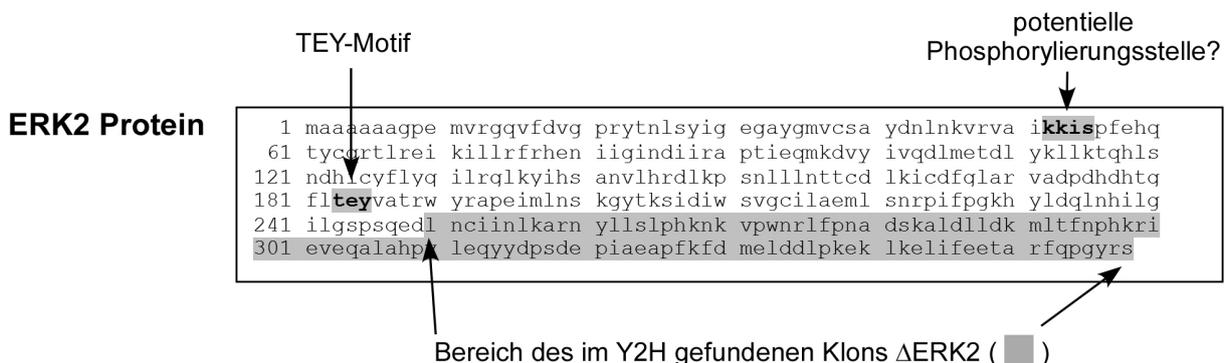


Abbildung 54: Proteinsequenz ERK2 (murine).

Grau unterlegt sind das TEY-Motiv (AS183-AS185), die potentielle Phosphorylierungsstelle KKIS (AS52-AS55) und der im Y2H Screen erhaltene Klon ΔERK2.

In einer verschiedenen Substrate der cAMP- und cGMP- abhängigen Kinasen vergleichenden Studie von Colbran *et al.* (1992) weist dieses Substratmotiv die geringste bzw. keine messbare Phosphorylierung durch eine der beiden Kinasen auf¹⁷². Die Analyse der Proteinsequenz der cGKII ergab, dass die cGKII eine für die Bindung von ERK2 an ein Substrat notwendige, sogenannte D-Domäne enthält¹⁷³:

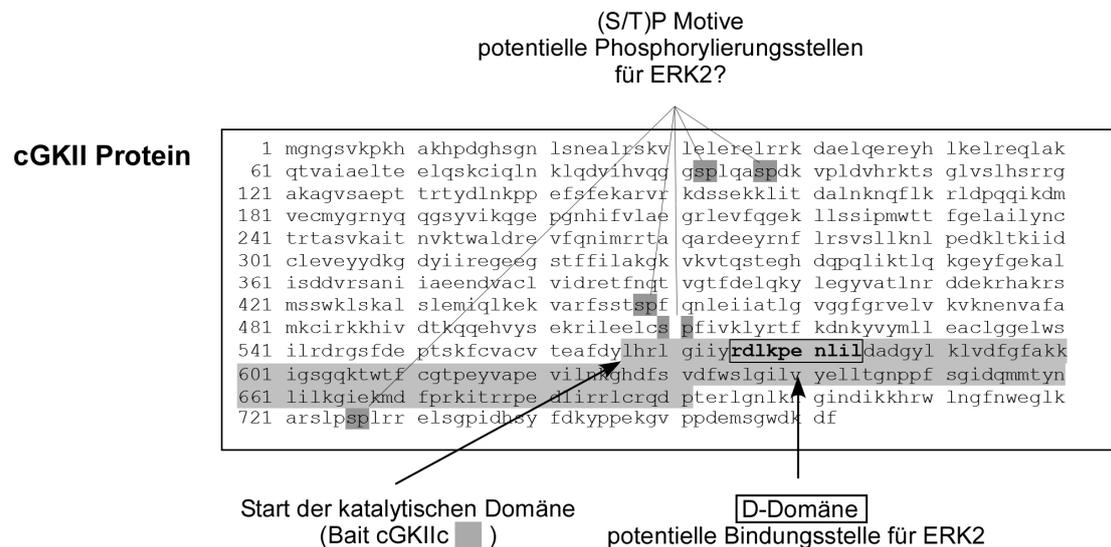


Abbildung 55: Proteinsequenz von cGKII (murine).

Grau unterlegt sind potentielle ERK2-Phosphorylierungsstellen (S/T)P, die potentielle Bindungsstelle für ERK2 (D-Domäne) und die katalytische Domäne der cGKII.

Die Gruppe der Inositol-metabolisierenden Enzyme sind u.a. als Träger derartiger D-Domänen identifiziert worden¹⁷⁴. Die Bindung an eine D-Domäne löst eine Konformationsänderung von ERK2 aus: Dabei wird das TEY-Motiv im *activation loop* von ERK2 zur cytosolischen Seite des Komplexes ausgerichtet¹⁷⁵. Die Proteinsequenz der cGKII weist darüber hinaus vier potentielle Phosphorylierungsmotive (S/T)P für ERK2 auf¹⁷³.

Die Proteinsequenzanalyse konnte keines der potentiellen Interaktionsmodelle ausschließen. Sie lieferte mit der Entdeckung der D-Domäne in der Proteinstruktur der cGKII aber eine mögliche Erklärung für die strukturelle Interaktion der beiden Kinasen.

Nach den erfolgreichen Interaktionsstudien im Hefesystem folgten nun die Versuche, die beiden Proteine in anderen eukaryotischen Expressionssystemen als interagierenden Komplex zu detektieren. Dazu wurden cGKII und ERK2 in verschiedene Expressionsvektoren eingeschleust und als FLAG-/HA- oder myc-Fusionsproteine in HEK Zellen überexprimiert. Aus den Lysaten der Zellen wurden sie dann im Pulldown-Assay mittels ihres Tags präzipitiert und auf co-präzipitiertes ERK2 bzw. cGKII untersucht. Als erstes gelang der Pulldown von 3x FLAG-ERK2 und der Nachweis der interagierenden cGKII-myc. Der Assay wurde *vice versa* wiederholt

und auch der Pulldown der myc-cGKII co-präzipitierte das interagierende 3x FLAG-ERK2. Darüber hinaus konnte in diesem Assay auch das endogene ERK2 der HEK-Zellen mittels überexprimierter cGKII detektiert werden.

Die Interaktion von cGKII und ERK2 in einem weiteren eukaryotischen Expressionssystem wurde mit den HEK-Pulldown-Experimenten zweifelsfrei belegt.

Um die Interaktion *in vivo* nachzuweisen, wurde eine endogene Co-Immunopräzipitation aus braunem Fettgewebe durchgeführt. Dabei konnte die endogene cGKII mittels des α -ERK1/2-Antikörpers co-präzipitiert werden.

Zusätzlich wurden auch Chondrozyten auf eine endogene Interaktion zwischen cGKII und ERK2 untersucht. Auch in Chondrocyten konnte endogene cGKII mit α -ERK1/2-Antikörper co-präzipitiert werden. Die Versuche bestätigten die Ergebnisse aus Y2H und Pulldown-Experimenten und verifizierten so eine bisher unbekannte Interaktion:

Die cGKII interagiert spezifisch mit der mitogen-aktivierten Kinase ERK2.

Zur Untersuchung der Phosphorylierungsaktivität beider Kinasen wurde als nächstes ein Phosphorylierungs-Assay in HEK Zellen durchgeführt. Dazu wurden cGKII und ERK2 wie bei den Pulldown-Assays heterolog in HEK Zellen exprimiert. Nach 48stündiger Expression wurden sie für drei Stunden in Medium kultiviert, das radioaktiv-markiertes Phosphat enthielt. Die cGKII wurde durch Applikation von cGMP zum Medium, ERK2 durch FBS aktiviert. Anschließend wurde die entsprechende Kinase jeweils per Pulldown präzipitiert. Die autoradiographische Detektion im Western Blot lieferte ein überraschendes Resultat: keine der beiden Kinasen wurde durch die andere signifikant phosphoryliert. Dieses Ergebnis wirft zwei neue Fragen auf:

Welche Rolle kommt dieser spezifischen Bindung zwischen cGKII und ERK2 zu?

Welche physiologischen Konsequenzen erwachsen daraus?

Vorausgesetzt, dass die Bindung zwischen cGKII und ERK2 mit einer strukturellen Modifikation von ERK2 einhergeht, so könnte das die Enzymaktivität von ERK2 beeinflussen¹⁷⁶. Um diese Frage zu klären, bedarf es weiterer Studien zur Interaktion zwischen ERK2 und cGKII und der (vielleicht) davon abhängigen Aktivität von ERK2. Es sollte versucht werden, die interagierenden Domänen durch Trunktationsvarianten weiter einzugrenzen und die potentielle D-Domänen-Interaktion durch Mutationsstudien zu untersuchen. Ferner könnte die Abhängigkeit zwischen ERK2-Aktivität und cGKII-Expression z.B. in Western Blots von HEK-Zellysaten studiert werden.

Denkbar wäre auch, dass die membranständige cGKII ein „scaffold“-Protein (Gerüst- oder Akerprotein) für ERK2 darstellt. *Scaffold*-Proteine bilden die Basis von Multiprotein-Komplexen. Sie können nicht nur die Lokalisation von Proteinen beeinflussen, sondern damit auch deren Aktivität und den Fortschritt der Signalübertragung^{177,178}. Durch *Scaffold*-Proteine kann auch eine ungewollte Cross-Reaktion zwischen Signalwegen unterbunden werden, die dieselben Mediatoren verwenden¹⁷⁸. Ferner kann ein ankommendes Signal an mehrere Proteine des Komplexes weitergegeben und so amplifiziert werden^{179,180}. cGKII ist in der Literatur bereits einmal als Teil eines *Scaffold*-Komplexes beschrieben^{181,182}: In der intestinalen Bürstensaummembran reguliert cGMP die Aktivität des NHE3 (Na^+ - H^+ exchanger) via Phosphorylierung durch cGKII¹⁸¹. GKAP (= cGMP kinase anchoring protein), oder auch NHERF2 (Na^+ - H^+ exchanger regulatory factor) genannt, fungiert als *Scaffold*-Protein für cGKII. Erst durch die Bindung an NHERF2 wird die membranständige cGKII so ausgerichtet, so dass sie NHE3 durch Phosphorylierung inhibieren kann^{181,182}. Für die MAPK-Kaskade und ihre Signalweiterleitung sind vielfache Interaktionen mit *Scaffold*-Proteinen beschrieben^{183,184}. ERK2 interagiert z.B. mit den beiden Tyrosinphosphatasen HePTP¹⁶⁹ und PTP-SL¹⁶⁸, sowie der MAPK-Phosphatase MKP3¹⁸⁵ und MEK1¹⁸⁶. Dabei fungiert jedes Mal eine andere Domäne von ERK2 als Bindungsstelle¹⁸⁷. Eine *Scaffold*-Interaktion zwischen cGKII und ERK2 könnte extrazelluläre Stimuli an der Membran empfangen und amplifizieren¹⁷⁸ oder das MAPK-Signaling durch Lokalisation von ERK2 im Cytosol regulieren. Andersherum könnte ERK2 als *Scaffold*-Protein die cGKII wie bei NHE3/NHREF ausrichten, so dass sie ihr Target (nicht mehr) phosphorylieren kann. Auf diese Weise ließe sich eine Cross-Aktivierung zwischen Signalwegen gleicher Mediatoren verhindern und regulieren¹⁷⁸. Für die weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet wird es unerlässlich sein, die Lokalisation und Aktivität von ERK2 in Abhängigkeit der cGKII zu analysieren.

Die Interaktion zwischen cGKII und ERK2 in braunem Fett ist offenbar ein weiteres Beispiel für eine Verbindung des NO-cGMP-Signalings mit der ERK-MAPK-Kaskade^{188,189,190}. Die Interaktion zwischen cGKI α und dem G-Protein Raf-1, das im MAPK-Signalweg vor („upstream“) den ERKs liegt, führt in Endothelzellen zur Aktivierung der ERKs und ihres Targetproteins¹⁹¹. In Aortazellen aktivieren NO und cGMP ebenfalls den Raf-1-MAPK-Signalweg bishin zur Targetaktivierung durch ERK1/2¹⁹².

Auch andere MAPK-Kaskaden wie der JNK (c-Jun N-terminal kinase)- und der p38-Signalweg können durch NO/cGMP-Signaling aktiviert werden^{188,193}. Die ERK-Isoformen am Ende der Ras-Raf-1-MEK-ERK-Kaskade regulieren Proliferation, Differenzierung und Lebensdauer der Zelle^{123,194}. Die Untersuchung der spezifischen, physiologischen Rollen von ERK1 und ERK2

erfolgte u.a. an Knockout-Mausmodellen^{195,196,197}. Während der ERK2-Knockout lethal ist, zeigt der ERK1-Knockout wenige Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp.

Untersuchungen der Adipogenese des ERK1-Knockouts *in vitro* und *in vivo* offenbarten einen Differenzierungsdefekt, der unabhängig von ERK2 ist: Eine zusätzliche Inhibition von ERK2 hat keinen Effekt auf die verbleibende Adipogeneserate, so dass die Autoren postulieren, ERK1 und nicht ERK2 vermittele die Differenzierung¹⁹⁵. Proliferation und Differenzierung sind somit gute Readouts für die Aktivität der ERK-Isoformen und vielleicht auch für die Untersuchung der cGKII-ERK2 Interaktion. Bereits bekannt ist, dass NO die Proliferation von Präadipozyten *in vitro* inhibiert, aber gleichzeitig die mitochondriale Biogenese stimuliert^{83,145}. Sollte cGKII eine *Scaffold*-Funktion für ERK2 besitzen, so könnte sich das in verändertem Proliferations- und/oder Differenzierungsverhalten der braunen Fettzellen beim Vergleich wt und cGKII-/- bemerkbar machen. Im anderen Fall, dass ERK2 *Scaffold*-Protein für cGKII ist, kann vielleicht die Untersuchung der ERK2-Lokalisation zwischen Wildtyp und cGKII-Knockout weiterhelfen. Im Wildtyp sollte eine verstärkte Lokalisation von ERK2 an der Membran auszumachen sein. Erste präliminäre Untersuchungen zur ERK2-Lokalisation in Chondrozyten zeigten eine veränderte Lokalisierung von ERK im cGKII-Knockout auf (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion von cGKII und ERK2 in braunem Fettgewebe könnte eine Verbindung von NO-cGMP-Signaling mit der MAPK-Kaskade bei Proliferation und Differenzierung von braunem Fett schaffen.

5.6 NO-cGMP-Signaling in Chondrozyten / cGKII und ERK2

Das NO-cGMP-Signaling in Chondrozyten erhielt durch die Publikation des cGKII-Knockout-Modells Aufmerksamkeit⁶⁸. Der Phänotyp des Knockouts zeigt inhibiertes Längenwachstum der Röhrenknochen, was auf die Expression der cGKII in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge zurückzuführen ist⁶⁸. Dort reguliert cGKII die Lokalisation von Sox9 und übt einen inhibierenden Effekt auf den Transkriptionsfaktor aus⁷⁴. Sox9 seinerseits ist essentiell für die Chondrogenese mesenchymaler Zellen¹⁹⁸ und fungiert zusätzlich als Inhibitor der hypertrophen Differenzierung von Chondrozyten¹⁹⁹. Der Phänotyp des cGKII-Knockouts ist auf die von Sox9 inhibierte Differenzierung zurückzuführen⁷⁴. *In vitro* Untersuchungen zur Rolle des ERK-MAPK-Signalings in chondrogenen Zellen liefern kontroverse Ergebnisse: Murakami *et al.* interpretieren ERK als positiven Regulator der Chondrogenese, weil durch die Inhibierung von ERK chondrogene Marker wie Sox9 nicht mehr aktiviert werden²⁰⁰. In mesenchymalen Zellen hingegen sinkt die ERK-Aktivität bei spontaner Chondrogenese und steigt bei durch den Wachstumsfaktor EGF induzierten Inhibition²⁰¹. Shakibaei *et al.* berichten sogar von einer molekularen Interaktion zwischen ERK1/2 und Sox9 im Zellkern artikulärer Chondrozyten²⁰².

Vor diesem Hintergrund stellt die in der vorliegenden Arbeit entdeckte Interaktion zwischen cGKII und ERK2 einen interessanten Befund in einem anderen Zellsystem bzw. Gewebe dar. Wie schon beim braunen Fett könnte auch hier die Lokalisierung von ERK2 die Interaktion mit cGKII in einem physiologischen Zusammenhang setzen. Denkbar wäre, dass cGKII ERK2 an der Membran fixiert und beide gemeinsam die Translokation von Sox9 in den Zellkern regulieren. Die Folge wäre eine reduzierte Aktivität von ERK2 und folglich eine forcierte Chondrogenese durch nukleäres Sox9. Der cGKII-knockout müsste demnach durch freies, aktives ERK an der Differenzierung gehindert werden und eine verminderte Chondrogenese zeigen. Diese These steht im Einklang mit dem Phänotyp des Knockouts. Weitere Versuche müssen nun zeigen, ob tatsächlich die Bildung eines *Scaffold*-Komplexes zwischen cGKII und ERK2 dafür verantwortlich ist und die Lokalisierung von Sox9 beeinflusst.

5.7 Bcl-3 und Cyld

Zur NF- κ B Familie gehören fünf verschiedene Proteine, die auf unterschiedliche Art und Weise die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B beeinflussen (kanonischer und nicht-kanonischer Signalweg). Die Regulation der NF- κ B-Aktivität erfolgt über den Inhibitor I- κ B, dessen Degradation (kanonischer Weg) genauso zur Aktivierung von NF- κ B führt wie der Abbau I- κ B-homologer Subdomänen in p105 und p100 (nicht-kanonischer Weg). p105 und p100 sind Precursorproteine von p50 und p52, die wiederum im Nukleus mit Bcl-3 assoziiert sind²⁰³. Da Bcl-3 in verschiedenen Zelltypen im Cytosol lokalisiert ist und erst nach Aktivierung in den Nukleus wandert, sollte ein Mechanismus existieren, der den Übergang von Bcl-3 in den Zellkern überwacht.

In dieser Arbeit konnte die Interaktion zwischen Bcl-3 und Cyld mittels des Y2H nachgewiesen werden. Darüber hinaus gelang es, die mit Bcl-3 interagierende Domäne von Cyld am C-Terminus der Deubiquitinase zu lokalisieren. Dazu wurden die cDNAs der beiden Proteine in Bait- und Preyvektor des Hefesystems kloniert und in Hefen heterolog exprimiert. Die Interaktion von Bcl-3 und Cyld *in vivo* aktivierte die Reportergene der Hefe. Der Einsatz von Cyld-Trunkationsmutanten offenbarte zudem, dass der N-Terminus von Cyld für die Interaktion mit Bcl-3 entbehrlich ist. Die Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass Cyld und Bcl-3 deubiquitiniert und Bcl-3 dadurch an der Translokation in den Zellkern gehindert wird¹³¹.

5.8 Ausblick

Die Entdeckung der cGMP-abhängigen Kinase II in braunem Fett und die Identifizierung von ERK2 als Interaktionspartner geben Anlass, die Rolle des NO-cGMP-Signalwegs in der Adipogenese weiter zu untersuchen. Das Wissen um den zusätzlichen, chondrogenen Differenzierungsdefekt wirft die Frage auf, ob die cGKII eine generelle Aufgaben bei der Differenzierung von Zellen des Mesenchyms spielt. Bei der Interaktion von cGKII und ERK2 gilt es nun, die physiologische Bedeutung zu untersuchen. Die Theorie, dass cGKII eine Art *Scaffold* für ERK2 darstellen könnte, muss z.B. durch Lokalisationsuntersuchungen geklärt werden. Darüber hinaus sollte die Analyse von „downstream“-Targets von ERK2 Aufschluss über dessen Aktivität während der Differenzierung geben. Zusätzlich ist das Vorhandensein einer „docking site“ (D-Domäne) in der Proteinsequenz der cGKII erwähnenswert. Es ist unter Umständen maßgeblich an der detektierten Interaktion zwischen ERK2 und cGKII beteiligt. Interessant ist die Interaktion zwischen ERK2 und cGKII außerdem im Hinblick auf die chondrogene Differenzierung von MSCs, nachdem es erste Hinweise gibt, die der cGKII die Funktion eines molekularen Schalters zwischen Proliferation und Differenzierung zuweisen. Weiter gibt es mehrere Hinweise, dass sowohl die cGKII als auch ERK2 in Verbindung mit Sox9, einem wichtigen Transkriptionsfaktor der Chondrogenese, stehen. Da in Form der cGKII-knockout-Maus ein genetisches Modell vorhanden ist, an dem die physiologischen Konsequenzen der cGKII-Deletion analysierbar sind, sollte die weitere Aufklärung des NO-cGMP-Signalweges und seiner Interaktion mit ERK2 gelingen.

Darüber hinaus wurde mit PLAA ein weiterer Interaktionspartner identifiziert. Die Interaktion von cGKII und PLAA weist auf einen weiteren Signalweg innerhalb der Adipogenese hin, nämlich die potentielle Regulation der Differenzierung durch die Phospholipase-Aktivität und die damit verbundene Ausschüttung von Botenstoffen wie z.B. Prostaglandinen. Die ersten Untersuchungen zur Phospholipase-Aktivität in braunen Fettzellen sind vielversprechend. Vorerst gilt es, die Interaktion von cGKII und PLAA sowohl im Pulldown wie auch in endogener Co-Immunopräzipitation zweifelsfrei zu belegen und die Untersuchungen der PLA2 Aktivität während der Adipogenese zu vervollständigen.

6 Zusammenfassung

Die NO-cGMP-Signalkaskade ist an der Regulation verschiedenster physiologischer Prozesse beteiligt. Die cGMP-abhängigen Kinasen sind dabei die Hauptrezeptoren für cGMP.

Beide cGMP-abhängigen Kinasen konnten in dieser Arbeit erstmals in Präadipozyten und in Zellen der adipogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die NO/cGMP-Signalkaskade eine Rolle bei der Differenzierung und Funktion von BAT spielt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die cGKII-Interaktionspartner in BAT Zellen zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte die zur Familie der MAP-Kinasen gehörende ERK2 (*extracellular regulated kinase 2*) als Interaktionspartner der cGKII identifiziert werden.

Sie ist einer von mehreren potentiellen Interaktionspartnern, die durch den Yeast-Two-Hybrid-Screen einer cDNA-Bibliothek gefunden wurden, die im Rahmen dieser Doktorarbeit erstellt wurde. Die verwendete cDNA-Bibliothek wurde aus braunem Fettgewebe hergestellt, das Zellen verschiedener, adipogener Differenzierungsstadien enthält. Darüber hinaus wurde die Interaktion sowohl in Pulldown-Assays als auch in endogener Co-Immunopräzipitation verifiziert.

Mit ERK2 konnte eine an vielen transkriptionellen Regulationsmechanismen beteiligte Proteinkinase als Interaktionspartner der cGKII identifiziert werden. Trotz einer potentiellen cGKII-Phosphorylierungsdomäne innerhalb von ERK2 konnte jedoch keine signifikante Phosphorylierung durch die cGKII nachgewiesen werden. Stattdessen ergab die Analyse der cGKII Proteinsequenz eine für die Bindung von ERK2 beschriebene, sogenannte D-Domäne. Dieses Strukturelement liegt innerhalb der katalytischen Untereinheit und vermittelt bei bisher charakterisierten Interaktionspartnern die Bindung zu ERK2. Möglicherweise dient diese rein strukturelle Interaktion der Ausbildung eines Proteinkomplexes in dem die cGKII die Rolle eines *Scaffold*-Proteins für ERK2 übernimmt.

Die Entdeckung von ERK2 als spezifischen Interaktionspartner der cGKII in BAT und auch in Chondrozyten stellt einen weiteren Schritt dar, die Interaktionspartner der NO-cGMP-Kaskade und deren Bedeutung im Differenzierungsprozess von Zellen mesenchymalen Ursprungs zu entschlüsseln.

Der Yeast-Two-Hybrid-Screen lieferte neben ERK2 noch weitere potentielle Interaktionspartner der cGKII: das Phospholipase A2 aktivierende Protein PLAA und PR65, die strukturelle Untereinheit der Proteinphosphatase PP2A.

Während die cGKII-PR65 Interaktion offenbar unspezifisch ist, zeigten verschiedene Versuche eine Interaktion von PLAA und cGKII. Die Interaktion der beiden Proteine konnte im Pulldown-Assay nachgewiesen werden. Erste präliminäre Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung der Phospholipase A₂ in Präadipozyten sind ebenfalls vielversprechend: Das Fehlen der cGKII in den knockout-Präadipozyten führt zu einer im Vergleich zum Wildtyp erhöhten PLA₂-Aktivität.

Bei beiden neuen Interaktionspartnern ERK2 und PLAA ist diese Doktorarbeit die Basis für weitere Untersuchungen.

Außerdem wurde in dieser Arbeit der NF- κ B-Signalweg mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems untersucht. Es konnte die Interaktion zwischen Bcl-3 und Cyld nachgewiesen und auf bestimmte Domänen eingegrenzt werden. Weitere Untersuchungen (Massoumi et al. 2006) zeigten, dass Cyld Bcl-3 deubiquitiniert und dadurch die Translokation von Bcl-3 in den Zellkern hemmt.

7 Anhang

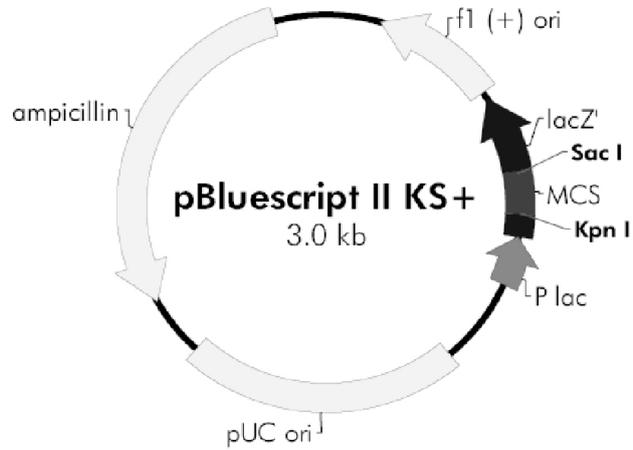
7.1 Übersicht der verwendeten Primer

hBcl3_3'_for	AATTTCTTCCTTCCTTCCCCAT
hBcl3_5'_rev	AGGGGGACGACAAGGCCCGCA
hBcl3_EcoRI_for	AGAATTCATGGACGAGGGGCCCCTGGAC
hBcl3_BamHI_rev	AGGATCCTCAGCTGCCTCCTGGAGCTGG
Bait_T7_Seq_Primer	TAATACGACTCACTATAGGGC
Bait_3'_Seq_Primer	TTTTCGTTTTTAAAACCTAAGAGTC
cGK2ATGfor	GGAATTCGCCACCATGGGAAATGGTTCAGTGAAGCC
cGK2Nsirev	ATGACGTAGCTGCCCTGTTGATAG
cGK2cR	CCGCTCGAGTCACCTGCAAAGCCTCCGGATCA
hCYLD_1_for	CATGCCATGGCTATGAGTTCAGGCTTATGGA
hCYLD_684_rev	CAAGAATTCCTCAGGATCTTTTTTC
mERK2ATGfor	CGGGATCCAGGCCACCATGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
mERK2_seq_for	GTACAGGACCTCATGGAGAC
mERK2_seq_rev	CAACCTGTTCCATGGCACC
mERK2_XhoI_rev	CAGCTCGAGTTTAAAGATCTGTATCCAGGCTG
mGAPDH_for	CGGCAAATTCAACGGCACAGTCA
mGAPDH_rev	GGTTTCTCCAGGCGGCACGTC
HexaXhoIBam	AGGTTCCCTCGAGTTGGATCC(A/G/C/T) ₆ A
K2cKozEcoF	GGAATTCGCCACCGTCGCTTGTGTGACAGAAGC

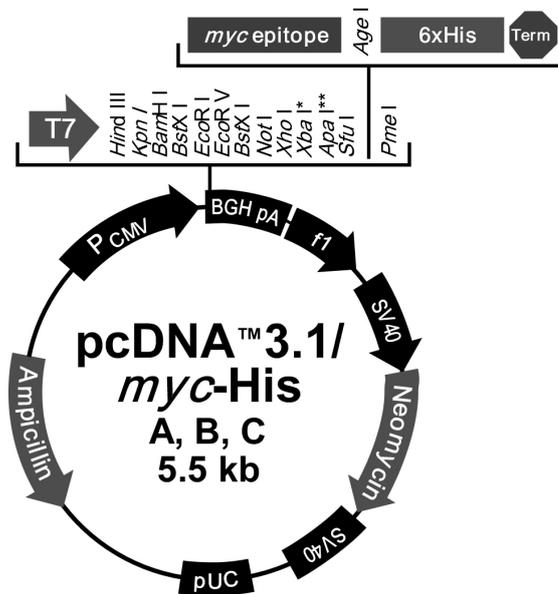
mPLAA_KpnI_for	TAGGTACCTAACCGCCATGGCGAGCGGCGCCTCCAGA
mPLAA_EcoRI_rev	GGAATTCCTACAGCAAATGTAAGACAAG
mPLAA_seq1_for	GACCACAATATTTGCATTTTC
mPLAA_seq2_for	GGGCATGAAGACTGTGTAAG
mPLAA_seq3_for	CAGAGATGGAGAGAGAGTTG
mPLAA_seq4_rev	GAAGTTGCTGGGCCGTTGG
mPLAA_seq5_rev	CCGGATTCAGTTCTATTGC
hPR65_3'_for	ATCCTGGACAACAGCACCTT
hPR65_5'_rev	TTCTTGATGCTGTTGAGGCGAA
hPR65_AA404_for	CGAATTCCTGCTCCCTGCCATTGTGGAG
hPR65_BamHI_rev	ATGGATCCTCAGGCAATAGAGAGAACAGTCAGAGC
Prey_3'_Seq_Primer	AGATGGTGCACGATGCACAG
T3_rev	AATTAACCCTCACTAAAGGG
mVASP_BamHI_for	CGGGATCCGCACCGCCATGAGCGAGACGGTCATCTGTTCC
mVASP_XhoI_rev	TCCCTCGAGTCAAGGAGAACCCCGCTTCCTCAG
mVASP_NdeI_for	GGCAGCCGGAGCATATGGAGC
mVASP_NdeI_rev	CCCGGCGCTCCATATGCTCCG

7.2 Übersicht der wichtigsten, verwendeten Plasmide

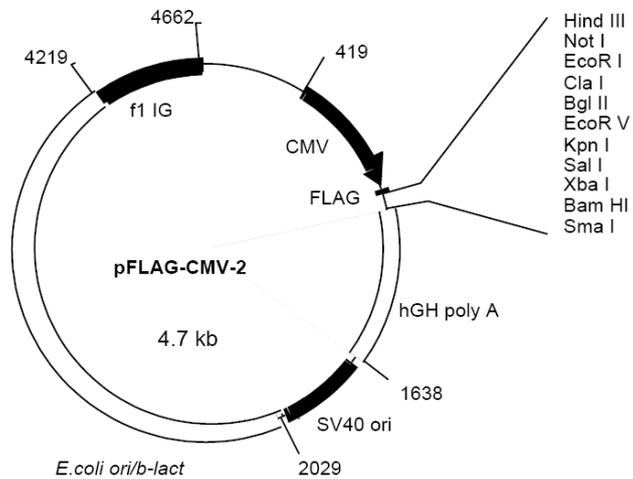
pBluescript II KS+
(Invitrogen)



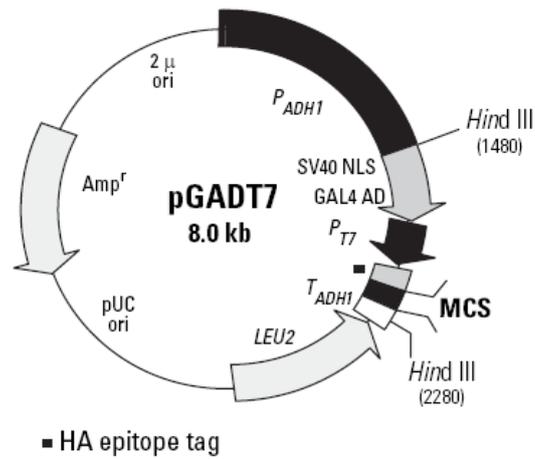
pcDNA3.1MycHis (Invitrogen)



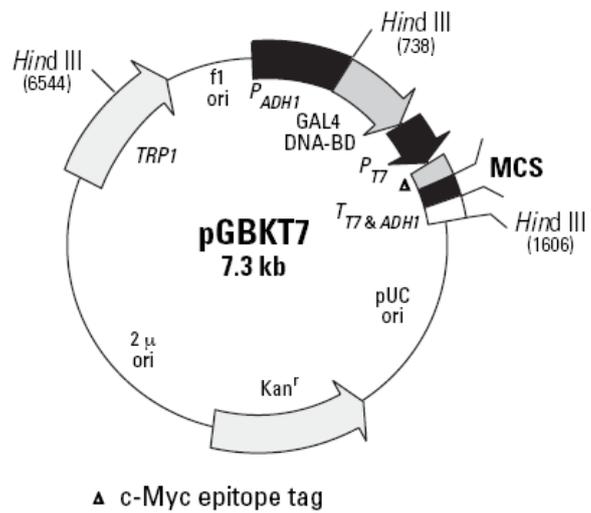
pFLAGCMV2 (Sigma)



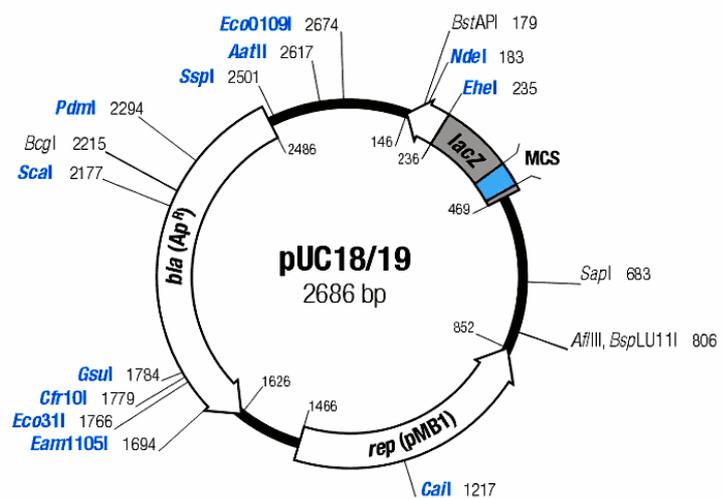
pGADT7 (Clontech)



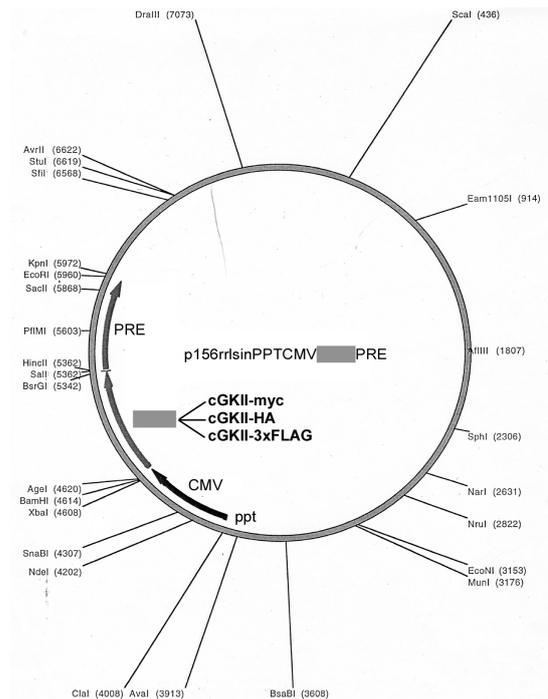
pGBKT7 (Clontech)



pUC18 (Pharmacia)



p156rrlsinPPTCMV-cGKII-
(myc/HA/3xFLAG)-PRE



7.3 Übersicht der verwendeten Originalkonstrukte

Originalkonstrukt	Herkunft
Bcl-3-pRcRSV	R. Massoumi
p3xFLAG-CMV7.1-ERK2	Dr. M. Cobb
PR65-pCS2+ (pBTM116)	Dr. D. Virshup
pCLMFGGFP-CYLD	R. Massoumi
p156rrlsinPPTCMV-cGKII-HA-PRE	B. Haas
p156rrlsinPPTCMV-cGKII-myc-PRE	B. Haas
p156rrlsinPPTCMV-cGKII-3xFLAG-PRE	B. Haas

7.4 Antikörper

7.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
anti- β -Aktin	Maus	1:2000	Sigma ¹
anti-cGKI	Kaninchen	1:2000	eigene Herstellung
anti-cGKII	Kaninchen	1:2000	eigene Herstellung
anti-cGKII	Ziege	1:1000	Santa Cruz ²
anti-ERK1/2	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling ³
anti-HA	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling ³
anti-myc	Maus	1:2000	Cell Signaling ³
anti-VASP	Maus	1:1000	Nanotools ⁴

7.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Herkunft
anti-Kaninchen	Esel	AP	1:2000	Cell Signaling ³
anti-Kaninchen	Esel	HRP	1:5000	Cell Signaling ³
anti-Maus	Esel	HRP	1:10000	Sigma ¹
anti-Ziege	Kaninchen	HRP	1:5000	Pierce ⁵

1 Sigma-Aldrich, Seelze.

2 Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg.

3 Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA.

4 Nanotools Antikörpertechnik, Teningen.

5 Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA.

8 Lebenslauf und Publikation

Name	Katharina Hennecke
Geburtsdatum	3. Juli 1977
Geburtsort	Arnsberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1983-1987	Grundschule Johannesschule Arnsberg
1987-1996	Gymnasium Laurentianum, Arnsberg Abschluss: Abitur

Studium

1996-1998	Studium Chemie, Rheinische Friedrich-Wilhelm Universität Bonn Abschluss: Vordiplom
1998-2002	Hauptstudium Chemie, Ludwig-Maximilian Universität München Abschluss: Diplom

Beruflicher Werdegang

2003-2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig-Maximilian Universität München
2006-2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelm Universität Bonn
seit Oktober 2007	Technische Projektplanerin bei der egomedical AG, München.

Publikation

Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A and Fässler R (2006) Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF- κ B signalling, *Cell* **125**:665-677.

9 Literaturverzeichnis

- ¹ Rapoport RM, Draznin MB & Murad F (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic-GMP-dependent phosphorylation, *Nature* **306** (5939):174-6.
- ² Nüssler AK, Beger HG, Liu ZZ & Billiar TR, Nitric oxide, hepatocytes and inflammation (1995) *Res. Immunol.* **146**(9):671-77.
- ³ Moncada S, Higgs A & Furchgott R, International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research (1997) *Pharmacol. Rev.* **49**(2):137-42.
- ⁴ Furchgott RF & Zawadzki RV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of vascular smooth muscle by acetylcholine, *Nature* **288**(5789):373-6.
- ⁵ Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns AE & Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *PNAS* **84**(24):9265-69.
- ⁶ SoRelle R (1998) Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries, *Circulation* **98**(22):2365-6.
- ⁷ Murad F (1986) Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation, *J. Clin. Invest.* **78**(1):1-5.
- ⁸ Murad F (1994) Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system, *Adv. Pharmacol.* **26**:19-33.
- ⁹ Hakim TS, Sugimori K, Camporesi EM & Anderson G (1996) Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin, *Physiol. Meas.* **17**(4):267-77.
- ¹⁰ Stuehr DJ, Kwon MS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL & Wiseman J (1991) N-omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine, *J. Biol. Chem.* **266**(10):6259-63.
- ¹¹ Friebe A & Koesling D (2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase, *Circ. Res.* **93**(2):96-105.
- ¹² Garbers DL & Lowe DL (1994) Guanylyl cyclase receptors, *J. Biol. Chem.* **269**(49):30741-44.
- ¹³ Feil R, Lohmann SM, de Jonge H, Walter U & Hofmann F (2003) Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice, *Circ. Res.* **93**:907-916.
- ¹⁴ Biel M, Sautter A, Ludwig A, Hofmann F & Zong X (1998) Cyclic nucleotide-gated channels—mediators of NO:cGMP-regulated processes, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **358**(1):140-4.
- ¹⁵ Sonnenburg AK & Beavo JA (1994) Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis, *Adv. Pharmacol.* **26**:87-114.
- ¹⁶ Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P & Hofmann F (1999), Structure and function of cGMP-dependent protein kinases, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **135**:105-49.
- ¹⁷ Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, Hofmann F & Beavo JA (2002) Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.* **277**(5):3310-7.
- ¹⁸ Lerner A & Epstein PM (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases as targets for treatment of haematological malignancies, *Biochem. J.* **393**:21-41.

-
- ¹⁹ Francis SH, Turko IV & Corbin JD (2001) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function, *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* **65**:1-52.
- ²⁰ Nagaoka T, Shirakawa T, Kasuya J, Balon TW, Maganiello VC & Fujita-Yamaguchi Y (1998) Cyclic nucleotide PDE-3. Quantification of PDE-3A and -3B in rat tissues by RNase protection assay, *Cell. Biochem. Biophys.* **29**(1-2):49-66.
- ²¹ Fesenko EE, Kolesnikov SS & Lyubarsky AL (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane in retinal rod outer segment, *Nature* **313**:310-313.
- ²² Yau KW & Nakatani K (1985) Light-suppressible, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment, *Nature* **317**:252-255.
- ²³ Nakamura T & Gold GH (1987) A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia, *Nature* **325**:442-444.
- ²⁴ Thurauf N, Gjuric M, Kobal G & Hatt H (1996) Cyclic nucleotide-gated channels in identified human olfactory receptor neurons, *Eur. J. Neurosci.* **8**:2080-9.
- ²⁵ Kaupp UB & Seifert R (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels, *Physiol. Rev* **82**:769-824.
- ²⁶ Kuo JF & Greengard P (1970) Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3',5'-monophosphate, *J. Biol. Chem.* **245**:2493-2498.
- ²⁷ Hofmann F & Sold G (1972) A protein kinase activity from rat cerebellum stimulated by guanosine-3':5'-monophosphate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**(4):1100-7.
- ²⁸ De Jonge HR (1981) Cyclic GMP-dependent protein kinase in intestinal brush borders, *Adv. Cyclic Nucleotide res.* **14**:315-333.
- ²⁹ Uhler MD (1993) Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from rat brain, *J. Biol. Chem.* **268**(18):13586-91.
- ³⁰ Wernet W, Flockerzi V & Hofmann F (1989) The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase, *FEBS Lett.* **251**:191-196.
- ³¹ Atkinson RA, Saudek V, Huggins JP & Pelton JT (1991) ¹H-NMR and circular dichroism studies of the N-terminal domain of cyclic GMP-dependent protein kinase: a leucin/isoleucine zipper, *Biochemistry* **30**:9387-95.
- ³² Landgraf W, Hofmann F, Pelton JT & Huggins JP (1990) Effects of cyclic GMP on the secondary structure of cyclic GMP-dependent protein kinase and analysis of the enzyme's aminoterminal domain by far-ultraviolet circular dichroism, *Biochemistry* **29**:9921-9928.
- ³³ Zhao J, Trewella J, Corbin J, Francis S, Mitchell R, Bushin R & Walsh D (1997) Progressive cyclic nucleotide-induced conformational changes in the cGMP-dependent protein kinase studied by small angle x-ray scattering in solution, *J. Biol. Chem.* **272**:31929-31936.
- ³⁴ Kemp BE & Pearson RB (1991) Intrasteric regulation of protein kinases and phosphatases, *Biochem. Biophys. Acta* **1094**:67-76.
- ³⁵ Smith JA, Francis SH, Walsh KA, Kumar S & Corbin JD (1996) Autophosphorylation of type Ibeta cGMP-dependent protein kinase increases basal catalytic activity and enhances allosteric activation by cGMP or cAMP, *J. Biol. Chem.* **271**:20756-20762.
- ³⁶ Glass DB & Krebs EG (1979), Comparison of the substrate specificity of adenosine 3':5'-monophosphate and guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases. Kinetic studies using synthetic peptides corresponding to phosphorylation sites in histone H2B, *J. Biol. Chem.* **254**(19):9728-9738.

-
- ³⁷ Tegge W, Frank R, Hofmann F & Dostmann WRG (1995) Determination of cyclic nucleotide-dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper, *Biochemistry* **34**:10569-10577.
- ³⁸ Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korh M, Wilm M, Hofmann F & Ruth P (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase Ibeta, *Nature* **404**:197-201.
- ³⁹ Vaandrager AB, Smolenski A, Tilly BC, Houtsmuller AB, Ehlert EME, Bot AGM, Edixhoven M, Boomaars WEM, Lohmann SM & de Jonge HR (1998) Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl channel activation, *PNAS* **95**:1466-1471.
- ⁴⁰ Skalhegg BS & Taskèn K (1997) Specificity in the cAMP/PKA signalling pathway, differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA, *Front. Biosci.* **2**:331-42.
- ⁴¹ Ruth P, Landgraf W, Keilbach A, May B, Egleme C & Hofmann F (1991) The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini, *Eur. J. Biochem.* **202**:1339-1344.
- ⁴² Hofmann F, Feil R, Kleppisch T & Schlossmann J (2006) Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion, *Physiol. Rev.* **86**:1-23.
- ⁴³ Lohmann SM, Walter U, Miller PE, Greengard P & De-Camilli P (1981) Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain, *PNAS* **78**:653-657.
- ⁴⁴ Geiselhöringer A, Gaisa M, Hofmann F & Schlossmann J (2004) Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues, *FEBS Lett.* **575**:19-22.
- ⁴⁵ Waldmann R, Bauer S, Göbel C, Hofmann F, Jakobs KH & Walter U (1986) Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets, *Eur. J. Biochem.* **158**:203-208.
- ⁴⁶ Keilbach A, Ruth P & Hofmann F (1992) Detection of cGMP-dependent protein kinase isozymes by specific antibodies, *Eur. J. Biochem.* **208**:467-473.
- ⁴⁷ Quian Y, Chao DS, Santillano DR, Cornwell TL, Nairn AC, Greengard P, Lincoln TM & Brecht DS (1996) cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons, *J. Neurosci.* **16**:3130-3188.
- ⁴⁸ Chao DS, Silvagno F, Xia H, Cornwell TL, Lincoln TM & Brecht DS (1997) Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate, *Neuroscience* **76**:665-672.
- ⁴⁹ Feil S, Zimmermann P, Knorn A, Brummer S, Schlossmann J, Hofmann F & Feil R (2005) Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina, *Neuroscience* **135**(3):863-868.
- ⁵⁰ Kleppisch T, Pfeifer A, Klatt P, Ruth P, Montowski A, Fässler R & Hofmann F (1999) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking the cGMP-dependent protein kinase is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase, *J. Neurosci.* **19**(1):48-55.
- ⁵¹ Joyce NC, De-Camilli P, Lohmann SM & Walter U (1986) cGMP-dependent protein kinase is present in high concentrations in contractile cells of the kidney vasculature, *J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res.* **11**:191-198.

-
- ⁵² Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sauszbier M, Hirneiß C, Wang G-X, Korth M, Aszódi A, Andersson K-E, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fässler R & Hofmann F (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice, *EMBO J.* **17**(11):3045-51.
- ⁵³ Komalavilas P & Lincoln TM (1996) Phosphorylation of the 1,4,5-triphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.* **269**(12):8701-7.
- ⁵⁴ Haug LS, Jensen V, Hvalby O, Walaas SI & Ostvold AC (1999) Phosphorylation of the 1,4,5-triphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ, *J. Biol. Chem.* **274**(11):7467-73.
- ⁵⁵ Ammendola A, Geiselhöringer A, Hofmann F & Schlossmann J (2001) Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-triphosphate receptor-associated cGMP-dependent protein kinase substrate IRAG and cGMP kinase Ibeta, *J. Biol. Chem.* **276**(26):24153-9.
- ⁵⁶ Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P & Toro L (1998) The large conductance, voltage-dependent and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo, *J. Biol. Chem.* **273**(49):32950-6.
- ⁵⁷ Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B & Keef KD (1999) Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072, *J. Biol. Chem.* **274**(16):10927-35.
- ⁵⁸ Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM & Mendelsohn ME (1999) Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ialpha, *Science* **286**:1583-1587.
- ⁵⁹ Somlyo AP & Somlyo AV (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II, *J. Physiol.* **522**(2):177-185.
- ⁶⁰ Massberg S, Sauszbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fässler R, Ruth P, Krombach F & Hofmann F (1999) Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3':5'-monophosphate kinase I, *J. Exp. Med.* **189**(8):1255-64.
- ⁶¹ Walter U, Eigenthaler M, Geiger J & Reinhard M (1994) Role of cyclic GMP-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets, *Adv. Exp. Med. Biol.* **344**:237-249.
- ⁶² Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sauszbier M, Klatt P & Hofmann F (1999) Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, *Springer Berlin Heidelberg* **135**:105-149.
- ⁶³ Reinhard M, Jarchau T & Walter U (2001) Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins, *Trends Biochem. Sci.* **26**:243-249.
- ⁶⁴ El-Husseini AE, Balden C & Vincent SR (1995) Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain, *J. Neurochem.* **64**:2814-2817.
- ⁶⁵ Markert T, Vaandrager AB, Gambaryan S, Pohler D, Hausler C, Walter U, de Jonge HR, Jarchau T & Lohmann SM (1995) Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine, Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *J. Clin. Invest.* **96**:822-830.
- ⁶⁶ Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U & de Jonge HR (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases, *Trends Biochem. Sci.* **22**:307-312.
- ⁶⁷ Gambaryan S, Häusler C, Markert T, Pohler D, Jarchau T, Walter U, Haase W, Kurtz A & Lohmann SM (1996) Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression, *J. Clin. Invest.* **98**:662-670.

-
- ⁶⁸ Pfeifer A, Aszódi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F & Fässler R (1996) Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II, *Science* **274**:2082-2086.
- ⁶⁹ Vaandrager AB, Ehlert EME, Jarchau T, Lohmann SM & de Jonge HR (1996) N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II, *J. Biol. Chem.* **271**:7025-7029.
- ⁷⁰ French PJ, Bijman J, Eidixhoven M, Vaandrager AB, Scholte BJ, Lohmann SM, Nairn AC & de Jonge HR (1995) Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II, *J. Biol. Chem.* **270**:26626-26631.
- ⁷¹ Giannella RA (1976) Suckling mouse model for detection of heat-stable *E.coli* enterotoxin: characteristics of the model, *Infect. Immun.* **14**(1):95-99.
- ⁷² He XR, Greenberg SG, Briggs JP & Schneermann JP (1995) Effect of nitric oxide in renin secretion. II. Studies in the perfused juxtaglomerular apparatus, *Am. J. Physiol.* **268**:F953-F959.
- ⁷³ Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F & Kurtz A (1998) Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression, *J. Clin. Invest.* **102**(8):1576-82.
- ⁷⁴ Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Shimoaka T, Kawano H, Kamekura S, Tsuchida A, Yokoi N, Nakamura K, Komeda K, Chung UI & Kawaguchi H (2004) Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes, *Genes Dev.* **18**:2418-2429.
- ⁷⁵ Barnard T (1977) Brown adipose tissue as an effector of non-shivering thermogenesis, *Experientia* **33**:1124-1125.
- ⁷⁶ Rothwell NJ & Stock MJ (1979) A role of brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis, *Nature* **281**:31-35.
- ⁷⁷ Cinti S (2005) The adipose organ. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **73**:9-15.
- ⁷⁸ Nicholls DG (1983) The thermogenic mechanism of brown adipose tissue, *Rev. Biosci. Rep.* **3**:431-441.
- ⁷⁹ Palou A, Pico C, Bonet ML & Oliver P (1998) The uncoupling protein, thermogenin, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **30**(1):7-11.
- ⁸⁰ Cleeter MWJ, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S & Schapira AHV (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide, *FEBS Lett.* **345**:50-54.
- ⁸¹ Beltran B, Mathur A, Duchon MR, Erusalimsky JD & Moncada S (2000) The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death, *PNAS* **97**(26):14602-14607.
- ⁸² Nisoli E, Clementi E, Tonello C, Sciorati C, Briscini L & Carruba MO (1998) Effects of nitric oxide on proliferation and differentiation of rat brown adipocytes in primary culture, *British J Pharmacol* **125**:888-894.
- ⁸³ Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S & Carruba MO (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide, *Science* **299**:896-899.
- ⁸⁴ Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG & Prockop DJ (2004) Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSC), *J. Bone. Miner. Res.* **19**:256-264.

-
- ⁸⁵ Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT & Owen ME (1991) Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential, *J. Cell. Sci.* **99**(Pt1):131-9.
- ⁸⁶ Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM & Johnstone B (1998) The chondrogenic potential of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells, *J. Bone Joint Surg. Am.* **80**(12):1745-57.
- ⁸⁷ Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI & Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro, *J. Biol. Chem.* **64**:295-312.
- ⁸⁸ Baksh D, Song L & Tuan RS (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy, *J. Cell. Mol. Med.* **8**(3):301-316.
- ⁸⁹ Sambrook J & Russell DW (2001) Molecular Cloning A laboratory manual, 3rd ed, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- ⁹⁰ Sanger F, Micklen S & Coulson AR (1977) DNA-sequencing with chain-termination inhibitors, *PNAS* **74**:5463-5467.
- ⁹¹ Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **48**:422-427.
- ⁹² Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**:680-685.
- ⁹³ Fling SP & Gregerson DS (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris-buffer system without urea, *Anal.Biochem.* **155**:83-88.
- ⁹⁴ Schmitt M & Lehr M (2004) HPLC assay with UV spectrometric detection for the evaluation of inhibitors of cytosolic phospholipase A2, *J.Pharm.Biomed.Anal.* **35**(1):135-42.
- ⁹⁵ Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal.Biochem.* **162**(1):156-9.
- ⁹⁶ Okayama H & Berg HP (1982) High-efficiency cloning of full-length cDNA, *Mol. Cell. Biol.* **2**:161-170.
- ⁹⁷ Fields S & Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions, *Nature* **340**:245-46.
- ⁹⁸ Ma J & Ptashne M (1987) Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments, *Cell* **48**(5):847-53.
- ⁹⁹ Guthrie C & Fink GR (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology, *Methods Enzymol.* **194**:1-932.
- ¹⁰⁰ James P, Halladay J & Craig EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast, *Genetics* **144**:1425-36.
- ¹⁰¹ Harper JW, Adami GR, Wel N, Keyomarsi K & Elledge SJ (1993) The p21Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell* **75**:805-16.
- ¹⁰² Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R & Fields S (1993) Elimination of false positives that arise in using the Two-Hybrid-system, *Biotechniques* **14**:920-24.
- ¹⁰³ Gietz RD & Woods RA (1994) High Efficiency transformation in Yeast. (Invited Book Chapter) In: *Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches*, pp. 121-134.
- ¹⁰⁴ Miller JH (1972) aus *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.

-
- ¹⁰⁵ Miller JH (1992) aus *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor p.72.
- ¹⁰⁶ Haas B, unpublished data.
- ¹⁰⁷ Mumby MC & Walter G (1993) Protein serine/threonine kinases: structure, regulation and functions in cell growth, *Physiol. Rev.* **73**(4):673-699.
- ¹⁰⁸ Resjö S, Oknianska A, Zolnierowicz S, Manganiello V & Degerman E (1999) Phosphorylation and activation of phosphodiesterase type 3B (PDE3B) in adipocytes in response to serine/threonine phosphatase inhibitors: deactivation of PDE3B in vitro by protein phosphatase type 2A, *Biochem. J.* **341**:839-845.
- ¹⁰⁹ Virshup DM, Cegielska A, Russo A, Kelly TJ & Shaffer S (1993) *Adv. Protein Phosphatases* **7**:271-293.
- ¹¹⁰ Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hammings BA & Barford D (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs, *Cell* **96**:99-110.
- ¹¹¹ Lechward K, Awotunde OS, Swiatek W & Muszynska G (2001) Protein Phosphatase 2A: Variety of forms and diversity of functions, *Acta Biol. Pol.* **48**:921-933.
- ¹¹² Berger HA, Travis SM & Welsh MJ (1993) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and phosphatases *J. Biol. Chem.* **3**(25):2037-2047.
- ¹¹³ Sansom SC, Stockand JD, Hall D & Williams B (1997) Regulation of large calcium-activated potassium channels by protein phosphatase 2A, *J. Biol. Chem.* **272**(15):9902-9906.
- ¹¹⁴ McCright B & Virshup DM (1995) Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunit, *J. Biol. Chem.* **270**(44):26123-26128.
- ¹¹⁵ Murakami M, Nakatani Y, Atsumi G, Inoue K & Kudo I (1997) Regulatory functions of phospholipase A2, *Crit. Rev. Immunol.* **17**(3-4):225-283.
- ¹¹⁶ Su X, Mancuso DJ, Bickel PE, Jenkins CM & Gross RW (2004) Small interfering RNA knockdown of calcium-dependent phospholipases A2 β or γ inhibits the hormone-induced differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes, *J Biol. Chem.* **279**(21):21740-21748.
- ¹¹⁷ Chopra AK, Ribardo DA, Wood TG, Prusak DJ, Xu Xj & Peterson JW (1999) Molecular characterization of cDNA for phospholipase A2-activating protein, *Biochim. Biophys. Acta* **144**:125-130.
- ¹¹⁸ Ribardo DA, Kuhl KR, Peterson JW & Chopra AK (2002) Role of melittin-like region within phospholipase A2-activating protein in biological function, *Toxicon* **40**:519-526.
- ¹¹⁹ Brett TJ, Traub LM & Fremont DH (2002) Accessory protein recruitment motifs in clathrin-mediated endocytosis, *Structure* **10**:797-809.
- ¹²⁰ Mullally JE, Chernova T & Wilkinson KD (2006) Doa1 is a Cdc48 adapter that possesses a novel ubiquitin binding domain, *Mol. Cell. Biol.* **26**(3):822-830.
- ¹²¹ Widmann C, Gibson S, Jarpe MB & Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human, *Physiol. Rev.* **79**(1):143-169.
- ¹²² Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E & Cobb MH (1998) Phosphorylation of MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation, *Cell* **93**(4):605-615.

-
- ¹²³ Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K & Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocrin. Rev.* **22**:153-183.
- ¹²⁴ Turjanski AD, Vague JP & Gutkind JS (2007) MAP Kinases and the control of nuclear events, *Oncogene* **26**(22):3240-53.
- ¹²⁵ Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J & Walter U (1994) cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets, *J. Biol. Chem.* **269**: 14509-14517.
- ¹²⁶ Taylor MK, Ahmed R, Begley M & Uhler MD, Autoinhibition and isoform-specific dominant negative inhibition of the type II cGMP-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.* **277**: 37242-37253.
- ¹²⁷ Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R, Green H, Brown C, Biggs PJ, Lakhani SR, Jones C, Hansen J, Blair E, Hofmann B, Siebert R, Turner G, Evans DG, Schrandt-Stumpel C, Beemer FA, van Den Ouweland A, Halley D, Delpuch B, Cleveland MG, Leigh I, Leisti J & Rasmussen S (2000) Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene, *Nat. Genet.* **25**:160-165.
- ¹²⁸ Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D & Coutois G (2003) The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signalling by deubiquitination, *Nature* **424**:801-805.
- ¹²⁹ Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirritzis T, Farmer H, Ashworth A & Mosialos G (2003) CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF- κ B-activation by TNFR family members, *Nature* **424**:793-796.
- ¹³⁰ Regamey A, Hohl D, Liu JW, Roger T, Kogerman P, Toftgard R & Huber M (2003) The tumor suppressor CYLD interacts with TRIP and regulates negatively NF- κ B activation by tumor necrosis factor, *J. Exp. Med.* **198**:1959-1964.
- ¹³¹ Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A & Fässler R (2006) Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl3-dependent NF- κ B-signaling, *Cell* **125**:665-677.
- ¹³² Gamm DM, Francis SH, Angelotti TP, Corbin JD & Uhler MD (1995) The type II isoform of cGMP-dependent protein kinase is dimeric and possesses regulatory and catalytic properties distinct from type I isoforms, *J. Biol. Chem.* **270**:27380-27388.
- ¹³³ Glass DB (1990) Peptides and protein phosphorylation (Kemp, BE, ed.), *CRC Press*, 209-238.
- ¹³⁴ Toro L, Wallner M, Merra P & Tanaka Y (1998) Maxi-KCa, a unique member of the voltage-gated K channel superfamily, *News Physiol. Sci.* **13**:112-117.
- ¹³⁵ Yuasa K, Michibata H, Omori K & Yanaka N (1999) A novel interaction of cGMP-dependent protein kinase I with troponin T, *J. Biol. Chem.* **274**:37429-37434.
- ¹³⁶ Yuasa K, Omori K & Yanaka N (2000) Binding and phosphorylation of a novel male germ cell-specific cGMP-dependent protein kinase-anchoring protein by cGMP-dependent protein kinase I α , *J. Biol. Chem.* **275**:48974905.
- ¹³⁷ Picciotto MR, Cohn JA, Bertuzzi G, Greengard P & Nairn AC (1992) Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *J. Biol. Chem.* **267**:12742-12752.
- ¹³⁸ De Combrugghe B, Lefebvre C & Nakashima K (2001) Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13**:721-727.

-
- ¹³⁹ Sock E, Pagon RA, Keymolen K, Lissens W, Wegner M & Scherer G (2003) Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor Sox9 as a cause for campomelic dysplasia, *Hum. Mol. Genet.* **12**:1439-1447.
- ¹⁴⁰ Lefebvre V, Li P & de Crombrughe B (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene, *EMBO J.* **17**:5718-5733.
- ¹⁴¹ Seydoux J & Girardier L (1978) Control of brown fat thermogenesis by the sympathetic nervous system, *EXS* **32**:153-167.
- ¹⁴² Cannon B & Nedergard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance, *Physiol. Rev.* **84**(1):277-359.
- ¹⁴³ Florez-Duquet M & McDonald RB (1998) Cold-induced thermoregulation and biological aging, *Physiol. Rev.* **78**(2):339-354.
- ¹⁴⁴ Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F & Ricquier D (1991) Minireview: The uncoupling protein UCP1: a membranous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue, *Int. J. Biochem.* **23**:791-801.
- ¹⁴⁵ Giordano A, Tonello C, Bulbarelli A, Cozzi V, Cinti S, Carruba MO & Nisoli E (2002) Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus, *FEBS Lett.* **514**:135-140.
- ¹⁴⁶ Kawachi H, Moriya NH, Korai T, Tanaka S, Watanabe M, Matsui T, Kawada T & Yano H (2006) Nitric oxide suppresses preadipocyte differentiation in 3T3-L1 culture, *Mol. Cell. Biochem.* **300**:61-67.
- ¹⁴⁷ Wera S & Hemmings BA (1995) Serine/threonine phosphatases, *Biochem. J.* **311**:17-29.
- ¹⁴⁸ Lechward K, Awotunde OS, Swiatek W & Muszynska G (2001) Protein phosphatase 2A: Variety of forms and diversity of functions, *Acta Biochim. Pol.* **48**(4):921-933.
- ¹⁴⁹ Hemmings BA, Adams-Pearson C, Maurer F, Mueller P, Goris J, Merlevede W, Hofsteenge J & Stone SR (1990) Alpha-forms and beta-forms of the 65 kD subunit protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure, *Biochemistry* **29**:3166-3173.
- ¹⁵⁰ Clark MA, Conway TM, Shorr RGL & Crooke ST (1987) Identification and isolation of a mammalian protein which is antigenically and functionally related to the phospholipase A2 stimulatory peptide melittin, *J. Biol. Chem.* **9**(25):4402-4406.
- ¹⁵¹ Habermann E (1972) Bee and wasp venoms, *Science* **177**(46):314-322.
- ¹⁵² Dennis EA (1983) Phospholipases, *The Enzymes 3rd edition* **16**:307-357.
- ¹⁵³ Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross TS, Bross TE, Ishii H, Bansal V & Wilson D (1986) The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules, *Science* **234**:1519-1526.
- ¹⁵⁴ Dennis EA (1987) The regulation of eicosanoid production: role of phospholipases and inhibitors, *Bio/Technology* **5**:1294-1300.
- ¹⁵⁵ Murakami M & Kudo I (2004) Secretory phospholipase A2, *Biol. Pharm. Bull.* **27**(8):1158-1164.
- ¹⁵⁶ Hirabayashi T, Murayama T & Shimizu T (2004) Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2, *Biol. Pharm. Bull.* **27**(8):1169-1173.
- ¹⁵⁷ Akiba S & Sato T (2004) Cellular function of calcium-independent phospholipase A2, *Biol. Pharm. Bull.* **27**(8):1174-1178.

-
- ¹⁵⁸ Bomalaski JS, Baker DG, Brophy L, Ressurrecion NV, Spilberg I, Muniain M & Clark MA (1989) A phospholipase A2-activating protein (PLAP) stimulates human neutrophil aggregation and release of lysosomal enzymes, superoxide and eicosanoids, *J. Immunol.* **142**(11):3957-62.
- ¹⁵⁹ Gao G & Serrero G (1990) Phospholipase A2 is a differentiation-dependent enzymatic activity for adipogenic cell line and adipocyte precursors in primary cultures, *J. Biol. Chem.* **265**(5):2431-2434.
- ¹⁶⁰ Miller CW, Casimir DA & Ntambi JM (1996) The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F2alpha, *Endocrinology* **137**(12):5641-5650.
- ¹⁶¹ Casimir DA, Miller CW & Ntambi JM (1996) Preadipocyte differentiation blocked by prostaglandin stimulation of prostanoid FP2 receptor in murine 3T3-L1 cells, *Differentiation* **60**:203-210.
- ¹⁶² Su X, Mancuso DJ, Bickel PE, Jenkins CM & Gross RW (2004) Small interfering RNA knockdown of calcium-independent phospholipases A2 β or γ inhibits hormone-induced differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *J. Biol. Chem.* **279**(21):21740-21748.
- ¹⁶³ Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ & Sturgill TW (1989) Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase, *PNAS* **86**:6940-6943.
- ¹⁶⁴ Chang L & Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades, *Nature* **410**(6824):37-40.
- ¹⁶⁵ Ferrell JE, Bhatt RR (1997) Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.* **272**:19008-19016.
- ¹⁶⁶ Robbins DJ, Cobb MH (1992) ERK2 autophosphorylates on a subset of peptides phosphorylated in intact cells in response to insulin and nerve growth factor: analysis by peptide mapping, *Mol. Biol. Cell.* **3**:299-308.
- ¹⁶⁷ Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S & Pouyssegur J (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry, *EMBO J.* **18**(3):664-674.
- ¹⁶⁸ Zuniga A, Torres J & Pulido R (1999) Interaction of mitogen-activated protein kinase with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm, *J. Biol. Chem.* **274**(31):21900-21907.
- ¹⁶⁹ Pettiford SM & Herbst R (2003) The protein tyrosine phosphatase HePTP regulates nuclear translocation of ERK2 and can modulate megakaryocytic differentiation of K562 cells, *Leukemia* **17**(2):366-78.
- ¹⁷⁰ Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH & Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF, *Cell* **65**(4):663-675.
- ¹⁷¹ Marshall CJ (1994) MAP kinase kinase kinases, MAP kinase kinase and MAP kinase, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**(1):82-89.
- ¹⁷² Colbran JL, Francis SH, Leach AB, Thomas MK, Jiang H, McAllister LM & Corbin JD (1992) A phenylalanine in peptide substrates provides for selectivity between cGMP- and cAMP-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.* **267**(14):9589-9594.

-
- ¹⁷³ Fantz DA, Jacobs D, Glossip D & Kornfeld K (2001) Docking sites on substrate specific proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues, *J. Biol. Chem.* **276**(29):27256-27265.
- ¹⁷⁴ Caldwell KK, Sosa M & Buckley CT (2006) Identification of mitogen-activated protein kinase docking sites in enzymes that metabolize phosphatidylinositols and inositols phosphates, *Cell. Comm. Signal.* **4**:2.
- ¹⁷⁵ Zhou T, Sun L, Humphreys J and Goldsmith EJ (2006) Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2, *Structure* **14**(6):1011-1019.
- ¹⁷⁶ Tanoue T, Adachi M, Moriquichi T & Nishida E (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators, *Nat. Cell. Biol.* **2**(2)110-6.
- ¹⁷⁷ Pawson T & Scott JD (1997) Signaling through scaffold, anchoring and adapter proteins, *Science* **278**(5246):2075-2080.
- ¹⁷⁸ Juliano RL (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins and immunoglobulin-superfamily members, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**:283-323.
- ¹⁷⁹ Burack WR & Shaw AS (2000) Signal transduction: hanging on a scaffold, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**:211-216.
- ¹⁸⁰ Levchenko A, Bruck J & Sternberg PW (2000) Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signalling and reduce its threshold properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:5818-5823.
- ¹⁸¹ Cha B, Kim JH, Hut H, Hogema BM, Nadarja J, Zizak M, Cavet M, Lee-Kwon W, Lohmann SM, Smolenski A, Ming Tse C, Yun C, de Jonge HR & Donowitz M (2005) cGMP inhibition of Na⁺/H⁺ antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter NHERF2, a broad specificity protein kinase G-anchoring protein, *J. Biol. Chem.* **280**(17):16642-16650.
- ¹⁸² Donowitz M, Cha B, Zachos NC, Brett CL, Sharma A, Ming Tse C & Li X (2005) NHERF family and NHE3 regulation, *J. Physiol.* **567**.1:3-11.
- ¹⁸³ Karandikar M & Cobb MH (1999) Scaffold and protein interactions in MAP kinase modules, *Cell Calcium* **26**(5):219-226.
- ¹⁸⁴ Morrison DK & Davis RJ (2003) Regulation of MAP kinase signalling modules by scaffold proteins in mammals, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **19**:91-118.
- ¹⁸⁵ Farooq A, Chaturvedi G, Mujtaba S, Plotnikova O, Zeng L, Dhalluin C, Ashton R & Zhou MM (2001) Solution structure of ERK2 binding domain of MAPK phosphatase MKP-3: structural insights into MKP-3 activation by ERK2, *Mol. Cell.* **7**(2):387-399.
- ¹⁸⁶ Eblen ST, Catling AD, Assanah MC & Weber MJ (2001) Biochemical and biological functions of the N-terminal, noncatalytic domain of extra-cellular regulated kinase 2, *Mol. Cell. Biol.* **21**(1):249-259.
- ¹⁸⁷ Shibayama S, Shibata-Seita R, Miura K, Kirino Y & Takishima K (2002) Identification of a C-terminal region that is required for the nuclear translocation of ERK2 by passive diffusion, *J. Biol. Chem.* **277**(40):37777-37782.
- ¹⁸⁸ Komalavilas P, Shah PK, Jo H & Lincoln TM (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.* **274**:34301-34309.

- ¹⁸⁹ Hood J & Granger HJ (1998) Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells, *J. Biol. Chem* **273**:23504-23508.
- ¹⁹⁰ Gu M, Lynch J & Brecher P (2000) Nitric oxide increases p21(Waf1/Cip1) expression by a cGMP-dependent pathway that includes activation of extracellular signal-regulated kinase and p70(S6k), *J. Biol. Chem.* **275**:11389-11396.
- ¹⁹¹ Zaragoza C, Soria E, López E, Browning D, Balbín M, López-Otín C & Lamas S (2002) Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells, *Mol. Pharmacol.* **62**:927-935.
- ¹⁹² Oliviera CJ, Schindler F, Ventura AM, Morais MS, Arai RJ, Debbas V, Stern A, Monteiro HP (2003) Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells, *Free Radic. Biol. Med.* **35**(4):381-396.
- ¹⁹³ Hou Y, Ye RD & Browning DD (2004) Activation of the small GTPase Rac1 by cGMP-dependent protein kinase, *Cell. Signal.* **16**(9):1061-1069.
- ¹⁹⁴ Brunet A & Pouyssegur J (1997) Mammalian MAP kinase modules: how to transducer specific signals, *Essays Biochem.* **32**:1-16.
- ¹⁹⁵ Bost F, Aouadi M, Caron L, Even P, Belmonte N, Prot M, Dani C, Hofmann P, Pagès G, Pouyssegur J, Le Marchand-Brustel Y & Binétruy B (2005) The extracellular-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis, *Diabetes* **54**:402-411.
- ¹⁹⁶ Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P & Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk1) knockout mice, *Science* **286**:1374-1377.
- ¹⁹⁷ Yao Y, Wu J, Germann UA, Su MSS, Kuida K & Boucher DM (2003) Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation, *PNAS* **100**(22):12759-12764.
- ¹⁹⁸ De Combrugghe B, Lefebvre V & Nakashima K (2001) regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13**:721-727.
- ¹⁹⁹ Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A & de Combrugghe B (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6, *Genes Dev.* **16**(21):2813-2828.
- ²⁰⁰ Murakami S, Kan M, MacKeehan WL & de Combrugghe B (2000) Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway, *PNAS* **97**(3):1113-1118.
- ²⁰¹ Yoon YM, Kim SJ, Oh CD, Ju JW, Song WK, Yoo Yj, Huh TL & Chun JS (2002) Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extra-cellular regulated protein kinase, *J. Biol. Chem.* **277**(10):84128420.
- ²⁰² Shakibaei M, Seifarth C, John T, Rahmanzadeh M & Mobasher A (2006) Igf-I extends chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: molecular association between Sox9 and ERK1/2, *Biochem. Pharmacol.* **72**(11):1383-1395.
- ²⁰³ Watanabe N, Iwamura T, Shinoda T & Fu T (1997) Regulation of NFkB1 proteins by the candidate oncoprotein Bcl-3: generation of NF- κ B homodimers from the cytoplasmic pool of p50-p105 and nuclear translocation, *EMBO J.* **16**:3609-3620.