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



**Regulation der Zelladhäsion in Lymphozyten
durch Interaktion der cytoplasmatischen Proteine
Cytohesin-1 und CYTIP**

von
Thomas Böhm
aus
München

München 2005

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 02.02.2005



Thomas Böhm

Dissertation eingereicht am: 17.02.2005
1. Gutachter: Prof. Dr. W. Kolanus
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Domdey
Mündliche Prüfung am: 19.05.2005

Danksagung

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Genzentrums, allen Kolleginnen und Kollegen, die während meiner Doktorarbeit mit mir kooperierten und mich bei meiner Arbeit unterstützten.

Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus möchte ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Genzentrum München und die fast unerschöpfliche Möglichkeit Ideen umzusetzen zu können danken. Neben der ständigen Diskussionsbereitschaft will ich an dieser Stelle die große Unterstützung während einer gesundheitlichen Beeinträchtigung hervorheben.

Herrn Prof. Dr. Horst Domdey möchte ich herzlich für die Erstellung des Gutachtens und die Übernahme des Vorsitzes bei meiner Dissertation danken.

Dr. Wolfgang Nagel und Dr. Lutz Zeitlmann danke ich besonders für die große Unterstützung und Ideen und für mind. 1001 freie Minuten für meine Fragen die zu jeder Tages- und Nachtzeit gestellt werden konnten.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kolanus bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Besonders hervorheben und danken möchte ich hierbei Dr. Christiane Geiger, die mich viele Stunden „Schreibplatz an Schreibplatz“ ertragen mußte/durfte. Ihr, wie auch Bettina Kellersch danke ich für die große Unterstützung beim Review meiner Veröffentlichung.

Auch bei Henning Dierks, Thomas Knorr und Pinar Sirim möchte ich mich für die freundschaftliche Stimmung im Labor sowie bei Michael Knoll für die vielen Inkubationsstunden „Bänch an Bänch“ bedanken.

Mein besonderer Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Last but not least, möchte ich noch meiner Freundin Nanna danken, die mich stets während dieser Arbeit unterstützt hat und mir immer liebevoll zur Seite gestanden ist.

Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1997 bis Mai 2003 im Labor von Prof. Dr. W. Kolanus am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen bzw. Manuskripten verwendet:

Boehm T., Hofer S., Winklehner P., Kellersch B., Geiger C., Trockenbacher A., Neyer S., Fiegl H., Ebner S., Ivarsson L., Schneider R., Kremmer E., Heufler C. & Kolanus W. (2003).

Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration. *EMBO J.* **22**(5), 1014-1024.

Mayer G., Blind M., Nagel W., Böhm T., Knorr T., Jackson C.L., Kolanus W. & Famulok M. (2001).

Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 4961-4965.

Gawaz M., Besta F., Ylanne J., Knorr T., Dierks H., Böhm T. & Kolanus W. (2001).

The NITY motif of the beta-chain cytoplasmic domain is involved in stimulated internalization of the beta3 integrin A isoform. *J. Cell Sci.* **114**, 1101-1113.

Geiger C., Nagel W., Boehm T., van Kooyk Y., Figor C.G., Kremmer E., Hogg N., Zeitlmann L., Dierks H., Weber K.S.C. & Kolanus W. (2000).

Cytohesin-1 regulates β -2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J.* **19**, 2525-2536.

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein

Freiheit in der Forschung besteht darin, daß es jedem erlaubt ist, mehr zu arbeiten, als verlangt wird.

Feodor Lynen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen des Immunsystems der Vertebraten	1
1.2	Adhäsionsvorgänge bei Leukozyten	5
1.2.1	Die Familie der Selektine	7
1.2.2	Wichtige Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie bei Leukozyten-Wechselwirkungen	8
1.2.3	Die Proteinfamilie der Integrine	9
1.2.4	Wechselwirkung zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen werden zum großen Teil über Adhäsionsmoleküle vermittelt	12
1.3	Regulation der Integrinfunktion	13
1.3.1	Regulierung des Aktivierungszustands des LFA-1 Integrins	13
1.3.2	Signaltransduktion durch Integrine	14
1.3.3	Mechanismen der Integrinregulierung	15
1.4	Die Cytohesin-Familie	16
1.5	Cytohesin-1 und die Regulierung der Zelladhäsion	19
2	Zielsetzung der Arbeit	24
3	Materialien	26
3.1	Laborgeräte	26
3.2	Chemikalien und Biochemikalien	27
3.3	Radiochemikalien	29
3.4	Kommerzielle Reaktionssysteme	30
3.5	Enzyme	30
3.6	Agarose und Sepharose zur Koimmunpräzipitation	30
3.7	Kulturmedien/Seren	30
3.8	Antikörper	31
3.8.1	Primäre Antikörper	31
3.8.2	Sekundäre Antikörper	31
3.9	Lösungen und Puffer	32
3.10	Molekularbiologische Hilfsmittel	32
3.11	Bakterienstämme	33
3.12	Hefestämme	33
3.13	Eukaryontische Ziellinien	34

3.14	Virusstämme	34
3.15	Wurmstämme	34
3.16	DNA- und Proteinlängenstandards	35
3.16.1	DNA- Längenstandard	35
3.16.2	Protein- Längenstandards	35
3.17	Plasmide	36
3.18	Fusionsanteile von Plasmidvektoren	36
3.19	cDNA-Genbanken	37
3.20	Oligodesoxyribonukleotide	37
4	Methoden	39
4.1	Methoden prokaryontischer Zellkultur	39
4.1.1	Kultivierung von prokaryontischen Zellen (<i>E.coli</i>)	39
4.1.2	Stammhaltung von prokaryontischen Zellen (<i>E.coli</i>)	41
4.1.3	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien mittels CaCl_2	41
4.1.4	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien	42
4.1.5	Präparation und Modifikation von Plasmid-DNA	42
4.1.5.1	Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i> -Bakterien im μg -Maßstab	42
4.1.5.2	Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i> -Bakterien im mg -Maßstab	43
4.2	Methoden eukaryontischer Zellkultur	45
4.2.1	Kultivierung und Stammhaltung eukaryontischer Zelllinien	45
4.2.1.1	Kultivierung von Suspensionszellen	45
4.2.1.2	Kultivierung adhärenter Zellen	45
4.2.1.3	Anlegen von Dauerkulturen	45
4.2.2	DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion von COS7-Zellen	46
4.2.3	Transfektion von Suspensionszellen durch Elektroporation	47
4.2.4	Arbeiten mit rekombinanten Vaccinia-Viren	48
4.2.4.1	Infektion eukaryontischer Zellen mittels rekombinanter Vaccinia-Viren	48
4.2.4.2	Herstellung rekombinanter Viren	48
4.2.4.3	Selektion rekombinanter Vaccinia-Viren	49
4.2.4.4	Identifikation rekombinanter Vaccinia-Viren	49
4.2.4.5	Vermehrung rekombinanter Vaccinia-Viren	50
4.2.4.6	Infektion humaner Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren	50
4.3	Methoden im Hefesystem	51
4.3.1	Allgemeines Prinzip	51
4.3.2	Das "Two-Hybrid-System" nach Gyuris <i>et al.</i>	52
4.3.3	Kultivierung des Hefe-Stammes EGY48/JK103	53
4.3.4	<i>S. cerevisiae</i> - Glycerinkultur	54
4.3.5	Transformation von EGY48/JK103	54
4.3.6	Interaktionsanalyse zweier Proteine in <i>S.cerevisiae</i>	56
4.3.7	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität in Hefe-Flüssigkulturen	56
4.4	Methoden im <i>C.elegans</i> System	58
4.4.1	Kultivierung von <i>C.elegans</i>	58

4.4.1.1	Anzucht von <i>C.elegans</i>	58
4.4.1.2	Reinigung / Synchronisation	58
4.4.1.3	Anlegen von Dauerkulturen	59
4.4.2	Genetische Methoden im <i>C.elegans</i> System	59
4.4.2.1	Genetische Kreuzungen	59
4.4.2.2	Transformation von extrachromosomaler DNA in <i>C.elegans</i>	60
4.4.2.3	Integration extrachromosomaler DNA	60
4.4.3	Methoden auf Proteinebene	61
4.4.3.1	Aufschliessen von adulten <i>C.elegans</i> Tieren und deren Eier	61
4.4.3.2	Fixierung und Antikörperfärbung von <i>C.elegans</i>	62
4.4.4	„Gen-Knockout“ in <i>C.elegans</i>	64
4.4.4.1	Durchführung des „Gen-Knockout“ in <i>C.elegans</i>	64
4.4.4.2	"Egg"-Präparation	66
4.4.4.3	EMS-Mutagenese	67
4.4.4.4	DNA-Präparation aus <i>C.elegans</i>	68
4.4.5	Antisense-Knockout	68
4.5	DNA – Arbeitstechniken	71
4.5.1	DNA – Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion	71
4.5.2	PCR - Mutagenese	72
4.5.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	73
4.5.4	Enzymatische Spaltung von DNA (Restriktionshydrolyse)	74
4.5.5	Erzeugung von nicht-überhängenden DNA-Enden	75
4.5.6	Dephosphorylierung des 5'-Ende von DNA-Molekülen	75
4.5.7	Ligation von DNA-Fragmenten	75
4.5.8	Adapterligation	77
4.5.8.1	Ligationsansatz für Oligodesoxyribonukleotid-Adapter	77
4.5.8.2	Phosphorylierung von 5'Enden (Adapterphosphorylierung)	77
4.5.9	Qualitative und quantitative Analyse von DNA-Molekülen	78
4.5.9.1	DNA-Elektrophorese in Agarosegelen	78
4.5.9.2	DNA – Konzentrationsbestimmung	78
4.5.9.3	DNA-Sequenzanalysen	79
4.6	Proteinarbeitstechniken	80
4.6.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page)	80
4.6.2	Coomassie-Färbung von Proteingelen	82
4.6.3	Silberfärbung von Proteingelen	83
4.6.4	Transfer von Protein-SDS-Komplexen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blotting)	84
4.6.5	Detektion immobilisierter Proteine auf Nitrozellulosemembranen	85
4.6.6	"Stripping" von Nitrozellulosemembranen	86
4.6.7	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	87
4.6.8	Proteinexpression und Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine	87
4.6.8.1	Proteinexpression und -aufreinigung mit GST-Fusionsanteil in <i>E.coli</i>	88
4.6.8.2	Proteinexpression mit HIS-Fusionsanteil in <i>E.coli</i>	89
4.6.9	Präparation von Gesamtzelllysaten	90
4.6.9.1	Gesamtzelllysate aus adhärennten COS7-Zellen mit NP-40 Lysispuffer	90
4.6.9.2	Gesamtzelllysate aus Suspensionszellen	91

4.6.10	Präzipitation und Detektion von (Fusions-)proteinen	91
4.6.10.1	<i>Direktpräzipitation von Immunglobulin-Fusionsproteinen</i>	91
4.6.10.2	<i>In vitro Präzipitationsstudien</i>	92
4.6.10.3	<i>Koimmunpräzipitation von Proteinen</i>	93
4.6.10.4	<i>Detektion exprimierter Fusionsproteine mittels Durchflußzytometrie</i>	93
4.6.11	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	94
4.7	Funktionale Analysen	96
4.7.1	LFA-1 vermittelten Zelladhäsion an immobilisiertes ICAM-1-F _c	96
4.7.2	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von Ig-CYTIP mittels PKC α/δ	97
4.7.3	Dephosphorylierung von Ig-CYTIP <i>in vitro</i>	98
4.7.4	Phosphorylierung von rekombinantem 6xHis-Fusionsprotein <i>in vitro</i>	98
4.7.5	GDP/GTP-Austausch <i>in vitro</i>	98
4.7.5.1	<i>Liposomen-Präparation</i>	99
4.7.5.2	<i>Durchführung des GDP/GTP-Austausch in vitro</i>	99
4.7.6	Zellzyklusexperiment	101
4.7.7	Untersuchung von Zellmigrationseffekten	102
4.8	Computerarbeiten	103
5	Ergebnisse	104
5.1	Identifikation des intrazellulären Proteins CYTIP	104
5.2	Umklonierung und Charakterisierung von CYTIP	106
5.3	Eingrenzung der Bindungsregion zwischen CYTIP und Cytohesin-1 mit Hilfe des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems	110
5.4	Bindungsstudie zwischen CYTIP und den humanen Cytohesin-Homologen im „Yeast-Two-Hybrid“-System	112
5.5	Kopräzipitation zwischen Ig-CYTIP und endogenem Cytohesin-1 in Jurkat E6 Zellen	113
5.6	Molekularbiologischer Interaktionsnachweis zwischen CYTIP und den Cytohesin-Homologen	115
5.7	Assoziation von endogenem CYTIP und Cytohesin-1 in unterschiedlichen Zelltypen	116
5.8	Die Membranlokalisation von CYTIP in Jurkat E6 Zellen wird durch Bindung an Integrine induziert	118
5.9	Die Membranlokalisation von CYTIP wird über die zentrale PDZ-Protein-Interaktionsdomäne vermittelt	120
5.9.1	Die PDZ-Domäne, eine modulare Interaktionsdomäne	120
5.9.1.1	<i>Struktur der PDZ-Domäne</i>	121
5.9.1.2	<i>Die PDZ-Domäne bindet an spezifische Peptidfragmente</i>	122
5.9.2	Mögliche Bindungspartner für die PDZ-Domäne von CYTIP	124
5.9.2.1	<i>β_2-Kette von LFA-1 zeigt keine Interaktion in Kopräzipitationsstudien</i>	125
5.9.2.2	<i>ARF-Proteine: Ein Target für die PDZ-Domäne von CYTIP?</i>	126
5.9.3	Generierung von PDZ-Mutanten in CYTIP	128
5.9.4	Die Membranlokalisation von CYTIP wird über die PDZ-Domäne vermittelt	130

5.10	Die Behandlung von Jurkat Zellen mit Phorbol ester (PMA) führt zur Relokalisation von CYTIP von der Plasmamembran	132
5.11	Plasmamembran lokalisiertes Cytohesin-1 wird durch Expression von CYTIP und Phorbol ester stimulation von der Plasmamembran relocalisiert	134
5.12	Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 beeinflusst nicht die Bindung zwischen CYTIP und Cytohesin-1	136
5.13	Durch Überexpression von CYTIP wird der Guanin-Nukleotid-Austausch durch Cytohesin-1 nicht beeinflusst	137
5.14	Die Adhäsion von Jurkat E6 Zellen an den Integrinliganden ICAM-1 wird durch die Überexpression von CYTIP inhibiert	139
5.15	Erste Hinweise auf eine Steigerung der Migration von Jurkat Zellen durch Koexpression von CYTIP und Cytohesin-1	142
5.16	Ergebnisse zu temporären Lokalisationen und Modifikationen von CYTIP	144
5.16.1	Überexprimiertes CYTIP zeigt Kern- und Golgi-Lokalisation	144
5.16.1.1	Visualisierung mittels der konfokalen Lasermikroskopie	144
5.16.1.2	Zellzyklusabhängigkeit der Kernlokalisation von CYTIP	145
5.16.2	Wird CYTIP durch chemische Gruppen oder Peptide modifiziert?	147
5.16.2.1	Detektion einer Größenverschiebung von CYTIP im „Western-Blot“	147
5.16.2.2	Mögliche Sumofizierung von CYTIP?	149
5.16.2.3	Antikörperdetektion von SUMO und in vitro SUMO-Konjugation	152
5.16.2.4	Modifikation von Serinen oder Threoninen in CYTIP?	153
5.16.2.5	Modifikation von CYTIP durch Phosphorylierung?	155
5.17	Weiterführende Untersuchungen zu dem intrazellulären Protein Cytohesin-1 im Modellorganismus <i>C.elegans</i>	157
5.17.1	Der Fadenwurm <i>Caenorhabditis elegans</i> , ein idealer Modellorganismus für molekularbiologische Forschung	158
5.17.2	Homologieanalyse der Cytohesin-Familie in <i>Caenorhabditis elegans</i> und <i>Homo Sapiens</i>	160
5.17.3	Antikörperfärbung in <i>C.elegans</i> mit humanen anti-SEC7-Antikörpern	161
5.17.4	Nachweis endogener SEC7-Elemente in <i>C.elegans</i> mit humanen anti-Cytohesin-Antikörpern	164
5.17.5	Interaktionsanalyse von <i>grp-1</i> und <i>pat-3</i> in Hefe	165
5.17.6	Promotoranalyse von <i>K06H7.4 (grp-1)</i> in <i>C.elegans</i>	168
5.17.6.1	Konstruktion des GFP-Reporterplasmids für <i>K06H7.4 (grp-1)</i>	168
5.17.6.2	Ergebnisse der Promotoranalyse von <i>K06H7.4 (grp-1)</i>	170
5.17.7	Spezifische genetische Interferenz mittels doppelsträngiger RNA im Modellorganismus <i>C.elegans</i>	172
5.17.8	„Gen-Knockout“ des Cytohesin-Homologs <i>grp-1</i> in <i>C.elegans</i>	175
6	Diskussion	179
6.1	Charakterisierung und Expression von CYTIP	180
6.2	Interaktion von CYTIP mit Cytohesin-1 über eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne	182
6.3	In vivo Lokalisation von CYTIP in Jurkat E6-Zellen	183
6.3.1	Lokalisation von überexprimiertem CYTIP	183
6.3.2	Zellkernlokalisation von CYTIP	184

6.3.3	Die PDZ-Domäne ist für die Translokation von CYTIP an die Plasmamembran notwendig	184
6.3.4	Golgi-Expression von CYTIP	187
6.4	Mögliche membranständige Interaktionspartner für die PDZ-Domäne von CYTIP	192
6.5	Wird CYTIP <i>in vivo</i> modifiziert?	193
6.6	Regulierung der LFA-1 vermittelten Adhäsion durch CYTIP	196
6.7	Einfluss von CYTIP auf die GTPase Aktivität von Cytohesin-1	197
6.8	Modell zur Adhäsionsregulation durch CYTIP und Cytohesin-1	199
6.9	Mögliche <i>in vivo</i> Funktion von CYTIP	201
6.9.1	Einfluß von CYTIP auf die Zellmigration	201
6.9.2	Steuerung von Zellinteraktionen zwischen antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen	202
6.10	Cytohesin-1 und CYTIP in <i>C.elegans</i>	204
6.10.1	<i>In vivo</i> Lokalisation von grp-1 in <i>C.elegans</i>	204
6.10.2	grp-1 interagiert nicht mit Integrinen	205
6.10.3	grp-1 ein elementares Protein in <i>C.elegans</i>	206
7	Zusammenfassung	208
8	Literaturverzeichnis	210
9	Anhang	241
9.1	Abkürzungen	241
9.1.1	Allgemein	241
9.1.2	Einheiten	244
9.1.3	Präfixe	245
9.1.4	Abkürzungen der Nukleoside bzw. Nukleotide	245
9.1.5	Abkürzungen der Aminosäuren	245

1 Einleitung

Jeder Organismus ist an der Arterhaltung seiner Spezies und an seinem eigenen Überleben bestrebt. Im Laufe der Evolution wurden hierbei die unterschiedlichsten Methoden entwickelt und etabliert, um eine optimale Anpassung an die Umgebung zu gewährleisten und dynamisch auf Veränderungen der Umwelt zu reagieren. Durch eine große Anzahl von Nachkommen wird das Überleben der niedrigeren Arten gesichert und durch spontane Mutationen die Anpassung an neue Lebensumstände erhöht. Mit der Etablierung von Vielzellern begann eine neue Epoche von Lebensformen, mit neuen Anforderungen und Strategien, immer komplexer werdende Zellverbände wirksam gegen **Pathogene** zu schützen. Das Immunsystem der Vertebraten hat hierbei hocheffektive Mechanismen zur Bekämpfung pathogener Mikroorganismen entwickelt. Zur Gruppe der Pathogene gehören neben den Viren und Bakterien, pathogene Pilze und komplexe eukaryontische Organismen, die man unter dem Begriff **Parasiten** zusammenfaßt.

1.1 Grundlagen des Immunsystems der Vertebraten

Allgemein kann man zwei Immunantworten in Vertebraten unterscheiden. Sowohl die **angeborene Immunität**, als auch **erworbene** (adaptive) **Immunreaktion** basiert auf den Reaktionen von weißen Blutzellen oder **Leukozyten**. Die angeborene Immunität wird zu einem großen Teil von den **Granulozyten**, zu den die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Zellen gehören sowie von **Makrophagen** und **natürlichen Killerzellen** getragen. Diese Zellen können zahlreiche Mikroorganismen sofort angreifen ohne diesen vorher schon einmal begegnet zu sein.

Die erworbene oder adaptive Immunantwort beruht auf den **Lymphozyten**. Man unterscheidet aufgrund ihrer Funktion zwischen zwei Hauptgruppen von Lymphozyten:

B-Lymphozyten oder **B-Zellen** differenzieren nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen, die Immunglobuline (Antikörper) freisetzen und dabei die **humorale Immunantwort** vermitteln. Die Antikörper können das **Komplementsystem**, ein System von Plasmaproteinen aktivieren, welches die Phagozyten bei der Aufnahme und Zerstörung von Bakterien unterstützt. Eine weitere Aufgabe der Antikörper stellt die **Neutralisation** dar. Durch Bindung an Antigene von Krankheitserregern oder toxischen Produkten wird eine Wechselwirkung mit den Zellen, die sie infizieren oder zerstören würden, blockiert. Manche Krankheitserreger werden von Phagozyten jedoch nicht direkt erkannt. Als **Opsonierung** wird das Einhüllen von Krankheitserregern mit Antikörpern bezeichnet. Die konstante Region (F_C-Anteil) der Antikörper kann dann von den Phagozyten erkannt werden, die das so „markierte“ Pathogen schließlich bekämpfen.

T-Lymphozyten oder **T-Zellen** bilden zwei Klassen, von denen eine vor allem aus den **cytotoxischen T-Zellen** besteht, während die zweite Zellen umfaßt, die wiederum andere Zellen, wie B-Zellen oder Makrophagen, aktivieren. T-Zellen bilden somit die Grundlage der **Zell-vermittelten Immunantwort**.

Alle Zellen des Immunsystems haben ihren Ursprung im Knochenmark, aber nur die B-Zellen reifen auch dort. Die T-Zellen wandern zur Reifung aus dem Knochenmark in den Thymus. Nach abgeschlossener Reifung patrouillieren die Immunzellen durch die Gewebe, indem sie zwischen dem Blutsystem und dem lymphatischen System zirkulieren. Sowohl B- als auch T-Zellen tragen an ihrer Oberfläche extrem vielgestaltete Rezeptoren.

Naiven T- und B-Zellen gemein ist ihre Antigen-spezifität. Jede Zelle exprimiert klonale Antigenrezeptoren, die jeweils nur ein spezifisches Antigen erkennen können. Durch **klonale Selektion** werden Zellen mit gegen körpereigene gerichtete Rezeptoren sofort eliminiert.

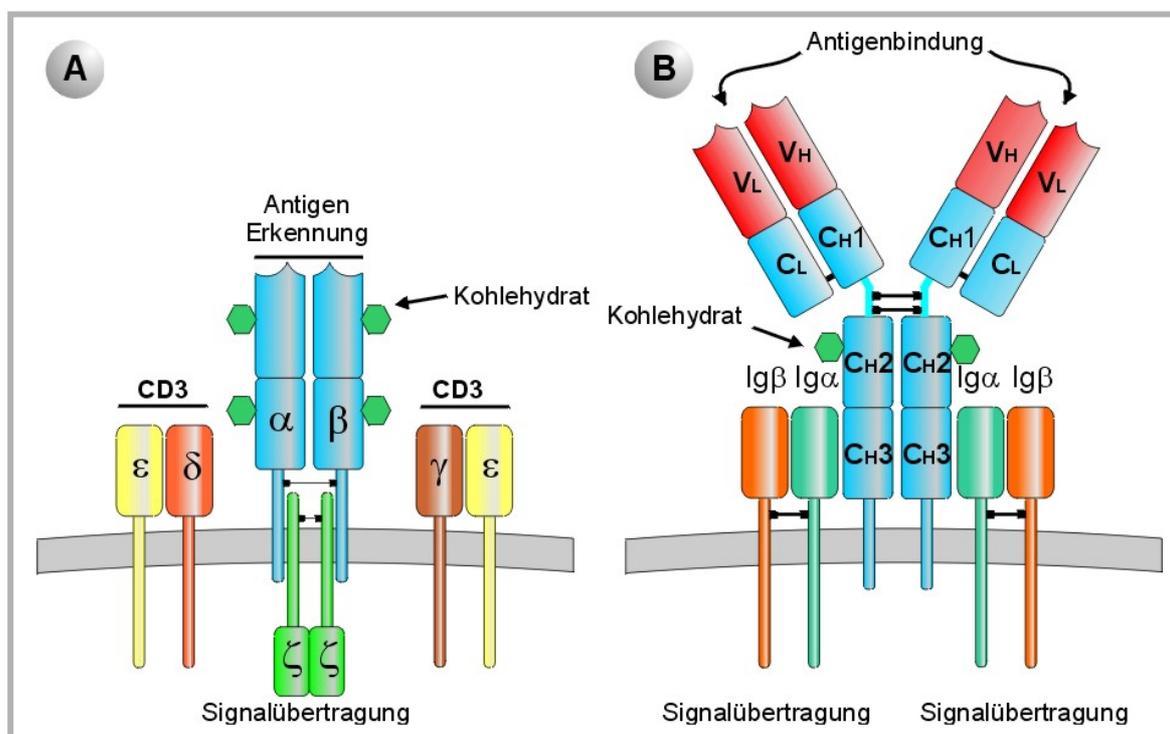


Abb. 1: Schematische Darstellung der T- und B-Zellrezeptorkomplexe

(A) Der T-Zell-Rezeptor (TCR) besteht aus einem über eine Disulfidbrücke kovalent verknüpftes $\alpha:\beta$ Heterodimer mit einer nur sehr kurzen cytoplasmatischen Domäne und ist eng mit dem CD3-Komplex verknüpft, der aus den drei verschiedenen Untereinheiten (γ , δ , ϵ) besteht. Ein weiteres Modul stellt ein Dimer dar, welches ebenfalls kovalent über eine Disulfidbrücke verbunden ist und aus zwei ζ -Ketten zusammengesetzt ist. Der CD3-Komplex, wie auch die sog. ζ -Ketten sind für das Erscheinen des T-Zell-Rezeptors an der Oberfläche, wie auch für die Signalübertragung in das Zellinnere erforderlich. CD3-Moleküle und ζ -Ketten enthalten Sequenzmotive, die man als ITAMs (immunoreceptor tyrosin-based activation motifs) bezeichnet. Diese Sequenzen assoziieren nach Stimulierung des Rezeptors mit cytosolischen Proteintyrosinkinasen und stellen den erste Schritt einer Immunantwort dar.

(B) Der B-Zell-Rezeptor (BCR) selbst besteht aus zwei langen und zwei kurzen Ketten. Das C_{H2} und C_{H3} Fragment wird auch als F_c -Fragment bezeichnet und ist der Teil des

Moleküls, der bei sekretierten Antikörpern mit Effektormolekülen und Effektorzellen interagieren kann. Die schweren und leichten Kette sind über die C_H1 und C_L Fragmente sowie über die Gelenkregion mittels Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden. Die V_H- und V_L-Fragmente bilden die variable Region des Antikörpers, der für die Antigenspezifität verantwortlich ist. Wie auch beim TCR ist der cytoplasmatische Anteil des BCR zu kurz für eine Signalübertragung. Die Transmembranglobuline bilden mit zwei weiteren Proteinen, Ig α und Ig β , die über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden sind, einen Komplex. Auch diese Proteine besitzen ähnlich dem CD3-Komplex des TCR sog. ITAMs, die an Proteintyrosinkinasen binden können und so Signalkaskaden initiieren.

Der Antigenrezeptorkomplex der B-Lymphozyten besteht aus einer membrangebundenen Form eines Antikörpermoleküls (Immunglobulin, Ig) und zwei nicht-kovalent gebundenen Signalübermittlungseinheiten Ig α und Ig β (Abb. 1/B). Der cytoplasmatische Anteil der Proteine weist bestimmte Sequenzmotive auf, die sog. **Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatorsequenzen** (ITAMs), die auch im T-Zell-Rezeptorkomplex auftreten (Malissen & Malissen, 1996). Wenn Tyrosinreste der ITAMs phosphoryliert werden, erkennen cytoplasmatische Signalmoleküle diese Signalmotive, binden daran und werden so aktiviert (z.B. Fyn, Lyn, Syk). Diese Phosphorylierung der ITAMs ist der erste Schritt einer intrazellulären Signalkaskade, die durch die Bindung eines Antigens an den Rezeptor gestartet wird.

Die Bindung eines Antigens an solch ein Transmembranimmunglobulin löst die Aktivierung der B-Zelle aus und damit letztendlich deren **klonale Expansion** und die **Differenzierung** der Nachkommen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Einige Antigene können allein durch ihre Bindung an den BCR (B-cell-receptor) B-Zellen aktivieren, aber im allgemeinen erfordern B-Zell-Reaktionen besondere Wechselwirkungen mit anderen Zellen, wie die T_H2-Helferzelle, die stimulierende Signale für eine Aktivierung liefert.

Krankheitserreger sind nur im Blutssystem und in den Extrazellularräumen für Antikörper erreichbar. Einige Bakterien und Parasiten sowie Viren vermehren sich innerhalb von Zellen, wo Antikörper sie nicht aufspüren können. Die Bekämpfung dieser Eindringlinge ist die Aufgabe der T-Lymphozyten, die durch die zellvermittelte Immunantwort für die adaptive Immunität verantwortlich sind. Zellvermittelte Reaktionen basieren auf direkten Wechselwirkungen zwischen T-Zellen und Zellen die das Antigen tragen, welches von den T-Zellen erkannt werden soll. Charakteristisch für die T-Zellen sind die heterodimeren Antigenrezeptoren (TCR, T-cell-receptor), die mit den Proteinen des CD3-Komplexes assoziiert sind (Abb. 1/A). Die meisten T-Zellen tragen α : β heterodimere Rezeptoren (Bentley und Mariuzza, 1996), jedoch besitzt eine Subpopulation von epithelialen T-Zellen auch γ : δ heterodimere Rezeptoren (Chien *et al.*, 1996). Ähnlich den Immunglobulinen besitzt der TCR hochvariable Regionen, die durch Genumlagerungen erzeugt werden und für eine spezifische Antigen-Bindung nötig sind.

T-Zellen erkennen dabei über ihren TCR-Rezeptor Peptidfragmente von Proteinen der Erreger, die als Komplex aus Peptid-Antigen und dem sog. **Haupthistokompatibilitätskomplex** (MHC, major histocompatibility complex) an der Oberfläche dieser Zellen präsentiert werden. MHC-Moleküle sind transmembrane Glykoproteine die in zwei Klassen eingeteilt werden können.

MHC-Klasse-I-Moleküle befördern Peptide, die aus dem Cytosol stammen an die Zelloberfläche, wo der Peptid:MHC-Komplex von CD8-positiven T-Zellen oder cytotoxischen T-Zellen erkannt und zur direkten Abtötung der infizierten Zellen führt. Viren und einige Bakterien replizieren sich im Cytosol oder im angrenzenden Zellkern. Da virale Infektionen alle Zellen betreffen können, werden MHC-I Moleküle auf fast allen Zellen exprimiert.

Viele pathogene Bakterien und einige eukaryontische Parasiten hingegen vermehren sich in den Endosomen und/oder Lysosomen, die ein Teil des vesikulären Systems bilden. Neben diesen Peptiden werden auch Proteine oder Toxine von phagozytierenden Makrophagen bzw. nach Bindung an den Antigenrezeptor der B-Zellen (BCR) durch Endozytose aufgenommen Proteine, vom **MHC-Klasse-II-Molekülen** an der Oberfläche präsentiert und von CD4-positiven T-Zellen erkannt. CD4 bzw. CD8-Moleküle gehören zur Superfamilie der Immunglobuline und sind für die Signaltransduktion des aktivierten TCR-Komplexes als Korezeptor erforderlich.

CD4⁺-Zellen sind darauf spezialisiert andere Zellen zu aktivieren. Sie unterteilen sich in die inflammatorischen T_H1-Zellen, die T_H2 oder auch **T-Helferzellen** genannt und in die T_H3-Zellen, die den transformierenden Wachstumsfaktor-β als Reaktion auf das Antigen (über die Mundschleimhaut aufgenommen) produzieren. T_H1-Zellen aktivieren Makrophagen, so daß diese intravesikuläre Bakterien in ihrem Inneren abtöten. Die T_H2-Zellen stimulieren B-Zellen in erster Linie zur Antikörperproduktion.

Für eine erfolgreiche Aktivierung bzw. Differenzierung naiver T-Zellen zu bewaffneten T-Effektorzellen sind neben der Bindung des TCR-Rezeptors an den Antigen:MHC-Komplex kostimulierende Signale von einer **professionellen antigenpräsentierenden Zelle** (APC) nötig. Nur APC exprimieren beide Klassen von MHC-Molekülen und zusätzlich kostimulierende Oberflächenmoleküle, die es ihnen erlauben, die klonale Expansion der naiven T-Zellen und ihre Differenzierung zu bewaffneten Effektorzellen in den peripheren lymphatischen Organen zu steuern. Die Aktivierung der naiven T-Zellen nach ihrem ersten Zusammentreffen mit einem Antigen auf der Oberfläche einer APC wird als „priming“ bezeichnet und erzeugt gleichzeitig ein **immunologisches Gedächtnis**, welches einen Schutz vor nachfolgenden Angriffe des gleichen Pathogens bietet. T-Zellen exprimieren während ihrer Entwicklung verschiedene Oberflächenmoleküle, welche die Reifung, Differenzierung bzw. Aktivierung steuern.

Zu den antigenpräsentierenden Zellen gehören neben den Makrophagen und B-Zellen auch die **dendritischen Zellen** (DC).

Die dendritischen Zellen, die besonders gehäuft in den lymphatischen Geweben auftreten, haben sich wahrscheinlich nach den B- und T-Zellen entwickelt, da ihre einzige Aufgabe darin besteht T-Zellen zu aktivieren. Sie sind in der Lage, im Gegensatz zu Makrophagen, besonders effektiv virale Proteine auf der Oberfläche den T-Zellen zu präsentieren. Sie exprimieren große Mengen an MHC-Klasse-I-Moleküle und MHC-Klasse-II-Moleküle, die kostimulierenden Glykoproteine B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) sowie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2, LFA-3 (vgl. 1.2.2) und LFA-1 (vgl. 1.2.3). Bei einer viralen Infektion einer dendritischen Zelle werden die meisten viralen Proteine im Cytosol gebildet und Peptidfragmente über MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche

präsentiert, die von naiven CD8-T-Zellen erkannt werden. Virale Hüllproteine werden jedoch in das endoplasmatische Retikulum überführt und in den Endosomen verpackt. Dort können die Peptidfragmente mit MHC-Klasse-II-Molekülen interagieren und anschließend auf der Zelloberfläche präsentiert werden, wo sie von CD4-T-Zellen erkannt werden, die sich dann in T_H1- oder T_H2-Zellen differenzieren können. Dendritische Zellen können auf diese Weise sowohl CD8⁺- als auch CD4⁺-T-Zellen stimulieren.

1.2 Adhäsionsvorgänge bei Leukozyten

Adhäsionsvorgänge haben in einer Vielzahl von Zell/Zell- sowie Zell/Matrix-Wechselwirkungen eine wesentliche Bedeutung. Besonders die Zellen des Immunsystems sind in ständiger Bewegung und wandern zwischen den Blutbahnen und den peripheren lymphatischen Geweben. Bei der Wanderung naiver T-Zellen durch die Lymphknoten interagieren diese mit antigenpräsentierenden Zellen (APC). Bei passendem TCR/Antigen/MHC-Komplex werden diese Bindungen verstärkt, bei unspezifischer Bindung wieder gelöst. Adhäsionsvorgänge spielen aber auch eine wichtige Rolle beim Kontakt zwischen T-Effektorzellen und ihren Zielzellen in peripheren Geweben und der Wanderung dorthin. Alle diese Bindungsreaktionen werden durch eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen reguliert, die zum Teil selbst Signale initiieren können. Die wichtigsten Klassen von Adhäsionsmolekülen die in T-Lymphozyteninteraktionen eine Rolle spielen sind die Selektine (vgl. 1.2.1), einige Mucin-ähnliche Moleküle (vgl. 1.2.1), Integrine (vgl. 1.2.3) sowie Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie (1.2.2). Einige dieser Moleküle sind dabei hauptsächlich am Erreichen des Bestimmungsortes, auch als „homing“ bezeichnet, der Lymphozyten beteiligt. Die folgende Abbildung verdeutlicht das Zusammenspiel der verschiedenen Adhäsionsmoleküle bei der Wanderung von T-Lymphozyten aus dem Blutstrom heraus in das periphere Gewebe, in Richtung eines inflammatorischen Stimuli. Dieser Vorgang wird auch als **Extravasation** bezeichnet und ist wesentlich in vier Schritte unterteilt (Abb. 2).

Eine wichtige Aufgabe der angeborenen Immunantwort ist es phagozytierende Zellen und Effektormoleküle an einen Infektionsherd zu dirigieren. Dies geschieht durch Freisetzung von einer Reihe von **Cytokinen**, wie z.B. Interleukin-8 (IL-8) oder den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Aber auch andere Mediatoren, wie z.B. Histamine, Leukotrine (LTB₄) und auch Entzündungsvermittler des Komplementsystems (C5a) werden ausgeschüttet und führen zur Aktivierung von Granula die in ihnen gespeicherte P-Selektine binnen Minuten an der Oberfläche der Endothelialzellen freisetzen. Ein zweites Selektin, das E-Selektin, wird erst nach Stunden nach der Interaktion mit TNF- α oder Lipopolysacchariden (LPS) auf der Zelloberfläche exprimiert. Leukozyten binden über Kohlehydratepitope (z.B. Sialyl-Lewis^x) bestimmter Glykoproteine an die Selektine und beginnen auf den Endothelialzellen zu „rollen“. Die Scherkräfte des Blutstroms sind stark genug um diese Bindungen immer wieder zu lösen, so daß die Zellen über die epitheliale Oberfläche bewegen.

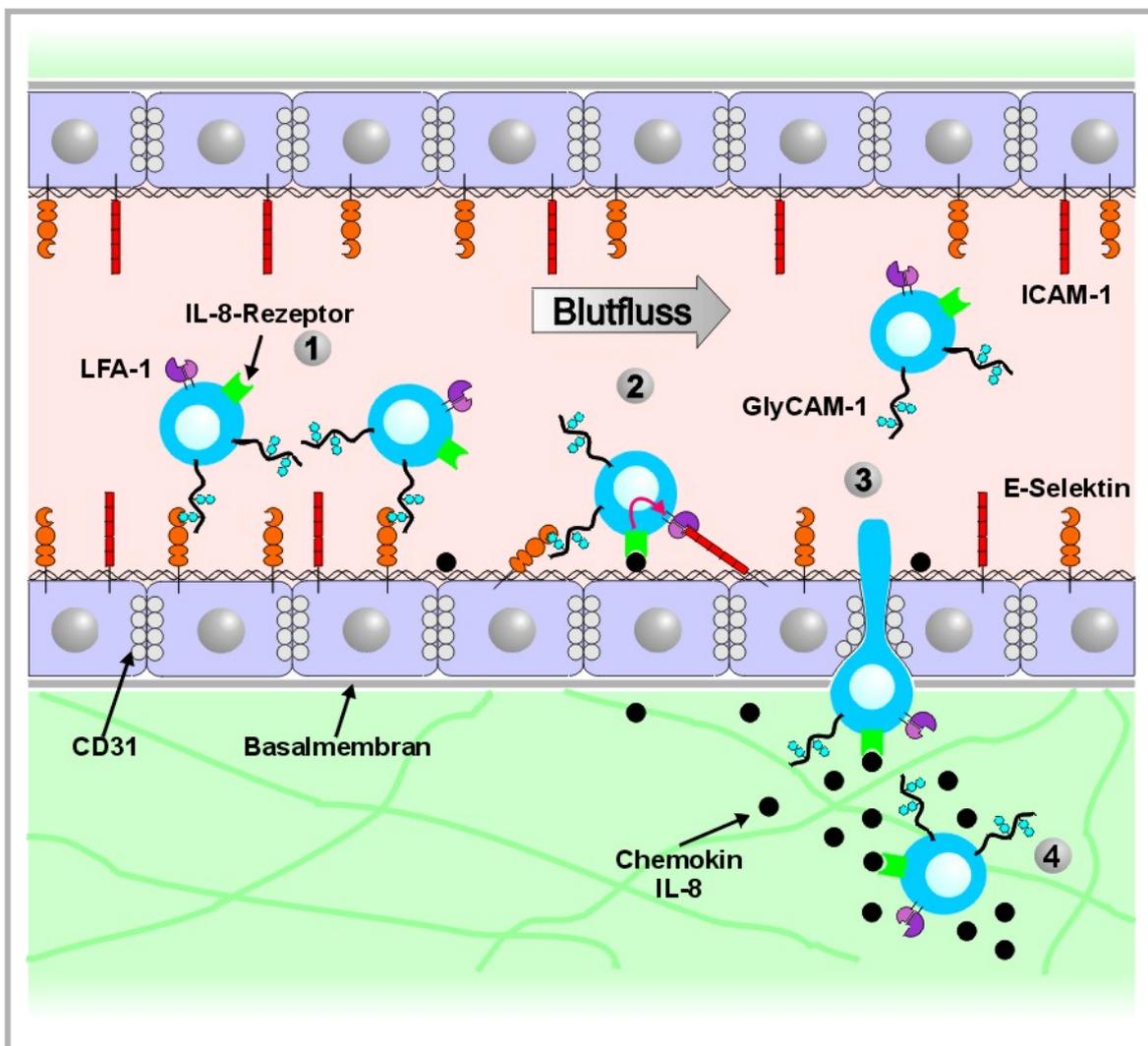


Abb. 2: Modell der Extravasation von Leukozyten.

Leukozyten binden über den Sialyl-Lewis^x-Rest von Kohlehydratlignanden (z.B. GlyCAM-1) an E-Selektine des Gefäßwandendothels (1). Diese Bindung ist nicht stark genug, um den Scherkräften des Blutstroms zu widerstehen. Die Zellen „rollen“ durch ständiges Lösen und Ausbilden neuer Bindungen über das Endothel. Lokale Chemokine (z.B. IL-8) aktivieren LFA-1 auf den Leukozyten und führen zu einer stabilen Bindung an ICAM-1 und zur Beendigung der Rollbewegung (2). Die Leukozyten beginnen sich zwischen den Endothelzellen hindurchzuzwängen (Diapedese), welche die Wandung der Blutgefäße bilden und durchstoßen die Basalmembran (3). Auch die Adhäsion zwischen CD31-Molekülen, die sowohl auf Leukozyten wie auch an der Verbindung zwischen Endothelzellen exprimiert werden, trägt wahrscheinlich zur Diapedese bei. Schließlich wandern die Leukozyten auf einem Konzentrationsgradienten von Chemokinen in Richtung Infektionsherd (4).

Eine stabile Bindung zwischen Leukozyt und Endothelialzellen wird durch die Interaktion zwischen den Leukozytenintegrinen (vgl. 1.2.3) LFA-1 (CD11a/CD18) bzw. Mac-1 (CD11b/CD18) und den Immunglobulin verwandten Adhäsionsmolekülen ICAM-1, ICAM-2 bzw. ICAM-3 (vgl. 1.2.2) vermittelt. ICAM-1 wird bei TNF- α Stimulation erhöht auf der Endotheloberfläche exprimiert. Die Bindung von IL-8 an den IL-8-Chemokinrezeptor induziert eine Konformationsänderung der Integrine.

Diese Aktivierung führt zu einer stärkeren Adhäsionskapazität zwischen LFA-1 und ICAM-1 und zum Stillstand der Leukozytenbewegung auf dem Endothelium.

Die anschließende Passage durch die Gefäßwand wird als **Diapedese** bezeichnet. Neben den schon bekannten Integrinen LFA-1 und Mac-1 spielen hierbei auch andere Immunglobulin-ähnliche Moleküle wie CD31 eine wichtige Rolle. CD31 wird auf Leukozyten und an den Verbindungsstellen der Endothelialzellen exprimiert und reguliert das hindurchzwängen der Leukozyten durch die endotheliale Barriere. Die Basalmembran, eine extrazelluläre Matrix, wird durch proteolytische Enzyme durchlässig gemacht.

In einem letzten Schritt wandern die Leukozyten durch das Gewebe, unter dem Einfluß eines Chemokin-Konzentrationsgradienten in Richtung des Infektionsherdes. Dort interagieren die Effektorzellen wieder über Oberflächenmoleküle mit den Zielzellen. Diese Migration wird hauptsächlich durch β_1 -Integrine vermittelt. (Gonzalez-Amaro und Sanchez-Madrid, 1999).

1.2.1 Die Familie der Selektine

Damit Leukozyten ihren Zielort in spezifischen Geweben erreichen können, sind primär vor allem die Selektine (CD62) verantwortlich. Auf dem vaskulären Endothel werden P-Selektin (CD62P) und E-Selektin (CD62E) exprimiert, die über ihre Lektin-ähnliche Seitenkette an spezifische Zuckerreste (Sialyl-Lewis^x-Rest) der Kohlehydratmoleküle an der Zelloberfläche von Leukozyten binden können (Gonzalez-Amaro und Sanchez-Madrid, 1999). Sie spielen zusammen mit den Integrinen unter anderem bei der Extravasation von Leukozyten eine Rolle (vgl. 1.2).

Das L-Selektin (CD62-L) wird im Gegensatz dazu auf der Oberfläche von naiven T-Zellen exprimiert und bindet an sulfatisierte Sialyl-Lewis^x-Anteile, von Mucin-ähnlichen Moleküle, die auch als vaskuläre Adressine bezeichnet werden. Zwei Vertreter von ihnen, CD34 und GlyCAM-1, werden u.a. in den Lymphknotenvenolen mit hohem Endothel exprimiert, wobei ein dritter Vertreter MAdCAM-1 auf dem Schleimhautendothel exprimiert wird und den Eintritt von Lymphozyten in lymphatisches Schleimhautgewebe steuert. Dieses Adressin bindet neben dem L-Selektin auch an das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin (Berlin *et al.*, 1995).

GlyCAM-1 erscheint nur auf Venolen mit hohem Endothel und besitzt keinen Membrananker, die Bindung an die Membran ist bisher unklar. CD34 wie auch MAdCAM-1 sind jedoch an der Membran verankert. Neben den Venolen mit hohem Endothel wird CD34 auch auf Endothelzellen vieler Gewebe exprimiert, wird aber auf Grund differenter Glykosylierung nicht von L-Selektin gebunden. Auch diese Funktion ist noch unklar.

	Name	Gewebeverteilung	Ligand
Selektine	L-Selektin (Mel-14, CD62L)	naive und einige Gedächtnislymphozyten, Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, Eosinophile	sulfatisiertes Sialyl-Lewis ^x , GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1
	P-Selektin (PADGEM, CD62P)	aktiviertes Endothel und Thrombozyten	Sialyl-Lewis ^x
	E-Selektin (ELAM-1, CD62E)	aktiviertes Endothel	Sialyl-Lewis ^x
Mucin-ähnliche vaskuläre Adressine	CD34	Endothel	L-Selektin
	GlyCAM-1	Venolen mit hohem Endothel	L-Selektin
	MAdCAM-1	Venolen in lymphatischem Schleimhautgewebe	L-Selektin, Integrin $\alpha_4\beta_7$

Tab. 1: Selektine und die Mucin-ähnlichen Adressine steuern mitunter die Wanderung und Zielortbestimmung von Lymphozyten.

Die Bindung von L-Selektin an die Adressine und das verbundene Entlangrollen naiver T-Zellen an der Wand postkapillarer Venolen mit hohem Endothel spielen eine wichtige Rolle bei der Zielortbestimmung. Für eine feste Bindung der T-Zelle mit dem hohem Endothel reichen diese Molekülinteraktionen jedoch nicht aus. Für eine stabile Adhäsion sind insbesondere Integrin-Ligand-Wechselwirkungen notwendig.

1.2.2 Wichtige Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie bei Leukozyten-Wechselwirkungen

Zur Immunglobulinsuperfamilie zählen neben den T- und B-Zellrezeptoren auch die Korezeptoren CD4, CD8, CD19 sowie die interzellulären Adhäsionsmoleküle. Mindestens sechs dieser Moleküle sind besonders bei der T-Zell-Aktivierung wichtig. ICAM-1 und ICAM-3 bestehen aus fünf Immunglobulin-Domänen im extrazellulären Bereich, ICAM-2, CD2 und LFA-3 nur aus zwei Immunglobulin-Domänen. Die drei sehr ähnlichen interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3 binden alle an das T-Zell-Integrin LFA-1 (vgl. 1.2.3), wobei nur ICAM-1 und ICAM-2 auf dem Endothel exprimiert wird. ICAM-3 (Gahmberg *et al.*, 1997) und CD2 werden nur auf Leukozyten exprimiert und haben wahrscheinlich einen großen Anteil an der Bindung zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen. LFA-3 wird dagegen nur auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und bindet an CD2.

Durch Stimulation des Endotheliums mit Reagenzien wie IL-1, IL-4, IFN γ oder TNF α kann besonders eine Steigerung der ICAM-1-Expression erzielt werden (Thornhill *et al.*, 1991, Dustin *et al.*, 1986). Die ICAM-2- und ICAM-3-Expressionen wird hingegen weniger von Cytokinen bestimmt. Auch VCAM-1 wird durch Cytokin-Induktion in größeren Mengen auf dem Endothel exprimiert und verstärkt die T-Zell/Endothel-Bindung.

	Name	Gewebeverteilung	Ligand
Immunglobulin-superfamilie	CD2 (LFA-2)	T-Zellen	LFA-3
	ICAM-1 (CD54)	aktivierte GefäÙe, Lymphozyten, dendritische Zellen	LFA-1, Mac-1
	ICAM-2 (CD102)	ruhende GefäÙe, dendritische Zellen	LFA-1
	ICAM-3 (CD50)	Lymphozyten	LFA-1
	LFA-3 (CD58)	Lymphozyten, antigen-präsentierende Zellen	CD2
	VCAM-1 (CD106)	aktiviertes Endothel	VLA-4

Tab. 2: Überblick über die Adhäsionsmoleküle der Immunglobulinsuperfamilie welche in Leukozytenwechselwirkungen involviert sind.

Verwendete Abkürzungen: ICAM (intercellular cell adhesion molecule); LFA (lymphocyte function-associated antigen); VCAM (vascular cell adhesion molecule); VLA (very late activation antigen)

1.2.3 Die Proteinfamilie der Integrine

Integrine stellen eine große Gruppe von heterodimeren transmembranen Adhäsionsmolekülen dar. Sie können Signale bidirektional vom intrazellulären in den extrazellulären Raum („inside-out“) oder in entgegengesetzter Richtung („outside-in“) übermitteln. Diese Rezeptoren sind sowohl bei der Zell/Zell- als auch bei Zell/Matrix-Interaktionen von zentraler Bedeutung (Dustin und Springer, 1991; Springer 1994; Ley, 1996). Bei einer Vielzahl von biologischen Funktionen wie Wundheilung (Hynes, 1992), neuronales Gedächtnis (Grotwiel *et al.*, 1998), Gewebeaufbau (Edelmann und Crossin, 1991) sowie bei der Zellwanderung während der Embryonalentwicklung (Darribere *et al.*, 2000) spielen die Integrine eine wichtige Rolle. Ferner vermitteln sie bei Kontakten zwischen Lymphozyten und antigenpräsentierender Zellen (1.2.4) und stellen einen entscheidenden Faktor bei der Migration und Extravasation von Leukozyten dar (1.2). Neben der Vermittlung einer stabilen Adhäsion gibt es bereits Hinweise, daß nur schwache LFA-1/ICAM-1 Wechselwirkungen ähnlich der Selektine bei einem „Rollen“ der Leukozyten auf dem Endothelium involviert sein könnten (Sigal *et al.*, 2000).

Strukturell bestehen Integrine aus zwei nicht-kovalent gebundenen α - und β -Untereinheiten. Durch Kombination von 17 α - und 8 β -Ketten sind derzeit 22 verschiedene Paarungen bekannt (Stewart *et al.*, 1995; Kumar, 1998). Die wichtigsten auf Leukozyten exprimierten Integrine sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Die extrazellulären Bereiche der α - und β -Ketten enthalten meist mehrere Bindungskonsensussequenzen für divalente Kationen (Takada *et al.*, 1997). Einige α - wie auch β -Integrine besitzen als zusätzliche Kationenbindungsstelle eine sog. I-Domäne (Hogg *et al.*, 1994; Leitinger und Hogg, 2000), eine konservierte Mg^{2+}/Mn^{2+} -Bindungsstelle, die auch als Metalionen-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS, metal ion-dependent adhesion site) bezeichnet wird (Loftus *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995). Integrine werden normalerweise in einem inaktiven Zustand auf der Zelloberfläche exprimiert und binden ihren Liganden erst nach Aktivierung. Die Bindung divalenter Kationen stellt so ein Aktivierungsstimuli dar.

Die Ligandenbindung selbst erfolgt in erster Linie über bestimmte Bindungsmotive in den besagten Kationenbindungsstellen, insbesondere über die beschriebene I-Domänen (Mould, 1996; Takada *et al.*, 1997) der α - wie auch der β -Kette.

Die cytoplasmatische Domäne der α -Integrine ist sehr unterschiedlich, besitzt aber eine konservierte Aminosäuresequenz (KXGFFKR), die u.a. ein Bindungsmotiv für Calreticulin darstellt (Williams *et al.*, 1994; O'Toole, 1997). Für die α -Kette der β_2 -Integrine wird weiterhin eine Regulierung der Integrin-Aktivität durch Chemokine postuliert (Weber *et al.*, 1999). Bei den cytoplasmatischen Domänen der β -Ketten ist die Aminosäuresequenz LLv_hDRRE sowie das NPXY/F-Motiv konserviert (Williams *et al.*, 1994; O'Toole, 1997).

Auf Leukozyten werden nur β_1 -, β_2 -, β_3 -, und β_7 -Integrine exprimiert, wobei β_2 - und β_7 -Integrine ausschließlich auf Leukozyten identifiziert wurden. Die β_2 -Kette (CD18, ca. 95 kDa) ist auf Leukozyten das vorherrschende Integrin und bildet mit 4 verschiedenen α -Untereinheiten die Heterodimere LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18; CR3), p150.95 (CD11c/CD18) und $\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18). Das wahrscheinlich wichtigste Leukozytenintegrin stellt das Heterodimer LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) dar, welches fast ausschließlich auf T-Lymphozyten exprimiert wird (Arnaout, 1990), während auf Neutrophilen und Makrohagen alle β -Integrine exprimiert werden.

Das Heterodimer LFA-1 ist in vielfältige Funktionen wie der beschriebenen Migration und Extravasation von Leukozyten, der Interaktion von Effektorzellen mit ihren Zielzellen, bei der Antigen-spezifischen T-Zell-Prolifation oder bei der T-Zell-abhängigen Antikörperantwort involviert (Arnaout, 1990; Springer, 1990).

LFA-1 bindet an die Liganden ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4 und ICAM-5, wobei ICAM-1 den wichtigsten Bindungspartner für LFA-1 darstellt (Gahmberg *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 2000). Sowohl das MIDAS-Motiv der α -Kette (O'Toole *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 1992; Kassner und Hemmler, 1993; O'Toole *et al.*, 1994; Filardo und Cheresch, 1994; Edwards *et al.* 1996) wie auch die I-Domäne der β -Kette (Hayashi *et al.*, 1990; Hibbs *et al.*, 1991; Pasqualini und Hemmler, 1994;

Hughes *et al.*, 1995; Lewis und Schwartz, 1996; Chen *et al.*, 1997; Huth *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000) scheinen in die Ligandenbindung bei LFA-1 involviert zu sein.

Bei der erbliche Immunschwäche LAD (leukocyte adhesion deficiency) besteht ein Defekt bei der Synthese der gemeinsamen β_2 -Kette der Integrine. Patienten mit diesem Defekt sterben schon in jungen Jahren durch wiederkehrende Infektionen mit extrazellulären Bakterien, da die Funktion der Neutrophilen und Makrophagen erheblich eingeschränkt ist.

Integrin	Bezeichnung	Gewebeverteilung	Ligand
$\alpha_1\beta_1$	VLA-1, CD49a/CD29	Leukozyten	Kollagen I und IV, Laminin
$\alpha_2\beta_1$	VLA-2, CD49b/CD29	Monozyten	Kollagen I und IV, Laminin
$\alpha_3\beta_1$	VLA-3, CD49c/CD29	Leukozyten	Kollagen I, Laminin, Fibronektin, Epiligrin
$\alpha_4\beta_1$	VLA-4, CD49d/CD29	Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen	VCAM-1, Fibronektin
$\alpha_5\beta_1$	VLA-5, CD49e/CD29	Monozyten, Makrophagen, Gedächtniszellen, T-Zellen	Fibronektin
$\alpha_6\beta_1$	VLA-6, CD49f/CD29	Monozyten, Gedächtniszellen, T-Zellen	Laminin
$\alpha_L\beta_2$	LFA-1, CD11a/CD18	Monozyten, T-Zellen, Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen	ICAM-1,-2,-3,-4,-5
$\alpha_M\beta_2$	Mac-1, CD11b/CD18	Neutrophile, Monozyten, Makrophagen	ICAM-1, iC3b, Fibrinogen, Faktor X
$\alpha_X\beta_2$	CR4, p150.95, CD11c/CD18	dendritische Zellen, Makrophagen, Neutrophile	Fibrinogen, iC3b, CD23
$\alpha_D\beta_2$	CD11d/CD18		ICAM-3, VCAM-1
$\alpha_V\beta_3$	CD51/CD61	Makrophagen	Vitronektin, Fibronektin, VCAM-1
$\alpha_4\beta_7$	LPAM-1, CD49d/ -	Lymphozyten	MAdCAM-1, Fibronektin, VCAM-1
$\alpha_E\beta_7$		Lymphozyten im Epithel	E-Cadherin

Tab. 3: Zusammenstellung der auf Leukozyten exprimierten Integrine.

Benutzte Abkürzungen: ICAM (intercellular cell adhesion molecule); LFA (lymphocyte function-associated antigen); VCAM (vascular cell adhesion molecule); VLA (very late activation antigen); iC3b (inaktivierte Form von C3b)

1.2.4 Wechselwirkung zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen werden zum großen Teil über Adhäsionsmoleküle vermittelt

Neben der Wanderung von Leukozyten spielen die Integrin-Ligand-Wechselwirkungen auch bei der Differenzierung naiver T-Zellen zu T-Effektorzellen sowie bei der Interaktion zwischen Effektorzelle und antigenpräsentierenden Zellen (APC) in den T-Zell-Bereichen der lymphatischen Geweben eine große Rolle. Hierbei ist eine vorübergehende Bindung zwischen TCR/CD3-Komplex der naiven T-Zelle mit dem MHC/Peptid-Komplex der antigenpräsentierenden Zelle notwendig, die durch Interaktionen zwischen Integrinen und deren Liganden (vgl. Abb. 3) vermittelt werden.

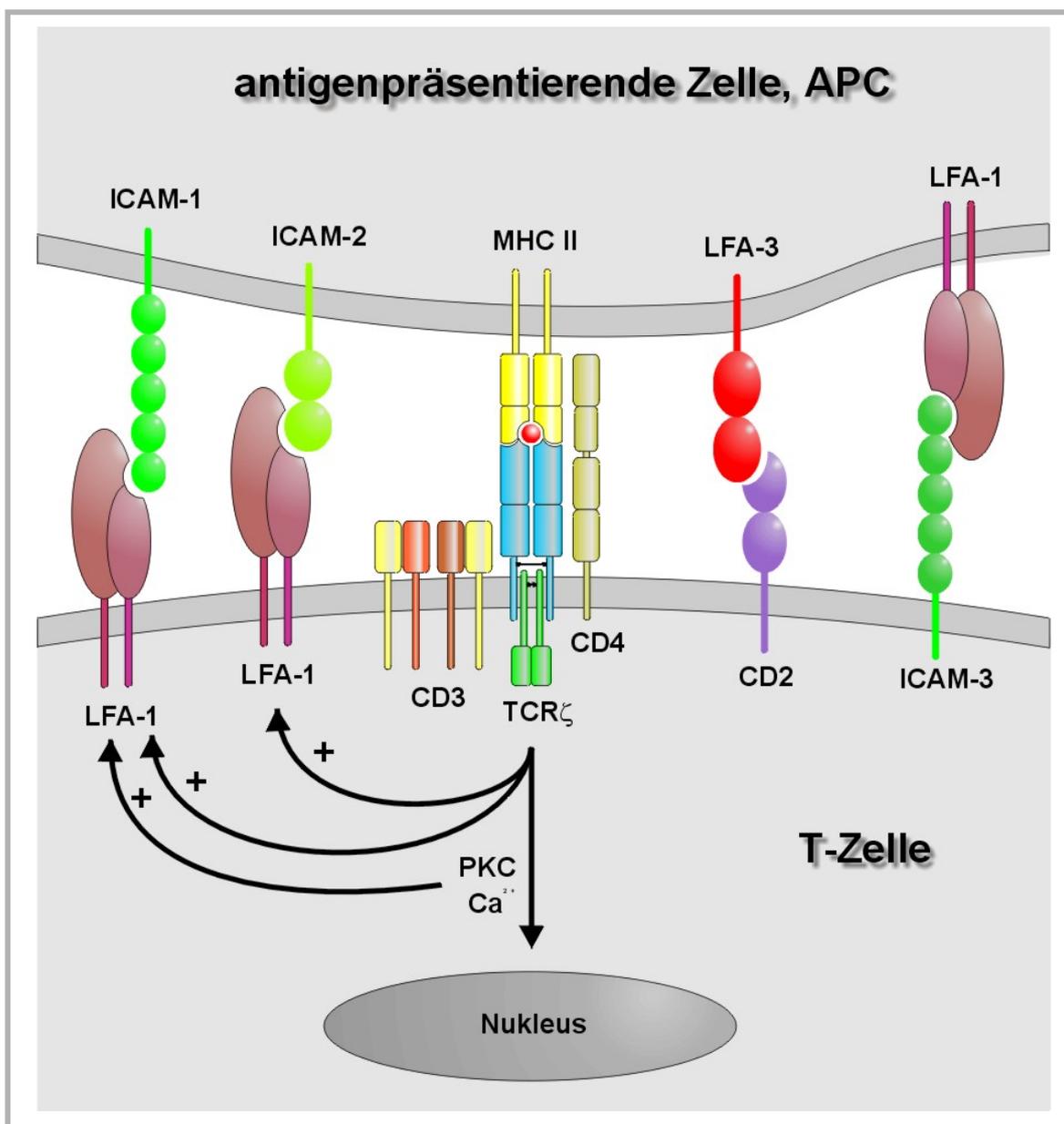


Abb. 3: Schematische Darstellung der APC-TCR-Bindung

Bei der Bindung von naiver T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle werden erst Bindungen über Zelloberflächenmoleküle vermittelt. Trifft eine naive T-Zelle auf eine

antigenpräsentierende Zellen (APC), wird der erste Kontakt über CD2/LFA-3 und zum Teil über LFA-1/ICAM-1, LFA-1/ICAM-2 hergestellt. Wird das von der antigenpräsentierenden Zelle über MHC-Moleküle präsentierte Antigen vom TCR/CD3-Komplex erkannt, werden Signalkaskaden aktiviert, die z.B. die Proteinkinase C oder den Calciuminflux in der T-Zelle aktivieren. Diese Signale wirken positiv verstärkend auf die LFA-1 vermittelte Zelladhäsion.

Wird der MHC/Peptid-Komplex der antigenpräsentierenden Zelle vom TCR/CD3-Komplex der naiven T-Zelle nicht erkannt, lösen sich die Bindungen wieder und die naive T-Zelle bindet an die nächste APC. Bei Erkennung des präsentierten Peptid als Antigen wird der TCR/CD3-Komplex aktiviert und die Bindung zwischen LFA-1 und ICAM-1 wird verstärkt (Dustin und Springer, 1989). Die Aktivierung der Integrine wird durch Konformationsänderungen erreicht, wobei die aktivierten Integrine bestimmte Epitope ausbilden, die durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden können (Van Kooyk *et al.*, 1991). Die Bindung von LFA-1 an seinen Liganden ICAM-1, ICAM-2 oder ICAM-3 spielt neben der Adhäsionsverstärkung auch bei einer Aktivierung der T-Zelle eine große Rolle.

Für die anschließende **klonale Expansion** der naiven T-Zellen sind jedoch weitere spezifische Liganden und kostimulatorische Signale (z.B. B7-Moleküle) notwendig, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll.

1.3 Regulation der Integrinfunktion

Die Integrine müssen bei ihren Aufgaben wie z.B. Migration, Extravasation oder der beschriebenen T-Zelle/APC-Interaktion oft dynamisch und sehr fein reguliert werden. Für eine Regulation der Adhäsionsvorgänge sind Aktivierungs- und Deaktivierungsvorgänge nötig, die bisher nur zum Teil geklärt werden konnten und hier im wesentlichen am Beispiel des β_2 -Integrins dargestellt werden sollen.

1.3.1 Regulierung des Aktivierungszustands des LFA-1 Integrins

In der Literatur werden verschiedene mechanistische Modelle vorgeschlagen, um die Integrinmodulation zu beschreiben. Der Aktivierungszustand der Integrine kann im wesentlichen durch den Affinitäts- oder Aviditätszustand der Integrine charakterisiert werden.

Die **Affinität** beschreibt hierbei den Aktivierungszustand eines einzelnen Integrin-Moleküls, welcher durch Konformationsänderungen einzelner spezifischer Aktivierungsepitope generiert wird. Konformationsänderungen können z.B. durch divalente Kationen wie Mn^{2+} , Mg^{2+} und Ca^{2+} induziert werden (Mould, 1996; Tominaga *et al.*, 1998). Neben den divalenten Kationen lassen sich *in vitro* aktive Konformationen auch durch Antikörper induzieren und stabilisieren. Zu diesen zählen der

anti-CD11a-Antikörper MEM83 (Landis *et al.*, 1993; Andrew *et al.*, 1993) sowie der anti-CD18-Antikörper KIM185 (Ortlepp *et al.*, 1995). Ein mit mab24 bezeichneter Antikörper erkennt hingegen ein durch die Bindung von ICAM-1 an LFA-1 induziertes aktiviertes Epitop auf LFA-1 in Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen ohne dabei den Aktivierungszustand zu beeinflussen (Dransfield und Hogg *et al.*, 1989; Dransfield *et al.*, 1992; Mould, 1996).

Die **Avidität** hingegen beschreibt das Aktivierungs- bzw. Bindungsverhalten eines einzelnen Moleküls, sondern die Kooperativität der Integrinmoleküle und deren funktionale Auswirkungen. So führt das Zusammenlagern von LFA-1 Molekülen in sog. „Cluster“ zur Aktivierung von Integrinen. Auch diese Zustände können mittels Antikörper (mAK NKI-L16) nachgewiesen werden (van Kooyk *et al.*, 1991; van Kooyk *et al.*, 1994). Normalerweise sind Integrine direkt oder über assoziierte Proteine mit dem Aktincytoskelett verankert und somit relativ immobil. In der Literatur (Dustin und Springer, 1991; van Kooyk *et al.*, 1999; van Kooyk und Figor, 2000) wurde bereits beschrieben, daß sich Integrine vom Aktincytoskelett entkoppeln und auf diese Weise eine laterale Mobilität erreichen können.

1.3.2 Signaltransduktion durch Integrine

Neben der Verarbeitung intrazellulärer Signale können Integrine auch Informationen aus dem extrazellulären Raum verarbeiten, die durch Ligandbindung oder über Assoziation mit anderen Rezeptoren, wie z.B. TM4SF (Transmembran-4-Superfamilie) oder CD47 induziert werden. Auch durch Quervernetzung von LFA-1 mit Antikörper lassen sich Integrin vermittelte Signalwege induzieren und untersuchen. Der Ausgangspunkt der Signalkaskade stellt neben der β_2 -vermittelten Aktivierung der Src-Tyrosinkinasen Fgr, Hck, Lyn und der Tyrosinkinase Syk (Yan *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1997; Lowell *et al.*, 1996) die Aktivierung von Proteinen der Fokaladhäsionskinase (FAK)-Familie wie p125FAK, fakB und Pyk2 (Yan *et al.*, 1999) dar. Die Aktivierung dieser Proteine führt zu einer Phosphorylierung bzw. Aktivierung einer Vielzahl weiterer Signalkaskaden und Proteine (Guan, 1997; Berton und Lowell, 1999; O'Neill *et al.*, 2000). Zu diesen gehören u.a. der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav (Zheng *et al.*, 1996), die extrazellulär-regulierte-Kinase ERK (McGilvray *et al.*, 1998), das cytoskelettale Protein Paxillin (Fuortes *et al.* 1994), Phospholipase C_γ , Adapterproteine wie c-Cbl sowie die cytoplasmatischen Anteile der α - wie auch β_2 -Kette selbst (Hibbs *et al.*, 1991; O'Toole *et al.*, 1994; Kassner *et al.*, 1994). Weitere Ereignisse in den Signalkaskaden stellen Aktivierungen von GTPasen, wie Rho und Rac oder der PI(3)-Kinase dar. Produkte der Phospholipase C_γ führen zu einer Regulierung der Ca^{2+} -Ionenkonzentration (Dib und Andersson, 2000) und folglich zu einer Aktivierung.

Wie die Aktivierung der Tyrosinkinasen durch den cytoplasmatischen Teil der β_2 -Kette vermittelt wird ist bisher noch unklar, da das Integrin selbst keine intrinsische Enzymaktivität besitzt. Es ist anzunehmen, daß weitere Proteine involviert sind die zwischen Integrin und z.B. Tyrosinkinasen vermitteln. Bekannt ist bereits, daß Integrine über Aktin-bindende Proteine wie α -Aktin, Talin, Filamin an das Aktincytoskelett gekoppelt werden. Für die Aktin-bindende Proteine Paxillin, Filamin

und Spektrin werden in der Regulierung von Integrinen impliziert (Miyamoto *et al.*, 1995; Bennett und Gilligan, 1993). β_2 -Integrine binden konstitutiv an Talin (Sampath *et al.* 1998), und Filamin. Eine α -Aktin-Bindung erfolgt erst bei einer „Cluster“-Bildung der Moleküle (Pavalko und Laroche, 1993).

Die genannten Tyrosinkinasen, Aktin-bindende Proteine, Adapter-/Signalproteine sowie die cytoplasmatischen Domänen der Integrine bilden Multiproteinkomplexe, die als **fokale Adhäsionskomplexe** (FACs) bezeichnet werden. Von Yamada *et al.* (1995) konnte gezeigt werden, daß diese FACs für eine Aggregation von LFA-1 und eine erfolgreiche Ligandbindung nötig sind.

1.3.3 Mechanismen der Integrinregulierung

Wie in 1.3.1 beschrieben stützt sich die Integrinaktivierung und somit eine verstärkte Zelladhäsion auf Affinitäts- bzw. Aviditätsänderungen der Integrine. Eine Aktivierung von LFA-1 kann durch Quervernetzung des T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplexes (Dustin and Springer, 1989), aber auch der Korezeptoren CD2, CD7, CD28 und CD31 (van Kooyk *et al.* 1989; Shimizu *et al.*, 1995, Carr *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1996; Zell *et al.*, 1996; Shimizu and Hunt, 1996; Chan *et al.*, 1997) erreicht werden. In der durch Quervernetzung induzierten Signalkaskade werden Ras und Proteintyrosinkinasen (z.B. Fyn, Lck, ZAP-70) aktiviert, die wiederum die Phospholipase B, Phospholipase C oder PI(3)-Kinase aktivieren (Shimizu *et al.*, 1995).

Durch diese Phospholipasen wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) gespalten. Während Diacylglycerin die Proteinkinase C (PKC) stimuliert, erhöht IP₃ die Ca²⁺-Ionenkonzentration durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Darüber hinaus wird in der T-Zell-Membran ein Ca²⁺-spezifischer Ionenkanal geöffnet, so daß auch aus extrazellulären Quellen Calciumionen einströmen können. Sowohl die PKC-Aktivierung, als auch die Ca²⁺ Freisetzung führen zu einer transienten Aktivierung (vgl. Abb. 3) von LFA-1 (Kolanus und Seed, 1997; Lub *et al.*, 1995). *In vitro* kann eine Aktivierung der PKC und der daraus folgenden erhöhten Zelladhäsion, durch PMA (Tetradecanoylphorbol-13-acetat), einem Strukturanaloga von Diacylglycerin erreicht werden (Valmu *et al.*, 1999), wobei im cytoplasmatischen Bereich der β_2 -Kette die Aminosäure S756 phosphoryliert wird (Hibbs *et al.*, 1991; LaFlamme *et al.*, 1997). Eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels kann durch Calcium-Ionophor, PLC γ oder PI(3)-Kinase induziert werden (Lub *et al.*, 1995; Shimizu und Hunt, 1996).

Neben den hier beschriebenen Aktivierungskaskaden können Integrine auch direkt durch Bindung von Proteinen an die cytoplasmatische Domäne aktiviert werden. Zum Beispiel bindet das Protein β_3 -Endonexin an das β_3 -Integrin und reguliert vermutlich die Affinität von $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu seinem Liganden (Eigenthaler *et al.*, 1997; Kashiwagi *et al.*, 1997).

Für das β_1 -, β_2 - und β_7 -Integrin wurde als *in vitro* Interaktor die Serin/Threonin-Kinase ILK (Integrin-linked-kinase) beschrieben (Dedhar und Hannigan, 1996; Hannigan *et al.*, 1996). *In vivo* stellt wahrscheinlich β_1 der einzige Bindungspartner dar, da ILK-Peptide nur die cytoplasmatische Domäne des β_1 -Integrins phosphorylieren können (Hannigan *et al.*, 1996). Eine Überexpression von ILK vermindert die Bindungsaffinität zwischen Integrin und Ligand. ILK stellt somit ein Negativ-Regulator für eine Integrin-Ligand-Bindung dar.

Als Interaktor für LFA-1 bzw. der β_2 -Kette wurde 1996 von Kolanus *et al.* Cytohesin-1 entdeckt, welches bei Überexpression die LFA-1 vermittelte Zelladhäsion verstärkt und somit ein positiver Regulator darstellt. Im Laufe der letzten Jahre hat sich die Gruppe der Cytohesin-Moleküle auf vier Mitglieder erweitert. Die Aufklärung der Funktionsmechanismen ist bereits Bestandteil vieler Forschungsarbeiten.

1.4 Die Cytohesin-Familie

Zur Gruppe der noch wachsenden GEF-Familie (guanine-exchange-factor) gehören die BFA-insensitiven (Morinaga *et al.*, 1996) Cytohesin-Proteine zu den wohl am best untersuchtesten. Zur Zeit sind vier homologe Proteine mit einer Länge von ca. 400 Aminosäuren im Menschen identifiziert worden, wobei sich Cytohesin-1, Cytohesin-2 (ARNO) und Cytohesin-3 (GRP-1) in ihrer Aminosäuresequenz mit 81-84% Identität kaum unterscheiden. Das erst kürzlich beschriebene Cytohesin-4 besitzt jedoch immerhin noch eine Homologie von 69-71%. Eine schematische Darstellung der Domänenstruktur von Cytohesin-1 ist stellvertretend für diese Proteinfamilie in Abb. 4 dargestellt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz ist weiterhin in Abb. 54 auf Seite 161 zusammengefasst.

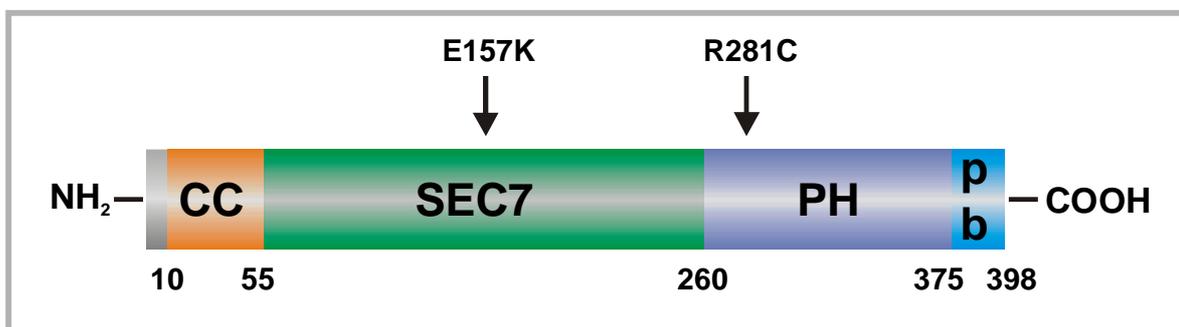


Abb. 4: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von Cytohesin-1, stellvertretend für die Cytohesin-Familie.

Die Proteine bestehen aus einer N-terminalen „coiled-coil“-Domäne (CC), einer zentralen SEC7-Domäne und einer daran angeschlossenen Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne. Carboxyterminal abschließend befindet sich eine polybasische Region (c-Domäne, pb). Durch Mutation an der Aminosäure E157K kann die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 blockiert werden. Die Mutante R281C hat die Fähigkeit verloren Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP₃) zu binden.

Die Cytohesin-Proteine bestehen N-terminal aus einer α -helikale Superhelix („coiled-coil“-Domäne), die vermutlich an der Oligomerisierung und/oder an Proteininteraktionen beteiligt ist, ein zentrales SEC7-Motiv, welches zu einer kurzen Sequenz des sonst nicht näher verwandten Proteins SEC7 in *S.cerevisiae* homolog und dort in den Proteintransport vom ER zum Golgi-Komplex involviert ist (Achstetter *et al.*, 1988). Durch NMR-spektroskopische Messungen (Betz *et al.*, 1998) konnte die Struktur der SEC-7 bereits aufgeklärt werden. Die Domäne setzt sich aus zwei Gruppen von jeweils fünf α -Helices zusammen. An die SEC7-Domäne schließt sich direkt eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) an und am carboxyterminalen Ende der Proteine befindet sich schließlich eine kurze poly-basische Region (c-Domäne).

Die PH-Domäne ist ein Modul, welches in über 100 Proteinen identifiziert wurde und bei Signaltransduktionsmechanismen eine große Rolle spielt. Die PH-Domäne ist bei Proteinkinasen (z.B. β ARK, Akt, Btk) genauso vertreten, wie bei Regulatoren kleiner G-Proteine (SOS, Vav, Dbp). Ferner stellt die PH-Domäne ein Sequenzmotiv bei Lipid-assoziierten Proteinen wie PLC β , $-\gamma$, $-\delta$ oder der PI(3)-Kinase dar. Allgemein vermittelt die PH-Domäne *in vitro* die Membranrekrutierung von Proteinen über Bindung an Membran-verankerte Lipide (Pawson, 1995; Shaw, 1996; Lemmon *et al.*, 1996; Rameh *et al.*, 1997; Lemmon *et al.*, 1997), wie z.B. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP₂) (Garcia *et al.*, 1995; Pitcher *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1996; Frech *et al.*, 1997). Einige Proteine binden auch an Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP₃) (Salim *et al.*, 1996; Franke *et al.*, 1997a, Franke *et al.*, 1997b), einem *in vivo* Produkt der Phosphatidylinositol (3)-Kinase (PI(3)-K). Eine weitere Untergruppe der PH-Domänen binden an Tyrosin phosphorylierte Proteine (Lemmon *et al.* 1996), die in diesem Zusammenhang aber keine Rolle spielen.

Die SEC-7 Domäne von Cytohesin-1 konnte als Interaktionsdomäne für den cytoplasmatischen Teil von CD18 identifiziert werden (Kolanus *et al.*, 1996). Ferner besitzt diese Domäne der Cytohesin-Homologe enzymatische Aktivität und katalysiert den Guanin-Nukleotid-Austausch kleiner, 20 kDa, ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARFs) der Ras GTPase Superfamilie. ARF-Proteine wurden aufgrund ihrer Fähigkeit die ADP-Ribosyltransferase Aktivität der Cholera Toxin A Untereinheit zu aktivieren, identifiziert (Tsai *et al.*, 1987) und werden in den intrazellulären Vesikeltransport, Cytoskelett-Reorganisationen (Norman *et al.*, 1998) sowie in der Aktivierung der Phospholipase D und Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase impliziert (Honda *et al.*, 1999).

Die GDP (Guanosindiphosphat) gebundene Form der ARFs wird als inaktiv bezeichnet. Der Austausch von GDP in GTP (Guanosin-5'-triphosphat) wird durch GEFs (guanine nucleotide exchange factors), zu den auch die Cytohesin-Proteine gehören, katalysiert und führt zur Aktivierung der ARFs. Die Hydrolyse des GTP zu GDP und die damit verbundene Inaktivierung der ARF-Proteine wird durch GAPs (GTPase-Aktivierungsproteine) vermittelt (Moss und Vaughan, 1998; Donaldson und Jackson, 2000).

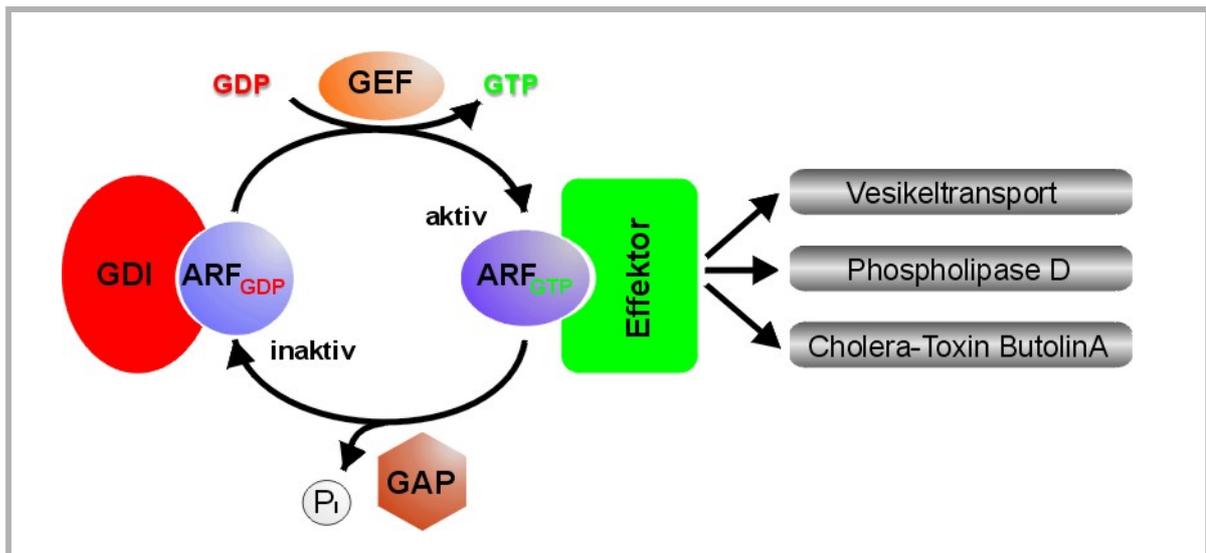


Abb. 5: Schematisches Modell des ARF_{GDP}/ARF_{GTP}-Zyklus.

Der ARF_{GDP}-Zustand wird über den Guanin-Dissoziationsinhibitor (GDI) stabilisiert. Durch einen GDP/GTP-Austausch, der durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) katalysiert wird, erfährt das ARF-Protein eine Aktivierung (ARF_{GTP}) und interagiert schließlich mit Effektormolekülen. Die Hydrolyse bzw. Inaktivierung erfolgt durch GTPase aktivierende Proteine (GAP).

Für alle Proteine der Cytohesin-Familie konnte bisher GEF-Aktivität dokumentiert werden. Die SEC7-Domäne ist dabei für die Austauschaktivität ausreichend (Chardin *et al.*, 1996; Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1998.) Für Cytohesin-2 (ARNO, ARF nucleotide-binding site opener), ein ubiquitär exprimiertes Protein, wurde GEF-Aktivität für ARF1 und ARF6 *in vitro* dokumentiert (Chardin *et al.* 1996; Frank *et al.*, 1998a) und eine Rolle bei der Modulation des Aktincytoskelettes angenommen (Frank *et al.*, 1998b).

Auch Cytohesin-3 (ARNO3) besitzt *in vitro* GDP/GTP-Austauschaktivität gegenüber ARF1 (Franco *et al.*, 1998) und wurde zunächst über das Maus-Homolog GRP1 (general receptor for phosphoinositides) identifiziert (Klarlund *et al.*, 1997). Entdeckt wurde GRP-1 als Bindungspartner für Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP₃) im „Two-Hybrid“-Screen. Das jüngste Mitglied der Cytohesin-Familie stellt Cytohesin-4 dar, welches hauptsächlich in peripheren Leukozyten exprimiert wird und *in vitro* GEF-Aktivität gegenüber ARF1 und ARF5 zeigt (Ogasawara *et al.*, 2000). Für alle Cytohesin-Homologe konnte eine Membranrekrutierung durch Aktivierung der PI(3)-Kinase vermittelt, dokumentiert werden.

Am carboxyterminalen Ende von Cytohesin-1 befindet sich eine kurze polybasische Region (c-Domäne) die neben der PIP₃-Bindung der PH-Domäne für eine Membranlokalisation von Cytohesin-1 nötig ist (Nagel *et al.*, 1998a; Nagel *et al.*, 1998b). Ein Serin/Threonin-Motiv innerhalb dieser c-Domäne kann durch gereinigte PKC δ *in vitro* und *in vivo* nach Phorbolsterstimulierung phosphoryliert werden. Durch die Phosphorylierung konnte eine Assoziation von Cytohesin-1 mit dem Aktincytoskelett, eine gesteigerte Zelladhäsion sowie eine Regulation des Guanin-Nukleotid-Austausch an ARF1 *in vitro* gezeigt werden (Dierks *et al.*, 2001).

1.5 Cytohesin-1 und die Regulierung der Zelladhäsion

Das intrazelluläre Protein Cytohesin-1, 47 kDa, wurde 1996 von Kolanus *et al.* als Interaktionspartner für das β_2 -Integrin CD18 identifiziert. Auf der Suche nach Regulatorproteinen für das Integrin LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD18) wurde die komplette cytoplasmatische Domäne der β_2 -Kette an die DNA-Bindungsdomäne des LexA-Repressors kloniert und ein „Two-Hybrid-Screen“ durchgeführt. Die cDNA-Bibliothek wurde aus Jurkat E6 Zellen gewonnen. Der erhaltene Klon ist mit der cDNA-Sequenz von B2-1 identisch, ein schon früher von Lui and Pohajdak (1992) beschriebenes Protein mit unbekannter Funktion, aber hoher Expression primär in hämatopoetischen Zellen, wie z.B. in natürlichen Killerzellen und cytotoxischen T-Zellen. Von einigen Gruppen konnte eine Expression von Cytohesin-1 auch in einigen nicht-hämatopoetischen Zellen wie HeLa, K652 oder CV-1 nachgewiesen werden (Lui und Pohajdak, 1992; Kolanus *et al.* 1996; Geiger *et al.*, 2000). Cytohesin-1 zeigt in den Zellen eine starke Expression, in denen auch LFA-1 hoch exprimiert wird.

Die Überexpression von Cytohesin-1 bzw. der SEC7-Domäne in der Jurkat T-Zell-Linie führt zu einer erhöhten Bindung von LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) an den Liganden ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Eine Überexpression der carboxyterminalen PH-Domäne inhibiert die Aktivierung von LFA-1 jedoch vollständig (dominant negativ).

Die PH-Domäne scheint bei der Membranrekrutierung von Cytohesin-1 eine große Rolle zu spielen. Wie gezeigt werden konnte (Klarund *et al.*, 1997; Nagel *et al.* 1998b) bindet die PH-Domänen von Cytohesin-1 mit hoher Affinität an PIP₃ (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat), einem zellulären Phosphorylierungsprodukt der PI(3)-Kinase. Eine PH-Mutante (PH_{R281C}), die nicht mehr in der Lage ist PIP₃ zu binden, zeigt keine Membranlokalisation mehr und blockt auch nicht dominant negativ die Zelladhäsion von T-Zellen (Jurkat E6).

Neben der PIP₃-Bindung ist für eine Membranlokalisation auch die polybasische Domäne am c-Terminus von Cytohesin-1 nötig (Nagel *et al.*, 1998a). PH und positiv geladene c-Domäne wirken kooperativ und stabilisieren nur gemeinsam sehr spezifisch die PIP₃-Bindung (Nagel *et al.*, 1998b).

In weiteren Analysen konnte die funktionale Relevanz der PI(3)-Kinase als intrazellulärer Mediator in der Integrinaktivierung von LFA-1 und der damit verbundenen Steigerung der Zelladhäsion aufgezeigt werden. Rezeptoren die in der Lymphozytenaktivierung beteiligt sind, wie der T-Zell-Rezeptor (TCR) selbst oder Korezeptoren wie CD2 oder CD28, induzieren PI(3)-Kinase Funktion über Tyrosin-Kinase-Aktivierung (Ward *et al.*, 1996; Zell *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1997). Die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form der PI(3)-Kinase (Fusionsprotein aus katalytischen Domäne p110 und regulatorischen Domäne der p85 Untereinheit) zeigt eine klare LFA-1 vermittelte Adhäsion von Jurkat E6 Zellen (Nagel *et al.*, 1998b). Neben der beschriebenen Überexpression von Cytohesin-1 führt auch eine Stimulierung des T-Zell-Rezeptors mit einem aktivierenden Antikörper (OKT3) zur Erhöhung der Zelladhäsion. Durch die PI(3)-Kinase Inhibitoren Wortmannin oder LY294002 (Shimizu und Hunt, 1996) konnte die Adhäsion vollständig inhibiert

werden. Dies lässt darauf schließen, daß PI(3)-Kinase in der Signalkaskade nachgeschaltet vom T-Zell-Rezeptor im LFA-1 Adhäsions-Signalweg liegt. Bei Überexpression von Cytohesin-1 und Anwendung der PI(3)-Kinase-Inhibitoren wurde die LFA-1 vermittelte Adhäsion nur partiell inhibiert. Cytohesin-1 ist demnach der PI(3)-Kinase nachgeschaltet aber zum Teil auch unabhängig von dieser reguliert. Zusammenfassend lässt sich sagen, daß konstitutiv aktive PI(3)-Kinase in T-Zellen, durch die Membranrekrutierung von Cytohesin-1 vermittelt LFA-1 aktiviert (Nagel *et al.* 1998b) und auf diese Weise die Zelladhäsion erhöht.

Ein ähnlicher Mechanismus für eine Integrinaktivierung über PI(3)-Kinase und Cytohesin-1 wurde für eine LPS (Lipopolysaccharid) vermittelte Aktivierung von LFA-1 in Monozyten durch CD14 vorgeschlagen (Hmama *et al.*; 1999). Die Bindung von LPS an den Oberflächenrezeptor CD14 führt zu einer Tyrosin-Kinase-Aktivierung und Rho-abhängiger Aktivierung von PI(3)-Kinase. Die genaue Funktion von Cytohesin-1 ist hierbei jedoch noch unklar.

Wie auch die schon beschriebenen Homologen der Cytohesin-Familie katalysiert Cytohesin-1 den *in vitro* GDP/GTP-Austausch an Proteinen der ARF-Familie über die SEC7-Domäne (Chardin *et al.*, 1996; Meacci *et al.*, 1997; Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1998; Donaldson und Jackson, 2000). Cytohesin-1 stellt ein GEF für ARF1 und ARF6 dar. Betrachtet man die Expression der Proteine, so lokalisiert ARF6 ähnlich wie Cytohesin-1 an der Plasmamembran (D'Souza, *et al.*, 1998). Cytohesin-1 reguliert an der Membran die β_2 vermittelte Adhäsion von T-Zellen, wobei bei der Aktivierung der Integrinen zum Teil Cytoskelettveränderungen auftreten (Lub *et al.*, 1995). Eine dominant aktive Form von ARF6 wird ebenfalls in der Reorganisation der Aktincytoskelettstruktur impliziert (D'Souza, *et al.*, 1995, 1997, 1998). Gegen ARF6 als *in vivo*-Austauschfaktor spricht, daß PIP₂ den GDP/GTP-Austausch von ARF6 vermindert, PIP₃ sogar ganz suprimiert (Knorr *et al.*, 2000), Cytohesin-1 aber über PIP₃-Bindung der PH-Domäne an die Membran rekrutiert wird.

Im Gegensatz dazu, steigert PIP₃ den GDP/GTP-Austausch von ARF1. Die Steigerung der GDP/GTP-Austauschaktivität durch PIP₃ wurde auch für Cytohesin-3 dokumentiert (Klarlund *et al.*, 1998). Die Lokalisation von ARF1 in Golgi-Apparat Strukturen deutet aber darauf hin, daß auch ARF1 kein *in vivo*-Austauschfaktor für Cytohesin-1 darstellt, da Cytohesin-1 bisher in keinen Golgi-Strukturen nachgewiesen werden konnte. Dagegen deuten einige Ergebnisse auf eine Golgi-Funktion von Cytohesin-2 und Cytohesin-3 (Franco *et al.*, 1998).

Die *in vitro*-Spezifität von Cytohesin-1 als GEF konnte jedoch durch die Generierung der Mutante E157K unterstrichen werden. Die Aminosäure E157 in Cytohesin-1 bzw. E156 in Cytohesin-2 (Peyroche *et al.*, 1996; Mossessova *et al.*, 1998) stellt eine Mutante dar, die ARF-Moleküle binden kann, aber keinerlei GDP/GTP-Austauschkapazität mehr zeigt.

Zusammenfassend stellen ARF1 und ARF6 im Prinzip *in vitro*-Austauschfaktoren für Cytohesin-1 dar, wobei die beschriebenen Ergebnisse gegen eine *in vivo*-Funktion sprechen. Wahrscheinlich sind weitere noch nicht identifizierte ARF-Proteine bzw. ARF-Domänen enthaltende Proteine die physiologischen Austauschpartner für Cytohesin-1. Erst kürzlich konnte ARD1, ein ARF-Domänen enthaltendes Protein mit 64 kDa, identifiziert werden (Vitale *et al.*, 1998, 2000, 2001). ARD1 ist primär in Lysosomen und Golgi-Membranen lokalisiert. Cytohesin-1 und Cytohesin-2 besitzen GEF-

Aktivität gegenüber ARD1, weitere funktionale Daten, wie auch Daten über die *in vivo*-Spezifität sind bisher noch nicht bekannt. Die primäre Lokalisation in den genannten Kompartimenten von ARD1 spricht aber ebenfalls nicht für einen physiologischen Interaktor für Cytohesin-1.

Für die Aktivierung von LFA-1 durch Cytohesin-1 sind zwei Punkte besonders ausschlaggebend. Die Bindung von Cytohesin-1 an β_2 und seine GEF-Aktivität für ARF-G-Proteine. Beide Funktionen werden über die SEC7-Domäne vermittelt. Drei Aminosäuren (WKA 723-725) im cytoplasmatischen transmembrannahen Bereich der β_2 -Kette sind verantwortlich für die Bindung an Cytohesin-1. Die Mutante TRG₇₂₃₋₇₂₅ zeigt keine Interaktion im „Two-Hybrid-System“ oder im „pull down“ und eine Inhibition der Integrinaktivierung durch Cytohesin-1. Dieser Effekt ist aber nicht auf eine strukturelle Umlagerungen in der β_2 -Kette durch die Mutation zurückzuführen, da divalente Kationen LFA-1 immer noch aktivieren können. Die Wichtigkeit von Cytohesin-1 für die Zelladhäsion wird noch durch folgendes Ergebnis bestärkt. Durch TCR-Stimulierung mit einem monoklonalen Antikörper (OKT3) lässt sich die β_2 vermittelte Zelladhäsion verstärken. Dieser Effekt bleibt bei der β_2 -Mutante aus, da eine intakte Cytohesin-1/ β_2 -Bindung nötig ist, um das vom TCR initiierte „inside-out“-Signal zu verarbeiten.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Ligandenbindung und Aktivierung des Integrins unabhängig voneinander ablaufen, zum Teil aber durch Cytohesin-1 vermittelt werden.

Auf der extrazellulären Seite des Integrins lässt sich mittels des Antikörpers mAb24 ein Aktivierungsepitop, das durch extrazelluläres Mn^{2+} oder Mg^{2+} /EGTA induziert werden kann, detektieren (Dransfield *et al.*, 1992). Auch eine Expression von Cytohesin-1 in Gegenwart von EGTA erhöht durch direkte Interaktion mit LFA-1 partiell die Epitopformierung, zeigt aber keine Erhöhung der Bindungskapazität an lösliches ICAM-1. Das Aktivierungsepitop von LFA-1 korreliert somit nicht mit einer erhöhten Affinität von LFA-1 zu seinem Liganden ICAM-1 (van Kooyk *et al.*, 1999).

Interessanter Weise konnte auch die Cytohesin-1 Mutante E157K (besitzt keine ARF-GEF-Aktivität), nicht jedoch die PH-Domäne alleine (inhibiert Zelladhäsion), die Epitopformierung fördern. Andererseits blockiert die E157K Mutante ähnlich der PH-Domäne die Zelladhäsion und die Zellmigration völlig, auch nach Stimulation mit PMA.

Die ARF-Aktivität ist demnach nicht für die Epitopbildung aber für die Zelladhäsion und Zellsausbreitung („cell spreading“), wahrscheinlich durch Cytoskelett-Reorganisation und damit verbundenes „Clustering“ von LFA-1 mitverantwortlich.

Ein weiterer Aspekt der für einen Einfluß von Cytohesin-1 auf die Aktivierung von LFA-1 durch „Cluster“-Bildung bzw. Aktincytoskelettuumlagerung spricht, stellt die Phosphorylierung von Cytohesin-1 dar (Dierks *et al.*, 2001). Cytohesin-1 und Cytohesin-2, nicht jedoch Cytohesin-3 können *in vitro* durch PKC δ in der polybasischen Domäne phosphoryliert werden. In Cytohesin-2 stellt das Serin 392, in Cytohesin-1 das Serin 394 und Threonin 395, die potentiellen Phosphorylierungsstellen dar. *In vivo* kann die Phosphorylierung durch PMA-Stimulation ausgelöst werden, die direkt PKCs aktivieren kann (Nishizuk, 1984, Nishizuka, 1986). Ob PKC δ tatsächlich

die physiologische Kinase darstellt oder PKC-Proteine weitere Kinasen aktivieren, die dann Cytohesin-1 phosphorylieren, ist bisher noch unklar. Deletionsmutanten zeigten deutlich eine Blockierung einer PMA-vermittelten Steigerung der Adhäsion von LFA-1 an seinen Liganden. Das durch Cytohesin-1 vermittelte Grundadhäsionsniveau wurde jedoch nicht beeinflusst.

Weitere Studien zeigten, daß die Assoziation von Cytohesin-1 mit dem Aktincytoskelett, nicht jedoch die Assoziation mit Membranlipiden durch die Phosphorylierung am carboxyterminalen Ende von Cytohesin-1 reguliert wird (Dierks *et al.*, 2001).

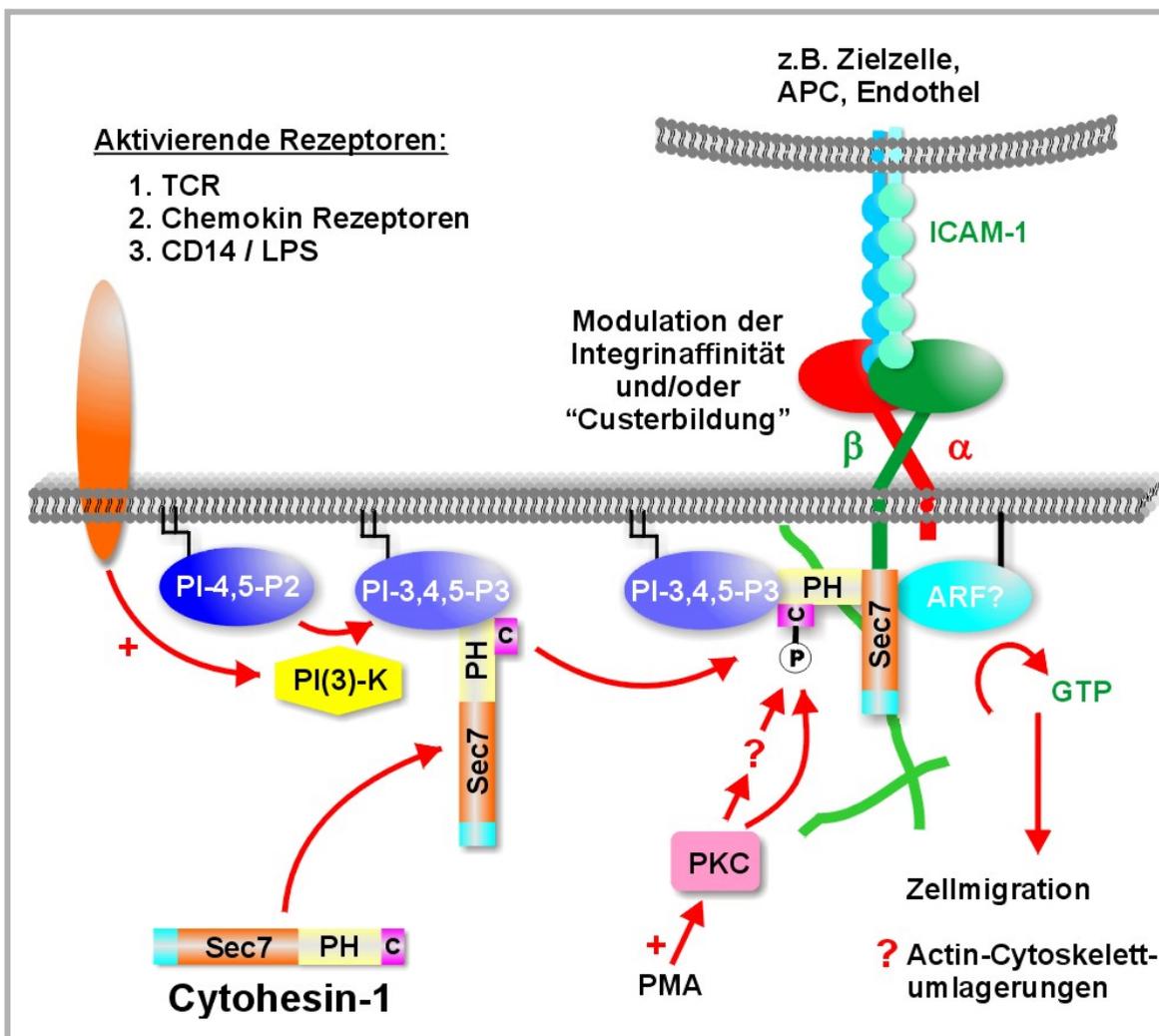


Abb. 6: Zusammenfassendes Modell zur LFA-1 vermittelten Adhäsionsmodulation durch Cytohesin-1.

Aktivierende Signale vom TCR, Chemokinen oder Korezeptoren (CD14/LPS) können die PI(3)-Kinase aktivieren, die PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert. Cytohesin-1 besitzt eine erhöhte Affinität zu PIP₃ und wird über die PH-Domäne an die Plasmamembran rekrutiert. Über die SEC7-Domäne kann Cytohesin-1 mit der β -Kette von LFA-1 interagieren und die Integrinaffinität zum Liganden ICAM-1 regulieren. Ferner wirkt Cytohesin-1 als GEF für ARF-Proteine die in Vesikeltransport und Aktincytoskelettlagerungen impliziert werden. Durch Phosphorylierung von Cytohesin-1 durch PKC wird eine Assoziation mit dem Aktincytoskelett ausgebildet, die eine Aktivierung von LFA-1 impliziert.

In welcher Weise hat die Assoziation von Cytohesin-1 an das Aktincytoskelett eine Rolle bei der Integrinaktivierung? Von Lub *et al.* (1995) wurde ein Modell entwickelt, welches eine mögliche Antwort auf die Frage gibt. Nach diesem Modell wird eine Ligandenbindung erst durch eine Entkoppelung des relativ immobilen LFA-1 Integrins vom Cytoskelett möglich. Durch die erlangte laterale Mobilität kann das Integrin aufgrund von Oligomerisierung und/oder „Cluster“-Bildung besser die Liganden erreichen und binden. Durch weitere Signale von z.B. Oberflächenrezeptoren könnten Signale, mitunter über Cytohesin-1 vermittelt, eine Aktincytoskelettlagerung initiieren und eine über längere Zeit stabile Integrin/Ligandenbindung herstellen. Cytohesin-1 selbst könnte durch Bindung an das Aktincytoskelett an eine günstige Position verankert werden, um mit LFA-1 optimal interagieren zu können.

Aufgrund der vielen bereits vorhandenen Daten, kann Cytohesin-1 als ein zentrales Molekül bei der LFA-1 vermittelten Zelladhäsion bezeichnet werden. Besonders wichtig für die Aktivierung erscheint in diesem Zusammenhang die Membranassoziation von Cytohesin-1, durch Bindung der PH-Domäne an Membranständige Phospholipide.

Immunzellen, wie Lymphozyten oder Leukozyten sind durch diesen Mechanismus in der Lage Zell/Zell- oder Zell/Matrix-Interaktionen effektiv auszubilden. Bei der Migration von Zellen oder bei der Bindung von Immunzellen an antigenpräsentierenden Zellen müssen Interaktionen gebildet, aber auch wieder gelöst werden können. Bisher ist noch nicht bekannt, auf welche Weise eine aktivierte Integrinbindung in Leukozyten moduliert bzw. wieder aufgehoben werden kann.

In dieser Arbeit wird ein neues Molekül, CYTIP, beschrieben, welches einen stabilen Komplex mit den Mitgliedern der Cytohesin-Familie ausbildet und die Zelladhäsion inhibieren kann. Nach Modifikation und Abspaltung von CYTIP, wird Cytohesin-1 aktiviert und die LFA-1 vermittelte Adhäsion von Lymphozyten an den Integrinliganden gesteuert.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Fähigkeit der Zellen spezifische Interaktionen untereinander bzw. mit einer extrazellulären Matrix auszubilden stellt eine Schlüsselfunktion in der Evolution vielzelliger Organismen dar. Während Zellen in Geweben meist eine dauerhafte Bindung mit ihrer Umgebung eingehen, sind viele Zellen des hämatopoetischen Systems nicht stationär. Sie können die Blutbahn verlassen und migrieren in das periphere Gewebe. Durch Cytokine gesteuert wandern sie in Richtung eines inflammatorischen Stimuli, zerstören Pathogene oder interagieren in den Lymphknoten reversibel/stabil mit antigenpräsentierenden Zellen (APC).

Die Regulation der Adhäsion wird durch verschiedene integrale Membranproteine reguliert, die unter dem Begriff „Zelladhäsionsmoleküle“ zusammengefaßt werden. Zu ihnen gehören die Integrine, Selektine, Mitglieder der Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie, Mucine und Cadherine. Integrine, die aus zwei Untereinheiten bestehen, binden nicht konstitutiv an ihren Liganden sondern müssen erst aktiviert werden. Das nur auf hämatopoetischen Zellen exprimierte Integrin LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) bindet an die interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1, -2, -3 und ist neben der Regulation der Zelladhäsion von Lymphozyten an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt.

Für die cytoplasmatische Domäne der LFA-1- β_2 -Untereinheit (CD18) wurde 1996 von Kolanus *et al.* Cytohesin-1 als Interaktor identifiziert. Überexpression von Cytohesin-1 in der humanen T-Zell-Linie Jurkat E6 führte zu einer deutlich gesteigerten Adhäsion der Zellen an den Liganden ICAM-1, die durch Phosphorylierung der C-Domäne von Cytohesin-1 noch gesteigert werden konnte. Die Überexpression der isolierten PH-Domäne hingegen zeigte eine Inhibition der Adhäsion. Die PH-Domäne ist für die Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran über Bindung an Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3) notwendig (Nagel, *et al.*, 1998a). Als weitere Domäne besitzt Cytohesin-1 eine Protein-Protein-Bindungsdomäne, die als „coiled-coil“-Domäne bezeichnet wird. Bisher konnte weder eine Dimerisierung von Cytohesin-1 noch eine Interaktion mit einem zweiten Protein detektiert werden.

Als zentrale Einheit besitzt Cytohesin-1 weiter eine SEC7-Domäne. Cytohesin-1 interagiert über diese Domäne mit einem membrannahen Bereich der cytoplasmatischen Domäne der β_2 -Kette von LFA-1 (Geiger, *et al.*, 2000). Ferner besitzt die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 enzymatische Aktivität und katalysiert den Guanin-Nukleotid-Austausch an kleinen ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARFs) der Ras GTPase Superfamilie. ARF-Proteine werden im intrazellulären Vesikeltransport, bei der Cytoskelettorganisation (Norman *et al.*, 1998) sowie in die Aktivierung der Phospholipase D und Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase impliziert (Honda *et al.*, 1999). Die Guanin-Nukleotid-Austauschfunktion (GEF-Funktion) von Cytohesin-1 ist vielmehr für eine effiziente Zelladhäsion notwendig, da die GEF-defekte Punktmutante Cytohesin-1(E157K) nicht mehr in der Lage ist die Adhäsion von Jurkat E6-Zellen an ICAM-1 stabil zu induzieren.

Durch eine differentielle Analyse von ungereiften und gereiften dendritischen Zellen konnte mit Hilfe der „Yeast-Two-Hybrid“-Technik ein bisher noch unbekanntes Protein, welches in dieser Arbeit als „Cytohesin-1-Interacting-Protein“ (CYTIP) bezeichnet wird, als Interaktor für Cytohesin-1 identifiziert werden. Mittels biochemischer und zellbiologischer Methoden sollte dieses neue Protein *in vivo* und *in vitro* untersucht werden.

Neben der biochemischen Bestätigung einer Interaktion zwischen CYTIP und Cytohesin standen zunächst die Identifikation von funktionellen Domänen und die Lokalisation des Proteins in hämatopoetischen Zellen im Vordergrund.

Im Anschluss war die Analyse der *in vivo* Funktion von CYTIP im Fokus der Forschungsarbeit. Hierbei wurde primär der Einfluß von CYTIP auf die Regulation der LFA-1 vermittelten Zelladhäsion sowie eine mögliche Regulierung der GEF-Aktivität von Cytohesin-1 untersucht.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Hemathode *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus verwendet, um weitere Informationen über mögliche Signalwege, Expressionsmuster und Interaktoren von Cytohesin zu erlangen. Interessanter Weise exprimiert der Fadenwurm im Gegensatz zum Menschen nur ein Cytohesin-Homolog und besitzt auch kein dem Menschen vergleichbares Immunsystem. Integrine werden jedoch in *C.elegans* exprimiert und stellen somit auch mögliche Interaktoren dar. Neben der Entwicklung und Etablierung neuer Methoden zur Visualisierung und Detektion von Proteinen *in vivo* stand die Generierung eines Cytohesin-Gen-Knockouts im Vordergrund der Arbeiten mit *C.elegans*.

3 Materialien

3.1 Laborgeräte

Agarosegeldokumentation	Eagle-Eye II, Stratagene (Heidelberg)
Agarosegelkammern	Harnischmacher (München)
	Werkstätten des Max-Planck-Instituts für Biochemie (Martinsried)
	MMM (München)
Autoklaven	ISF-1-V, Adolf Kühner (Schweiz)
Bakterienschüttler	Roth (Karlsruhe)
Bunsenbrenner	Top Count, Canberra/Packard (Frankfurt)
Chemilumineszens-Meßgerät	Epics XL, Coulter (Miami, USA)
Durchflussszytometer	Ziegra
Eismaschine	EasyJect Plus D2000, Eurogentec (Searing, Belgien)
Elektroporationsapparatur	Hyperprocessor, Amersham (Braunschweig)
Entwicklermaschine	CytoFlourII, PerSeptive Biosystems (USA)
Fluoreszenz-Meßgerät	Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg)
Heizblöcke	Ikamag RCT, Bachofer (Reutlingen)
Heizrührgerät	Heraeus (Osterode)
Inkubatoren	Liebherr, Privileg
Kühlschränke	TCS-NT/Leitz DM IRB/E, Leica (Wetzlar)
Konfokales Lasermikroskop	Typ IM 35, Zeiss (Jena)
Lichtmikroskop	Ikamag Reo, Bachofer (Reutlingen)
Magnetrührer	Robocycler Gradient 40, Stratagene (Heidelberg)
PCR-Heizblock	Thermocycler PJ Research PTC-200
	Modell 761, Knick (Berlin)
pH-Meter	Instant-Imager, Canberra/Packard (Frankfurt)
Phospho-Imager	DU 640, Beckmann (München)
Photometer	P2, P20, P200, P1000, Gilson (Middleton, USA)
Pipetten	Hirschmann (Eberstadt)
Pipettierhilfe	BioRad (München)
Protein-Minigel-Apparaturen	Schleicher & Schuell (Dassel)
Protein-Transfer-Apparaturen	BioRad (München)
	Instant Imager, Canberra/Packard
Radioaktivitätsmessgerät	MilliRo 30plus, Millipore (Eschborn)
Reinstwasseranlage	Reax2000, Heidolph (Kelheim)
Schüttelinkubator	3020, GFL (Burgwedel)
Schüttler	ISF-1-V, Adolf Kühner (Schweiz)
	Sonifier GM300, Bandelin (Berlin)
	Modell 455, Consort (Turnhout, Belgien)
Sonifikator	BDK (Sonnenbühl)
Spannungsgeräte	XLC-230, MVE (New Prague, USA)
Sterilbank	MM2, Retsch
Stickstofftank	Bachofer (Reutlingen)
Schwingmühle	Transsonic digital T480/H-2, Elma (Singen)
Überkopfschüttler	Bachofer (Reutlingen)
Ultraschalbad	Modell 583, BioRad (München)
UV-Illuminatoren (254 nm und 365 nm)	Bachofer (Reutlingen)
Vakuum-Geltrockner	Reax2000, Heidolph (Kelheim)
Vakuum-Rotationsverdampfer	AE163, Mettler-Toledo (Gießen)
Vortex	Typ 1412, Sartorius (Göttingen)
Waagen	1086, GFL (Burgwedel)
Wasserbäder	

Zentrifugen	Sorval RC-5C plus, Du Pont (Bad Homburg)
	J6-MC, Beckmann (München)
Ultra-	L8.80M, Beckmann (München)
Tisch-	5417, Eppendorf (Hamburg)
Kühl-	5417R, Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugenrotoren	Beckmann (München)
	Du Pont (Bad Homburg)

3.2 Chemikalien und Biochemikalien

2-Desoxycytidine	Sigma (Taufkirchen)
2-Mercapto-Ethanol	Merck (Darmstadt)
12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (PMA)	Sigma (Taufkirchen)
30% Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	Roth (Karlsruhe)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Biomol (Hamburg)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Agar (für Bakterienkulturen)	Difco (Detroit, USA)
Agar (für Hefepplatten)	Difco (Detroit, USA)
Agar (für Wurmpplatten)	Gibco BRL (Heidelberg)
Agarose	Sigma (Taufkirchen)
Agarose (LMP-Agarose)	NuSieve®, Biozym (Oldendorf)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt)
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Sigma (Taufkirchen)
Aphidicolin	Sigma (Taufkirchen)
Aprotinin	Sigma (Taufkirchen)
ATP	Boehringer (Mannheim)
Bacto-Hefe-Stickstoffbase	Gibco (Eggenstein)
Bacto-Pepton	Gibco (Eggenstein)
Bacto-Trypton	Gibco (Eggenstein)
Benzamidin	Sigma (Taufkirchen)
Bisbenzimid H33342 Fluorochrom Trihydrochlorid	Calbiochem (Bad Soden)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Caesiumchlorid	Biomol (Hamburg)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Calcium-Ionophor A23187	Sigma (Taufkirchen)
Casaminoacids	Difco (Detroit)
Chloramphenicol	Sigma (Taufkirchen)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Chloroquin-Phosphat	Sigma (Taufkirchen)
Cholesterol	Sigma (Taufkirchen)
Coomassie Blau R-250	Sigma (Taufkirchen)
DEAE-Dextran	Sigma (Taufkirchen)
Desoxycytidin	Sigma (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Dimethylformamid (DMF)	Roth (Karlsruhe)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Di-Natriumthiosulfat	Merck (Darmstadt)
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Dioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-glycerol	Sigma (Taufkirchen)
Dithiothreitol (DTT)	Merck (Darmstadt)
dNTP	Boehringer (Mannheim)

Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (EtOH)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma (Taufkirchen)
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethylenglycol-bis[β -aminoethylether] -N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Sigma (Taufkirchen)
Fibronektin	Sigma (Taufkirchen)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Galaktose	Merck (Darmstadt)
Gelatine	Merck (Darmstadt)
Gentamycinsulfat	Gibco (Eggenstein)
Glukose	Gibco (Eggenstein)
Glutathion (GSH)	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Glykogen	Boehringer (Mannheim)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
Hefe-Extrakt	Gibco (Eggenstein)
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure)	Biomol (Hamburg)
Hypoxanthin	Sigma (Taufkirchen)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
i-Inositol	Gibco (Eggenstein)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
Isobuttersäure	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	Boehringer (Mannheim)
Kaliumacetat	Riedel-de-Haen (Seelze)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kalium-di-Hydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumphosphat	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma (Taufkirchen)
Lachsspermien DNA	Sigma (Taufkirchen)
LB-Agar	Gibco (Eggenstein)
LB-Base	Gibco (Eggenstein)
L- α -Phosphatidylchol- β -palmitoyl- γ -oleol	Sigma (Taufkirchen)
L-Aminosäuren	Sigma (Taufkirchen)
Leupeptin	Sigma (Taufkirchen)
Lithiumacetat	Merck (Darmstadt)
Lithiumchlorid	Sigma (Taufkirchen)
Magermilchpulver	Töpfer (Dietmannsried)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
2-Mercapto-Ethanol	Merck (Darmstadt)
Mineralöl	Sigma (Taufkirchen)
Mounting-Medium	Vector Laboratories
Mycophenolsäure (MPA)	Sigma (Taufkirchen)
n-Butanol	Roth (Karlsruhe)
n-Octyl- β -D-glycopyranosid	Sigma (Taufkirchen)
N,N-Dimethylformamid	Merck (Darmstadt)
N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva (Heidelberg)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natrium-di-Hydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumfluorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)

Natriumhypochlorid	Merck (Darmstadt)
Natrium-ortho-Vanadat	Sigma (Taufkirchen)
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Biomol (Hamburg)
Nonident P40 (NP40)	ICN (Aurora, USA)
Nystatin	Sigma (Taufkirchen)
o-Nitrophenyl-β-D-Galaktosid (ONPG)	Sigma (Taufkirchen)
Octyl-β-D-Thioglycopyranosid	Sigma (Taufkirchen)
para-Formaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Phenol (in TE äquibriert)	Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva (Heidelberg)
Phosphatidylserin	Sigma (Taufkirchen)
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma (Taufkirchen)
Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000)	Roth (Karlsruhe)
Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000)	Roth (Karlsruhe)
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Sigma (Taufkirchen)
Polyvinylpyrolidon	Sigma (Taufkirchen)
Ponceau-S	Sigma (Taufkirchen)
Pyridin	Merck (Darmstadt)
Rinderserumalbumin (BSA)	Boehringer (Mannheim)
Saccharose	Merck (Darmstadt)
Salzsäure (37%)	Riedel-de-Haen (Seelze)
Scintillationsflüssigkeit Quicksafe A	Zinsser Analytic (Frankfurt)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe)
Spermidin	Boehringer (Mannheim)
Spermin	Roche (Mannheim)
Streptomycin	Sigma (Taufkirchen)
Sulfosalycilsäure	Sigma (Taufkirchen)
Tetracyclin	Boehringer (Mannheim)
Tetradecanoylphorbol-13-acetat (PMA)	Sigma (Taufkirchen)
Thymidin	Sigma (Taufkirchen)
Trichloressigsäure	Merck (Darmstadt)
Tris-[hydroxymethyl]amino-methan (Tris)	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Fluka (Heidelberg)
Trypsin (TPCK-behandelt)	Sigma (Taufkirchen)
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco (Eggenstein)
Xanthin	Sigma (Taufkirchen)
Xylencyanol	BioRad (München)
Yeast-nitrogen-base	Difco (Detroit, USA)

3.3 Radiochemikalien

Nukleotid	Aktivität	Quelle
[³⁵ S]GTP _γ S	370 MBq/ml, 10 mCi/ml, >1000 Ci/mmol	Amersham (Braunschweig)

3.4 Kommerzielle Reaktionssysteme

Bradford-Reagenzlösung	BioRad (München)
HRP-Detektionssystem (Braunschweig)	RPN 2106 ECL, Amersham

3.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer (Mannheim)
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	NEB, Fermentas (Vilnius, Litauen)
Lysozym	Boehringer (Mannheim)
PKC- α	Labor W.Kolanus
PKC- γ	Labor W.Kolanus
Proteinase K	Stratagene (Heidelberg)
Restriktionsnukleasen	Biolabs (Schwalbach)
	Boehringer (Mannheim)
	Fermentas (Vilnius, Litauen)
RNase A	Sigma (Taufkirchen)
T3-RNA Polymerase	Stratagene (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (Vilnius, Litauen)
T4-DNA-Polymerase	Biolabs (Schwalbach)
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	Biolabs (Schwalbach)
T7-RNA Polymerase	Stratagene (Heidelberg)
Taq-Polymerase	Biolabs (Schwalbach)
Vent _R -DNA-Polymerase	Biolabs (Schwalbach)

3.6 Agarose und Sepharose zur Koimmunpräzipitation

GSH-Sepharose CL-4B	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Nickel-NTA-Agarose	Quiagen (Hilden)
Protein-A-Agarose	Sigma (Taufkirchen)
Protein A-Sepharose™ 6MB	Sigma (Taufkirchen)

3.7 Kulturmedien/Seren

DMEM	Gibco (Eggenstein)
FCS	Gibco (Eggenstein)
HBSS	Gibco (Eggenstein)
LB-Agar	Gibco (Eggenstein)
LB-Base	Gibco (Eggenstein)
M9 minimal salts	Bectom-Dickinson (Franklin Lake, USA)
NuSerum	Gibco (Eggenstein)
RPMI 1640-Medium	Gibco (Eggenstein)

3.8 Antikörper

3.8.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Ratte-anti-Cytohesin-1 (7H2)	1:10 (WB), unverdünnt (IF)	E. Kremer (GSF, München)
Ratte-anti-Cytohesin-1 (2D7)	1:10 (WB), unverdünnt (IF)	E. Kremer (GSF, München)
CAD9 (7H2-isotypenspezifischer Kontroll-Antikörper aus Ratte)	1:10 (WB), unverdünnt (IF)	E. Kremer (GSF, München)
Maus-anti-FLAG (M5)	1:2000 (WB)	Sigma (Taufkirchen)
Maus-anti-TCR (OKT3)	2 µg/ml	E. Kremer (GSF, München)
Maus-anti-CD18 (MEM48)	1:1000 (IF, WB)	V.Horejsi (Prag, Tschechien)
Ziege-anti-Mensch-IgG (Fc γ -spezifisch)	1:1000 (WB)	Dianova (Hamburg)
Ziege-anti-Ratte-IgG	1:1000 (WB)	Dianova (Hamburg)
Kaninchen-anti-Mensch-IgG (F(ab') ₂ -Fragment)	1:1000 (WB)	Rockland (Gilbertsville, USA)
Maus-pan-anti-Mensch-ARF	1:500 (WB)	Alexis (Grünberg)
Kaninchen-anti-Mensch-SUMO1	1:1000 (WB)	F. Melchior (MPI-München)
Ratte-anti-CYTIP (1G1)	1:10 (WB)	E. Kremer (GSF, München)
Ratte-anti-CYTIP (2F9)	1:10 (WB)	E. Kremer (GSF, München)

WB: Im Western-Blot eingesetzt.

IF: In der Immunfluoreszenz eingesetzt.

3.8.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
HRP-Ziege-anti-Maus	1:3000 (WB)	Dianova (Hamburg)
HRP-Ziege-anti-Ratte	1:2000 (WB)	Sigma (Taufkirchen)
HRP-Esel-anti-Ziege	1:3000 (WB)	Dianova (Hamburg)
HRP-Ziege-anti-Kaninchen	1:2000 (WB)	Dianova (Hamburg)
FITC-Schaf-anti-Maus	1:100 - 1:400 (IF)	Dianova (Hamburg)
FITC-Ziege-anti-Mensch	1:400 (IF)	Dianova (Hamburg)
FITC-Ziege-anti-Ratte F(ab') ₂	1:100 (IF)	Rockland (Gilbertsville, USA)
Texas-Red-Ziege-anti-Maus F(ab') ₂ Fragment	1:100 (IF)	Dianova (Hamburg)

WB: Im Western-Blot eingesetzt.

IF: In der Immunfluoreszenz eingesetzt.

3.9 Lösungen und Puffer

50x TAE:	242 g 57 ml 50 mM ad 1 l	Tris 100% Essigsäure EDTA H ₂ O _{bidest.}	10x TBE:	108 g 55 g 20 mM ad 1 l	Tris Borsäure EDTA H ₂ O _{bidest.}
10x PBS:	80 g 2 g 14 g 2,4 g ad 1 l	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ H ₂ O _{bidest.} pH 7,4	10x TBS:	121,1 g 87,66 g ad 1 l	Tris NaCl H ₂ O _{bidest.} pH 7,5
1x TBST:	10% 0,1%	10xTBS Tween-20	TE:	10 mM 1 mM	Tris-HCl (pH 7,6) EDTA (pH 8,0)
10x SDS:	30,2 g 188 g 10% ad 1 l	Tris Glycin SDS H ₂ O _{bidest.}	M9 Puffer:	3 g/l 6 g/l 5 g/l 1 ml/l	KH ₂ PO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl MgSO ₄ -Lösung (1M)

3.10 Molekularbiologische Hilfsmittel

6-well, 12-well, 24-well, 96-well-Platten	Becton-Dickinson (Franklin Lake, USA)
Aluminiumblock (für 1,5 ml Reaktionsgefäße)	Werkstätten des Genzentrum (München)
Boyden-Kammer	Costar (Bodenheim)
Chromatographie-Kammer	Schott (Mainz)
Deckgläser	Marienfeld
Drzygalski-Glasspatel	Roth (Karlsruhe)
Einmalskalpelle	Roth (Karlsruhe)
Einmalspritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun (Melsungen)
Elektroporationsküvetten	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Filterpapier (Whatman-3MM)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Gefriergefäße (2 ml)	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Glasgefäße	Schott (Mainz)
Glasspatel	Peske (Aindling)
Gasperlen	Roth (Karlsruhe)
Handschuhe	Roth (Karlsruhe)
Kanülen (für Einmalschpritzen)	Dispomed (Gelnhausen)
Mikrotiterplatten (FluoroNunc/96-well)	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Nitrozellulosemembran (0,45 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Objektträger	Marienfeld
Objektträger (poly-L-Lysin beschichtet)	Sigma (Taufkirchen)
Pap Pen	Immunotech (Marseille, Frankreich)
Pasteurpipetten	Peske (Aindling)
PCR-Gefäße (0,2 ml, 0,5 ml)	Peske (Aindling)
Petrischalen (Ø 10 cm)	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Petrischalen für eukaryontische Zellkultur (Ø 6 cm, Ø 10 cm, Ø 15 cm)	Becton-Dickinson (Franklin Lake, USA)

Pipettenspitzen (2 µl, 200 µl, 1000 µl)	Peske (Aindling)
Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Plastikzellschaber	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Proteingel-Trockenfolie	Promega (Madison, USA)
Proteingel-Trockenrahmen	Promega (Madison, USA)
Quickseal-Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann (München)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Röntgenfilme	Kodak X-Omat, XAR5 (Rochester, USA)
Sterilfilter Millex-GP (0,22 Nunc µm)	Millipore (Eschborn)
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann (München)
Verbandsmull	Roth (Karlsruhe)
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Becton-Dickinson (Franklin Lake, USA)
Zellkultur-Einweg-Plastikmaterialien	Nunc (Roskilde, Dänemark)
	Falcon (Heidelberg)
Zentrifugenbecher (30 ml, 500 ml, 1 l)	Beckmann (München)

3.11 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
BL21	<i>f- ompT hsdSB (r_B m_B) gal dcm (DE3) (Cam^r)</i>	Expression von GST-Fusionsproteinen	Studier <i>et al.</i> , 1990
BL21LysS	<i>f- ompT hsdSB (r_B m_B) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^r)</i>	Expression von GST-Fusionsproteinen	Studier <i>et al.</i> , 1990
DH5α	<i>endA1, hsdR17(r_K m_K⁺), supE44, thi-1, recA1, gryA (Naf), relAA1</i>	Amplifikation von Plasmiden	Hanahan, 1983
MC1061	<i>F', araD139, Δ(ara-leu)7696, galE15, galK16, Δ(lac)_{X74}, rpsL(Str^r), hsdR2(m_K m_K⁻), mcrA, mcrB</i>	Amplifikation von Plasmiden	Casadaban & Cohen, 1980
MC1061-P3	<i>Wie MC1061, aber mit Helferplasmid p3: kann, bla(amp)-am, tet-am</i>	Amplifikation von CDM-Vektoren	Casadaban & Cohen, 1980
OP 50	<i>ura</i>	Wachstum von <i>C.elegans</i>	Brenner, 1974

3.12 Hefestämme

Bezeichnung	Genotyp	Verwendung	Referenz
EGY48/JK103	MATa, trp1, ura3, his3, LEU2: pLexA, op6-LEU2; zusätzlich mit Reporterplasmid JK103: amp, Ura	Interaktionsanalysen	Zervos <i>et al.</i> , 1993

3.13 Eukaryontische Ziellinien

Bezeichnung	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
COS7m6	Fibroblasten-ähnliche CV1-Affennierzellen mit integriertem, replikationsdefektem SV-40-Genom	Transiente Expression von Proteinen durch DEAE-Dextran/Chloroquin Transfektion bzw. durch Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren	Gluzman, 1981 ATCC CRL-1651
CV-1	Fibroblasten-ähnliche Affennierzellen („African green monkey“)	Amplifikation rekombinanter Vaccinia-Viren	Jensen <i>et al.</i> , 1964 ATCC CCL-70
Jurkat E6	Klon der Jurkat-T-Zelllinie aus Patienten mit akuter Leukämie	Transiente Expression von Proteinen durch Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren	Weiss <i>et al.</i> , 1984 ATCC TIB-152
Jurkat LT	SV-40 LT-Antigen exprimierendes Jurkat E6-Derivat	Funktionale Studien nach transienter Transfektion bzw. Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren	Clipstone & Crabtree, 1992
LCL-721	humane lymphoblastoide B-Zell-Linie	Transiente Expression von Proteinen	Reitnauer <i>et al.</i> , 1985

3.14 Virusstämme

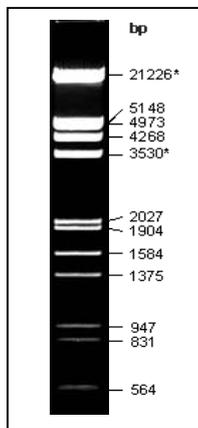
Bezeichnung	Verwendung	Referenz
Vaccinia (WR-Stamm)	Insertion rekombinanter DNA in das Vaccinia-Genom. Proteinexpression in Säugerzellen durch rekombinante Viren	Mackett <i>et al.</i> , 1982

3.15 Wurmstämme

Bezeichnung	Verwendung	Referenz
N1 Wildtyp	Injektionen von Reporterplasmiden, Antikörperfärbungen, Mutagenesen, Gen-Knock-Out	var. Bristol

3.16 DNA- und Proteinlängenstandards

3.16.1 DNA- Längenstandard



λ DNA / EcoRI+HindIII Marker (Fermentas, Vilnius (Litauen))

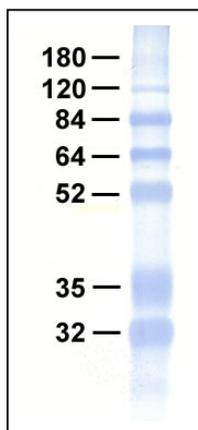
Von einer käuflich erworbenen λ DNA-Stammlösung (500 ng/ μ l), verdaut mit EcoRI und HindIII wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt und mit DNA-Auftragspuffer versetzt.

100 μ l λ DNA / EcoRI + HindIII
 167 μ l 6x Auftragspuffer
 733 μ l bidest. H₂O

Auf ein Agarosegel wurden in der Regel 7 μ l Marker aufgetragen.

6x DNA-Auftragspuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau
 0,25% (w/v) Xylencyanol
 30% (v/v) Glycerin
 50 mM EDTA
 in bidest. H₂O
 Lagerung bei 4°C.

3.16.2 Protein- Längenstandards



7B-SDS-Molekular-Gewicht-Marker

Im beschriebenen Proteinmarker sind folgende Proteinstandards enthalten:

180 kDa: α_2 -Macroglobulin von humanem Plasma
 120 kDa: β -Galactosidase von *E.coli*
 84 kDa: Fructose-6-Phosphat Kinase aus Kaninchenmuskel
 64 kDa: Pyruvat Kinase aus Hühnermuskel
 52 kDa: Fumerase aus Schweineherz
 35 kDa: Laktose-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel
 32 kDa: Triosephosphat-Isomerase aus Kaninchenmuskel

Die Einzelkomponenten wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen und der Marker gemäß den Herstellerangaben angesetzt.

3.17 Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Verwendung	Referenz
CDM7	SupF (amp/tet)	Expression nativer Proteine	Seed, 1987
p5C7	amp	Expression von Proteinen mit clg-Fusionsanteil	Kolanus, nicht publiziert
pT7Hxpflu	amp	Expression von Proteinen mit hexa-Histidinpeptid-Fusionsanteil	Kolanus, nicht publiziert
pTKg	amp	Vektor zur homologen Rekombination mit Vaccinia-Genom	Romeo und Seed, 1991
pEGFP N1	kan	prokaryontische Expression	Clontech
pN1 G418	kan, G418	prokaryontische Expression	Clontech
pEG202	amp, His	Expression des "bait"-Proteins in Hefe	Ruden <i>et al.</i> , 1991
pJG4-5	amp, Trp	Expression des "prey"-Proteins in Hefe	Gyuris <i>et al.</i> , 1993
pGEX-2T	amp	Expression mit GSH-Fusionsanteil	Smith & Johnson, 1988
pPB KS II (+)	amp	<i>in vivo</i> Transkription von RNA	Stratagene

3.18 Fusionsanteile von Plasmidvektoren

Bezeichnung	Aufbau	Verwendung	Referenz
clg	CH2- und CH3-Domänensegmente der humanen IgG1 -cDNA	Expression zellulärer Proteine zur Präzipitation über den Fusionsanteil an Protein A. Detektion des Fusionsanteils mittels käuflicher Antikörper.	Kolanus <i>et al.</i> , 1996
Flag	FLAG Sequenz: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys	Nachweis rekombinant überexprimierter Proteine	Hopp <i>et al.</i> , 1988
6xHis	Erkennungssequenz für Faktor Xa, Hämagglutinin-Epitop	Expression und vereinfachte Aufreinigung rekombinanter Proteine über den Fusionsanteil an Ni-Agarose	Kolanus <i>et al.</i> , 1996
GST	Glutathion S-transferase Gen	Expression und vereinfachte Aufreinigung rekombinanter Proteine über den Fusionsanteil an Glutathion-Agarose	Smith <i>et al.</i> , 1988 Toye <i>et al.</i> , 1990
eGFP	Codon-humanisiertes grün fluoreszierendes Protein aus der Quallenart <i>Aequoria victoria</i>	Proteinlokalisierung <i>in vivo</i>	Chalfie <i>et al.</i> , 1994 Haas <i>et al.</i> , 1996

3.19 cDNA-Genbanken

Bezeichnung	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
NK-Library	cDNA-Genbank aus natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) auf der Basis des CDM7-Vektors	Klonierung von Genen	W. Kolanus, persönliche Mitteilung

3.20 Oligodesoxyribonukleotide

Die unten aufgeführten Oligodesoxyribonukleotide wurden im Labor von Herrn Dr. Arnold (Genzentrum, LMU-München) synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz
pHE-2 cod	5'- GCC GCG ACG CGT GCC ACC ATG TCT TTA CAA AGG CTC CTG -3'
pHE-1 rev	5'- GCC GCT GCG GCC GCT CAA AAG CGA CTT TCT TCC TC -3'
Cod HE Nde1	5'- GGG AAT TCC ATA TGT CTT TAC AAA GGC TCC TG -3'
Rev HE Xho1	5'- CGC GCC CTC GAG TCA AAA GCG ACT TTC TTC CTC -3'
Cyh2 cod Nde1	5'- GCG CGG CAT ATG GAG GAC GGC GTT TAT GAA CCC -3'
Cyh2 rev Xho1	5'- CGC GGC CTC GAG TCA GGG CTG CTC CTG CTT CTT C -3'
Cyh3 cod Nde1	5'- GCG CCG CAT ATG GAT GAA GAC GGC GGC GGC GAG -3'
Cyh3 rev Xho1	5'- CGC GGC CTC GAG CTA TTT TTT ATT GGC AAT CCT TCG -3'
pHE coiled cod	5'- CGC GGC ACG CGT GCC ACC ATG GGA AAC CTG CTA ACG ATA GAG AC -3'
pHE coiled rev	5'- GCC GCT GCG GCC GCT CAA AGC AGA CGA TGT TCC TGT AAC -3'
pHE 203 cod	5'- GCG GGC ACG CGT GCC ACC ATG CAT GGT GAT GCA GCT AAT TGC CCC -3'
rev HE 357*	5'- CGC CCT GCG GCC GCT TCA TTC TTC CTC TTC CAC AGC -3'
COD HE PDZ	5'- GCG GCC ACG CGT GCC ACC ATG TCC TGG TCT CAA AGA AAG CTT -3'
COD HE Q146	5'- CGC GCC ACG CGT GCC ACC ATG CAA GTC GTT GAC CTG ATC AGA G -3'
REV HE FPG	5'- GGC GCT GCG GCC GCT TTA GGG TCC AAA CAA AGA CAA TTC -3'
REV HE SSE	5'- GGC GCT GCG GCC GCT TTA CTC ACT GGA TAA TCG ATT CCG -3'
REV HE LPR	5'- GGC GCT GCG GCC GCT TTA CCG GGG CAG GGT CCC AAA G -3'
REV HE EDG	5'- GGC GCT GCG GCC GCT TTA GCC ATC TTC ACT GTC CAT CGT -3'
REV HE FIP	5'- GGC GCT GCG GCC GCT TTA GGG GAT AAA GCA CTC ATC ATC -3'
REV HE RSS	5'- CGC CCC GCG GCC GCT TTA GGA CGA TCT GAT CAG GTC AAC -3'
COD HE LPG	5'- GGC GCG ACG CGT GCC ACC ATG CTG CCT GGG CCA GGC CCA GCC -3'
COD HE K247R	5'- GAG AGC AGC TGT AGG AGC TGG CTG AGC TCC -3'

REV HE K247R	5'- GGA GCT CAG CCA GCT CCT ACA GCT GCT CTC -3'
COD HE K287R	5'- GAG TGC TTT ATC CCC AGG GAG GGG GAT GAT -3'
REV HE K287R	5'- ATC ATC CCC CTC CCT GGG GAT AAA GCA CTC -3'
cod HE K82E	5'- GTT ACT GTG GAG GAG CAG GAT AAT G -3'
rev HE K82E	5'- CAT TAT CCT GCT CCT CCA CAG TAA C -3'
cod HE F90A	5'- GAA ACA TTT GGA GCT GAA ATT CAG -3'
rev HE F90A	5'- CTG AAT TTC AGC TCC AAA TGT TTC -3'
cod HE I92A	5'- GGA TTT GAA GCT CAG TCT TAC AGG -3'
rev HE I92A	5'- CCT GTA AGA CTG AGC TTC AAA TCC -3'
cod HE 90/92	5'- GAA ACA TTT GGA GCT GAA GCT CAG -3'
rev HE 90/92	5'- CTG AGC TTC AGC TCC AAA TGT TTC -3'
cod HE S251/52A	5'- AAG AGC TGG CTG GCC GCC ATG ACG ATG GAC -3'
rev HE S251/52A	5'- GTC CAT CGT CAT GGC GGC CAG CCA GCT CTT -3'
cod HE T254A/S257A	5'- CTG AGC TCC ATG GCG ATG GAC GCT GAA GAT GGC TAC -3'
rev HE T254A/S257A	5'- GTA GCC ATC TTC AGC GTC CAT CAC CAT GGA GCT CAG -3'
cod HE S244/45A	5'- TTA TCC AGT GAG GCC GCC TGT AAG AGC TGG -3'
rev HE S244/45A	5'- CCA GCT CTT ACA GGC GGC CTC ACT GGA TAA -3'
cod HE S248A	5'- AGC AGC TGT AAG GCC TGG CTG AGC TCC -3'
rev HE S248A	5'- GGA GCT CAG CCA GGC CTT ACA GCT GCT -3'
eGFP COD	5'- GCG GCG GCT AGC GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG C -3'
eGFP REV	5'- GCG GCG GGT ACC TCC ACC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC G -3'
pat3 cdw cod	5'- GCG GGG ACG CGT TGG AAA TTG CTC ACA GTA C -3'
pat3 cdl cod	5'-GCG GGG ACG CGT TTG CTC ACA GTA CTT CAT G -3'
pat3 cd rev	5'- CGC CCC GCG GCC GCT TTA GTT GGC TTT TCC AGC -3'
ce cytSEC cod	5'- GCG GGG ACG CGT GCC ACC ATG TAC ACC CAT CCA AAA TCA AAA G -3'
ce cytSEC rev	5'- GCG GGG GCG GCC GCT TTA AAT ATC GTT AGT TCC -3'
ce Cyh COD Mlu	5'- GGC GCG ACG CGT GCC ACC ATG ACT CTT CCC AAA GTA CGC -3'
ce Cyh REV Not	5'- GGC CGC GCG GCC GCT TCA GTG GGT ACT TTT TGG TCT GGC -3'
codRNA1ceh	5'- GCG CCG AAG CTT GAA GGA CTT TCT AAA AGT GCG -3'
revRNA1ceh	5'- CGG CGC GGA TCC TTC ATT TCA ATA TAT TTT TCC -3'
revRNA2ceh	5'- CGG CGC GGA TCC TAA TAA ATG TTG CTG CGG TGC -3'
CODoutCOS	5'- CCG CAC AGC CCT GAT GAG GAC CAA TAT TCC -3'
REVoutCOS	5'- GGA CAA TTA CAT GTT GTA CAC TGG TCC GAG -3'
CODoutCOS2	5'- GTA AAA TCT CAA AAC TCT GGT CGT TAA CC -3'
REVoutCOS2	5'- CAG GCT CAG AAG ACT GTT TGC G -3'
CODinCOS	5'- CGC AGC TTC GGA TGG ACT GTT AAT TTC ACC -3'
REVinCOS	5'- TCA TCG ATT CGA AAC GGT TCA ACA CCT TGC -3'
EG 3.1	5'- TGC TTT GAT TGT TTT CGC AG -3'
EG 3.2	5'- TCA CCA AAA TCC ACT GGA CA -3
EG 3.3	5'- ATC TTG AGG GTC TCC CGT -3'
EG 3.4	5'- CGA GTC TTC TGA CAA ACG CA -3'

4 Methoden

4.1 Methoden prokaryontischer Zellkultur

4.1.1 Kultivierung von prokaryontischen Zellen (*E.coli*)

Die Arbeiten mit Bakterien wurden unter sterilen Bedingungen unmittelbar neben einer Bunsenbrennerflamme mit sterilen Glas- und Plastikwaren durchgeführt. Zum Ausplattieren von Bakterien wurde ein Drzygalski-Spatel verwendet, der durch Eintauchen in 100% EtOH und Abflammen über einer Bunsenbrennerflamme sterilisiert wurde.

Die für die Plasmidamplifikation verwandten *E.coli*-Stämme wurden unter sterilen Bedingungen mit einer Platin-Impföse der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Kolanus entnommen, einer Transformation (4.1.4) mit Plasmid-DNA unterzogen und auf Agarplatten vereinzelt. Die Selektion basiert auf einer plasmidcodierten Resistenz gegenüber einem Antibiotikum. Nach einer Inkubation über Nacht, bei 37°C, wurden einzelne Klone in 5 ml LB-Medium überführt und unter gleichen Bedingungen im Schüttelinkubator bei 180 bis 230 rpm vermehrt. Für größere Plasmidpräparationen (1L Bakterienkulturen) diente der 5 ml Ansatz als Vorkultur.

Anzucht von *E.coli* MC1061, DH5 α , BL21 und BL21 LysS mit Ampicillin-resistenten Vektoren

Die Bakterien wurden mit β -Lactamase codierenden Vektoren transformiert und dem LB-Medium zur Selektion Ampicillin in einer Endkonzentration von 50-100 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt.

Anzucht von *E.coli* MC1061p3 mit CDM7-Vektoren (Ampicillin/Tetracyclin-Resistenz)

Für die Amplifikation von CDM-Vektoren, welche ein Gen einer amber-Suppressor-tRNA beinhalten, wurde der Bakterienstamm MC1061p3 verwendet. Die Anzucht dieses Bakterienstammes mit dem Zusatzplasmid p3 erfolgte in M9-Medium. Bei Wachstum der Bakterien in diesem Medium lassen sich im Gegensatz zu LB-Medium höhere Reinheitsgrade der DNA erzielen. Selektiert wurde in Gegenwart von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 7,5 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin.

Anzucht von *E.coli* MC1061 und DH5 α mit Kanamycin-resistenten pN1-Vektoren

Die Anzucht dieser Bakterienstämme erfolgte in LB-Medium, dem zur Selektion auf Plasmid-transformierten Bakterien Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt war.

<i>Agaroseplatten:</i>	1,0% (w/v)	Bacto-Trypton
	0,5% (w/v)	Hefe-Extrakt
	1,0% (w/v)	NaCl
	1,5% (w/v)	Agar
	pH 7,0	

Zur Sterilisation wurde die Lösung autoklaviert. Die Zugabe des Antibiotikums erfolgte nach Abkühlen der Lösung <55°C. Anschließend wurde die Lösung auf 10 cm Petrischalen verteilt, bei RT polymerisiert und bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

<i>LB-Medium:</i>	1,0% (w/v)	Bacto-Trypton
	0,5% (w/v)	Hefe-Extrakt
	1,0% (w/v)	NaCl
	pH 7,0	

Sterilisation durch Autoklavieren. Vor Gebrauch wurde die entsprechende Menge an Antibiotikum zugegeben.

<i>M9-Medium:</i>	10 g/l	M9-Minimal-Salts
	10 g/l	Casamino-Acids
	ad 990 ml/l	H ₂ O _{bidest.}

Nach Sterilisation der Lösung durch Autoklavieren und Abkühlen <55°C wurde weiter zugegeben:

10 ml/l	100x M9-Additions
125 µl/l	Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml)
1 ml/l	Tetracyclin-Stammlösung (7,5 mg/ml)

<i>M9-Additions (100x):</i>	86% (v/v)	Glycerin
	1M	CaCl ₂
	1M	MgSO ₄

Alle Komponenten wurden separat autoklaviert.

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml in 50% EtOH

Kanamycin-Stammlösung: 30 mg/ml in H₂O_{bidest.}

Tetracyclin-Stammlösung: 7,5 mg/ml in 90% EtOH
(Lagerung unter Lichtausschluss)

Sterilisation der Antibiotika-Stammlösungen durch Filtration über einen 0,2 µm Spritzenfilter.

Lagerung bei -20°C.

4.1.2 Stammhaltung von prokaryontischen Zellen (*E.coli*)

Mit Parafilm abgedichtete Agarplatten konnten bis zu 3 Monate bei 4°C aufbewahrt werden. Zur längeren Konservierung der Zellen wurden Glycerolkulturen angelegt. Hierzu wurde 1 ml einer gesättigten Bakterienkultur 1 min bei 6800xg zentrifugiert und 700 µl des Überstandes abgenommen. Das Zellsediment wurde mit dem restlichen Überstand resuspendiert und mit 300 µl Glycerin (86%) gut durchmischt. Eine Lagerung der Glycerolkulturen erfolgte bei -80°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen.

4.1.3 Herstellung kompetenter *E.coli*-Bakterien mittels CaCl₂

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach einem von Mike Scott (UCSF) etablierten Verfahrens mittels CaCl₂. Mit dieser Methode können Kompetenzen von 10⁶ transformierte Kolonien pro µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

Der gewünschte Bakterienstamm wurde auf einer Antibiotika-freien LB-Agarplatte vereinzelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. 20 ml TYM (in 250 ml Erlenmeyer-Kolben) wurden mit einer Bakterieneinzelkolonie inokuliert und bei 37°C und unter kräftigem Schütteln bei 200 rpm in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,9 kultiviert. Diese Vorkultur wurde in einem 2 L Erlenmeyer-Kolben überführt, in dem 100 ml TYM auf 37°C vorinkubiert worden war. Nach einer weiteren Inkubation unter gleichen Bedingungen wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,9 diese Kultur mit 380 ml vorgewärmtem TYM auf 500 ml verdünnt. Anschließend wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 weiterinkubiert und die Bakterienkultur durch Schwenken in einem Eis-Wasser-Bad möglichst rasch auf 4°C abgekühlt und 10 min bei 3000xg, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die sedimentierten Bakterien schonend in 100 ml kaltem TfB II resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation unter gleichen Bedingungen, wurden die Zellen in 20 ml TfB II aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 200 µl Aliquots aufgeteilt und möglichst rasch in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung kompetenter *E.coli*-Stämme erfolgt bei -80°C.

Zur Ermittlung der Kompetenz der behandelten Zellen wurden 10 ng Plasmid-DNA transformiert, mehrere Verdünnungen auf LB-Agarplatten ausplattiert und die Kolonien nach Inkubation im Brutschrank über Nacht, bei 37°C, ausgezählt.

TYM:	2% (w/v)	Bacto-Trypton
	0,5% (w/v)	Hefe-Extrakt
	0,1 M	NaCl
	10 mM	MgSO ₄

Sterilisation der Lösung durch Autoklavieren.

<i>TfB I:</i>	30 mM	Kaliumacetat
	100 mM	KCl
	10 mM	CaCl ₂
	15% (v/v)	Glycerin

Nach einer Sterilisation (autoklavieren) wird separat sterilisierte MnCl₂-Lsg. zugesetzt:

50 mM	MnCl ₂
-------	-------------------

<i>TfB II:</i>	10 mM	HEPES (pH 7,0)
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	KCl
	15% (v/v)	Glycerin

Sterilisation durch Filtration (0,2 µm Spritzenfilter).

4.1.4 Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien

5 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µl eines 50 µl Ligationsansatzes (4.5.7) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 80 µl, bei RT aufgetaute, kompetente *E.coli*-Bakterien (4.1.3) vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis, erfolgte ein Hitzeschock von 5 min bei 37°C, wobei die Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen wird. Nach einer weiteren Minute auf Eis wird der Transformationsansatz mit einem Dryzgal'ski-Glasspatel auf einer selektiven LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.1.5 Präparation und Modifikation von Plasmid-DNA

4.1.5.1 Plasmidpräparation aus *E.coli*-Bakterien im µg-Maßstab

Um rekombinante Klone auf korrekte DNA-Insertion zu überprüfen, wurde im kleinen Maßstab plasmatische DNA nach dem schnell durchführbaren Boil-Lysis Verfahren von Homes und Quigley (1981) isoliert. Die mit dieser Methode präparierte Plasmid-DNA konnte ohne Probleme in Restriktionsverdau (4.5.4) und weitere Klonierungsschritte eingesetzt werden, enthält aber noch beträchtliche Mengen an RNA.

Eine 5 ml Antibiotika-supplementierte Übernachtskultur wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 37°C unter aeroben Bedingungen kultiviert. 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden bei 20800xg in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen und das Zellsediment in 200 µl STET-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen und

Zerkleinerung von RNA wurde 10 µl Lysozym/RNase-Lösung zugegeben und die Lösung kurz mit dem Vortex durchmischt. Zum Aufschluss der Zellen wurden die Probe 10 min bei 95°C auf dem Heizblock erhitzt, Zellreste, Proteine und chromosomale DNA durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 20800xg in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der klare Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein frisches Plastikgefäß überführt und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 200 µl 5 M Ammoniumacetat und 400 µl Isopropanol (100%) versetzt. Die Probe wurde durch Invertieren durchmischt und die gefällte Plasmid-DNA 10 min bei 20800xg, 4°C in einer Kühlzentrifuge präzipitiert, mit kaltem 70%-igen EtOH gewaschen, bei 37°C auf dem Heizblock getrocknet und der Ausbeute entsprechend in 30-100 µl bidest. H₂O aufgenommen.

<i>STET-Puffer:</i>	8% (w/v)	Saccharose
	5% (v/v)	Triton X-100
	50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	50 mM	EDTA (pH 8,0)

Sterilisation durch Filtration (0,2 µm Spritzenfilter).
Lösung bei 4°C lagerfähig.

<i>Lysozym/RNase-Lösung:</i>	10 mg/ml (w/v)	Lysozym
	1 mg/ml (w/v)	RNase A
	50 mM	EDTA (pH 8,0)

Lagerung bei -20°C.

4.1.5.2 Plasmidpräparation aus *E.coli*-Bakterien im mg-Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (1-8 mg) erfolgte in Anlehnung an die Protokolle zur „alkalischen Lyse“ von Birnboim und Doly (1979), Ish-Horowicz und Burke (1981).

Die Reinigung bakterieller Plasmid-DNA durch Caesiumchlorid-Gleichgewichtszentrifugation liefert große Mengen hochreiner DNA, die in konzentrierter wässriger Lösung über Jahre hinweg lagerfähig ist. Prinzip der Trennung im Dichtegradienten ist die unterschiedliche Menge an Ethidiumbromid, die in überspiralisierte Plasmid-DNA im Vergleich zu linearen Nukleinsäure-Molekülen inkorporiert.

1,0 L LB-Medium wurde mit einer 5 ml Vorkultur inokuliert und über Nacht bei 37°C unter selektiven, aeroben Bedingungen kultiviert. Dies erfolgte mit Ausnahme des *E.coli*-Stammes MC1061p3, für den M9-Medium (siehe 4.1.1) verwendet wurde. Zur Sedimentierung wurde die Zellsuspension 15 min bei 4500xg in einem J6-MC Rotor (Sorvall) zentrifugiert, der Überstand abdekandiert und das Zellsediment in 40 ml Lösung 1 resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 80 ml Lösung 2. Unter wiederholtem Umschwenken wird chromosomale DNA und Proteine durch Zugabe von 40 ml Lösung 3 präzipitiert. Zur besseren Dekandierbarkeit wurde

erneut bei 5000xg sedimentiert und der Überstand durch ein mehrlagiges Verbandsmull in einen 500 ml Zentrifugenbecher filtriert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde 100 ml Isopropanol zugegeben, zur gründlichen Mischung mehrmals invertiert und bei 5000xg in einem GSA-Rotor (Sorvall) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Fällungsprodukt mit 70%-igem EtOH gewaschen und anschließend bei RT getrocknet.

Die Resuspendierung erfolgte je nach Menge des Niederschlags in 3,5 - 4,0 ml Lösung 1, so daß ein Endvolumen von 4,5 ml zu 5,7 g CsCl hinzugefügt werden konnte, die in einem 13 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt worden war. Durch kräftiges Schütteln und Erwärmen in einem 37°C Wasserbad wurde das CsCl vollständig gelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) und erneutem Mischen der Lösung erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 12300xg, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde der Überstand in ein QuickSeal-Ultrazentrifugenröhrchen überführt und durch Verschweißen verschlossen.

Zur Einstellung des Dichtegradienten wurde in einer Ultrazentrifuge (Beckmann) mit einem NVT90-Rotor 3 h bei 80000 rpm oder bei 65000 rpm über Nacht zentrifugiert.

Anschließend wurde die Plasmidbande mit einer Spritze abgezogen und in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt, zur Entfärbung mit 10 ml 1 M NaCl-gesättigtem n-Butanol aufgefüllt und kräftig geschüttelt. Die nun das Ethidiumbromid enthaltende hydrophobe Phase wurde in ein Gefäß gesaugt, in dem zur Neutralisation 5 M NaOH vorgelegt wird. Dieser Waschvorgang wurde so lange wiederholt bis die wässrige Phase farblos erschien. Die verbleibende wässrige Phase wurde möglichst vollständig abgenommen und mit gleichen Volumen einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung und dem zweifachen Volumen abs. EtOH versetzt und gut durchmischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei -20°C wurde 10 Minuten bei 10000 rpm in einem SS-34 Rotor (Sorvall) zentrifugiert und das entstandene Sediment mit 70% EtOH gewaschen, anschließend getrocknet und in 500-1000 µl bidest. Wasser resuspendiert.

<i>Lösung 1:</i>	10 mM	EDTA (pH 8,0)
<i>Lösung 2:</i>	0,2 M 1% (w/v)	NaOH SDS
<i>Lösung 3:</i>	2,5 M 2,5 M pH 4,7	Kaliumacetat Essigsäure
<i>Ethidiumbromid- Stammlösung:</i>	10 mg/ml (w/v)	Ethidiumbromid in bidest. H ₂ O

4.2 Methoden eukaryontischer Zellkultur

4.2.1 Kultivierung und Stammhaltung eukaryontischer Zelllinien

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank, mit sterilen Glas- und Plastikmaterialien durchgeführt. Biologisches Material wurde durch Autoklavieren inaktiviert.

4.2.1.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Eukaryontische Suspensionszellen wurden in sterilen Plastikzellkulturflaschen in RPMI 1640-Medium supplementiert, mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (56°C für 30 min) und 13 µg/ml Gentamycinsulfat in einem Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO₂, 96% relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die Zellen wurden jeweils in einer Dichte von 0,2 bis max. 1,5 x 10⁶ Zellen/ml kultiviert und zur Verdünnung mit vorgewärmtem (37°C) Medium (mit Zusätzen, siehe oben) versetzt.

4.2.1.2 Kultivierung adhärenter Zellen

Adhärenente eukaryontische Zellen wurden als „Monolayer-Kulturen“ in sterilen 10 cm-Zellkulturschalen in DMEM-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (56°C für 30 min) und 13 µg/ml Gentamycinsulfat in einem Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO₂, 96% relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Zur Umsetzung wurden die Zellen zunächst mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit 2,5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 mg Trypsin/ml und 0,2 mg/ml EDTA in HBSS) inkubiert, um sie von der Zellkulturschale zu lösen. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von DMEM-Medium abgestoppt und die Zellen 3 min bei 900xg abzentrifugiert und anschließend in frisches vorgewärmtes (37°C) DMEM-Medium (mit Zusätzen) überführt.

4.2.1.3 Anlegen von Dauerkulturen

Zur langfristigen Lagerung von eukaryontischen Zellen wurden Dauerkulturen angelegt. Hierzu wurde 900 µl FCS/30% DMSO (v/v) in sterile 2,0 ml-Gefriergefäße (Kryotube) vorgelegt. Die adhärenenten Zellen einer dicht bewachsenen 15 cm Zellkulturschale bzw. 5x10⁷ Zellen einer Suspensionskultur wurden 5 min bei 900xg abzentrifugiert, die Zellen dann in 900 µl Medium/10% FCS resuspendiert und über die Vorlage geschichtet, durch invertieren vermischt und sofort bei -80°C eingefroren. Die längerfristige Lagerung der Dauerkulturen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

4.2.2 DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion von COS7-Zellen

Die Transfektion von COS7-Zellen erfolgte zur transienten Überexpression von nativen und rekombinanten Proteinen. Dieses Expressionssystem ermöglicht hohe Proteinausbeuten (bis zu 50% Transfektionseffizienz) bei einfacher Handhabung der Zellen. Die Transfektionsprozedur orientiert sich an dem Protokoll von Lopata *et al.* (1984). Zur Steigerung der Transfektionseffizienz werden jedoch verschiedene Parameter modifiziert (Sussman und Milman, 1984).

Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA im Komplex mit DEAE-Dextran über einen bisher nicht vollständig geklärten Mechanismus aufgenommen. Chloroquin begünstigt diesen Prozess vermutlich dadurch, daß eine zu starke Ansäuerung der DNA-enhaltenden Endosomen vermindert wird. Als Expressionsvektoren wurden CDM-Derivate für die Expression von Fusionsproteinen oder p5C7-Konstrukte für nativ-exprimierte Proteine eingesetzt.

COS7-Zellen einer konfluenten 10 cm - Zellkulturschale wurden am Vorabend durch Trypsinierung abgelöst und derart auf neue Schalen verteilt, daß die Zellen am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 60-80 % aufwiesen. Vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch 5 ml DMEM/10% NuSerum (Cooaborativ Research 55000) ersetzt. Die geringe Proteinkonzentration des NuSerums gegenüber dem normalerweise für des Zellwachstum verwendeten FCS minimiert die Bildung von hochmolekularen Protein-DEAE-Komplexen. Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA pro ml Medium jedes zu transfizierenden Konstruktes und 200 µl einer 25-fach konzentrierten DEAE-Dextran/Chloroquin-Lösung startete die Transfektion. Bei Mehrfach-Transfektionen wurden alle Plasmide jeweils in der oben genannten Endkonzentration zugegeben. Nach ca. 2 h Inkubation bei 37°C / 5 % CO₂ begannen sich die Zellen auf der Platte in der Regel abzurunden. Die Transfektion war abgeschlossen, wenn sich etwa 80 % der Zellen abgerundet, aber noch nicht gelöst hatten. Dies war normalerweise nach einer 4–5 stündigen Reaktionszeit der Fall. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen für 2 min mit 5 ml PBS/10% (v/v) DMSO gewaschen. Die PBS/DMSO-Lösung wurde verworfen und die Zellen ÜN bei 37°C / 5% CO₂ in 10 ml DMEM/10% FCS/Antibiotikum inkubiert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen nach 1x Waschen mit 1xPBS, mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung trypsiniert und 1:1 auf frische Platten überführt. Nach 24-48 h Inkubation bei 37°C / 5% CO₂ konnten die Zellen dann für Experimente verwendet werden.

25x DEAE-Dextran/Chloroquin:

10 mg/ml (w/v)	DEAE-Dextran
2,5 mM	Chloroquinphosphat
	in 1x PBS

Sterilisation durch Filtration (0,2 µm Spritzenfilter).
Lagerung bei -20°C.

4.2.3 Transfektion von Suspensionszellen durch Elektroporation

Humane Suspensionszellen wurde in dieser Arbeit neben der Infektion mit Vaccinia-Viren (4.2.4.6) mittels Elektroporation transfiziert. Neben Expressionsvektoren wurden auch Reporterplasmide mit Hilfe dieser Technik in diverse Zelltypen eingebracht. Darüber hinaus eignet sich diese Methode auch zur Selektion stabil transfizierter Zellen, da die Methode weniger mutagen wirkt als z.B. die DEAE-Transfektion (4.2.2).

Starke elektrische Felder permeabilisieren Zellmembranen kurzfristig derart, daß große Moleküle, wie beispielsweise DNA, in die Zelle aufgenommen werden können. Ein kleiner Teil des eingeschleusten Plasmids wird dabei normalerweise stabil in das Genom der Zellen integriert.

Zur Elektroporation wurden $1,5 \times 10^7$ Suspensionszellen 5 min bei 900xg abzentrifugiert und in 400 µl RPMI / 10% FCS resuspendiert. In 4 mm Elektroporationsküvetten wurden 10-30 µg jeder zu transfizierenden DNA vorgelegt. Nach Zugabe der Zellen und mischen durch Invertieren, erfolgte die Elektroporation nach den zuvor empirisch ausgetesteten Zell-spezifischen Bedingungen.

Zelllinie	Spannung [V]	Feldstärke [μ Farad]	Effizienz
Jurkat E6	240	1500	ca. 45 %
Large T (LT)	310	1200	ca. 80 %
721	290	1500	ca. 4 %
Hela	220	900	ca. 50%
COS7	249	900	ca. 40 %

Tab. 4: Elektroporationsbedingungen und Transfektionseffizienzen der verwendeten Zelllinien.

Zur Bestimmung der jeweiligen Effizienz wurden Expressionsvektoren für EGFP transfiziert und durchflußzytometrisch der Anteil der fluoreszierenden Zellen bestimmt.

Zur Expression wurden die Zellen in 6 cm Zellkulturschalen mit 5 ml RPMI / 10 % FCS überführt und ÜN bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert bevor die Zellen in weitere Experimente eingesetzt wurden.

4.2.4 Arbeiten mit rekombinanten Vaccinia-Viren

4.2.4.1 Infektion eukaryontischer Zellen mittels rekombinanter Vaccinia-Viren

Das Vaccinia-Virus, ein Mitglied der Poxvirus-Familie, ist ein „Vektorsystem“ für die transiente Expression von Genen in Säugerzellen (Panicali und Paoletti, 1982; Mackett *et al.*, 1982). Der Vorteil der Vaccinia-Infektion besteht im weiten Spektrum von Wirtszellen und einer annähernd 100%-igen Transfektionseffizienz. Die zu exprimierende cDNA wurde in den Plasmid-Vektor pTKg kloniert, der über homologe Rekombination in das Tymidinkinase-Gen des Vaccinia-Stammes WR inseriert.

4.2.4.2 Herstellung rekombinanter Viren

Von einer konfluenten 10 cm-Schale CV-1-Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 3 ml DMEM (ohne Zusätze) ersetzt. Die Zellen wurden dann mit 10^8 - 10^9 pfu des Vaccinia-Wildtyp-Virus pro ml Medium infiziert und 2 h bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch 5 ml DMEM/10% FCS ersetzt und das zu rekombinierende Plasmid auf folgende Weise vorbereitet und zugegeben:

Zu 500 µl CaCl₂ (250 mM) wurden 10 µg des jeweiligen pTKg-Derivats gegeben. Unter Schütteln wurde diese Mischung in 500 µl 2x HEBS-Lösung getropft und der Ansatz unter Schwenken auf die CV-1-Zellen verteilt. Nach 12 h Inkubation bei 37°C / 5 % CO₂ wurde das Medium durch frisches DMEM/10% FCS ersetzt und die Zellen weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Die so infizierten Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet und 5 min bei 900xg zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 300 µl 10 mM Tris/HCl (pH 9,5) aufgenommen, 15 min bei RT inkubiert und anschließend zur vollständigen Lyse bei -20°C tiefgefroren. Die so behandelten Zellen mußten anschließend auf rekombinante Vaccinia-Viren selektiert werden (4.2.4.3), da sie neben rekombinanten Vaccinia-Viren auch Wildtyp-Viren enthalten können.

2x HEBS-Lösung:	270 mM	NaCl
	12 mM	D ⁺ -Glucose
	100 mM	KCl
	1,4 mM	Na ₂ HPO ₄
	40 mM	HEPES
	pH 7,1	

Sterilisation durch Filtration (0,2 µm Spitzenfilter).

Lagerung bei -20°C.

4.2.4.3 Selektion rekombinanter Vaccinia-Viren

Zur Selektion rekombinanter Vaccinia-Viren wurde Mycophenolsäure (MPA) eingesetzt, welche die Guanylat-Synthese in der Zelle und somit die Virus-Replikation hemmt. Durch die Koexpression des *E.coli* gpt-Gens, das für die Guanin-Phosphoribosyltransferase (XGPRT) codiert, kann dieser Effekt bei der Anwesenheit von Xanthin und Hypoxanthin umgangen werden, da XGPRT diese beiden Substrate zur GMP-Synthese verwenden kann (Falkner und Moss, 1988). Der pTKg-Expressionsvektor trägt die DNA-Sequenz für das gpt-Gen.

Zur Selektion wurden konfluente CV-1-Zellen auf 6 cm Schalen ÜN mit 3 ml Selektionsmedium vorinkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgenommen und durch 1,5 ml DMEM (ohne Zusätze) ersetzt. Die Zellen wurden anschließend mit einer Verdünnungsreihe (je 1 µl, 3 µl und 10 µl) des primären Zellüberstand (4.2.4.2) infiziert und 1 h bei 37°C / 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde entfernt und durch 3 ml Selektionsmedium ersetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 36-48 h wurden durch rekombinanten Virus lysierte Zellbereiche als "Viren-Plaques" sichtbar. Die Viren-Plaques wurden unter sterilen Bedingungen von der Platte entfernt, in 200 µl 10 mM Tris/HCl (pH 9,5) überführt und für eine erneute Selektionsrunde eingesetzt.

Nach 2-3 Selektionsrunden lag der rekombinante Virus in der Regel in reiner Form vor und konnte auf Proteinexpression hin getestet werden.

<i>Selektionsmedium:</i>	190 ml	DMEM
	2,5 % (v/v)	FCS
	10 mg	MPA
	100 mg	Xanthin
	3 mg	Hypoxanthin

4.2.4.4 Identifikation rekombinanter Vaccinia-Viren

Die Reinheit der rekombinanten Viren kann rasch über eine Anfärbung der Viren-Plaques geprüft werden. Bei Expression des gewünschten Oberflächenproteins wird dieses durch Zugabe spezifischer Antikörper erkannt und mit Hilfe eines sekundären Enzym-konjugierten Antikörpers visualisiert. Intrazelluläre Proteine wurden mit Hilfe der Durchflußzytometrie (4.6.10.4) nachgewiesen.

CV-1-Zellen dicht bewachsener 6 cm-Schalen wurden mit dem zu testenden Vaccinia-Virus infiziert und in DMEM/10 % FCS Medium so lange bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert, bis gut sichtbare Viren-Plaques im Zellrasen entstanden waren. Das Medium wurde abgenommen und durch 1 ml 1xPBS ersetzt.

Zur Anfärbung des überexprimierten Proteins wurde der spezifische Antikörper in einer entsprechenden Verdünnung zugegeben und 1 h bei RT auf einem Kippschüttler inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 3 mal mit 1xPBS gewaschen und erneut mit 1 ml 1xPBS überschichtet. Nach Zugabe von 2 µg eines Alkalische-Phosphatase-gekoppelten sekundären

Antikörper, wurden die Zellen erneut 1 h bei RT auf einem Kippschüttler geschwenkt und anschließend 4x mit 1xPBS gewaschen. Die Detektion der überexprimierten Proteine erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml AP-Puffer, 8,25 µl BCIP (50 mg/ml) und 16,5 µl NBT (50 mg/ml).

Protein-exprimierende Zellen färbten sich dabei nach etwa 10-20 min violett.

<i>AP-Puffer:</i>	100 mM	Tris/HCl (pH9,5)
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂

4.2.4.5 Vermehrung rekombinanter Vaccinia-Viren

Eine konfluente, 10 cm CV-1-Zellkulturschale wurde mit 50 µl rekombinantem Vaccinia-Virus, in 2,5 ml DMEM (ohne Zusätze) infiziert und 1 h bei 37°C / 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 10 ml DMEM/10 % FCS ersetzt.

Nach 12-36 h konnte normalerweise eine gleichmäßige und praktisch vollständige Infektion aller Zellen beobachtet werden, die mit einer Auflösung des homogenen Zellverbandes einherging. Die Zellen wurden in diesem Stadium 1x mit 5 ml 1xPBS gewaschen und nach erneuter Zugabe von 5 ml 1xPBS mit einem sterilen Plastikzellschaber von der Zellkulturplatte abgelöst. Nach 5 min Zentrifugation bei 900xg wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment mit 500 µl 10 mM Tris/HCl (pH 9,5) versetzt. Die Zellen wurden 20 min bei RT inkubiert und im Ultraschallbad (Transsonic Digital – Typ T480/H-2, Firma ELMA) bei maximaler Beschallungsstärke für 30 sek. vereinzelt und anschließend bei –20°C gelagert.

4.2.4.6 Infektion humaner Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden 3×10^6 Suspensionszellen 3 min bei 900xg zentrifugiert und in 100 µl RPMI (ohne Zusätze) resuspendiert. Die Infektion mit 10 MOI (multiplicity of infection, entspricht 10 Viren pro Zelle) rekombinantem Virus, ca. 50 µl Virus-Stock, erfolgte für 1 h bei 37°C / 5 % CO₂. Dem Infektionsansatz wurden danach 5 ml RPMI/10 % FCS hinzugefügt und die Zellen in 6 cm Zellkulturschalen überführt. Nach einer Expressionsdauer von 6 h bis ÜN bei 37°C / 5 % CO₂ konnten die Zellen für weitere Analysen/Experimente eingesetzt werden.

4.3 Methoden im Hefesystem

4.3.1 Allgemeines Prinzip

Um neue Interaktionspartner einzelner Proteine aufzuspüren (Interaktionsklonierung) oder die Komplexformierung bereits bekannter Proteine genauer zu analysieren (Interaktionsanalyse), wird oftmals die als „Two-Hybrid-System“ (Fields *et al.*, 1989; Fields *et al.*, 1994) oder auch als „Interaction Trap“ (Gyuris *et al.*, 1993) bezeichnete Methode verwendet. Die Interaktionsstudien werden im Hefesystem durchgeführt, wobei die Interaktion zweier Proteine die transkriptionelle Aktivierung von Reportergenen vermittelt. Der zu untersuchende Interaktionspartner, auch als „bait“-Protein bezeichnet, wird dabei als Fusionsprotein mit einer spezifischen DNA-bindenden Domäne exprimiert. Der zweite „potentielle“ Interaktionspartner, auch als „prey“-Protein bezeichnet, wird mit einem Transaktivierungs-Fusionsanteil exprimiert, der die Transkription von Genen aktivieren kann.

Als DNA-bindender Fusionsanteil kommen im Prinzip zwei Domänen zum Einsatz: Zum Einen das heterologe DNA-Bindungsprotein *lexA* (aus *E.coli*), das keine transkriptionelle Aktivität besitzt und in $GAL4^+$ -Hefestämmen zusammen mit einem Gal-induzierbarem Promotor eingesetzt werden kann. Zum Anderen die $GAL4$ -DNA-Bindungsdomäne, die jedoch in $Gal4^-$ -Hefestämmen verwendet werden muß, die schwieriger zu transformieren sind als $GAL4^+$ -Stämme, da $GAL4$ einen wichtigen Transkriptionsaktivator in Hefe darstellt. Jedoch scheint die $GAL4$ -DNA-Bindungsdomäne effizienter im Zellkern lokalisiert zu sein.

Als transaktivierender Fusionsanteil stehen die entsprechenden Domänen von $GAL4$ oder Herpes-Simplex VP16 zur Verfügung. Diese Domänen gelten als starke bzw. sehr starke transkriptionelle Aktivatoren. Als mittelstarke Transaktivierungsdomäne gilt die aus *E.coli* selektierte B42-Domäne (Ruden *et al.*, 1991). Die transaktivierende Funktion wird bei allen Transaktivierungsdomänen durch eine Folge saurer Aminosäuren vermittelt.

Als Reportergene dienen in der Regel *lacZ* oder *LEU2*.

In allen, in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsanalysen kam ausschließlich das *lexA/B42*-System nach Gyuris *et al.* (1993) zum Einsatz (4.3.2).

Interaktionsanalysen in Hefe setzen unter anderem voraus, daß das verwendete „bait“-Protein auch in den Zellkern transloziert wird. Proteine mit einer transmembranen Domäne beispielsweise eignen sich nicht für Interaktionsstudien in Hefe.

Zudem muß sichergestellt sein, daß das „bait“-Protein keine intrinsische Fähigkeit besitzt, die Transkription der Reportergene stark zu aktivieren. Ferner muß man sich bewusst sein, daß im „Two-Hybrid-System“ normalerweise die Interaktion einzelner Proteindomänen untersucht wird, die wiederum als Fusionsproteine exprimiert werden. Auftretende Interaktionen zwischen zwei Proteinen können daher nur ein erster Hinweis sein und müssen in jedem Fall durch zusätzliche Analysen in anderen Systemen bestätigt werden.

4.3.2 Das "Two-Hybrid-System" nach Gyuris *et al.*

Das „Two-Hybrid-System“ nach Gyuris *et al.* (1993) verwendet als DNA-Bindungs-Domäne das bakterielle *lexA*-Protein, als Transaktivierungsdomäne B42 und sowohl *lacZ*, wie auch *LEU2* als Reportergene und selektierbare Marker.

Hefestamm und Reportergene

Für die gesamten Interaktionsstudien wurde ausschließlich ein Derivat des *S. cerevisiae*-Stammes EGY48 (Gyuris *et al.*, 1993) verwendet, der zusätzlich das *lacZ*-Reporterplasmid JK103 (Finley *et al.*, unveröffentlicht) enthielt. Der Hefestamm EGY48 trägt Mutationen in den Genen *trp1*, *ura3*, *his3* und *leu2*, wodurch er nicht in der Lage ist, die entsprechenden Aminosäuren Tryptophan, Uracil, Histidin und Leucin *de novo* zu synthetisieren. Das chromosomale *LEU2*-Gen wurde dabei durch homologe Rekombination derart verändert, daß seine Transkription durch vier *lexA*-Operatoren kontrolliert wird. Somit kann *LEU2* als Reportergen fungieren, da der Hefestamm nur dann auf Leucin-freiem Medium wachsen kann, wenn durch eine Interaktion der zu testenden Fusionsproteine die Transkription des *LEU2*-Gens aktiviert wird.

Ein weiteres Reportergen trägt das *lacZ*-Reporterplasmid JK103. Dieses Plasmid codiert für β -Galaktosidase, ebenfalls unter der Kontrolle eines *lexA*-Operators. Eine Interaktion zweier zu testender Fusionsproteine und die damit verbundene Transkription der β -Galaktosidase kann über eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Das chromogene Substrat X-Gal wird bei Anwesenheit von β -Galaktosidase und Sauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff umgesetzt.

Das *lacZ*-Reporterplasmid enthält zusätzlich ein *URA3*-Gen. Ein JK103-tragender EGY48-Stamm kann somit auf Uracil-defizientem Medium selektiert werden. Weiterhin codiert das Plasmid für ein Ampicillin-Resistenzgen und trägt Replikationsursprünge für *E.coli* und *S.cerevisiae*.

Expressionsplasmide

Für die Expression des „bait“-Proteins wurde der Vektor pEG202 (Gyuris *et al.*, 1993) verwendet. pEG202 ist ein Derivat von Lex202 + PL (Ruden *et al.*, 1991). Der Vektor enthält die Sequenz für die DNA-bindende Domäne des *lexA*-Proteins (Aminosäuren 1-202). Am C-terminalen Ende der *lex202*-Sequenz schließt sich eine multiple Klonierungsstelle an. In diese kann die codierende Sequenz eines der potentiellen Interaktionspartner inseriert werden. Da als Promotor der starke ADH-Promotor aus *S.cerevisiae* verwendet wird, erhält man eine konstitutive Expression des DNA-bindenden Fusionsproteins. Dieses wird trotz fehlender Kernlokalisationssequenz in ausreichendem Maße in den Zellkern transloziert. Als Transkriptions-Terminator fungiert ebenfalls die Sequenz aus dem *S.cerevisiae* ADH-Gen.

Das pEG202 LexA-Fusionsplasmid codiert zudem für ein *his3*-Gen. Auf diese Weise kann ein pEG202 tragender EGY48-Stamm auf Histidin-negativem Medium selektiert werden.

Für die Expression des „prey“-Proteins wurde der Vektor pJG4-5 (Gyuris *et al.*, 1993) eingesetzt. Unter der Kontrolle des GAL1-induzierbaren Promotors wird die transaktivierende Domäne B42 mit einer nukleären Lokalisationssequenz aus SV40 am N-terminalen Bereich und einem Hämagglutinin(HA)-Epitop am C-terminalen Ende fusioniert exprimiert. Über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI am C-Terminus des HA-Epitops kann der potentielle Interaktionspartner inseriert werden. Als Transkriptions-Terminator fungiert wiederum der ADH-Terminator. Als Selektionsmarker enthält das Plasmid das *trp1*-Gen.

4.3.3 Kultivierung des Hefe-Stammes EGY48/JK103

Ausgehend von einer Glycerinkultur, wurde unter sterilen Bedingungen, ein Teil der noch gefrorenen Zellsuspension abgenommen und sofort in 20 ml U-Minimalmedium überführt. Die Zellen wurden anschließend in einem Schüttelinkubator bei 30°C und 280 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600} = 1,0$ wurde die Hefekultur mit frischem U-Minimalmedium auf eine OD_{600} von 0,1 verdünnt. Frisch aufgetaute Hefezellen wurden auf diese Weise einige Tage kultiviert, bevor sie in Interaktionsanalysen eingesetzt wurden.

<i>U-Minimalmedium:</i>	1,3 g	Dropout-Mix
	1,7 g	Yeast nitrogen base
	5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
	ad. 900 ml	H ₂ O _{bidest.}
	Sterilisation durch Autoklavieren (20 min in einem Tischautoklaven)	
	100 ml 20% (w/v)	Glukose (separat autoklaviert)
	8,3 ml 120x (w/v)	L-Histidin-Stocklösung
	8,3 ml 120x (w/v)	L-Tryptophan-Stocklösung
	16,6 ml 120x (w/v)	L-Leucin-Stocklösung

Dropout-Mix:

Aminosäure	Menge in 67 g Dropout-Mix [g]	Endkonzentration im Medium [µg/ml]
Adenin	2,5	40
L-Arginin	1,2	20
L-Aspartat	6,0	100
L-Glutamat	6,0	100
L-Lysin	1,8	30
L-Methionin	1,2	20
L-Phenylalanin	3,0	50
L-Serin	22,5	375
L-Threonin	12,0	200
L-Thyrosin	1,8	30
L-Valin	9,0	150

Stammlösungen der Selektions-Aminosäuren:

Aminosäure	Konzentration der 120x Stammlösung [mg/100 ml]	Endkonzentration im Medium [µg/ml]
L-Histidin	240	20
L-Tryptophan	480	40
L-Leucin	720	120

Die Stammlösungen wurden durch Filtration (0,2 µm Porendurchmesser) sterilisiert.

4.3.4 *S. cerevisiae* - Glycerinkultur

Zur längerfristigen Lagerung von Hefestämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 10 ml einer Flüssigkultur in logarithmischer Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5-0,8$) bei 900xg abzentrifugiert und das Zellsediment in 1,5 ml 50 % (v/v) Glycerin/TE resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

4.3.5 Transformation von EGY48/JK103

Die Transformation des *S. cerevisiae*-Stammes EGY48/JK103 für Interaktionsanalysen erfolgte nach einer Methode von Ito *et al.* (1983) und Schiestl und Gietz (1989). Die Kompetenz der Hefezellen zur Aufnahme von DNA wird dabei durch eine Behandlung mit Alkali-Ionen, PEG und hochmolekularer ssDNA induziert.

Für Interaktionsanalysen wurden stets beide Plasmide („bait“- und „prey“-Vektor) gleichzeitig transformiert.

Eine Glycerinkultur des zu transformierenden Stammes wurde in 20 ml flüssigem U-Minimalmedium 2 – 3 Tage kultiviert (4.3.3). Am Morgen der Transformation wurde die Hefekultur je nach Anzahl der Transformationen in einem entsprechenden Volumen derart verdünnt, daß die Kultur eine OD_{600} von 0,1 aufwies. Pro Ansatz wurden dabei in der Regel 20 ml Flüssigkultur eingesetzt. Anschließend inkubierte man die Kultur nochmals 5 – 6 Stunden bei 30°C und 280 rpm in einem Schüttelinkubator, bis eine OD_{600} von etwa 0,5 erreicht war. Die Hefezellen wurden 5 min bei 900xg in einem Plastikröhrchen sedimentiert und 2x mit bidest. Wasser gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1/200 Vol. der Ausgangskultur in 1x TE-Puffer/0,1 M LiOAc (Die Lösung wurde bei jeder Transformation frisch aus einer 10x Stocklösung angesetzt.) resuspendiert und jeweils 100 µl dieser Suspension zu einer Mischung aus je 1 µg „bait“- und „prey“-Plasmid-DNA und 50 µg einer hochmolekularen „Carrier“-DNA gegeben. Nach einer weiteren Zugabe von 350 µl 40% (w/v) PEG 4000/1x TE-Puffer wurde die Suspension vorsichtig durchmischt und 30 min bei 30°C auf einem Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einem anschließenden

10 minütigen Hitzeschock bei 42°C auf dem Thermomixer wurden die Zellen sofort auf UHW-Minimalmedium-Agarplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Normalerweise waren Hefekolonien nach ca. 2 - 3 Tagen Inkubation auf der Platte zu erkennen.

„Carrier“-DNA:

Hochmolekulare ssDNA aus Lachssperma (Sigma D1626) wurde nach einer Methode von Schiestl und Gietz (1989) hergestellt. Hierzu wurde die DNA in einer Konzentration von 10 mg/ml in 1x TE-Puffer über Nacht bei 4°C unter Rühren gelöst. 10 ml Aliquots der Lösung wurden bei mittlerer Intensität für eine Zeitdauer von 0 - 10 Sekunden mit einem Ultraschallstab (Sonifier GM300) sonifiziert, die Lösung anschließend mit 1 Vol. Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit 1/10 Vol. 3 M NaOAc und 2,5 Vol. abs. EtOH ausgefällt. Die getrocknete DNA wurde in 1x TE-Puffer in einer Konzentration von ca. 10 mg/ml resuspendiert und zur Denaturierung 20 min in einem Wasserbad aufgeköcht und sofort auf Eis abgeschreckt. DNA-Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

Die besten „Carrier“-Eigenschaften bietet sonifizierte DNA mit Fragmentlängen um ca. 7 kB. Die Fragmentlängen der einzelnen DNA-Proben wurden mit Hilfe eines 0,8% Agarosegels abgeschätzt, dabei zeigten DNA-Proben die zwischen 5 und 10 Sekunden sonifiziert worden waren, das beste Ergebnis. Diese Proben wurden als „Carrier-DNA“ eingesetzt.

UHW-Minimalmedium für Agarplatten:

1,3 g	Dropout-Mix
1,7 g	Yeast nitrogen base
5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
20 g	Agar
1 Pellet	NaOH (ca. 0,2 g)
ad 900 ml	mit H ₂ O _{bidest.}

Sterilisation durch Autoklavieren (20 min in einem Tischautoklaven)

Nach Abkühlen <55°C wurde weiterhin zugegeben:

100 ml	20% (w/v) Glukose separat autoklaviert.
16,6 ml	120x (w/v) L-Leucin-Stocklösung

4.3.6 Interaktionsanalyse zweier Proteine in *S.cerevisiae*

Die Interaktion zweier Proteine wurde über das lacZ-Reportergen (4.3.2) unter Induktion durch Galaktose getestet. Dazu wurden die erhaltenen Hefe-Transformanten einzeln von der Agarplatte abgeschabt und auf einer X-Gal/Galaktose-UHW-Minimalagarplatte ausgestrichen. Je nach Stärke der Interaktion trat nach 1-3 Tagen eine Blaufärbung der Hefekolonien auf.

X-Gal/Galaktose-UHW-Minimalagarplatte:

0,8 g	Dropout-Mix
1,7 g	Yeast nitrogen base
5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
20 g	Agar
1 Pellet	NaOH
ad 800 ml	mit H ₂ O _{bidest.}

Sterilisation durch autoklavieren (20 min in einem Tischaufklaven)

Nach Abkühlen <55°C wurde weiterhin zugegeben:

100 ml	20% (w/v) Galaktose separat autoklaviert.
100 ml	0,7 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,0 sterilfiltriert (0,2 µm Spritzenfilter).
2 ml	20 mg/ml (w/v) X-Gal in 100% N,N-Dimethylformamid

4.3.7 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität in Hefe-Flüssigkulturen

Die Ermittlung der β-Galaktosidase-Aktivität in Flüssigkultur wurde angewendet, um die Intensität von Protein-Protein-Interaktionen in Hefe quantitativ bestimmen zu können. Die Interaktion zweier zu testender Fusionsproteine in Hefe führt zur Transkription des lacZ-Reportergens und damit zur Produktion von β-Galaktosidase, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Galaktose. Werden die β-Galaktosidase produzierenden Hefezellen permeabilisiert oder aufgebrochen und das chromogene Substrat o-Nitrophenyl-β-D-Galaktosid (ONPG) im Überschuss zugegeben, so spaltet β-Galaktosidase ONPG in Galaktose und o-Nitrophenol. O-Nitrophenol ist eine gelbe Substanz mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm. Da ONPG im Überschuss zugegeben wird, ist die Menge an o-Nitrophenol proportional zur Menge des anwesenden Enzyms β-Galaktosidase und kann photometrisch vermessen werden.

Die mit den zu testenden Fusionskonstrukten, frisch transformierten Hefe-Einzelkolonien, wurden 1-2 Tage im entsprechenden Selektions-Flüssigmedium (enthält Glukose) kultiviert und

anschließend in Selektions-Flüssigmedium (enthält Galaktose) verdünnt. Die Zellen wurden bei 30°C kultiviert, bis sie eine OD_{600} von 0,5 bis 1,0 (Zellen befinden sich in der mittleren bis späten logarithmischen Phase) erreicht hatten.

Die Zellen wurden 5 min bei 600xg in einer Tischzentrifuge sedimentiert, in 1 ml Ausgangsvolumen Z-Puffer resuspendiert und auf Eis aufbewahrt. Für jeden Ansatz wurde die OD_{600} neu bestimmt. Für genaue Messungen sollte sie nicht über 0,7 liegen. In solchen Fällen wurde der Ansatz mit einem geeigneten Volumen Z-Puffer verdünnt.

Pro Ansatz wurde die Menge an β -Galaktosidase für zwei verschiedene Zell-Konzentrationen bestimmt, wobei das Ausgangsvolumen jeweils 1 ml betrug. Für eine Messung wurde die Zellsuspension unverdünnt, für eine zweite Messung 1:10 in Z-Puffer verdünnt eingesetzt.

Zur Permeabilisierung der Zellen wurde jeder Ansatz mit 1 Tropfen 0,1% SDS und 2 Tropfen $CHCl_3$ versetzt, 15 Sekunden lang gut durchmischt und 15 min in einem 30°C Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml einer 4 mg/ml (w/v) ONPG-Lösung zugegeben, kurz durchmischt und wiederum in einem 30°C Wasserbad inkubiert. Ab der erneuten Inkubation im Wasserbad wurde mit der Zeitnahme begonnen. Die Zeit wurde gestoppt, wenn eine mittlere Gelbfärbung der Probe auftrat und die Reaktion sofort mit 0,5 ml 1 M Na_2CO_3 gestoppt worden war.

Zelltrümmer wurden 5 min bei 600xg in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und die OD_{420} und OD_{550} des Überstandes gemessen. Eine Absorption bei OD_{550} deutete auf noch vorhandene Zelltrümmer hin.

Die Berechnung der Einheiten (U) an β -Galaktosidase erfolgte nach folgender Formel:

$$U = \frac{1000 \times [(OD_{420}) - (1,75 \times OD_{550})]}{(t) \times (v) \times (OD_{600})}$$

- t** = Reaktionszeit (min)
v = Volumen der eingesetzten Hefekultur (ml)
OD₆₀₀ = Zelldichte zu Beginn der Reaktion
OD₄₂₀ = Absorption durch o-Nitrophenol und Lichtstreuung durch noch vorhandene Zelltrümmer
OD₅₅₀ = Lichtstreuung durch Zelltrümmer

Z-Puffer:	16,1 g	$Na_2HPO_4 \times 7 H_2O$
	5,5 g	$NaH_2PO_4 \times H_2O$
	0,75 g	KCl
	0,246 g	$MgSO_4 \times 7 H_2O$
	2,7 ml	β -Mercaptoethanol
	ad 1 l	$H_2O_{bidest.}$
	(pH 7,0)	

4.4 Methoden im *C.elegans* System

4.4.1 Kultivierung von *C.elegans*

4.4.1.1 Anzucht von *C.elegans*

C.elegans wurde auf NGM-Platten mit einem Rasen aus *E.coli* OP50, wie von *Brenner*, 1974 beschrieben, gehalten. Die Platten wurden in luftdurchlässigen Kartonschachteln gelagert und die Tiere je nach Anforderung bei 15, 20 oder 25°C aufgezogen.

<i>NGM-Platten:</i>	3 g/l (w/v)	NaCl
	2,5 g/l (w/v)	Bacto-Pepton
	17 g/l (w/v)	Agar
	970 ml	H ₂ O _{bidest.}

Nach dem Autoklavieren wurde weiterhin zugegeben:

1 ml	0,1 M CaCl ₂
1 ml	0,1 M MgSO ₄
25 ml	1 M KH ₂ PO ₄ (pH 6,0 bei 25°C)
2,5 ml	Nystatin-Lösung
1 ml	Cholesterol (5 mg/ml in EtOH)
1 ml	Streptomycinlösung (200 mg/ml in H ₂ O)

<i>Nystatin-Lösung:</i>	4 g	Nystatin
	200 ml	EtOH
	200 ml	7,5 M Ammoniumacetat

Lösung sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße).
Lagerung bei -80°C.

4.4.1.2 Reinigung / Synchronisation

Mit den Nematoden wurde möglichst unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Unter Umständen können jedoch trotz Streptomycin und Nystatin auf den Kulturplatten Kontaminationen auftreten. Durch einfaches Umsetzen der Nematoden konnte die Kontamination oft nicht beseitigt werden, da an den Tieren haftende Bakterien mitgeschleppt werden können.

Zur Reinigung wurde ein Tropfen Hypochloridlösung an den Rand einer Platte gegeben und ca. 10 adulte Tiere in diesen Tropfen transferiert und anschließend auf eine frische NGM-Platte überführt. Nur die Eier sind gegen diese Behandlung ca. 15 min resistent. Diese Methode kann auch zur Synchronisation des Wachstums verwendet werden.

<i>Hypochloridlösung:</i>	200 mM	NaClO
	100 mM	NaOH
		in H ₂ O _{bidest.}

4.4.1.3 Anlegen von Dauerkulturen

C.elegans Tiere lassen sich für unbegrenzte Zeit bei -80°C bzw. in flüssigem Stickstoff lagern und bei Bedarf regenerieren. Von einer Ø 10 cm Kulturschale wurden die Tiere ein Tag nachdem das Futter (Bakterien) verbraucht war mit 5 ml M9 Puffer abgewaschen und in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen kurz bis 1000xg anzentrifugiert, um die Tiere zu sedimentieren. Die Nematoden wurden 1x mit 10 ml M9 Puffer gewaschen, der Überstand bis auf 1,5 ml abgenommen und mit 1,5 ml 2xEinfrierlösung versetzt. Nach dem Mischen wurden Portionen zu je 1 ml in Kryogefäße gefüllt und in einer Styroporschachtel bei -80°C eingefroren. Die Gefäße sollten idealer Weise um 1°C/min abkühlen.

<i>2x Einfrierlösung:</i>	20 ml	1M NaCl
	10 ml	NaH ₂ PO ₄ (pH 6,0 bei 25°C)
	60 ml	Glycerin
	ad 200 ml	H ₂ O _{bidest.}

Nach dem Autoklavieren wurden weiterhin zugegeben:

0,6 ml	0,1 M MgSO ₄
--------	-------------------------

Zum Regenerieren der Tiere wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend auf frische NGM-Kulturplatten verteilt.

4.4.2 Genetische Methoden im *C.elegans* System

4.4.2.1 Genetische Kreuzungen

Um homozygote Merkmale aus heterozygoten Tieren zu generieren mußten die Merkmale ausgekreuzt werden.

Kreuzungen zwischen Hermaphroditen und Männchen wurden auf Ø 3,5 cm Platten angesetzt. L4 Hermaphroditen und Männchen wurden im Verhältnis 1:3 (5+15 Tiere) verwendet. Nachkommen aus der Kreuzung und durch Selbstbefruchtung entstandene Nachkommen waren in der F1 Generation anhand genetischer Marker unterscheidbar. Mindestens drei F1 Tiere wurden vereinzelt und deren Nachkommen analysiert. Von den F2 Tieren wurden wiederum bei einem zu beobachtendem rezessiven Merkmal 20 Tiere vereinzelt. Sollte ein zweites Merkmal beobachtet werden, mußte außerdem die F3 Generation analysiert werden.

4.4.2.2 Transformation von extrachromosomaler DNA in *C.elegans*

Die Transformation von *C.elegans* mit extrachromosomaler DNA erfolgte mittels Mikroinjektion in L4 Tiere (Fire, 1986; Kimble *et al.*, 1982; Mello *et al.*, 1991).

Die zu transformierende DNA (10-20 ng) und der dominante Transformationsmarker (pRF4 oder rol-6, ca. 160 ng) wurden mittels Filtration durch 0,2 µm Nanosept-Filter gereinigt, um ein Verstopfen der Injektionskanüle zu verhindern. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen 2%-iger Agarose (in H₂O) aufgetropft und flachgedrückt. Diese beschichteten Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die getrocknete Agarose dehydratisiert die Nematode zum Teil und fixiert diese auf dem Untergrund. Zur Injektion wurde auf einen beschichteten Objektträger ein Tropfen Mineralöl gegeben. In diesen Tropfen wurden die zu transformierenden Tiere überführt.

Die Mikroinjektion der DNA erfolgte jeweils in die beiden Gonadenstränge der Tiere. Nach der Mikroinjektion wurden die Tiere in einem Tropfen M9-Puffer vom Objektträger auf Kulturplatten transferiert. In der F1 Generation wurden Tiere isoliert, die den Transformationsmarker exprimierten. Exprimierten auch deren Nachkommen den Transformationsmarker, wurde die transformierte DNA als extrachromosomales Element weitervererbt.

4.4.2.3 Integration extrachromosomaler DNA

Zur Integration von extrachromosomaler DNA wurden die Tiere mit einer Röntgenquelle bestrahlt. Durch starke Bestrahlungsenergie wird die chromosomale DNA, wie auch die Plasmid-DNA an verschiedenen Stellen aufgebrochen und durch zelluläre Reparaturmechanismen die Bruchstücke wieder ligiert.

Eine Ø 10 cm Kulturplatte mit *C.elegans* Tieren wurde mit offenem Deckel in den „Crosslinker“ gestellt und die Nematoden mit einer Bestrahlungsenergie von 350x100mJ/cm² bestrahlt. Diese Strahlendosis wurde empirisch ermittelt. Bei geringeren Strahlendosen ist die Integration geringer, bei zu hohen Strahlendosen erhöht sich die Letalität der Tiere deutlich.

30-60 min nach der Bestrahlung wurden 20 Kulturplatten (Ø 6 cm) mit jeweils 5 P0-Tieren (L4-Larvenstadium) pro Platte angesetzt. Die Tiere wurden bei 20°C so lange inkubiert bis die Bakterien verbraucht waren. Auf diese Weise wurde eine Synchronisation der F2 Generation erreicht. Von jeder dieser Platten wurden 20-30 Tiere auf Ø 3,5 cm Kulturplatten vereinzelt. Die Tiere wurden weiter bei 20°C inkubiert und in der folgenden F3 Generation die Tiere isoliert, die den Transformationsmarker (rol-6, GFP) exprimierten. Exprimierten alle Nachkommen den Transformationsmarker, trug der F2 Kandidat das zu integrierende Element homozygot. Exprimierten ~75% der Nachkommen den Marker liegt, das zu integrierende Element im F2 Tier heterozygot vor.

4.4.3 Methoden auf Proteinebene

4.4.3.1 Aufschliessen von adulten *C.elegans* Tieren und deren Eier

Diese Methode wurde im Zuge der hier vorliegenden Doktorarbeit von Dr. Wolfgang Nagel und Thomas Böhm entwickelt, um aus Gesamtwurmlysaten (auch Eier) Proteine immunpräzipitieren zu können.

C.elegans Tiere können aufgrund ihrer Kutikula relativ leicht durch Sonifikation oder Reagenzien (z.B. SDS) aufgeschlossen werden. Die Eier von *C.elegans* sind jedoch sehr gut gegen Umwelteinflüsse geschützt und gegen viele Reagenzien inert. Die Eischale ist aus 3 Schichten aufgebaut: Einer inneren Dotterhaut, welche gegen fast alle Lösung inpermeabel ist, einer mittleren chitinhaltigen Schicht und einer äußeren Schicht bestehend aus Lipiden und vermutlich über Collagen vernetzte Proteinen. Der Aufschluss der Eier war deshalb besonders schwierig und stellte eine besondere Herausforderung dar.

Zu einer Ø 10 cm Kulturschale mit nicht ausgehungerten *C.elegans* Tieren wurde 5 ml 1xPBS gegeben und 15 min auf einer Wippe inkubiert, um die Tiere sowie die Eier vom Agar zu lösen. Der Überstand wurde anschließend mit einer Glas-Pasteurpipette in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt und die Kulturplatte ein weiteres mal mit 5 ml 1xPBS gewaschen. Die Suspension wurde kurz bis 1000xg anzentrifugiert um die Tiere zu sedimentieren. Nach 2 weiteren Waschrissen mit jeweils 5 ml 1xPBS wurde die Wurmsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und weitere 3x mit kaltem WLB⁺-Puffer gewaschen und schließlich in 0,5 ml WLB⁺-Puffer aufgenommen. Zwischen den Waschrissen wurde bis 5200xg anzentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen.

Zum Aufbrechen der Tiere wurde 3x schockgefroren und bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Anschließend wurde 3x 30 sek. auf Eis sonifiziert (Sonifier GM300, Bandelin: Puls 50%, Intensität max. 20%). Zum Aufschluss der Eier wurde der Suspension 0,1 – 0,2 g Glasperlen (Sigma G-8772) zugegeben und 30 min, bei 4°C auf einer Schwingmühle bei voller Leistung geschüttelt. Um die Glasperlen sowie Zelltrümmer zu sedimentieren, wurde kurz bis 5200xg anzentrifugiert und eine Sonifikation wie oben beschrieben wiederholt. Um unlösliche Bestandteile abzutrennen, wurde abschließend 10 min bei 28800xg zentrifugiert und der Überstand in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Abschätzen der Proteinmenge wurden verschiedene Mengen des Lysats auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (4.6.1) und über eine Coomassie-Färbung (4.6.2) analysiert.

WLB ⁺ -Puffer:	50 mM	KCl
	10 mM	Tris/HCl (pH 8,2 bei 25°C)
	2,5 mM	MgCl ₂
	0,45 % (v/v)	NP-40
	0,45% (v/v)	Tween-20
	0,01% (w/v)	Gelatine
	ad 100 ml	H ₂ O _{bidest.}

Kurz vor Gebrauch der Lösung wurden noch folgende Proteaseinhibitoren zugegeben:

1 µl/ml	einer gesättigten PMSF-Lösung
1 µg/ml	Aprotein-A (Stock: 20 mg/ml)
1 µg/ml	Leupeptin (Stock: 20 mg/ml)

4.4.3.2 Fixierung und Antikörperfärbung von *C.elegans*

C.elegans Tiere sind von einer relativ stabilen Kutikula umgeben, die eine Permeabilisierung für eine Antikörperaufnahme etwas erschweren. Zur Perforierung der Kutikula kamen Collagenasen zum Einsatz, Disulfidbrücken die eine Quervernetzung in der Kutikula ausbilden wurden in dieser Arbeit mit β -Mercaptoethanol und DTT reduziert. Einfrieren der Proben unterstützt ebenfalls das Eindringen der Fixative. Zur Fixierung der Proben wurde eine Mischung aus Formaldehyd und Spermidin verwendet.

Fixierung

Eine \varnothing 10 cm Kulturschale mit nicht ausgehungerten Tieren wurde mit 6 ml 1xPBS versetzt und zum Ablösen der Eier vom Agar 15 min auf eine Wippe inkubiert. Diese Suspension wurde mit einer Glaspipette in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 3x mit 5 ml 1xPBS gewaschen. Zwischen den Waschschrritten wurde jeweils kurz bis 1500xg anzentrifugiert, um die Nematoden zu sedimentieren. Nach einem weiteren Waschschrtritt mit 5 ml H₂O_{bidest.} wurde der Überstand bis auf 500 µl abgenommen und 500 µl 2xMRWB-Puffer zugegeben. Zur Fixierung der Proben wurde Formaldehyd in einer Konzentration von 1-10% des Endvolumens zugegeben. Die Menge ist unter anderem vom verwendeten Antikörper abhängig und sollte empirisch ermittelt werden. Ein guter Ausgangswert liegt bei 4%. Die Lösungen wurden vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder bei RT aufgetaut. Der Vorgang wurde wiederholt und die Suspension 20 min bis 1 h auf Eis inkubiert, anschließend kurz bis 5200xg anzentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Reduktion

Nach 2x Waschen mit Tris-Triton-Puffer wurde 1 ml Tris-Triton-Puffer/1% β -Mercaptoethanol zugegeben, 10 min - 1 h (vom Antigen abhängig) bei 37°C unter mehrmaligen Umschwenken inkubiert und anschließend 1x mit 1xBoratpuffer gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Boratpuffer/10 mM DTT wurde ca. 15 min bei RT auf einem Überkopfschüttler inkubiert.

Oxidation

Die Suspension wurde mit 10-15-fachem Volumen an 1xBorat-Puffer gewaschen und anschließend 15 min bei RT mit 1xBorat-Puffer/0,3% H₂O₂ inkubiert. Hierbei ist aufgrund der Sauerstoffentwicklung die Verwendung von Schraubgefäßen angebracht. Nach 2x Waschen mit 1xBorat-Puffer wurde die Probe 15 min mit AK-B-Puffer äquilibriert.

H₂O₂ oxidiert die Sulfhydrylgruppen zu SO₃. Auf diese Weise wird eine Rückreaktion durch Oxidation mit Luftsauerstoff zur Disulfidbrücke verhindert.

Antikörperfärbung

Alle Antikörperfärbungen wurden in AK-A-Puffer durchgeführt, Waschschriffe in AK-B-Puffer.

Die Proben wurden kurz bis 5200xg anzentrifugiert, der Überstand abgenommen und in 0,5 ml AK-B-Puffer aufgenommen. Die Antikörper wurden in AK-A-Puffer verdünnt. Die Wurm suspension wurde kurz aufgeschlämmt, 50 µl in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl primären Antikörperlösung für 2 h auf dem Überkopfschüttler bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriffe wurde mit einem sekundären Antikörper bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Die verwendeten sekundären Antikörper waren in der Regel mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC, Texas Red oder TRITC markiert. Diese Farbstoffe können zur Fluoreszenz angeregt und im UV- oder Lasermikroskop sichtbar gemacht werden. Die Tiere wurden abschließend nochmals gewaschen und auf einem Objektträger in "mounting"-Medium (Vector Laboratories) eingebettet.

<i>2x MRWB-Puffer:</i>	160 mM	KCl
	40 mM	NaCl
	14 mM	Na ₂ EDTA
	1 mM	Spermidin-HCl
	0,4 mM	Spermin
	30 mM	Na-PIPES (pH 7,4 bei 25°C)
	0,2 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	50 % (v/v)	Methanol

<i>Tris-Triton-Puffer:</i>	100 mM	Tris/HCl (pH 7,4 bei 25°C)
	1 % (v/v)	Triton-X-100 oder NP-40
	1 mM	EDTA

<i>10x Borat-Puffer:</i>	1 M	H ₃ BO ₃
	0,5 M	NaOH
	0,1% (v/v)	Triton-X-100
	pH 9,5 (bei 25°C)	

<i>AK-A-Puffer:</i>	1 % (w/v)	BSA
	0,1 % (v/v)	Triton-X-100 oder NP-40
	0,2 % (w/v)	Natriumazid
	1 mM	EDTA
	in 1xPBS	

Lagerung bei 4°C.

<i>AK-B-Puffer:</i>	0,1 % (w/v)	BSA
	0,1 % (v/v)	Triton-X-100 oder NP-40
	0,2 % (w/v)	Natriumazid
	1 mM	EDTA
	in 1xPBS	

Lagerung bei 4°C.

4.4.4 „Gen-Knockout“ in *C.elegans*

Der „Gen-Knockout“ in *C.elegans* wurde in Anlehnung an das von Leon Avery (1997) beschriebenen Verfahren durchgeführt. *C.elegans* Tiere wurden mit einem chemischen Reagenz behandelt, wodurch zufällig DNA-Bruchstücke aus dem Genom entfernt werden. Hierbei hat sich EMS (Methansulfonicethylester) bewährt (Sulston & Hodgkin, 1988), da es neben mit dieser Methode nicht zu detektierbaren Punktmutationen, viele DNA-Fragmente zwischen 100–3000 bp eliminiert. Mit Hilfe der PCR-Methode (siehe auch 4.5.1) wird nach Mutationen gesucht, die im gewünschten Genbereich liegen, die Wildtypbande erscheint dann im DNA-Agarosegel (4.5.9.1) verkürzt. Da die Wahrscheinlichkeit einer solchen Mutation sehr gering ist müssen mehrere Millionen Tiere mutagenisiert werden.

4.4.4.1 Durchführung des „Gen-Knockout“ in *C.elegans*

Anzucht der Tiere

1-3 NGM-Platten (Ø 10 cm) wurden mit 10 Wildtyp (N2) L4 Hermaphroditen inokuliert und nach 4-5 Tagen zur Synchronisation des Wachstums die Eier präpariert („Egg“-Präparation, siehe 4.4.4.2). Die Anzahl gesunder L1-Larven wurde in einem 10 µl Aliquot gezählt und auf dieser Basis jeweils 5000 Tiere auf 10 frische Ø 10 cm NGM-Platten umgesetzt.

Mutagenese

Wenn die L1-Larven nach ca. 2 Tagen das L4-Stadium erreicht haben, wurde die EMS-Mutagenese (4.4.4.3) beschrieben durchgeführt.

Anschließend lässt man die mutagenisierten L4-Larven zu adulten Tiere mit vielen Eier heranwachsen und synchronisiert das Wachstum der Tiere erneut wie unter 4.4.4.2 beschrieben.

Die Anzahl lebender L1-Larven wurde in einem 10 µl Aliquot bestimmt und auf dieser Basis jeweils 1250 Tiere auf 110 frische Ø 6 cm NGM-Platten umgesetzt. Nach 3 Tagen bei 20°C sollten die meisten Tiere das adulte Stadium erreicht haben. Nach 2 weiteren Tagen unter gleichen Bedingungen sind die Bakterien auf den Kulturplatten verbraucht und die meisten Tiere auf den Platten sollten sich im L1-Larvenstadium befinden.

Archivierung

Die Tiere von 96 Platten (restlichen Platten wurden verworfen, kontaminierte Platten können so ausgetauscht werden) wurden in jeweils 5 ml M9-Medium aufgenommen und ein 10 µl Aliquot von einigen Platten gezählt. Es sollten zwischen 100.000 und 200.000 Tiere pro Platte vorhanden sein. Man lässt die Tiere absetzen und nimmt den Überstand bis auf 1,5 ml ab. 2 Aliquots zu je 0,5 ml wurden für spätere Analysen mit 0,5 ml 2xEinfrierlösung versetzt und in 1,8 ml Kryogefäße wie unter 4.4.1.3 beschrieben eingefroren. Von dem dritten Aliquot wurde wie unter 4.4.4.4 erklärt die DNA zur Analyse isoliert.

Analyse

In die anschließenden PCR-Reaktionen (siehe auch 4.5.1) wurde die präparierte DNA 1:5 verdünnt und 2 µl in einen 25 µl Ansatz eingesetzt. Ein Standardansatz für die durchgeführten Reaktionen war wie folgt zusammengesetzt:

2 µl	DNA
2,5 µl	10x Reaktionspuffer
2 mM	MgCl ₂
10 µM	Vorwärts-Primer
10 µM	Rückwärts-Primer
0,8 mM	dNTP-Mix
0,5 µl	Taq-Polymerase (0,5 U)
ad 25 µl	H ₂ O _{bidest.}

Für die Reaktionen wurden in der Regel folgende Bedingungen gewählt (Tab. 5). Die Ansätze wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen angesetzt und der Thermocycler PJ Research PTC-200 verwendet:

Reaktionsschritt	Temp. in °C	Zeiten in sek.	Bemerkung	Zyklen
Denaturierung	92	90	Trennung der Matrizenstränge	1
Denaturierung	92	30	Trennung der Matrizenstränge	35 ↓
Hybridisierung	55	40	Primer hybridisieren an ssDNA	
Elongation	72	360	Polymerase vervielfältigt Stränge	
Elongation	72	3000	Polymerase vervielfältigt Stränge	1

Tab. 5: Reaktionsbedingungen für die durchgeführten PCR-Reaktionen.

Die primäre längere Denaturierung ist für eine vollständige Trennung von besonders langen Matrizensträngen, wie bei der hier vorliegenden genomischen DNA von Vorteil. Die Hybridisierung der Primer ist effizienter, es werden mehr Kopien des gewünschten Konstruktes vervielfältigt. Dies ist besonders wichtig, da eine mögliche Mutation nur in sehr geringer Kopienzahl im Gegensatz zum Wildtypgen vorliegen wird.

Verwendet wurden bei der Analyse zwei ineinandergeschachtelte Oligodesoxyribonukleotidpaare (Abb. 7), die das zu untersuchende Gen abstecken („Nested-PCR“). Auf diese Weise lässt sich die Spezifität der Reaktion wesentlich erhöhen.

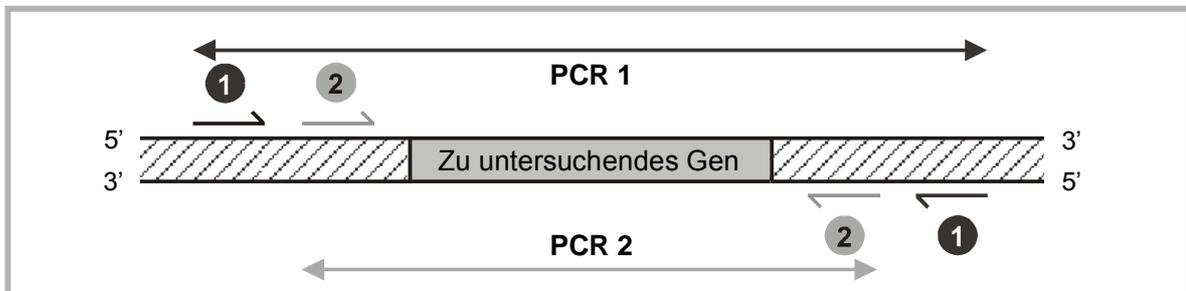


Abb. 7: Schematische Darstellung einer „Nested-PCR“.

Die 1. PCR-Reaktion wird mit Oligodesoxyribonukleotiden durchgeführt die ca. 3,5-4,0 kbp voneinander entfernt liegen und das zu untersuchende Gen abstecken. Die Oligodesoxyribonukleotide der 2. PCR-Reaktion liegen innerhalb des ersten Paares und haben einen Abstand von 3,2-3,5 kbp.

Die 1. PCR-Reaktion wurde mit den beiden äußeren Oligodesoxyribonukleotiden durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde 2 µl abgenommen und in eine 2. Reaktion mit den inneren Oligodesoxyribonukleotiden durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte über ein Agarosegel (4.5.9.1). Traten neben der Wildtypbande eine weitere kürzere Bande auf so wurde diese Probe weiter analysiert. PCR-Reaktionen wurden mit dieser Probe mehrfach wiederholt, um eine Unspezifität auszuschließen.

Zur weiteren Analyse wurde die entsprechende eingefrorene Probe (siehe Archivierung) aufgetaut und die Tiere auf mind. 100 Platten (Ø 6 cm) aufgeteilt, kultiviert und der oben beschriebene Vorgang wiederholt (ohne EMS-Mutagenese). Diese Strategie wurde so lange verfolgt bis einzelne mutagene Tiere vorliegen. Diese wurden anschließend mit Wildtyptieren N2 gekreuzt (4.4.2.1), um weitere nicht gewünschte Mutationen in anderen Genbereichen des Genoms zu eliminieren. Abschließend wurden heterozygote Hermaphroditen mit heterozygote Männchen gekreuzt, um homozygote Nematoden zu erhalten. Diese können dann phänotypisiert und weiter analysiert werden.

4.4.4.2 "Egg"-Präparation

Zur Synchronisation des Wachstums von *C.elegans* Tieren wurden diese mit Natriumhypochlorid behandelt. Adulte, wie auch Tiere in den verschiedenen Larvenstadien (L1-L4) werden bei dieser Behandlung abgetötet, wobei die Eier aufgrund ihrer stabileren Eischale für ca. 15 min gegen diese Behandlung resistent sind.

Die Nematoden wurden 2x mit 4ml 1xPBS (oder M9-Puffer) von den NGM-Platten gewaschen und in einem 15 ml Plastikröhrchen vereinigt. Hierbei wurden die fest haftenden Eier aktiv mit einer Glaspipette gespült. Die Tiere wurden noch 2x mit jeweils 10 ml 1xPBS gewaschen, wobei die Tiere bei 2000xg kurz sedimentiert und der Überstand bis auf ca. 3 ml abgenommen wurde. 10 ml frisch angesetzter EP-Puffer wurde zugegeben und für 5-10 min bei RT inkubiert, wobei der Aufbruch der Tiere durch Schütteln auf dem Vortex unterstützt wurde. Im Durchlichtmikroskop wurde der Vorgang beobachtet und nach vollendeter Inkubation 5x mit M9-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Eier mit 10 ml M9-Puffer versetzt und ÜN bei RT auf einem Überkopfschüttler bei geringer Umdrehung inkubiert, wobei die Tiere bis zum L1-Larvenstadium heranwachsen. Die Tiere können dann auf frische NGM-Platten verteilt und weiter kultiviert werden.

<i>EP-Puffer:</i>	2,4 ml	NaOCl (~4-5%)
	1 ml	NaOH (1M)
	6,6 ml	H ₂ O _{bidest.}

Lösung stets frisch ansetzen!

4.4.4.3 EMS-Mutagenese



Da EMS (Methansulfonicethylester) ein starkes Cancerogen, wie auch Mutagen ist, muß mit größter Sorgfalt gearbeitet werden. Handschuhe, Kittel und Schutzbrille sind obligatorisch, Abfälle wurden gesondert gesammelt, flüssige Abfälle mit KOH-Plätzchen deaktiviert. Alle Arbeiten wurden streng unter dem Abzug erledigt!

Nach erfolgter Synchronisation der Tiere (4.4.4.1) wurden die Nematoden bis zum L4-Larvenstadium kultiviert und die Tiere von der Kulturplatte 2x mit 4 ml M9-Medium gewaschen und in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt. Die Tiere wurden durch anzentrifugieren bis 2000xg sedimentiert und der Überstand bis auf 3,0 ml abgenommen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 10 ml M9-Medium unter gleichen Bedingungen.

In ein weiteres 15 ml Plastikgefäß wurde 20 µl EMS in 1 ml M9-Medium vorgelegt (Endkonzentration 47 mM), die 3 ml Wurm suspension zugegeben und für 4 h auf einer Wippe bei RT inkubiert. Zur Sedimentation der Tiere wurde kurz bis 2000xg anzentrifugiert und der Überstand entsprechend entsorgt. Nach 2-3x Waschen mit M9-Puffer wurden die Tiere auf 10 neue Ø 10 cm NGM-Platten verteilt.

4.4.4.4 DNA-Präparation aus *C.elegans*

0,5 ml Aliquots (siehe 4.4.4.1, Archivierung) wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zur Sedimentation der Tiere kurz bis 2000xg anzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µl abgenommen, zum Aufbruch der Tiere 250 µl WL-2-Puffer zugegeben und 30 min bei 65°C auf einem Tischheizblock inkubiert. Da die Enzymaktivität bei dieser Temperatur relativ schnell nachlässt wurden weitere 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und nochmals 30 min bei 65°C inkubiert. Zum Abbau von RNA inkubierte man 30 min bei 37°C mit 5 µl RNase (10 mg/ml), bevor sich eine Phenolextraktion anschloss, um Proteine zu entfernen.

500 µl Phenol wurde zu den Proben zugegeben und 30 min auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 20800xg zentrifugiert und die wässrige Phase mit 500 µl einer Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) für 30 min auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wiederholt, zur Präzipitation der DNA 1 ml abs. EtOH und 1 µl Glykogen zugegeben. Nach einer Inkubation ÜN bei 4°C wurde 10 min bei 20800xg zentrifugiert, das DNA-Präzipitat mit 70%-igem EtOH gewaschen und anschließend bei 37°C getrocknet.

Die DNA wurde in 150 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen und bei -80°C in einer Platte mit 96 Vertiefungen gelagert.

<i>WL-2-Puffer:</i>	200 mM	Tris/HCl (pH 8,5 bei 25°C)
	100 mM	NaCl
	50 mM	EDTA
	0,5% (w/v)	SDS

Kurz vor Gebrauch wurde weiter zugesetzt:

10 mg/ml	Proteinase K
----------	--------------

4.4.5 Antisense-Knockout

Die Induktion von RNA in Zellen kann in verschiedenen biologischen System verwendet werden um Genexpression zu manipulieren. Der Mechanismus basiert auf der Hybridisation zwischen injizierter RNA und endogenem mRNA Transkript. In *C.elegans* wird dieses System verwendet, um gezielt Genexpression zu unterdrücken. Wie von A. Fire (1998) beschrieben besitzt die Injektion von dsRNA eine höhere Blockierungseffizienz der mRNA als die jeweiligen Einzelstränge. In dieser Arbeit wurde ein Vektor verwendet, der die Promotoren für die T3 und die T7 RNA-Polymerase codiert und somit beide antiparallele sRNA Stränge aus einem Plasmid (pBluskript II KS (+)) durch Zugabe der entsprechenden RNA-Polymerase synthetisiert werden können.

Die Produkte der beiden Reaktionen wurden anschließend dimerisiert und in die Gonaden der Tiere injiziert.

Linearisierung der zu transkribierenden DNA

Für eine erfolgreiche Transkription ist die Linearisierung und somit eine Entspiralisierung der zu transkribierenden DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (4.5.4) notwendig. Es wurde folgender Ansatz verwendet (siehe auch 4.5.4):

12 µg	Plasmid-DNA
5 µl	Restriktionspuffer
2 U	Restriktionsenzym
ad 50 µl	H ₂ O _{bidest.}

Nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C wurden das Volumen verdoppelt. Um Enzym und sonstige Proteinverunreinigungen abzutrennen, wurde 100 µl Phenol (in 1xTE äquilibriert) zugegeben, gut durchmischt und bei 20800xg zur besseren Phasentrennung zentrifugiert. Die Phenolbehandlung wurde wiederholt und anschließend der wässrigen Phase 100 µl Chloroform zur Phenolbindung zugegeben, gut durchmischt und abermals 3 min bei 20800xg zentrifugiert.

Als Fällungshilfe wurde der wässrigen Phase 1 µl Glykogen zugegeben und die DNA mit 10 µl Natriumacetat (3M) und 250 µl kaltem, abs. EtOH gefällt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei -20°C wurde die DNA 10 min bei 20800xg in einer Kühlzentrifuge bei 4°C sedimentiert, 2x mit 1 ml 70%-igen EtOH gewaschen, bei 37°C auf einem Heizblock getrocknet und in 11 µl bidest. Wasser gelöst. Aus 1 µl wurde anschließend die Konzentration der DNA (4.5.9.2) bestimmt.

Transkriptionsansatz / DNase-Behandlung und RNA-Aufreinigung

Die so präparierte DNA konnte umgehend in den folgenden Transkriptionsansatz eingesetzt werden:

5 µl	5x Transkriptionspuffer
2 µl	DTT (100 mM)
2 µl	Ribonuklease Inhibitor (20 U)
4 µl	NTPs (2,5 mM)
1-5 µg	linearisierte DNA
1 µl	T3 oder T7 Polymerase (15-20 U)
ad 20 µl	H ₂ O _{bidst.}

Der Ansatz wurde 4-6 h oder auch ÜN bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz zum Abbau von DNA direkt 0,5 µl (5 U) DNase zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert.

Zur Reinigung der RNA wurde das Volumen des Ansatzes auf 100 μ l erhöht und wie oben beschrieben eine Phenolextraktion durchgeführt. Gefällt wurde die ssRNA mit 50 μ l Ammoniumacetat (6 M) und 450 μ l kaltem abs. EtOH. Zur Sedimentation der ssRNA wurde 20 min bei 30000xg und 4°C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Präzipitat mit 1 ml EtOH (70%) gewaschen und bei 37°C getrocknet. Die ssRNA wurde in 10-20 μ l H₂O_{bidest.} aufgenommen und photometrisch (4.5.9.2) die Konzentration bestimmt. Die ssRNA konnte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert werden.

Sense-Antisense-Anneling

Um den Sense- und Antisense-RNA-Strang zu dimerisieren wurden jeweils äquimolare Menge der beiden Produkte vereinigt, für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend 10 min bei 37°C inkubiert, bevor die RNA in die Gonaden der Nematoden injiziert (4.4.2.2) wurden.

4.5 DNA – Arbeitstechniken

4.5.1 DNA – Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*; 1988) erlaubt die Amplifikation und gezielte Mutagenese (4.5.2) von DNA-Fragmenten. Bei der PCR-Reaktion werden Oligodesoxyribonukleotide (Primer) so gewählt, daß sie antiparallel zueinander an die beiden Stränge der DNA hybridisieren und das gewünschte DNA-Fragment somit abstecken. Durch Erhitzen wird die durch Restriktionsverdau (4.5.4) linearisierte DNA thermisch denaturiert, so daß die Oligodesoxyribonukleotide beim Abkühlen an die passenden komplementären Sequenzen binden können. Durch die Anwesenheit von Vent-Polymerase (Wurde wegen der höheren Kopiergenauigkeit der Taq-Polymerase vorgezogen.) und dNTPs findet eine Primerverlängerungsreaktion (5'→3'-Richtung) statt, die in der Regel die DNA-Ketten zunächst über die jeweilige Position des Oligodesoxyribonukleotids auf dem Gegenstrang hinaus verlängert. Bei mehrfacher Wiederholung dieser Teilschritte erhält man eine Vielzahl von Kopien der beiden ursprünglichen DNA-Stränge, wobei die Kopienzahl exponentiell ansteigt, da jeder Reaktionsschritt neue Matrizen-DNA erzeugt. Auch die Länge von immer mehr DNA-Kopien entspricht exakt dem Abstand der beiden Oligodesoxyribonukleotide.

Ein Standardansatz für eine PCR-Reaktion enthält:

100 ng	linearisierte DNA
4 µl	10x Polymerase-Puffer
4 µl	2,5 mM dNTP-Mix
0,5 µg	Vorwärts-Primer
0,5 µg	Rückwärts-Primer
1 µl	Polymerase (1U/µl)
ad 40 µl	H ₂ O _{bidest.}

Die Proben wurden in 0,2 ml Eppendorfgefäße angesetzt und mit Mineralöl überschichtet, um ein Verdunsten der Proben zu unterbinden. Die Reaktionsbedingungen sind abhängig von Gerät, der Länge und Art der Matrizen-DNA, Länge und Basenzusammensetzung der Oligodesoxyribonukleotide und Menge des gewünschten Fragments.

Die Hybridisierungstemperatur, die in diesem Fall der Schmelztemperatur T_m der Primer entspricht, kann mit folgender Formel näherungsweise berechnet werden. Für A (Adenin), T (Thymin), C (Cytosin) und G (Guanosin) werden dabei die Anzahl der Basen im betrachteten DNA-Stück eingesetzt.

$$T_m = 2(A + T) + 4(C + G)$$

Die benötigte Elongationszeit kann in etwa mit der Polymeraseaktivität berechnet werden. Ein DNA-Strang wird je nach Polymerase um ca. 1000-2000 bp/min verlängert.

Für die meisten Reaktionen waren in der Regel folgende Bedingungen erfolgreich:

Reaktionsschritt	Temp. in °C	Zeiten in sec.	Bemerkung
Denaturierung	95	40	Trennung der DNA-Matrizenstränge
Hybridisierung	48 - 58	40	Primer hybridisieren an ssDNA
Elongation	72	30- 180	Polymerase vervielfältigt Stränge
12 - 25 Cycles			

Tab. 6: Reaktionsbedingungen für die Durchführung einer Polymerasekettenreaktion.

Durch den Denaturierungsschritt bei 95°C werden die DNA-Matrizenstränge getrennt und erreichbar für die Oligodesoxyribonukleotide (Primer). Durch Abkühlen kommt es zur Hybridisierung der Primer an die ssDNA. Bei 72°C bindet dann die Polymerase an die Hybridisierungsstellen und verlängert den fehlenden ssDNA-Strang in 5'→3'-Richtung. Der Vorgang wird mehrfach wiederholt, um eine ausreichende Menge an Produkt zu erhalten.

Nach Abschluss der Reaktion wurde ein 5 µl Aliquot des Produktes zur Kontrolle auf einem Agarosegel (4.5.9.1) analysiert. Die PCR-Produkte wurden anschließend einer Aufreinigung (4.5.3) unterzogen, um Kontaminanten zu eliminieren.

<i>10x Vent-Polymerase-Puffer:</i>	100 mM	KCl
	200 mM	Tris/HCl (pH 8,8)
	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	20 mM	MgSO ₄
	1% (v/v)	Triton-X-100
	pH 8,8	(bei 25°C)

<i>2,5 mM dNTP-Mix:</i>	2,5 mM	dGTP
	2,5 mM	dATP
	2,5 mM	dCTP
	2,5 mM	dTTP

4.5.2 PCR - Mutagenese

Die Mutagenisierung von cDNA erfolgte ebenfalls durch Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR). Verfahren wurde dabei nach dem in Abb. 8 dargestellten Schema. Mittels geeigneter Oligodesoxyribonukleotide wurden zunächst zwei DNA-Fragmente in separaten Reaktionen synthetisiert, die jeweils im Segment der Mutation überlappen. Oligodesoxyribonukleotide sowie das Wildtyp-DNA-Fragment der 1. und 2. PCR-Reaktion wurden über ein NuSieve-Agarosegel von den PCR-Produkten abgetrennt. Die PCR-Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten, bei 66°C

solubilisiert und jeweils direkt 1 μl in eine 3. PCR-Reaktion eingesetzt, wobei diesmal Oligodesoxyribonukleotide gewählt wurden, welche den gesamten Genabschnitt abstecken.

Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt (4.5.3) und nach Klonierung (4.5.7) in einen geeigneten Vektor sequenziert, um die Einführung der Mutation zu überprüfen und evt. eingeführte sekundäre Fehler im synthetisierten Genabschnitt zu identifizieren.

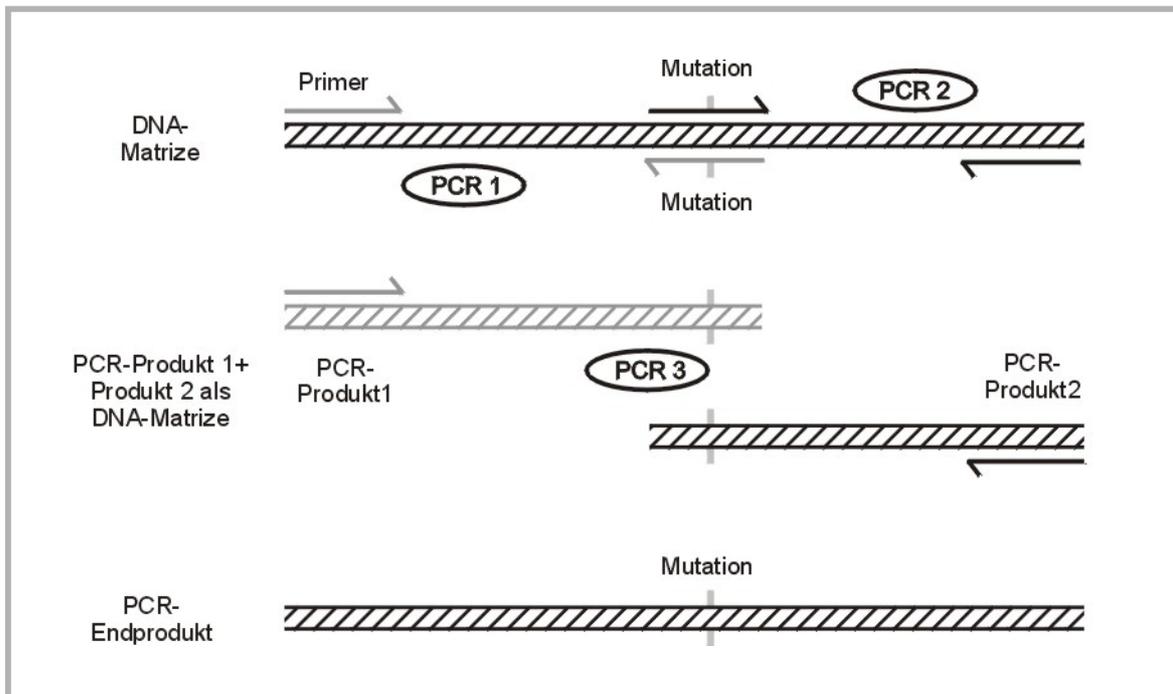


Abb. 8: Schematische Darstellung der Mutagenisierung von cDNA-Fragmenten mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR).

Bei der Reaktion 1 (PCR 1) trägt der Rückwärts-Primer die Mutation, wobei bei der Reaktion 2 (PCR 2) im Vorwärts-Primer die Mutation integriert ist. Durch eine 3. Reaktion (PCR 3) lässt sich der gesamte Genabschnitt mit eingeführter Mutation synthetisieren. Die Mutation sollte in den Primern möglichst mittig liegen, um eine bestmögliche Hybridisierung mit dem Matrizenstrang zu gewährleisten.

4.5.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Das synthetisierte PCR-Produkt wurde möglichst quantitativ in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, ohne jedoch das überschichtete Mineralöl mit aufzunehmen. Die Probe wurde dann zur besseren Handhabung mit bidest. Wasser auf 100 μl verdünnt. Um Enzym und mitgeschlepptes Mineralöl abzutrennen, wurde 100 μl Phenol (in 1xTE äquilibriert) zugegeben, gut durchmischt und bei 20800xg zur besseren Phasentrennung zentrifugiert. Die Phenolbehandlung wurde wiederholt und anschließend der wässrigen Phase 100 μl Chloroform zur Phenolbindung zugegeben, gut durchmischt und abermals 3 min bei 20800xg zentrifugiert.

Als Fällungshilfe wurde der wässrigen Phase 1 μl Glykogen zugegeben und die DNA mit 10 μl Natriumacetat (3M) und 250 μl kalten, abs. EtOH gefällt. Nach einer Inkubationszeit von

10 Minuten bei -20°C wurde die DNA 10 min bei 4°C und $20800\times g$ in einer Kühlzentrifuge sedimentiert, mit 1 ml 70%-igen EtOH gewaschen, bei 37°C auf einem Heizblock getrocknet und in $50\ \mu\text{l}$ bidest. Wasser gelöst.

Ein $10\ \mu\text{l}$ Aliquot wurde mit Restriktionsendonukleasen nachgeschnitten (4.5.4) und anschließend in Ligationsansätzen (4.5.7) direkt weiterverwertet.

4.5.4 Enzymatische Spaltung von DNA (Restriktionshydrolyse)

Für analytische Spaltungen mittels Restriktionsendonukleasen wurden $0,5\text{--}2\ \mu\text{g}$ DNA eingesetzt und Inkubationszeiten zwischen 10 und 30 min, für vollständige pr perative Ansätze $1\text{--}5\ \mu\text{g}$ DNA verwendet, Zeiten zwischen 2 und 12 h und eine Inkubationstemperatur von 37°C gewählt. Ein üblicher Restriktionsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

0,5 – 5 μg	Plasmid-DNA
3 μl	10x NEB-Restriktionsendonukleasepuffer
0,5 – 1 μl	Enzym (1-10U)
ad 30 μl	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Bei der Restriktion nach 4.1.5.1 präparierter Plasmid-DNA wurde zusätzlich $1\ \mu\text{l}$ RNase A (Stock: 1 mg/ml) zugefügt, um RNA-Kontaminationen zu entfernen.

Der optimale Restriktionspuffer und die ideale Inkubationstemperatur jeden Enzyms wurde den Herstellerangaben entnommen.

10x Restriktionspuffer Nr. 1:

10 mM	Bis-Tris-Propan/HCl
10 mM	MgCl_2
1 mM	DTT
pH 7,0 (bei 25°C)	

10x Restriktionspuffer Nr. 2:

10 mM	Tris/HCl
10 mM	MgCl_2
50 mM	NaCl
1 mM	DTT
pH 7,9 (bei 25°C)	

10x Restriktionspuffer Nr. 3:

50 mM	Tris/HCl
10 mM	MgCl_2
100 mM	NaCl
1 mM	DTT
pH 7,9 (bei 25°C)	

10x Restriktionspuffer Nr. 4:

20 mM	Tris/Acetat
10 mM	Magnesiumacetat
50 mM	Kaliumacetat
1 mM	DTT
pH 7,9 (bei 25°C)	

4.5.5 Erzeugung von nicht-überhängenden DNA-Enden

Für die spätere Ligation zweier nicht-kohäsiver DNA-Fragmente wurden zuvor doppelsträngige Enden erzeugt. Im Fall von 5'-überhängenden Enden wurden nach erfolgtem Restriktionsverdau eine Mischung aller dNTPs bis zu einer Endkonzentration von 100 μ M und 1 μ l Klenow-DNA-Polymerase zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurde das Enzym für 20 min bei 70°C inaktiviert oder durch eine Protein-Entfernungs-Säule zentrifugiert.

Im Fall von 5'-zurückgesetzten Enden wurde T4-DNA-Polymerase anstelle des Klenow-Reagenz benutzt, da 3'-überhängenden Enden von der Exonukleaseaktivität dieses Enzyms entfernt werden können.

4.5.6 Dephosphorylierung des 5'-Ende von DNA-Molekülen

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm entfernt in einem linearen doppelsträngigen DNA-Molekül endständige 5'-Phosphatgruppen. In den meisten Fällen wurden die 5'-Phosphatgruppen eines mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen und zu ligierenden Vektors abgespalten, um die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation der beiden Enden des Vektors zu reduzieren. Unerlässlich ist dies, wenn der für den Ligationsansatz präparierte Vektor komplementäre Enden aufweist.

Nach Restriktionsspaltung der DNA-Proben (4.5.4) wurde 1 μ l alkalische Phosphatase (1U) direkt in den Restriktionsverdau zugegeben und der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben konnten dann ohne weitere Aufreinigung in einen Ligationsansatz (4.5.7) eingesetzt werden.

4.5.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation enzymatisch gespaltener DNA-Fragmente erzeugt rekombinante Plasmide, die in Bakterien transformiert werden können (4.1.4). Die T4-DNA-Ligase katalysiert hierbei die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen endständigen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen eines doppelsträngigen DNA-Moleküls.

Für die kovalente Verknüpfung von Vektor-DNA (dephosphoryliert, siehe 4.5.6) mit einem zweiten DNA-Insert wurden beide Fragmente über Agarosegelelektrophorese (4.5.9.1) und anschließender Excision unter UV-Licht (366 nm) aus einem niedrigschmelzenden Agarosegel (NuSieve-Agarose, FCM) mit Hilfe eines Skalpellisoliert.

Die Gelstücke wurden bis zur vollständigen Solubilisierung (5-10 min) bei 66°C geschmolzen und das angegebene Volumen möglichst zügig in den Ligationsansatz überführt. Erfahrungsgemäß behindert die Zugabe von bis zu 1/10 Vol. (des Gesamtansatzes) geschmolzener NuSieve-Agarose die Ligationseffizienz bei Raumtemperatur kaum.

Als optimal erwies sich ein 3-fach molarer Überschuß des zu inserierenden DNA-Fragments gegenüber der Vektor-DNA. Aus diesem Grund wurden jeweils die gleichen Mengen der beiden äquimolaren Restriktionsansätze auf das präperative Gel aufgetragen und die isolierten Fragmente in den folgenden Volumina in die Ligationsreaktion eingesetzt:

1 µl	Vektor-DNA
3 µl	Insert-DNA
5 µl	10x Ligasepuffer
1 µl	T4-DNA-Ligase (2U/ µl)
ad 50 µl	H ₂ O _{bidest.}

Die Ligationsreaktion erfolgte 2 h bei Raumtemperatur. Bei Ligationsansätzen über Nacht wurde eine Inkubationszeit von 14°C gewählt. In Transformationen in *E.coli* (4.1.4) wurden direkt 5 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

<i>10x Ligationspuffer:</i>	50 mM	Tris/HCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	DTT
	1 mM	ATP
	25 µg/ml	BSA
	pH 7,8	(bei 25°C)

Um das Ausmaß der Selbstligation des Vektors zu ermitteln, wurden jeweils ein weiterer Kontrollansatz unter gleichen Bedingungen ligiert, in dem jedoch das zu inserierende DNA-Fragment durch bidest. Wasser ersetzt wurde. Die Anzahl der anschließend zur Plasmidpräparation weiterverwendeten Klone richtete sich nach dem Verhältnis der Kolonienzahl auf beiden Platten. Bei gründlicher alkalischer Dephosphorylierung der Vektor-DNA (4.5.6) wurde meist ein Verhältnis von mind. 1:200 erreicht.

4.5.8 Adapterligation

4.5.8.1 Ligationsansatz für Oligodesoxyribonukleotid-Adapter

In speziellen Fällen ist es notwendig nur sehr kurze DNA-Fragmente in einen Vektor zu inserieren. DNA-Fragmenten unter 50 bp können zwar mit Hilfe der PCR-Reaktion synthetisiert werden, lassen sich aber schlecht mittels Agarosegelen (4.5.9.1) analysieren und isolieren, da sie mit nicht verbrauchten Oligodesoxyribonukleotiden im Gel annähernd auf gleicher Höhe laufen und sich teilweise nicht ausreichend mit Ethidiumbromid anfärben lassen. Aus diesen Gründen wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus synthetischen Oligodesoxyribonukleotiden hergestellt.

Zur Hybridisierung von codierendem und reversem ssDNA-Strang wurden 5 µg von phosphorylierten (4.5.8.2) ssDNA-Adaptersträngen im Verhältnis 1:1 gemischt und Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 angesetzt. Von den jeweiligen Verdünnungen wurden jeweils 12 µl in den nachfolgenden Ligationsansatz eingesetzt:

1 µl	Vektor-DNA
12 µl	Adapter-DNA
5 µl	10x Ligasepuffer
1 µl	T4-DNA-Ligase (2U/ µl)
ad 50 µl	H ₂ O _{bidest.}

Puffer und Reaktionsbedingungen wurden bereits im Kapitel 4.5.7 beschrieben.

Durch geschickte Wahl der beiden Oligodesoxyribonukleotide können an den Enden des synthetische DNA-Fragments Basenüberhänge erzeugt werden, die einer geschnittenen DNA gleichkommen. Eine Restriktion des DNA-Fragments ist somit nicht notwendig.

4.5.8.2 Phosphorylierung von 5'Enden (Adapterphosphorylierung)

Die synthetischen Oligodesoxyribonukleotide besitzen aufgrund des Syntheseverfahrens ein nicht-phosphoryliertes 5'-Ende, welches aber zur Ligationreaktion (Ausbildung einer Phosphodiesterbindung) notwendig ist. Mit Hilfe der Polynukleotidkinase (PNK) werden diese 5' Enden phosphoryliert. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

100 nmol	ss-Oligodesoxyribonukleotide
6 µl	5x PNK-Puffer
2 µl	Polynukleotidkinase (20U)
0,5 µl	ATP (Stock: 100 mmol/L)
ad 30 µl	H ₂ O _{bidest.}

Die Phosphorylierungsreaktion wurde bei 37°C für 12 h durchgeführt. Das Produkt konnte direkt in einen Ligationsansatz (4.5.8.1) eingesetzt werden.

4.5.9 Qualitative und quantitative Analyse von DNA-Molekülen

4.5.9.1 DNA-Elektrophorese in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Proben im analytischen und/oder präoperativen Maßstab erfolgt mit Agarosegelen. DNA-Moleküle bewegen sich aufgrund der negativen Ladung der Phosphodiester-Gruppen in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. In einem Agarosegel ist die Wanderungsgeschwindigkeit durch Reibung limitiert und eine Funktion der Länge der DNA-Moleküle. Auf diese Weise ermöglicht die Agarosegelelektrophorese eine Trennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe und eine Molekulargewichtsbestimmung anhand einer bekannten Referenz (DNA-Marker).

Zur Visualisierung der DNA wird dem Gelsystem Ethidiumbromid zugesetzt, das in die DNA interkaliert und durch UV-Licht zur Lichtemission (Fluoreszenz) angeregt wird. Die DNA-Banden konnten anschließend mit Hilfe der Eagle-Eye II Apparatur (Stratagene) dokumentiert werden.

Agarose wird im gewünschtem Verhältnis mit 1xTAE-Puffer in einer Mikrowelle in Lösung gebracht und in einer geeigneten Gießeinrichtung bei RT erstarren lassen. Je nach Größe der vorliegenden Fragmente wurden 0,8-5,0% Gele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1xTAE-Elektrophoresepuffer bei 5 V/cm. Je nach Länge und Prozentigkeit des Gels wurden für 10-30 Minuten Spannungen zwischen 80-150 V angelegt.

1x TAE-Elektrophoresepuffer:

40 mM	Tris/HCl
40 mM	Essigsäure
1 mM	EDTA
20 µl	Ethidiumbromid-Lösung
pH 8,0	(bei 25°C)

Ethidiumbromid-Lösung: 10 mg/ml (in Wasser)

4.5.9.2 DNA – Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung erfolgt durch photometrische Messung bei einer optischen Dichte (OD) von 260 nm. Die DNA-Lösung wurde hierzu 1:50 in 200 µl H₂O verdünnt und Blasenfrei in eine Quarzküvette überführt. Für längere, doppelsträngige DNA-Moleküle wurde eine OD₂₆₀=1 von 50 µg/ml angenommen. (Sambrook *et al.* 1989), bei längeren, einzelsträngigen DNA-Molekülen wurde ein Wert von 33 µg/ml angenommen.

$$c = \frac{OD_{260} \times k}{\varepsilon \times d}$$

c = Konzentration in mM/l

k = Verdünnungsfaktor

ε = Extinktionsfaktor in $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

d = Küvettschichtdicke in cm

Für die Konzentrationsbestimmung kurzer Oligodesoxyribonukleotide wird der Extinktionsfaktor des Gesamtmoleküls $\varepsilon_{\text{gesamt}}$ von einem Programm des Spektralphotometers (Beckmann DU-640) anhand der Basenzusammensetzung ermittelt. Dabei wird von folgenden Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen ausgegangen (Wallace *et al.*, 1987):

Base	$\varepsilon^{1M} 260 \text{ nm}$
Adenin	$15,20 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Cytosin	$7,05 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Guanin	$12,01 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Thymin	$8,40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Abb. 9: Extinktionskoeffizienten der einzelnen Purin- und Pyrimidinbasen.

Weiterhin wurden Messungen zu Reinheit der DNA durchgeführt. Wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm ein weiteres Absorptionsmaximum gemessen, deutete dies auf die Anwesenheit von Proteinen in der Lösung hin. Das Abschätzen des Proteingehalts bei OD_{280} beruht in erster Linie auf seinen Tyrosin- und Tryptophangehalt. Der Koeffizient OD_{260}/OD_{280} beschreibt den Reinheitsgrad der DNA und liegt im Idealfall bei 1,8. Meßbare Absorption bei OD_{320} deutet auf partikuläre Bestandteile in der Lösung hin.

4.5.9.3 DNA-Sequenzanalysen

Sequenzanalysen die zur Überprüfung komplizierter Klonierungen und Mutationseinführungen nötig waren, wurden von der Firma Medigene (Martinsried b. München) oder von Dr. Arnold (Genzentrum, Martinsried) angefertigt.

4.6 Proteinarbeitstechniken

4.6.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page)

Das Prinzip der eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli (1970) beruht auf einer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen im elektrischen Feld, in Abhängigkeit ihrer Größe und Ladung.

Saturierende SDS-Konzentrationen führen zur vollständigen Denaturierung von Proteinen und erzeugen einen negativen Ladungsüberschuss, der proportional zum Molekulargewicht des Gesamtmoleküls ist. Die negativen Sulfatgruppen des SDS lagern sich dabei in einem bestimmten Verhältnis (2-3 SDS-Molekül/Aminosäure) an die Aminosäuren des Proteins an, wobei die Eigenladung des Proteins überdeckt wird.

Praktisch verwendet man ein Gefäß mit zwei Puffer-Reservoirs, wobei je eine Partielle mit der Kathode, die andere mit der Anode der Spannungsquelle verbunden ist. Als Verbindung der Partiiellen dient ein Polyacrylamidgel. Dieses Polymer hat sich als besonders günstig erwiesen, da es sich nicht mit der Probe vermischt und auch nicht mit dieser reagiert.

Als Ausgangssubstanz wird Acrylamid verwendet, welches durch eine Radikalreaktion polymerisiert. Ammoniumperoxodisulfat (APS) dient als Radikalstarter, zur Beschleunigung der Polymerisation wird der Radikalüberträger TEMED (Tetramethylethylendiamin) eingesetzt. Die Porengröße des Gels kann durch die vernetzende Komponente N,N-Methylen-bis-Acrylamid variiert werden.

Das Gel ist in ein engporiges Trenngel (pH 8,7) und ein weitporiges Sammelgel (pH 6,8) unterteilt. Das Sammelgel hat die Aufgabe die Proteine zu konzentrieren und somit gleiche Startbedingungen herzustellen. Das dem Laufpuffer zugesetzte Glycin liegt als Zwitterion vor und kann je nach pH-Wert protoniert oder deprotoniert auftreten. Es stellt sich immer ein Gleichgewicht zwischen Glycin und Glycinat ein. Im Sammelgel wird das Glycinat durch den leicht sauren pH-Wert dem Gleichgewicht entzogen und das Glycin liegt nach außen hin als ungeladenes Molekül vor. Ungeladenes Glycin bewegt sich im Sammelgel nur sehr langsam. Wird Spannung an das Gel angelegt, wandern die Cl⁻-Ionen (aus Tris-HCl) als kleine Ionen sehr schnell, das ungeladene Glycin kaum. Es besteht in diesem Bereich des Sammelgels ein Mangel an beweglichen Teilchen und somit ein starkes lokales elektrisches Feld. Aus diesem Grund können sich im großporigen Sammelgel anionische Proteine schnell bewegen.

Erreichen die Proteine das Trenngel verkleinert sich die Porengröße und der pH-Wert steigt. Die Proteine werden stark abgebremst und es erfolgt eine Aufkonzentrierung. Das Glycin liegt wegen des nun alkalischen Mediums geladen vor. Aufgrund der jetzt konstanten Feldstärke im gesamten Trenngel trennen sich die Proteine jetzt nach ihrer Ladung bzw. Größe auf.

Trenngel	10% [ml pro Gel]	12% [ml pro Gel]	Sammelgel	5% [ml pro Gel]
H ₂ O	1,9	1,6	H ₂ O	1,4
30% Acrylamid-Mix	1,7	2,0	30% Acrylamid-Mix	0,33
1,5 mM Tris/HCl pH 8,8	1,3	1,3	1,0 mM Tris/HCl pH 6,8	0,25
10% SDS	0,05	0,05	10% SDS	0,02
10% (NH ₄) ₂ S ₂ O ₄	0,05	0,05	10% (NH ₄) ₂ S ₂ O ₄	0,02
TEMED	0,002	0,002	TEMED	0,002

Tab. 7: Polyacrylamid-Gellösungen für Trenn- und Sammelgel.

Die Polyacrylamid-Lösung wurden wie aus Tab. 7 zu entnehmen ist hergestellt und mit Hilfe einer Gießapparatur (BioRAD Minigel-System oder Hoefer Tall Mighty Small Minigel-System) zwischen zwei Glasplatten zur Polymerisation gebracht. Das Trenngel wurde während der etwa 15 min in Anspruch nehmenden Polymerisation mit Iso-Butanol überschichtet, um eine homogene Polymerisation zu gewährleisten. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen (Höhe ca. 0,5 cm) und ein Geltaschenkamm eingeführt.

Die zu bestimmenden Zelllysate wurden vor dem Gellauf mit 3xSDS-Auftragspuffer versetzt und für 5 min im Wasserbad aufgeköcht. Die Geltaschen wurden mit jeweils 10-20 µl Probe beladen. Zur qualitativen Größenbestimmung von Proteinen wurde in einer Spur ein Proteinstandard (Marker, siehe 3.16.2) aufgetragen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 160-200 V für etwa 45-90 min, bis die Bromphenolblaubande aus dem Gel gelaufen war. An die Gelelektrophorese schloß sich meist eine Coomassie-Färbung (4.6.2), Silberfärbung (4.6.3) oder ein Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (4.6.5) an.

<i>30% Acrylamid-Mix:</i>	30% (w/v) 0,8% (w/v)	Acrylamid Bis-Acrylamid
<i>10x SDS-Laufpuffer:</i>	250 mM 2,5 M 1% (w/v) pH 8,3 (bei 25°C)	Tris/HCl Glycin SDS

3x SDS-Auftragspuffer:	150 mM	Tris/HCl (pH 6,8 bei 25°C)
	300 mM	DTT
	6% (w/v)	SDS
	30% (v/v)	Glycerin
	0,3% (w/v)	Bromphenolblau

Lagerung bei -20°C.

4.6.2 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Zur raschen Visualisierung einer Expression können Proteine direkt in einem Polyacrylamidgel angefärbt werden. In vielen Fällen wird hierbei die Coomassie-Färbung (Wilson C.M., 1993) angewendet. Diese Methode ist um 10-50 mal weniger sensitiv als die "Silberfärbung" (4.6.3), aber für einen Expressionsnachweis völlig ausreichend.

Das mit Protein(en) beladene Polyacrylamidgel wurde direkt nach der Elektrophorese in die Coomassie-Färbelösung überführt und unter leichtem Schwenken auf einem Schütteltisch für 30 min bis 1 h inkubiert. Die Färbelösung wurde abdekantiert und für weitere Färbungen aufbewahrt. Zur Entfernung des Farbhintergrundes wurde das Polyacrylamidgel mit Entfärber-Lösung versetzt und für 1 h auf dem Schüttler entfärbt. Während dieser Zeit wurde die Entfärberlösung mind. 2-3 mal gewechselt.

Zur Dokumentation wurden die Gele auf ein Whatman 3MM-Papier transferiert und für 1 h bei 80°C in einem Vakuum-Trockner getrocknet. Als Alternative wurden die Gele auch über ein Gel-Trocken-Film (Promega) getrocknet.

Coomassie-Färbelösung:	50% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
	0,25% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250

Lagerung bei RT.

Entfärber-Lösung:	10% (v/v)	Essigsäure
	20% (v/v)	Isopropanol
	70% (v/v)	H ₂ O _{bidest.}

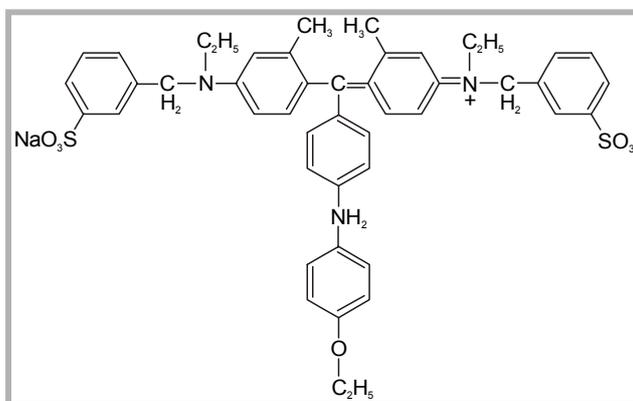


Abb. 10: Strukturformel des Coomassie-Brilliant-Blue R-250 Farbstoffes.

4.6.3 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung ist eine Methode mit einer sehr hohen Nachweisempfindlichkeit. Es lassen sich geringe Proteinmengen von 2-5 ng/Protein nachweisen. Dieses Protokoll von Bloom *et al.* (1987) ist schnell durchführbar und liefert Ergebnisse mit geringem Hintergrund.

Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese (4.6.1) wurde das Polyacrylamidgel 2 h in Fixierlösung auf einer Wippe inkubiert und anschließend 3x 15 min mit 40% Methanol und 1x mit 25% Methanol gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 1 min mit einer Di-Natriumthiosulfatlösung, um die Nachweisgrenze zu verbessern. Die Lösung wurde verworfen, 3x 20 sek mit bidest. Wasser gewaschen und weitere 20 min in der Färbelösung inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und das Gel 2x 20 sek mit bidest. Wasser gewaschen. Durch Zugabe des Entwicklers wurden die Proteinbanden im Gel sichtbar. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1x kurz mit bidest. Wasser gewaschen und das Gel 10 min in der Stopp-Lösung inkubiert. Das Gel kann mittelfristig in 30% Methanol oder bidest. Wasser aufbewahrt werden. Zur Dokumentation des Gels empfiehlt sich eine Trocknung über ein Gel-Trocken-Film (Promega).

<i>Fixierlösung:</i>	100 ml	Methanol
	24 ml	Eisessig
	200 µl	Formaldehyd
	ad 200 ml	H ₂ O _{bidest.}
<i>Di-Natriumthiosulfatlösung:</i>	0,1 g	Di-Natriumthiosulfat
	ad 500 ml	H ₂ O _{bidest.}
<i>Färbelösung:</i>	0,2 g	Silbernitrat
	75 µl	Formaldehyd
	ad 100 ml	H ₂ O _{bidest.}
	Lösung dunkel lagern! Lichtempfindlich!	
<i>Entwickler:</i>	400 µg	Di-Natriumthiosulfat
	50 µl	Formaldehyd
	6 g	Natriumcarbonat
	ad 100 ml	H ₂ O _{bidest.}
Stets frisch ansetzen!		
<i>Stopp-Lösung:</i>	50 ml	Methanol
	12 ml	Eisessig
	ad 100 ml	H ₂ O _{bidest.}

4.6.4 Transfer von Protein-SDS-Komplexen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blotting)

Beim "Western-Blotting" werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Polyacrylamid-Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter, wie z.B. nicht-aktivierte Nitrozellulosemembran übertragen. Die Methode des "Elektroblotting" wurde erstmals von Towbin (Towbin, 1979) beschrieben.

Bei diesem Verfahren wird eine exakte Kopie erzeugt, wobei die Proteine auf der Matrix immobilisiert werden. Unter geeigneten Bedingungen bleibt beim Transfer die Immunaktivität, als auch die funktionelle Aktivität der Proteine erhalten. Es ist daher möglich Proteine z.B. mit Antikörper oder Enzymsubstraten zu identifizieren, wie auch qualitative und quantitative Bestimmungen durchzuführen.

Der Protein-Transfer erfolgte im „Tank-Verfahren“, in einer vertikalen Protein-Transfer-Apparatur (BioRad). Das hierzu mit Proteinen beladene Polyacrylamidgel, die Nitrozellulosemembran, die Filterpapiere und Schwämme wurden in 1x Transferpuffer äquilibriert und entsprechend dem folgenden Schema, möglichst ohne Lufteinschlüsse, zwischen den Elektroden in einer Halterung angeordnet:

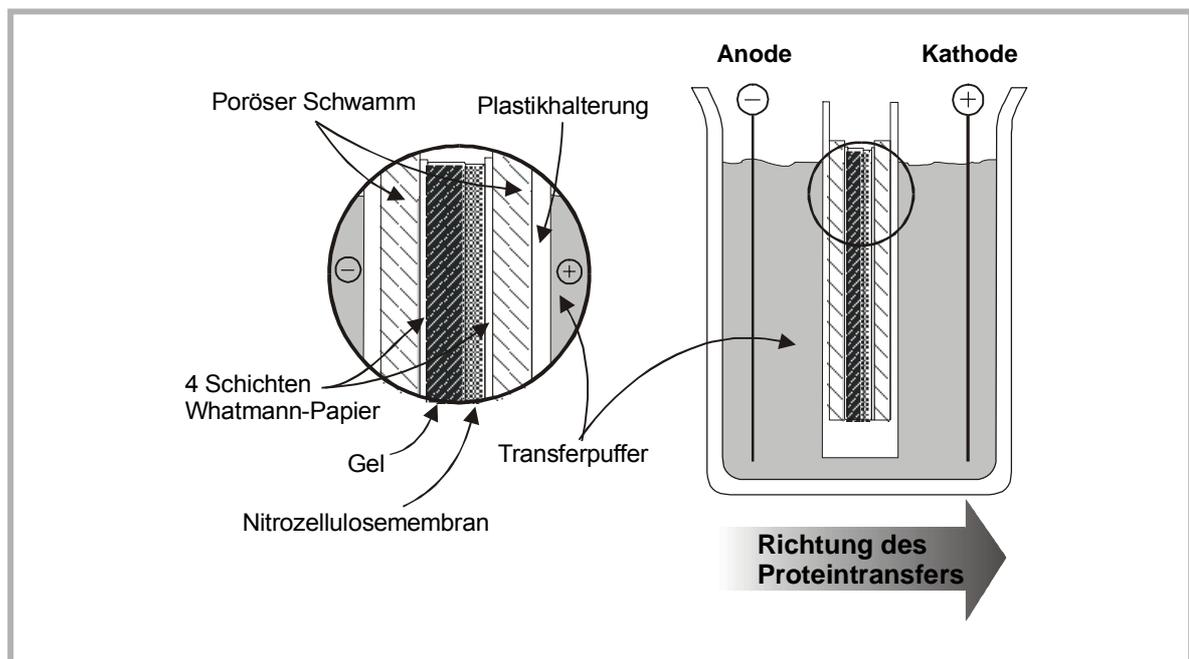


Abb. 11: Schematischer Aufbau einer Protein-Transfer-Apparatur.

Der Transfer der SDS-Proteinkomplexe erfolgte unter permanenter Pufferbewegung im Kühlraum (4°C) wahlweise bei 70 V für 3 h oder bei 20 V über Nacht.

Die Transfereffizienz wurde durch eine Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulose (etwa 15 min in Färbelösung; entfärbt mit bidest. Wasser) überprüft.

1x Transferpuffer:	25 mM	Tris-Base
	250 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
		in H ₂ O _{bidest.}

Kurz vor der Verwendung wurde weiterhin zugefügt:
20% (v/v) Methanol

10x Ponceau-S-Färbelösung:

20 g/L	Ponceau-S
300 g/L	Trichloressigsäure
300 g/L	Sulfosalycilsäure
	in H ₂ O _{bidest.}

4.6.5 Detektion immobilisierter Proteine auf Nitrozellulosemembranen

Nach dem Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (4.6.4) wurden diese mittels spezifischer Antikörper detektiert und ein Peroxidase-Konjugat als sekundärer Antikörper verwendet, welches mit dem ECL-System (Amersham, Braunschweig) durch Chemilumineszenz nachgewiesen werden konnte.

Das abgegebene Licht bei dieser Chemilumineszenzreaktion entsteht durch Oxidation von zyklischem Luminol (Issacson, 1974) unter alkalischen Bedingungen mittels Wasserstoffperoxid und Peroxidase als Katalysator. Durch Anwesenheit von Phenol tritt ein bis zu 1000-fache Verstärkung (Whitehead, 1979) der Chemilumineszenz auf.

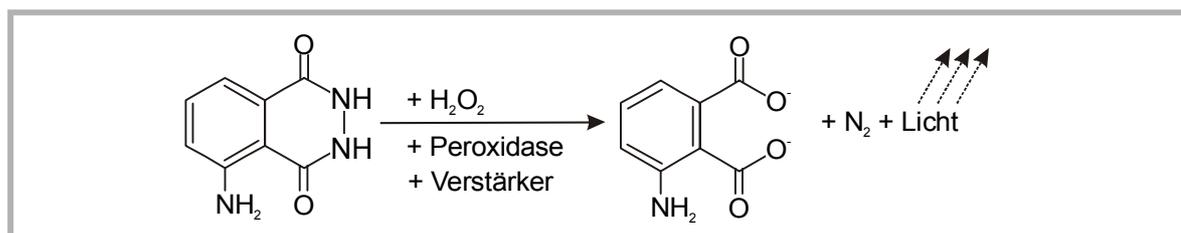


Abb. 12: Prinzip der Chemilumineszenz des ECL-Systems.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Transfer der Proteine (4.6.1) kurz in 1xTBST äquilibriert und anschließend 1-2 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubiert, um noch freie Bindungsstellen für Proteine auf der Membran abzusättigen. Nach 3x 5 min waschen mit 1xTBST, erfolgte unter leichtem Schwenken auf einem Schüttelinkubator bei RT eine Inkubation für 1 h bei RT mit primären proteinspezifischen Antikörper, der entsprechend den Herstellerangaben oder

empirisch ermittelten Werten (siehe 3.8.1) in 10 ml 1x TBST verdünnt worden war. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut 3x 5 min mit 1xTBST gewaschen. Auch der peroxidasekonjugierte sekundäre Antikörper wurde bei RT 30 min bis 1 h unter leichtem Schwenken in 10 ml Volumen eingesetzt (siehe 3.8.2) und die Membran abschließend 3x 5 min mit 1xTBST gewaschen.

Zur Detektion der spezifischen Proteine wurde anschließend das ECL-Reagenz verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Entsprechend der Chemilumineszenz wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-OMAT-AR) für 1 sek bis 20 min exponiert und anschließend entwickelt.

<i>1x TBST:</i>	10% (w/v) 0,1% (v/v)	10x TBS Tween-20 pH 7,5 (bei 25°C)
<i>Blockierlösung:</i>	1% (w/v)	Milchpulver in 1x TBST

4.6.6 "Stripping" von Nitrozellulosemembranen

Das "Stripping"-Verfahren ermöglicht das Entfernen spezifischer Antikörper auf Nitrozellulosemembranen und dadurch die mehrfache Detektion mit Antikörper verschiedener Spezifität auf einer Membran.

Nitrozellulosemembranen mit antikörpergebundenen Proteinen wurden 5 min bei 70°C in "Stripping"-Puffer unter leichtem Schwenken auf dem Schütteltisch im Abzug inkubiert. Der Puffer wurde abdekandiert und die Membran 3x 5 min bei RT mit 50 ml 1xTBST gewaschen. Die Membran konnte anschließend erneut zur spezifischen Proteindetektion (4.6.5) eingesetzt werden.

<i>"Stripping"-Puffer:</i>	100 mM 2% (w/v) 62,5 mM	2-Mercapto-Ethanol SDS Tris/HCl pH 6,7 (bei 25°C)
----------------------------	-------------------------------	---

Puffer stets frisch ansetzen!

4.6.7 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) basiert auf einem photometrischen Nachweis und wurde zur Abschätzung der Proteinmenge in Lösung verwendet. Der in der Bradford-Lösung (Fertigreagenz der Firma BioRad) enthaltene Farbstoff „Coomassie-Brilliant-Blau“ bildet mit basischen und aromatischen Aminosäureresten von Proteinen einen farbigen Komplex mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda=595$ nm im Vergleich zum freien Farbstoff.

Als Referenz der gemessenen Proteinkonzentration der Probe dient eine Eichkurve aus verschiedenen, bekannten Konzentrationen (1, 2, 5, 10, 20, und 30 μg) eines Standardproteins, in der Regel BSA. Die Bradford-Lösung wurde 1:5 mit bidest. Wasser verdünnt und jeweils 160 μl dieser Lösung mit 40 μl der entsprechenden Verdünnung (BSA) bzw. Proteinprobe bei RT für 5 min inkubiert. Die Proben wurden in einem Photometer (Beckmann) vermessen und die erhaltenen Messwerte in einem Diagramm aufgetragen, um die Proteinmenge abschätzen zu können.

4.6.8 Proteinexpression und Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine

Die Expression rekombinanter Fusionsproteine aus *E.coli* birgt den Vorteil hoher Proteinausbeuten bei hoher Reinheit. Die Proteine lassen sich leicht über einen Fusionsanteil (z.B. 6xHis, GST) an geeigneter Matrix aufreinigen. In allen verwendeten Vektoren codiert das Plasmid den lac-i-Repressor, welcher in uninduziertem Zustand der Zelle an den Operator bindet und somit die Transkription der Strukturgene verhindert.

Ein Induktor wie das IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid), ein Analogon des physiologischen Induktors Allolactose, bindet bei Zugabe an den Repressor und verhindert die Wechselwirkung mit dem Operator. Die Polymerase kann nun die Genregion des Plasmids ablesen.

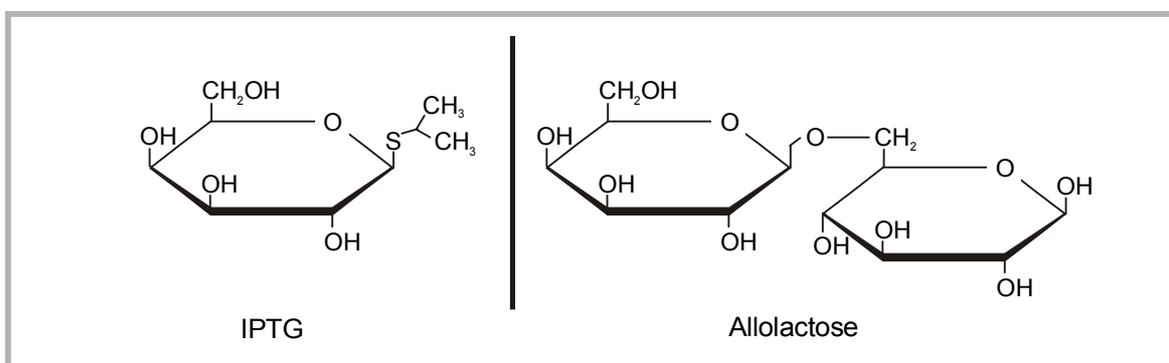


Abb. 13: Molekülstrukturen von IPTG und Allolactose.

4.6.8.1 Proteinexpression und -aufreinigung mit GST-Fusionsanteil in *E.coli*

Proteinexpression

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die entsprechenden Gene in den Ampicillin-resistenten Expressionsvektor pGEX-2T kloniert und in *E.coli*-Stamm DH5 α oder MC1061 (3.11) transformiert (4.1.4).

Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agarplatten (inkl. Antibiotikum) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. 500 ml LB-Medium (inkl. Antibiotikum) wurde mit einer Bakterieneinzelkolonie inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Nach Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM wurden die Kulturen weitere 3 h unter gleichen Bedingungen im Bakterienschüttler inkubiert.

Präparation der exprimierten Fusionsproteine

Die Bakterienkulturen wurden in 1l Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 5000xg abzentrifugiert. Die folgenden Schritte zur Präparation der GST-Fusionsproteine wurden auf Eis durchgeführt.

Das Zellsediment wurde in 25 ml Lysispuffer resuspendiert und in 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch 3 min Ultrabeschallung mit dem Sonifier GM300 (Bandelin) bei einer Pulsdauer von 50%. Die Ultrabeschallung wurde nach 10 min Kühlung des Ansatzes auf Eis wiederholt. Die Zellreste wurden 30 min bei 30000xg abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer zweiten Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde der Überstand in ein 50 ml Plastikröhrchen mit 0,5 ml gequollener GSH-Sepharose gegeben und 2 h auf Eis auf einem Schüttelinkubator unter leichtem Schütteln inkubiert. Die GSH-Sepharose wurde 1 min bei 9000xg abzentrifugiert und 3x mit Waschpuffer 1 gewaschen. Nach 2-maligem Waschen mit Waschpuffer 2 wurden die GST-Fusionsproteine mit 1,4 ml Elutionspuffer von der GSH-Sepharose gelöst. Die Inkubation wurde für 10 min auf Eis auf dem Schütteltisch, unter leichtem Schwenken durchgeführt. Durch Wiederholung der Elutionsprozedur kann die Ausbeute an GST-Fusionsprotein gesteigert werden. Die Proteinfraktionen konnten bei -20°C über längere Zeit gelagert werden. Über ein Polyacrylamidgel (4.6.1) und anschließender Färbung (4.6.2) wurden Menge sowie Reinheit und Degradation des Fusionsproteins analysiert.

<i>Lysispuffer:</i>	20 mM	Tris/HCl pH 8,0 (bei 25°C)
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	0,1% (v/v)	NP-40
<i>Waschpuffer 1:</i>	20 mM	Tris/HCl pH 8,0 (bei 25°C)
	1 M	NaCl
	1 mM	EDTA

Waschpuffer 2:	50 mM	Tris/HCl pH 8,0 (bei 25°C)
Elutionspuffer:	50 mM 20 mM	Tris/HCl pH 8,0 (bei 25°C) GSH (frisch angesetzt!)

4.6.8.2 Proteinexpression mit HIS-Fusionsanteil in *E.coli*

Proteinexpression

Zur Expression eines 6xHis-Fusionsproteins wurde das pET-Vektorsystem (Studier & Moffat, 1986 und Tabor & Richardson, 1985) verwendet. In diesem Expressionssystem werden Gene unter der Kontrolle des Bakteriophagen T7-Promotors exprimiert. Zusätzlich besitzt der Vektor einen lac-Operator und die Sequenz für den lac-Repressor. Unter Verwendung des *E.coli*-Stammes BL21(LysS), der das Gen für die Bakteriophage T7-Polymerase trägt, welche nur den T7-Promotor erkennt, kann die Expression des gewünschten Proteins mittels IPTG induziert werden.

Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agarplatten (inkl. Antibiotikum) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. 5 ml LB-Medium (inkl. Antibiotikum) wurde mit einer Bakterieneinzelkolonie inokuliert und ÜN inkubiert. Diese Kultur diente als Vorkultur für einen 1l Ansatz der bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert wurde. In der Phase des logarithmischen Wachstums erfolgte die Induktion mit IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM. Die Kulturen wurden weitere 3 h unter gleichen Bedingungen im Bakterienschüttler inkubiert.

Präparation des exprimierten Fusionsproteins

Die Bakterienkultur wurde in einen 1l Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 5000xg zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden auch hier auf Eis durchgeführt. Das Zellsediment wurde anschließend in 10 ml Sonifikationspuffer resuspendiert und ÜN bei -20° eingefroren. Nach dem Auftauen wurde der Puffer mit den Proteaseinhibitoren (siehe unten) komplementiert und die Bakterien zur vollständigen Lyse mit Ultraschall sonifiziert. Die Beschallung erfolgte mit dem Ultraschallstab (Sonifier GM300), auf Eiswasser, zunächst 1 min bei mittlerer Intensität und anschließend 4 min bei mittlerer Intensität und einer Pulsdauer von 50%. Nach dem Abkühlen (ca. 5 min) der Suspension wurde eine weitere Sonifikation von 2-3 min unter Pulsbetrieb angeschlossen. Unlösliche Bakterienbestandteile wurden in einem SS34-Rotor für 30 min bei 30000xg und 4°C abzentrifugiert, der Überstand aufbewahrt. Das Zellsediment wurde nochmals in 10 ml Sonifikationspuffer resuspendiert und die Sonifikationsprozedur wie oben beschrieben wiederholt.

Die Überstände wurden in einem 50 ml Plastikröhrchen vereinigt und mit 1 ml Ni-NTA-Agarose inkubiert, welche mit Sonifikationspuffer äquilibriert worden war. Nach 1 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler wurde 1 min bei 9000xg zentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Matrix 4x mit Waschpuffer gewaschen um unspezifisch gebundenes Material abzulösen. Die Elution des

gebundenen Fusionsproteins erfolgte in 2 Schritten mit je 5 ml Elutionspuffer, bei 4°C und einer Inkubation von 5 min auf dem Überkopfschüttler. Die Eluate wurden vereinigt und das überschüssige Reagenz (Imidazol) nach Überführen in einen Dialyseschlauch durch 3-malige Dialyse im Dialyse-Puffer entfernt. Die drei Dialyseschritte wurden in 500 ml 4°C kaltem Dialyse-Puffer für jeweils mind. 3h durchgeführt, wobei der Dialyse-Puffer bei jedem Schritt gewechselt wurde.

Die Proteinfractionen konnten bei -20°C über längere Zeit gelagert werden. Über ein Polyacrylamidgel (4.6.1) und daran anschließender Coomassie-Färbung (4.6.2) wurden Menge sowie Reinheit und Degradation des Fusionsproteins analysiert. In der Regel konnte mit dieser Aufreinigungsmethode eine Proteinkonzentration von ca. 1 mg/ml erreicht werden.

<i>Sonifikationspuffer:</i>	50 mM	Tris/HCl pH 8,0 (bei 25°C)
	0,3 M	NaCl
	100 µg/ml	Lysozymlösung (Stocklösung: 100 µg/ µl)
	6 µg/ml	Aprotinin
	6 µg/ml	Leupeptin
<i>Waschpuffer:</i>	50 mM	Tris/HCl (pH 6,0 bei 25°C)
	0,3 M	NaCl
	10% (v/v)	Glycerin
	10 mM	Imidazol
<i>Elutionspuffer:</i>	50 mM	Tris/HCl (pH 6,0 bei 25°C)
	0,3 M	NaCl
	10% (v/v)	Glycerin
	200 mM	Imidazol
<i>Dialyse-Puffer:</i>	50 mM	Tris/HCl (pH 6,0 bei 25°C)
	0,3 M	NaCl

4.6.9 Präparation von Gesamtzelllysaten

4.6.9.1 Gesamtzelllysate aus adhärennten COS7-Zellen mit NP-40 Lysispuffer

Vor der Lyse der adhärennten COS7-Zellen wurde das Medium von der 15 cm Kulturschale abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 10 ml 1x PBS versetzt. Mit Hilfe eines Plastikschabers wurden die Zellen vom Plattenboden abgelöst und in 15 ml Plastikröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 900xg wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment zur besseren Lyse der Zellen für 10 min bei -20°C eingefroren. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und mit 500 µl NP40-Lysispuffer resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis und mehrmaligem auf und ab pipettieren (unterstützt den Zellaufschluss durch Scherung) der Zellsuspension wurden die unlöslichen Zellreste bei 20800xg, 10 min bei 4°C abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und konnte kurzfristig bei 4°C gelagert werden. Zur längeren Aufbewahrung empfiehlt sich eine Lagertemperatur von -20°C.

<i>NP40-Lysispuffer:</i>	100 mM	Tris/HCl pH 8,0 (bei 25°C)
	150 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
	1% (v/v)	Nonidet P40 (NP40)
	40 µg/ml	PMSF

4.6.9.2 Gesamtzelllysate aus Suspensionszellen

Zur Lyse von Suspensionszellen wurden die Zellen in Zentrifugenbecher überführt und 5 min bei RT und 900xg sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit 1x PBS gewaschen und zur besseren Lyse der Zellen 10 min bei -20°C eingefroren. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und mit 500 µl NP40-Lysispuffer (siehe 4.6.9.1) resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis und mehrmaligem auf und ab pipettieren (unterstützt den Zellaufschluss durch Scherung) der Zellsuspension wurden die unlöslichen Zellreste bei 20800xg 10 min bei 4°C abzentrifugiert.

Für weitere Analysen wurde schließlich der Überstand abgenommen und kurzfristig bei 4°C, längerfristig bei -20°C gelagert.

4.6.10 Präzipitation und Detektion von (Fusions-)proteinen

4.6.10.1 Direktpräzipitation von Immunglobulin-Fusionsproteinen

Direktpräzipitationen von Immunglobulin clg-Fusionsproteinen (CH2+CH3 Domäne) wurde zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen (4.6.10.2) oder zur Protein-Expressionskontrolle durchgeführt. Der Vorteil der clg-Fusionsanteile liegt darin, daß sie praktisch quantitativ an Protein A bindet und über "Western-Blotting" (4.6.4) oder immunocytochemische Methoden (4.6.10.4) mit kommerziellen Antikörpern detektiert werden können.

Zur Direktpräzipitation von Ig-Fusionsproteinen wurden Gesamtzelllysate (4.6.9) eingesetzt. In der Regel wurden 500 µl Gesamtzelllysate mit 30 µl Matrix-gekoppelten Protein-A (Pharmacia) versetzt und 2 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Bindungskapazität der Protein A-Sepharose beträgt laut Herstellerangaben 10 µg humanes Immunglobulin pro 1 µl Protein A-Sepharose, so daß ein Überschuss an Protein A vorlag und eine quantitative Präzipitation der Fusionsproteine gewährleistet war.

Nach beendeter Präzipitation wurde der Protein-Matrix-Komplex 1 min bei 900xg und 4°C abzentrifugiert und 3-4 mal mit 1 ml des Puffers gewaschen, der im folgenden Experiment verwendet wurde. Im Falle einer anschließenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.6.1)

wurde mit 1xPBS gewaschen, das Präzipitat nach beschriebener Zentrifugation mit 40 µl 1xPBS und 20µl 3x Auftragspuffer (siehe 4.6.1) versetzt und der Ansatz 5 min bei 95°C aufgekocht.

4.6.10.2 In vitro Präzipitationsstudien

Mit *in vitro* Präzipitationsstudien wurden in dieser Arbeit Interaktionen zwischen Fusionsproteinen analysiert. Hierzu wurden entweder beide potentielle Interaktionspartner als Fusionsproteine (Ig-Tag und Flag-Tag) in COS7-Zellen (4.2.2) oder Jurkat E6 (4.2.3) Zellen überexprimiert, wie beschrieben (4.6.9.1, 4.6.9.2, 4.6.10.1) aufgearbeitet und anschließend über die „Western-Blot“-Technik (4.6.4, 4.6.5) analysiert.

Eine weitere Ansatz bestand darin, das überexprimierte clg-Fusionsprotein aus einem Gesamtzelllysat heraus an Protein A-Sepharose (6MB-Matrix) zu immobilisieren (4.6.10.1) und den potentiellen Interaktionspartner als aufgereinigtes Fusionsprotein (His- oder GST-Tag) zuzugeben.

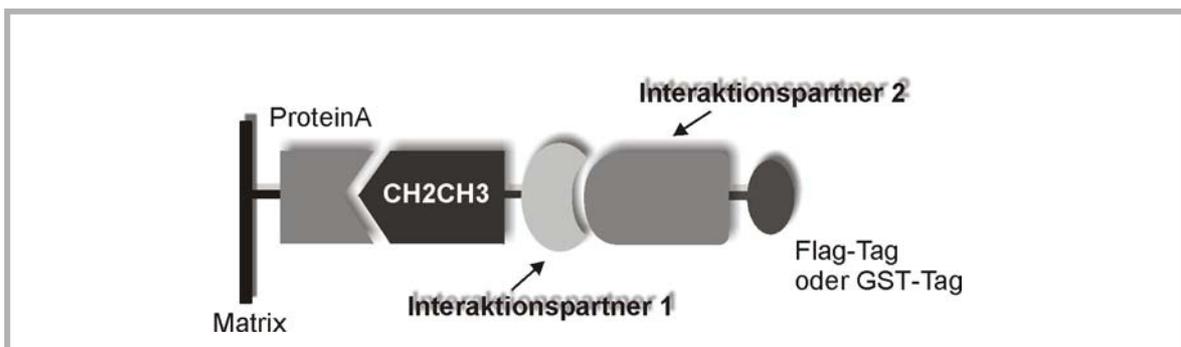


Abb. 14: Schematische Darstellung des *in vitro* Präzipitationsansatzes mit clg-Fusionsproteinen über Protein A-Sepharose.

Der Protein/Matrix-Komplex wurde in 500 µl Tween 20-Puffer äquilibriert, mit 10 µg des zu testenden Interaktionspartner (eingesetzt als His- oder GST-Fusionsprotein) versetzt und 1 h bei RT am Drehrad inkubiert. Die Protein-A-Matrix wurde 4x mit jeweils 1 ml 1xPBS + 0,05% Tween gewaschen. Wurden präzipitierte Fusionsproteine anschließend über ein SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.6.1) analysiert, so wurde die Matrix mit 3x Auftragspuffer (siehe 4.6.1) versetzt und der Ansatz 5 min bei 95°C aufgekocht.

<i>Tween20-Puffer:</i>	100 mM	Tris/HCl pH 7,5 (bei 25°C)
	1 mM	MgCl ₂
	0,1 mM	CaCl ₂
	50 mM	NaCl
	0,2% (v/v)	Tween20
	40 µg/ml	PMSF
	20 µg/ml	Aprotinin
	20 µg/ml	Leupeptin

4.6.10.3 Koimmunpräzipitation von Proteinen

Koimmunpräzipitationsanalysen wurden in dieser Arbeit durchgeführt, um die endogene Interaktion von Cytohesin-1 und CYTIP zu dokumentieren. Das Präzipitationsprotokoll orientierte sich dabei an der von S. Godar entwickelten Methode (Kolanus *et al.*, 1996).

Immobilisierung des präzipitierenden Antikörpers auf Zellkulturplastik

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Falcon, Nr. 3911) wurde mit 50 µg/ml eines Ziege-anti-Ratte-IgG-Antikörpers 1,5 h bei RT inkubiert (50 µl/Well). Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte dabei in 50 mM Tris/HCl (pH 9,5). Die Mikrotiterplatte wurde 3x mit 50 mM Tris/HCl (pH 9,5) gewaschen und anschließend mit dem Hybridomüberstand des monoklonalen Ratte-anti-Cytohesin-Antikörpers (7H2 oder 2D7) in einer 1:10-Verdünnung in 50 mM Tris/HCl (pH 9,5), 2-3 h auf Eis inkubiert. Die Platte wurde wiederum 3x mit 50 mM Tris/HCl (pH 9,5; eiskalt) gewaschen und unspezifische Bereiche mit 1% (w/v) BSA/PBS 1 h auf Eis blockiert. Nachdem die Platte 1x mit dem zur Zellyse verwendeten Puffer gewaschen worden war, wurde sie unverzüglich zur Koimmunpräzipitation von Proteinen eingesetzt.

Koimmunpräzipitation

Jurkat E6 Zellen, 721-Zellen oder PBMCs wurden in Lysispuffer (4.6.9.2), in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml lysiert und das Gesamtzelllysat in einer immobilisierte Mikrotiterplatte, inkubiert (3 h auf Eis, jeweils 50 µl Zelllysat pro Well). Die Platte wurde 3x mit Lysispuffer gewaschen und die präzipitierten Proteine durch je 6 µl 1x SDS-Probenpuffer/Well von der Matrix gelöst. Jeweils der Inhalt von vier Wells eines identischen Präzipitationsansatzes wurde vereinigt, die Proben 5 min bei 95°C inkubiert und die Proteine mittels SDS-PAGE (4.6.1) und Western-Blot (4.6.4, 4.6.5) analysiert.

4.6.10.4 Detektion exprimierter Fusionsproteine mittels Durchflußzytometrie

Zur Expressionskontrolle kam neben der Detektion immobilisierter Proteine auf Nitrozellulosemembranen (4.6.5) die fluoreszenzaktivierte Zelltrennung (FACS = fluorescence activated cell sorting) zur Anwendung. Mit dieser Methode können extrazellulär, als auch intrazellulär exprimierte Proteine im intakten Zellverband detektiert werden.

Zur Quantifizierung der Oberflächenexpression eines Proteins wurden die Zellen in der Regel nicht fixiert und permeabilisiert, sondern 3×10^6 Zellen 3 min bei 900xg in einem 15 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert, in 5 ml 1xPBS gewaschen und in 1 ml 2% FCS/1xPBS (v/v) aufgenommen. Zur Anfärbung des Zelloberflächenproteins wurde ein spezifischer Antikörper in einer geeigneten Verdünnung (3.8.1) eingesetzt und die Suspension 1 h bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 5 ml kaltem 1xPBS gewaschen und für eine weitere Stunde abgedunkelt bei 4°C mit sekundären

FITC-konjugierten Antikörper (3.8.2) inkubiert. Abschließend wurde ein weiteres mal mit 5 ml kaltem 1xPBS gewaschen, in 1 ml 1xPBS gut resuspendiert und die Probe durchflußzytometrisch (Coulter Epics XL) analysiert.

Zur Quantifizierung der Expression eines intrazellulär exprimierten Proteins wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, um den Eintritt des Antikörpers zu gewährleisten. Hierzu wurden gewaschene Zellen mit 1 ml 2% Formaldehyd/1xPBS (v/v) für 30 min bei RT fixiert, 3 min bei 900xg sedimentiert und überschüssiges Formaldehyd mit 2 ml 2% Glycin/1xPBS (w/v) zur Reaktion gebracht. Nach erneutem Waschen mit 5 ml 1xPBS wurden die Zellen zur Permeabilisierung 10 min mit 0,2% Triton/1xPBS (v/v) inkubiert, mehrmals mit 1xPBS gewaschen und wie oben beschrieben mit den geeigneten Antikörpern behandelt.

eGFP (enhanced green fluorescent protein) exprimierende Zellen wurden in der Regel unfixiert in 1xPBS aufgenommen und durchflußzytometrisch analysiert (Coulter Epics XL). Die Bestimmung der Expressionsrate und -effizienz von Antigenen erfolgte automatisch mit einem Steuerungsprogramm, meist in Form eines Histogramms von Zellzahl und logarithmischer Fluoreszenzintensität.

4.6.11 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie ermöglicht die Analyse der Proteinexpression und die genaue Lokalisierung von Proteinen in einzelnen Zellen. Analog der Durchflußzytometrie erfolgt die Protein-Markierung mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern oder über eGFP-Fusionsproteinen (enhanced green fluorescent protein). Um Adhäsionsvorgänge untersuchen zu können, wurden die Zellen auf verschiedenen beschichteten Objektträgern zur Adhäsion gebracht. Es kamen folgend beschichtete Objektträger zur Anwendung:

poly-L-Lysin:

Diese Objektträger sind bei der Firma Sigma käuflich zu beziehen und wurden als unspezifischer Bindungsuntergrund verwendet. Mit einem Fettstift konnten die Objektträger in einzelne Felder unterteilt werden, was eine Auftragung mehrerer, voneinander verschiedener Färbeansätze ermöglichte.

Fibronektin:

Objektträger (Marienfeld) wurden mittels eines Fettstiftes in Partien unterteilt und Fibronektin in einer Endkonzentration von 100 ng/ μ l in 1xPBS aufgetragen und für 1-2 h bei RT inkubiert. Die Lösung wurde mit einer feinen Kapillare abgesaugt und unspezifische Proteinbindungsstellen mit 1% BSA/1xPBS für 1 h bei RT abgesättigt, abschließend 3x mit 1xPBS gewaschen.

Fc-ICAM-1:

Vorbereitete Objektträger wurden 1 h mit Ziege-anti-Mensch-IgG₁-Antikörper in 50 mM Tris pH 9,5 (1:100) inkubiert. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden mit 1% BSA/1xPBS für 1 h bei RT abgesättigt, der Objektträger dann 3x mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde lösliches Fc-ICAM-1 (1:5 in DMEM) für 2 h bei RT inkubiert, abschließend abgenommen und der Objektträger wieder 3x mit 1xPBS gewaschen.

Das ICAM-1-F_c-Fusionsprotein (Kolanus *et al.*, 1996) wurde durch Überexpression über einen rekombinanten Vaccinia-Virus erhalten, wobei das Protein von den infizierten Zellen sezerniert und der resultierende Zellüberstand ohne weitere Aufreinigung des ICAM-1 verwendet wurde.

Pro Färbeansatz wurden ca. 1×10^6 Zellen für 3 min bei 900xg sedimentiert und in 1 ml HBSS aufgenommen. Man liess dann eine geeignete Menge Zellen für 30 min - 1 h bei 37°C auf dem präparierten Untergrund adhären und wusch anschließend nicht adhären Zellen vorsichtig mit HBSS ab. Zur Fixierung der adhären Zellen wurden die Objektträger für 15 min mit einer 2%-igen (w/v) Lösung von Paraformaldehyd in 1xPBS überschichtet, freie reaktive Gruppen für 1 h mit einer 2%-igen (w/v) Lösung von Glycin in 1xPBS abgesättigt und die Zellen 10 min mit 0,2 (v/v) Triton X-100 in 1xPBS permeabilisiert. Eine geeignete Verdünnung von Antikörper (3.8) wurde daraufhin in 2% FCS/1xPBS für 1 h bei RT inkubiert. Nach 3x Waschen mit 1xPBS wurden die Zellen für eine weitere Stunde mit einem sekundärem Antikörper inkubiert. Die verwendeten sekundären Antikörper waren in der Regel mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC, Texas Red oder TRITC markiert. Diese Farbstoffe können zur Fluoreszenz angeregt werden und somit im UV- oder Lasermikroskop sichtbar gemacht werden. Nach einem weiteren Waschschrift (3x mit 1xPBS) wurde die Flüssigkeit möglichst vollständig abgenommen und die Zellen mit "mounting"-Medium (Vector Laboratories) überschichtet, um ein zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Auf den Objektträger wurde ein Deckglas (Marienfeld) gelegt und die Ränder der beiden Glasplatten mit Nagellack abgedichtet, um ein Austrocknen der Probe zu unterbinden. Die Proben wurden anschließend mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leica TCS/NT) analysiert.

4.7 Funktionale Analysen

4.7.1 LFA-1 vermittelten Zelladhäsion an immobilisiertes ICAM-1-F_c

Die funktionale Charakterisierung der LFA-1 vermittelte Adhäsion an immobilisiertes ICAM-1-F_c - Fusionsprotein wurde mittels Fluoreszenzfärbung analysiert. Als LFA-1-Ligand diente hierbei ein lösliches Fusionsprotein von ICAM-1, ICAM-1-F_c, das sich aus der extrazellulären Domäne von ICAM-1 zusammensetzte, die über eine Hinge-Domäne N-terminal an die CH2- und CH3-Domäne von humanem IgG₁ fusioniert war (Kolanus *et al.*, 1996). Zellen wurden mit verschiedenen Stimuli behandelt und die Überexpression (4.2.4.6) verschiedener Proteine und Mutanten in der LFA-1 vermittelten Zelladhäsion analysiert.

Immobilisierung von ICAM-1-F_c -Fusionsprotein an Plastik

Die gewünschte Anzahl von Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorp/96-Well) wurde mit jeweils 50 µl eines Ziege-anti-Mensch-IgG Antikörpers (Fc_γ-spezifisch/Dianova) in einer 1:100 Verdünnung in 50 mM Tris/HCl (pH 9,5) 1,5 h bei RT präinkubiert. Nach 2x Waschen mit 50 mM Tris/HCl (pH 9,5) wurden noch freie Bindungsstellen auf der Plastikoberfläche mit 1% BSA/1xPBS (w/v) abgesättigt. Nach dieser einstündigen Behandlung wurde 1x mit 1xPBS gewaschen und anschließend die Mikrotiterplatte mit 80 µl/Vertiefung einer ICAM-1-F_c-Fusionsprotein-Lösung (1:10 in DMEM) für 1 h inkubiert, wobei das ICAM-1 über seinen Immunglobulin-Fusionsanteil an den anti-Human-IgG Antikörper bindet. Abschließend wurde überschüssiges Protein durch 1x Waschen mit HBSS (37°C) entfernt und die Platte für die Adhäsionsanalysen eingesetzt.

Präparation von ICAM-1-F_c -Fusionsprotein

Das ICAM-1-F_c-Fusionsprotein (Kolanus *et al.*, 1996) wurde durch Überexpression eines rekombinanten Vaccinia-Virus erhalten, wobei das Protein von den infizierten Zellen ins Medium sezerniert wird und der resultierende Zellüberstand ohne weitere Aufreinigung des ICAM-1-F_c verwendet wurde.

Analyse der Zelladhäsion

Die zu analysierenden Zellen wurden zur Fluoreszenzmarkierung mit dem Farbstoff Bisbenzimid H33342 Fluorochrom-trihydrochlorid (Calbiochem) in einer Endkonzentration von 12 µg/ml in DMEM-Medium für 30 min bei 37°C gefärbt. Wurden die Zellen zur Integrinaktivierung mit Agenzien (z.B. PMA, TNF, usw.) stimuliert konnten diese während der Färbung zugegeben werden. Die Zellen wurden anschließend bei 900xg für 5 min sedimentiert und das Zellsediment derart in HBSS (37°C) resuspendiert, daß eine Konzentration von 150000 Zellen/100 µl Puffer resultierte.

Die Adhäsion erfolgte je nach Zelltyp 30 min - 1 h bei 37°C. Nicht adhärenente Zellen wurden durch vorsichtiges Waschen mit HBSS (37°C) entfernt und der Prozentsatz adhärenente Zellen über deren resultierenden Fluoreszenzstrahlung mit einem Fluoreszenz-Meßgerät (Cyto-FluorII) bestimmt. Pro Versuchsansatz wurden in der Regel vier Vergleichswerte gemessen. Als Referenzwert (100%) der maximal möglichen Fluoreszenzstrahlung galt dabei jeweils die Fluoreszenzstrahlung der ursprünglich eingesetzten Gesamtzellmenge.

4.7.2 *In vitro* Phosphorylierung von Ig-CYTIP mittels PKC α/δ

In dieser Arbeit wurde neben der *in vivo* Phosphorylierung von Proteinen durch PKCs, die mittels PMA induziert wurden, auch *in vitro* Experimente durchgeführt, in die gezielt unterschiedliche PKCs eingesetzt wurden.

COS7 Zellen wurden transient durch DEAE-Dextran/Chloroquin Transfektion (4.2.2) mit einer für Ig-CYTIP codierten c-DNA transfiziert, nach der Zellernte im hypotonischem Puffer resuspendiert und mechanisch durch eine dünne Spritzenkanüle geschert. Zur Entfernung der Zellkerne und unlöslicher Komponenten wurden die Proben bei 21000xg für 15 min zentrifugiert. 50 μ l der cytoplasmatischen Fraktion wurden mit dem PKC-Reaktionspuffer versetzt und bei 30°C für 2 h inkubiert.

<i>Hypotonischer Puffer:</i>	10 mM	HEPES pH7,5 (bei 25°C)
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	KCl
	0,5 mM	DTT

Puffer möglichst frisch ansetzen!

Kurz vor Gebrauch werden weiterhin zugegeben:

10 μ g/ml Leupeptin
 10 μ g/ml Aprotinin
 2 μ g/ml Benzamidin
 1 mM PMSF

<i>PKC-Reaktionspuffer:</i>	50 mM	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH7,5 (bei 25°C)
	10 mM	HEPES
	10 mM	MgCl ₂
	0,1 mM	EGTA
	10 μ g/ml	Phosphatidylserin
	20 μ g/ml	PMA
	2 mM	ATP
	0,05%	Nonidet P-40
	20 μ g/ml	PKC α oder PKC δ

4.7.3 Dephosphorylierung von Ig-CYTIP *in vitro*

Jurkat E6 Zellen oder COS7-Zellen wurden mit Ig-CYTIP transfiziert (4.2.2, 4.2.3) und eine Stunde vor der Zellernte mit 40 ng/ml PMA stimuliert. Zur Lyse der Zellen und Präzipitation von Ig-CYTIP an Protein A-Sepharose wurde wie in Abschnitt 4.6.9 und 4.6.10.1 beschrieben vorgegangen.

Vor der Gelelektrophorese wurde den Proben 5 Units alkalische Phosphatase pro 50 μ l Präzipitationsansatz zugesetzt und die Proteine nach dem Gellauf (4.6.1) anschließend im Immunoblot (4.6.4, 4.6.5) visualisiert.

4.7.4 Phosphorylierung von rekombinantem 6xHis-Fusionsprotein *in vitro*

Zur Phosphorylierung von gereinigtem 6xHis-Cytohesin-1 wurden folgende Reagenzien in einem geeigneten Reaktionsgefäß mit der Proteinkinase C (PKC δ) für 60 min bei 30°C inkubiert.

100 μ g/ml	Proteinsubstrat
10 mM	HEPES
50 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
0,1 mM	EGTA
200 μ g/ml	Phosphatidylserin
20 μ g/ml	PMA
200 μ M	ATP
0,05 % (v/v)	Nonidet P-40 (NP-40)
1 μ g/ml	PKC δ
	bei pH 7,5

4.7.5 GDP/GTP-Austausch *in vitro*

Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) können in verschiedenen Aktivierungszuständen auftreten. In einem inaktiven, GDP-bindenden oder einem aktiven GTP-bindenden Zustand. Der Austausch von gebundenen GDP gegen GTP wird durch sog. Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysiert. Im Gegenzug katalysieren sog. GTPase-Aktivierungsproteine (GAPs) die Hydrolyse des gebundenen GTP, wodurch das G-Protein wieder in seinen inaktiven Zustands übergeht. Hydrolyse-beständige Analoga des GTP, wie beispielsweise GTP γ S, halten G-Proteine in einem permanent aktivierten Zustand und können daher eingesetzt werden, um die GEF-Aktivität von Proteinen zu bestimmen.

Der Guanin-Nukleotid-Austausch wurde in Anlehnung an das Verfahren von Cherfils (Cherfils *et al.*, 1998) durchgeführt.

4.7.5.1 Liposomen-Präparation

Als Membransurrogat des *in vitro* Guanin-Nukleotid-Austausches (4.7.5.2) dienten unilamelare Vesikel. Der Vorteil dieses künstlichen als Liposomen bezeichneten Membranvesikel besteht darin, daß die Zusammensetzung der Membranlipide sowie der Inhalt des Lumen genau definiert werden kann. Die nach dem modifizierten Protokoll von Szoka und Papahadjopoulos (1978) verwendete Methode wird als die "Reversphase Evaporationsmethode" bezeichnet und bedient sich dem Prinzip einer "Wasser in Öl"-Emulsion.

Hierzu wurden 7 mg L- α -Phosphatidylchol- β -palmitoyl- γ -oleoyl (Sigma) und 3 mg Dioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (Sigma) zusammen mit 15 mg des Detergenzes Octyl- β -D-Thioglucopyranosid in Chloroform/Methanol (1:2)-Lösung aufgenommen und in einen Glaskolben überführt. Unter ständigem Drehen wurde in einem Vakuum-Rotationsverdampfer das organische Lösungsmittel für 2 h vollständig abgedampft, so daß sich an der Glaswand eine gleichmäßige, dünne Schicht der Phospholipide absetzte. Der Glaskolben wurde mit 1 ml des Liposomen-Puffers versetzt und unter heftigem Schütteln die Lipide in der wässrigen Phase aufgenommen, wobei sie unilamelare Vesikel ausbilden sollten. Das überschüssige Detergenz wurde nach Überführen der primären Liposomen-Präparation in einen Dialyseschlauch durch 3-malige Dialyse im Liposomen-Dialyse-Puffer entfernt. Die drei Dialyseschritte wurden dazu in jeweils 500 ml 4°C kaltem Liposomen-Dialyse-Puffer für 1 h, 2 h und ÜN durchgeführt, wobei der zuvor verwendete Dialysepuffer vollständig ausgetauscht wurde.

<i>Liposomen-Puffer:</i>	10 mM	HEPES pH 7,4 (bei 25°C)
	80 mM	KCl
	15 mM	NaCl
	0,7 mM	NaH ₂ PO ₄
	1 mM	EGTA
	50 mM	n-Octyl- β -D-glycopyranosid
<i>Liposomen-Dialyse-Puffer:</i>	10 mM	HEPES pH 7,4 (bei 25°C)
	80 mM	KCl
	15 mM	NaCl
	0,7 mM	NaH ₂ PO ₄
	1 mM	EGTA

4.7.5.2 Durchführung des GDP/GTP-Austausch *in vitro*

In dieser Arbeit wurde die Analyse des GDP/GTP-Austausches benutzt, um die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 auf ARF1 und der Einfluß von CYTIP-1 auf diese Reaktion *in vitro* zu untersuchen. Hierzu wurden konfluenten COS-7m Zellen (auf 15 cm-Kulturschalen) mit rekombinanten Vaccinia-Viren (Ig-CYTIP) infiziert (4.2.4.6) und für 15-20 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 96% relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit begannen die Zelle

sich abzurunden und leicht von der Zellkulturschale abzulösen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber mechanisch von der Unterlage gelöst und in einem geeigneten 15 ml Gefäß bei 900 xg sedimentiert. Nach zweimaligen Waschen mit 1xPBS wurde das Zellpellet in 500 µl kaltem Lysepuffer aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis für 10 min vollständig lysiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden bei 20800xg für 5 min bei 4°C sedimentiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation des Fusionsproteins wurde zu je 500 µl Lösung 30 µl in Lysispuffer voräquilierte Protein A/6MB-Sepharose zugefügt und 2 h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die immobilisierten Proteine wurden 3x mit je 1 ml kaltem Lysepuffer gewaschen um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Zum Äquilibrieren wurde die Protein A-Matrix in 50 µl kalter GDP/GTP-Austausch-Puffer aufgenommen, zu den jeweiligen Ansätzen 2 µM myristoyliertes ARF1-Protein (Chardin, Paris), 100 nM Cytohesin-1 oder phosphoryliertes Cytohesin-1 (4.7.4) und 16 µl/ml der Liposomen-Präparation (4.7.5.1) zugegeben. Die Reaktion wurde auf ein Gesamtvolumen von 200 µl mit GDP/GTP-Austausch-Puffer eingestellt, durch Zugabe von 1 µCi [³⁵S]GTP_γS gestartet und die Reaktion bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach definierter Reaktionsdauer (1, 2, 4 und 8 min) wurde je Ansatz 40 µl der Probe entnommen und auf Nitrozellulose appliziert, die in GDP/GTP-Stopp-Puffer vorinkubiert worden war. Die Nitrozellulose wurde folgend 3x mit GDP/GTP-Stopp-Puffer vorsichtig gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in Haushaltsfolie verpackt und die verbliebene Radioaktivität auf der Nitrozellulosemembran mittels eines Phospho-Imager (Molekular Dynamics) quantifiziert.

GDP/GTP-Austausch-Puffer:

50 mM	HEPES pH 7,5 (bei 25°C)
1 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT

GDP/GTP-Stopp-Puffer:

20 mM	HEPES pH 7,5 (bei 25°C)
100 mM	NaCl
10 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT

Lyse-Puffer:

100 mM	Tris/HCl pH 8,0 (bei 25°C)
150 mM	NaCl
2 mM	EDTA pH 8,0 (bei 25°C)
1% (v/v)	Triton-X-100
40 µg/ml	PMSF
20 µg/ml	Aprotinin
20 µg/ml	Leupeptin

4.7.6 Zellzyklusexperiment

Betrachtet man einen Pool von *in vitro* kultivierten Zellen, so befinden sich diese in den unterschiedlichsten Zellzyklusphasen. Um die Expression einzelner Proteine in einer diskreten Stelle des Zellzyklus untersuchen zu können, ist eine Synchronisation des Zellwachstums notwendig. In Anlehnung an das von Everett *et al.* (1999) beschriebene Protokoll wurde der Zellzyklus durch sequenzielle Thymidin/Aphidicolin Behandlung synchronisiert. Durch hohe Thymidinkonzentrationen wird die DNA-Synthese in der S-Phase durch Blockierung der Ribonukleotid Reduktase, ein Enzym welches Ribonukleotide in Desoxyribonukleotide konvertiert, gehemmt (Wawra, 1988).

Aphidicolin, ein Diterpen, welches aus dem Pilz *Cephalosporium aphidicola* gewonnen wird, stellt einen reversiblen Inhibitor für die DNA-Polymerase- α , $-\delta$ und $-\epsilon$ (Oguro *et al.*, 1979) dar und arretiert den Zellzyklus in der G1/S Phasengrenze.

$1,5 \times 10^7$ Jurkat E6 Zellen wurden mittels Elektroporation (4.2.3) mit Plasmid-DNA transfiziert und über Nacht in einem Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO₂, 96% relative Luftfeuchtigkeit) in 5 ml DMEM/10% FCS inkubiert. Die Zellen wurden bei 900xg sedimentiert und 2x mit DMEM/10% FCS gewaschen. Alle weiteren im Verlauf des Protokolls durchgeführten Waschschriffe wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in 5 ml DMEM/10 % FCS aufgenommen, welches mit 2 mM Thymidin supplementiert worden war und für 12 h bei 37°C weiterinkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, 2x gewaschen und für 12 h mit 5 ml 0,025 mM Thymidin/0,025 mM Desoxycytidin in DMEM/10% FCS versetzt. Nach einem weiteren Waschschriffe wurden die Zellen mit 2,5 µg/ml Aphidicolin in DMEM/10% FCS inkubiert. Nach 14 h Inkubationsdauer wurde ein weiteres mal gewaschen und die Zellen in DMEM/10% FCS resuspendiert. Die Zellen wurden weiterkultiviert und nach 0, 3, 6, 12 und 24 Stunden jeweils 0,5 ml Aliquots abgenommen, und direkt auf beschichtete Objektträger (siehe 4.6.11) zur Adhäsion gebracht. Der Überstand wurde vom Objektträger abgezogen, die Zellen 2x mit 1xPBS gewaschen und mit 2% para-Formaldehyd/1xPBS für 10 min fixiert. Nach einem weiteren Waschschriffe (3x mit 1xPBS) wurde die Flüssigkeit möglichst vollständig abgenommen, die Zellen mit "mounting"-Medium (Vector Laboratories) überschichtet, um ein zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern und mit einem Deckglas abgedeckt.

In dieser Arbeit wurden zur Visualisierung GFP-Plasmidkonstrukte verwendet, so daß eine Anfärbung der überexprimierten Proteine nicht notwendig war und die exprimierten Fusionsproteine direkt mit einem UV-Mikroskop analysiert werden konnten.

4.7.7 Untersuchung von Zellmigrationseffekten

Eine wichtige Eigenschaft der Immunzellen ist die Zirkulation im Blutkreislauf und lymphatischen System sowie die gezielte Adhäsion an die endotheliale Kapillarwand, der Diapedese und der anschließenden Transmigration der Zellen zu einem Entzündungsherd. Dirigiert werden die Immunzellen dabei durch Freisetzung einer Reihe von Cytokinen, wie z.B. Interleukin-8 (IL-8) oder den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Aber auch andere Mediatoren wie z.B. Histamine, Leukotrine (LTB₄) und auch Entzündungsvermittler des Komplementsystems (C5a) werden ausgeschüttet und führen zur Aktivierung von weiteren Mechanismen.

Für *in vitro* Studien verwendet man zur Simulation von Migrationseffekten die „Boyden-Kammer“.

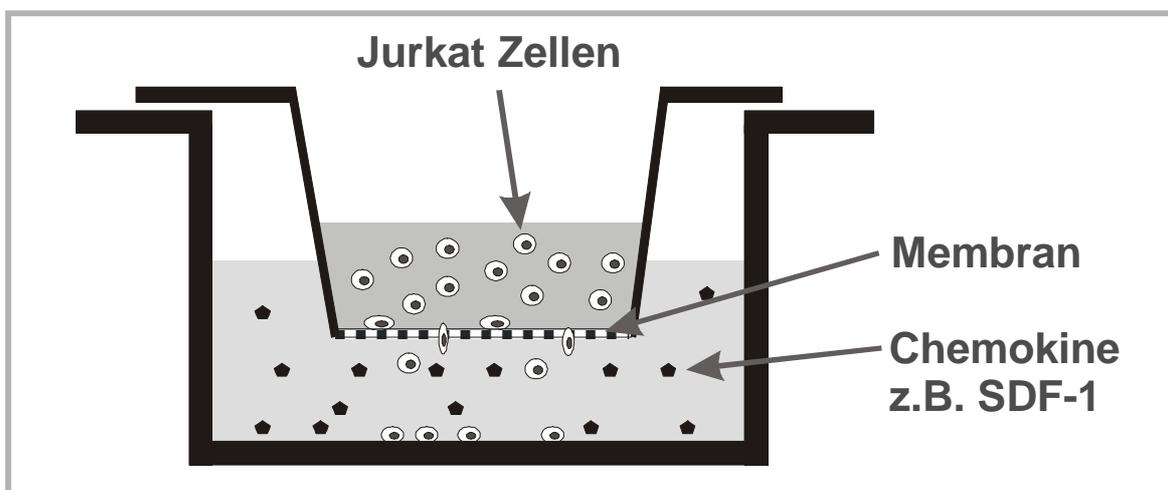


Abb. 15: Schematische Darstellung der „Boyden-Kammer“.

Als Reservoir dient eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen (24-well), in die Lösungen mit bzw. ohne Reagenzien vorgelegt werden. In diese Vertiefung wird eine Einsatz eingelegt, dessen Boden aus einer Polycarbonat-Membran (Porengröße 5,0 μm) besteht. Die Membran muß in die Lösung des Reservoirs eintauchen, um einen vollständigen Kontakt zum Einsatz zu gewährleisten. Der Boyden-Chamber Einsatz kann dann mit Zellsuspensionen gefüllt werden.

Der Aufbau besteht aus 2 Kammern, die durch eine Polycarbonat-Membran voneinander getrennt sind. Die untere Kammer wird mit einer Lösung befüllt, die u.a. Chemokine enthalten kann. Das obere Reservoir versetzt man mit einer Zellsuspension und inkubiert den Aufbau für mehrere Stunden. Zellen die z.B. auf Chemokine reagieren, transmigrieren durch die Membran in Richtung des Chemokins und werden in der unteren Kammer gesammelt. Anschließend zählt man die transmigrierten Zellen aus und setzt sie ins Verhältnis zur eingesetzten Gesamtzellzahl.

Die Methode wurde in Anlehnung an das Protokoll von Weber *et al.* 2001 durchgeführt. 100 ng/ml SDF-1 wurden in 600 μl 1xPBS in einer 24-well Platte vorgelegt und anschließend die „Boyden-Kammer“ eingesetzt. 8 Mio. transfizierte (4.2.3) Jurkat Zellen wurden in 150 ml 1xPBS aufgenommen und in das obere Reservoir eingefüllt. Nach einer Inkubation von 6 h bei 37°C wurden die Zellen in beiden Kammern resuspendiert und in zwei 15 ml Reaktionsgefäße überführt.

Die Zellen wurden anschließend wie in Kapitel 4.6.10.4 beschrieben fixiert, mittels Antikörper gefärbt und durchflußzytometrisch vermessen.

4.8 Computerarbeiten

Zur Anfertigung dieser Arbeit wurde ein PC-Computer mit dem Textverarbeitungsprogramm Word 2000 verwendet. Bilder wurden mit Adobe Photoshop 6.0, Graphiken mit Freehand 5.0 und Corel Draw 8.0 bearbeitet.

5 Ergebnisse

5.1 Identifikation des intrazellulären Proteins CYTIP

Unreife dendritische Zellen (DC) sind Leukozyten, die in den meisten Geweben und Organen aufzufinden sind. Sie wandern durch die Peripherie, tasten ihre Umgebung ab und halten Antigene an ihrer Zelloberfläche fest. Durch Entzündungsreaktionen (z.B. virale Infektion) oder durch Antigenbindung werden diese Zellen stimuliert und machen einen Reifungsprozess durch. Die Zellen migrieren in lymphatische Gewebe, wo sie Antigene den T-Zellen präsentieren. Antigene von extra- und intrazellulären Pathogenen werden hierzu auf MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Aufgrund dieser Tatsache und aufgrund ihrer Fähigkeit aktivierende Signale auszusenden, bezeichnet man die dendritischen Zellen zusammen mit den Makrophagen und den B-Zellen als „professionell antigenpräsentierenden Zellen“ (APC).

Gereifte DC besitzen eine spektakuläre, durch Plasmamembranprotrusionen gekennzeichnete Morphologie und treten ausschließlich in den T-Zellbereichen der lymphatischen Gewebe auf, wo sie auch als „interdigitierende retikuläre Zellen“ bezeichnet werden.

Das erste Zusammentreffen einer naiven T-Zelle mit einem Antigen auf einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle führt zu einer primären Immunantwort, der Aktivierung der T-Zelle und erzeugt gleichzeitig ein immunologisches Gedächtnis, das einen Schutz vor nachfolgenden Angriffen der gleichen Pathogene bietet.

In Kollaboration mit C. Heufler (Department of Dermatology, Innsbruck, Austria) suchten wir mittels differentieller Analysen nach unbekanntem Molekülen, die während der Reifung dendritischer Zellen auf mRNA-Ebene in ihrer Expression reguliert werden. Dazu wurden *in vitro* generierte dendritische Zellen verwendet, die aus einer lymphspezifischen Monozyten-Vorläuferzelle durch Zugabe der Cytokine IL-4 und GM-CSF gewonnen werden können. Eine stimulierte Reifung der Zellen wurde durch Kultivierung in MEM-Medium (monocyte-conditioned-medium) und Zugabe von Cytokinen (IL-1 β , IL-6, TNF- α) und Prostaglandin E2 erreicht. Im Zuge dieser Analysen wurde ein bislang unbekanntes cytoplasmatisch exprimiertes Molekül identifiziert, welches während der Reifung dendritischer Zellen signifikant hochreguliert wird. Mit Hilfe von „Yeast-Two-Hybrid“-Analysen (vgl. 4.3.1) konnte überraschenderweise Cytohesin-1 als spezifischen Interaktor identifiziert werden.

„Cytohesin-1-Interacting-Protein“ (CYTIP) wie auch Cytohesin-1 werden in maturierten dendritischen Zellen verstärkt exprimiert. Dieses Ergebnis konnte auf mRNA-Ebene (vgl. Abb. 16/B) und auf Proteinebene (vgl. Abb. 16 C/D) durch Detektion mit spezifischen Antikörpern gegen Cytohesin-1 und CYTIP verifiziert werden. Interessanter Weise ist in nicht-maturierten

dendritischen Zellen die Cytohesin-1 Menge höher als die von CYTIP. In maturierten Zellen verhält sich das Mengenverhältnis reziprok (vgl. Abb. 16/B).

CYTIP wird weiterhin sehr stark in den Lymphknoten, in der Milz und den peripheren Blutleukozyten (PBL) exprimiert (Boehm *et al.*, 2003). Im Knochenmark und im Thymus ist nur eine schwache Expression, in der fetalen Leber keine Expression messbar. In nicht-hämatopoetischen Zellen ist CYTIP jedoch nicht nachweisbar.

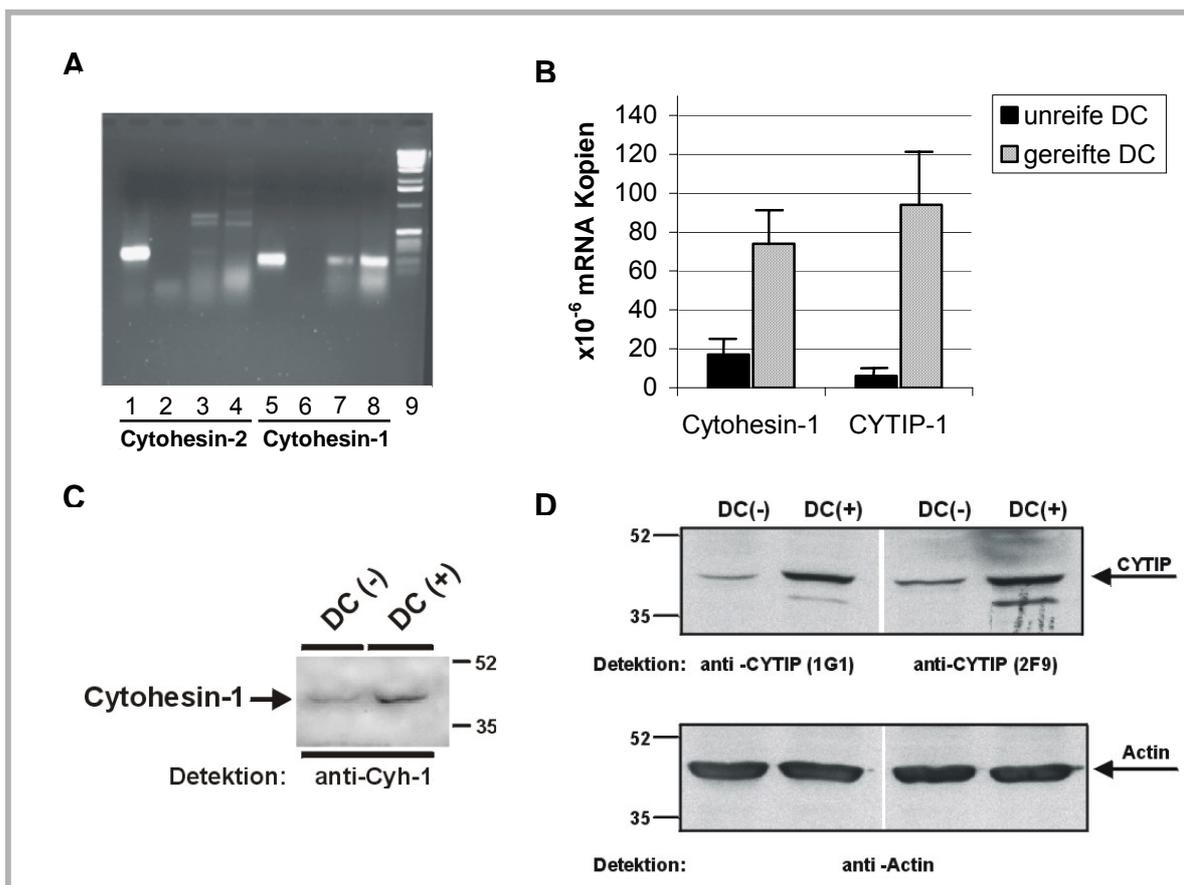


Abb. 16: Expression von Cytohesin-1 und CYTIP in dendritischen Zellen. (Daten wurden von C.Heufler generiert, Boehm *et al.*, 2003.)

(A) RT-PCR Analyse der Expression von Cytohesin-2 und Cytohesin-1 in gereiften dendritischen Zellen. Für Probe 3 und 7 wurden 2 μ l, für Probe 4 und 8 jeweils 5 μ l cDNA pro Reaktion verwendet. Bei den Negativkontrollen (Probe 2 und 6) wurde keine cDNA zur Reaktion zugesetzt. Als Positivkontrolle (Probe 1 und 5) diente 5 ng Plasmid-DNA des jeweiligen Proteins.

(B) Vergleich der Anzahl von mRNA Kopien von Cytohesin-1 und CYTIP in unreifen und gereiften dendritischen Zellen. Die Messungen wurden mittels RT-PCR durchgeführt und die Quantifizierung der gemessenen Werte in Relation zu ribosomalen RNS S18 gebracht. Die Ergebnisse stellen einen Durchschnitt von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten dar.

(C) Western-Blot-Analyse von Wildtyp Cytohesin-1 in Zelllysaten von nicht-maturierten [DC(-)] und maturierten [DC(+)] dendritischen Zellen. Cytohesin-1 wurde mit dem monoklonalen Antikörper 7H2 detektiert. Zur Visualisierung wurde ein sekundärer Peroxidase-konjugierter Antikörper verwendet.

(D) Endogenes CYTIP wurde aus Totalzelllysaten von nicht-maturierten [DC(-)] und maturierten [DC(+)] dendritischen Zellen mit Hilfe eines Immunoblots detektiert (obere Abbildung). Zur Detektion von CYTIP wurden die beiden Antikörper 1G1 und 2F9 verwendet. Mit einem anti-Aktin-Western-Blot wird weiterhin gezeigt, daß äquivalente Totalproteinmengen auf das Gel aufgetragen wurden (unter Abbildung).

5.2 Umklonierung und Charakterisierung von CYTIP

Die Grundlage für das Arbeiten mit dem Protein CYTIP stellte die Volle-Länge Klonierung und Adaptierung der cDNA auf die im Labor verwendeten Expressionssysteme dar. Freundlicher Weise wurde mir die cDNA von CYTIP von Christine Heufler (Institut of Dermatology, Austria) zur Verfügung gestellt.

Die Klonierung erfolgte durch PCR mittels spezifischer, komplementärer Oligodesoxyribonukleotide (pHE-2 cod / pHE-1 rev), die den zu amplifizierenden Sequenzbereich flankieren. Die Oligodesoxyribonukleotide besitzen einen Überhang mit integrierten Restriktionsschnittstellen, die für eine Klonierung nötig sind. Die PCR-Produkte wurden über die Restriktionsschnittstellen *MluI* und *NotI* in die Plasmidvektoren pRK5C7, pTKg und pEGFP N1 kloniert.

Zur einfacheren Umklonierung verschiedener Genelemente, Fusions-Tags und Reporterelemente wurde die Grundstruktur der im Labor gebräuchlichsten Vektoren adaptiert. Die multiplen Klonierungskassetten der Ursprungsvektoren pRK5C7, pTKg, pEGFP N1 wurden durch eine neue Kasette (*HindIII*, *MluI*, *NotI*) ersetzt (vgl. Abb. 17). Durch einfache Umklonierung über die Restriktionsschnittstellen *MluI/NotI* (Schnittstellen mit geringer Wiederholungsrate im Genom) konnten Gene zwischen den Vektoren ausgetauscht werden. Zur Generierung von Fusionsproteinen (Flag-Tag, Ig-Tag, eGFP) wurden die Schnittstellen *HindIII/MluI* verwendet. An die Fusions-Fragmente wurde das ATG-Startcodon vorangesetzt, um eine Expression der Fusionsproteine zu gewährleisten. Die Kozack-Sequenz (GCC ACC) erhöht die Translationseffizienz indem der Preinitiationskomplex das Startcodon spezifischer erkennen kann.

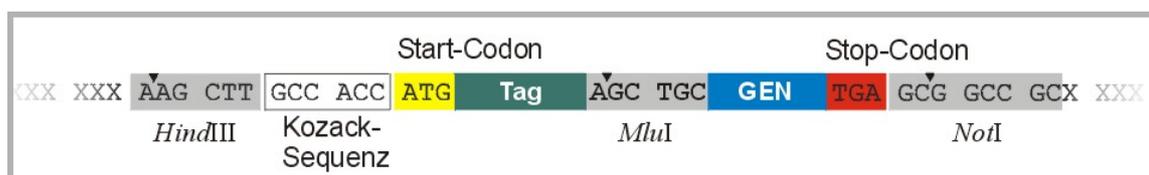


Abb. 17: Schematische Darstellung der verwendeten Klonierungskassette.

Durch adaptierte Vektoren können Gene und Fusionsanteile schnell zwischen verschiedenen Expressionsvektoren ausgetauscht werden. In dieser Arbeit wurden als Fusionsanteil der Flag-Tag, der Ig-Tag, His-Tag und eGFP als Reporter verwendet.

Die cDNA von CYTIP besteht aus 1080 bp (Accession Nummer: AF068836; C.Heufler, 1998) und codiert für ein Protein mit 359 Aminosäuren. Das empirisch berechnete Molekulargewicht liegt bei ca. 41 kDa. In der Maus konnte ein Homolog mit 65% Identität durch Vergleich der Gen-Datenbank-Einträge (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) identifiziert werden.

[human]	1	MSLQRLQ-H	SSNGNLADFC	AGPAYSSYST	LTGSLTMNDN	RRIQMLADTV
[mouse]	1	MSLQRF LQRQ	CSNGNLEY-C	ADSAYSSYSV	LTGSLTMEDN	RRIQMLADTV
		~~~~~	////	~~~~~	////	~~~~~
[human]	51	ATLPRGRKQL	ALTRSSSLSD	F SWSQRKLV	VEKQDNETFG	FEIQSYRPQN
[mouse]	51	ATLPRGRKQL	ALARSSSLGD	F SWSQRKLV	VEKQDNETFG	FEIQTYRLQN
		~~~~~	~~~~~	////	////	////
[human]	101	QNACSSSEMFT	LICKIQEDSP	AHCAGLQAGD	VLANINGVST	EGFTYKQVVD
[mouse]	101	QNCSSSEVGT	MICKIQEDSP	AHCAGLQAGD	IFANINGVST	EGFTHKQVVD
		////	~~~~~	////	~~~~~	~~~~~
[human]	151	LIRSSGNLLT	IETLNGTMIL	KRTELEAKLQ	VLKQTLKQKW	VEYRSLQLQE
[mouse]	151	LIRSSGNLLT	IETLNGTMIH	RRAELEAKLQ	VLKQTLKQKW	VEYRSLHLQE
		~~~~~	////	~~~~~	~~~~~	~~~~~
[human]	201	HRL LHGDAAN	CPSLENMDLD	ELSLFGPLPG	PGPALVDRNR	LSSSESSCKSW
[mouse]	201	QRL LHGDIAN	SPLENMDLD	ESSLFGNLG	PSPALLDRHR	LSSSESSCKSW
		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
[human]	251	LSSMTMDS	EDGYQTCVSEDS	SRGAFSRQTS	TDDEC FIPKE	GDDFLRRSSS
[mouse]	251	LSSMTVDSE	DGYRSMSEDS	IRGAFSRQTS	TDDEC FHSKD	GDEILRNASS
		~~~~~	////	~~~~~	~~~~~	~~~~~
[human]	301	RRNRSISNTS	SGSMSPLWEG	NLSSMFGTLP	RKSRKGS	VRKQLLKFIPLGH
[mouse]	301	RRNRSISVTS	SGSESPLWES	NLSSVFGTLP	RKSRKGS	VRKQLLKFIPLGH
		~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
[human]	351	RAVEEEESRF				
[mouse]	351	RAVEEEESRF				
		~~~~~				

**Abb. 18: Sequenzvergleich von humanem CYTIP und murinem Homolog.**

Der gelbe Bereich markiert die PDZ-Domäne, der blaue die „coiled-coil“-Domäne. Durch grüne Hinterlegung wurde ein Serin-reicher, durch violette eine Prolin-reicher Sequenzabschnitt hervorgehoben. Rote Bereiche heben Unterschiede der Proteinsequenz zwischen den beiden Homologen hervor.

~~~~~ stellt Bereiche mit  $\alpha$ -Helix-, //// Bereiche mit einer  $\beta$ -Faltblatt-Struktur dar. Die Berechnung der Sekundärstruktur wurde aus Daten von drei Computer gestützten Algorithmen GOR IV (Garner J, 1996), SOPMA (Geourjon C, 1995) und NNPREDCIT (J.L. McClelland, 1988; D.G. Kneller, 1990) zusammengefasst. Die Programme können über die Internetseite [www.expsy.ch](http://www.expsy.ch) abgerufen werden.

Durch Sequenzanalysen und -vergleiche konnten zwei dominante Domänen in CYTIP identifiziert werden. Auf eine N-terminale Sequenz von 72 Aminosäuren, die keine besondere Homologie zu anderen Proteinen und Domänen aufweist, schließt sich eine PDZ-Domäne (auch bekannt als DHR- oder GLGF-Domäne) an. PDZ-Domänen (vgl. 5.9.1) werden als Protein-Erkennungs-Module bezeichnet, die im zentralen Nervensystem häufig dazu verwendet werden Ionenkanälen und Membran-Rezeptorkomplexen auf der cytoplasmatischen Seite zu aggregieren und diese Rezeptoren an ihre Effektorenzyme zu koppeln.

C-terminal dazu trägt CYTIP eine weitere Proteininteraktionsdomäne, die als „Leucin-Zipper“ bezeichnet wird. Klassisch wurde diese Domäne in Transkriptionsaktivatoren wie z.B. CAP

(catabolyte gene activator protein, *E.coli*) oder GCN4 (*S.cerevisiae*) identifiziert (McKay & Steitz, 1981; Nilges & Brunger, 1991). Am carboxyterminalen Ende des „Leucin-Zipper“-Motifs in GCN4 befindet sich ein basischer Bereich, der eine DNA-Bindung vermittelt. Der „Leucin-Zipper“ selbst ist an der Erkennung nicht beteiligt, er wird lediglich als Strukturprinzip der Dimerisierung des Proteins benötigt.

Der „Leucin-Zipper“ bezieht seine Bezeichnung aus der regelmäßigen Abfolge von Leucin-Resten (ca. jede 7. Position) oder anderen hydrophoben Resten die in einer α -Helix angeordnet sind. Aufgrund dieser Sequenzabfolge sind die hydrophoben Reste auf einer Seite der Helix angeordnet und die hydrophoben Reste von zwei bis fünf α -Helices (Burkhard *et al.*, 2001) können über diese hydrophobe Interaktionen wie ein Reisverschluss ineinander greifen, bilden eine Superhelix aus, die auch als „coiled-coil“-Motif bezeichnet wird (O’Shea *et al.*, 1989). Das „coiled-coil“-Motif ist vor allem ein Werkzeug zur Oligomerisierung von Proteinen, wobei sowohl Homodimere als auch Heterodimere gebildet werden können. Die ersten „coiled-coil“-Motif wurden schon 1953 von Crick als Strukturelement in Faser-bildenden Proteine, wie Keratin, Myosin und Fibrinogen entdeckt.

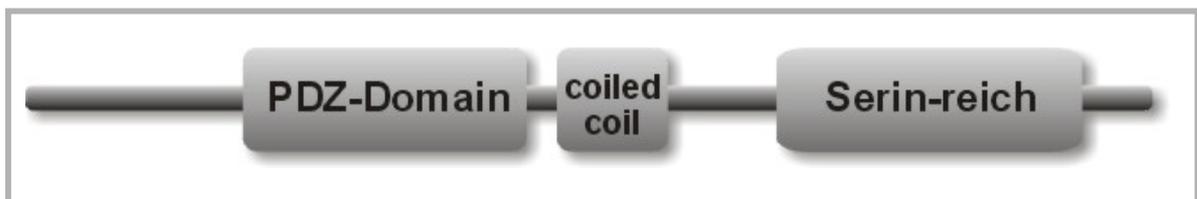


Abb. 19: Strukturmodell von CYTIP.

Die Abbildung zeigt schematisch CYTIP, mit den beiden dominanten Domänen PDZ und „coiled-coil“ sowie einer Serin-reicher Region im carboxyterminalen Bereich des Proteins.

Der C-terminale Bereich von CYTIP weist eine hohe Anzahl von Serinen auf, ohne jedoch markante Homologien zu anderen Proteine zu besitzen. Auffallend ist weiterhin ein saures C-terminales Ende mit einer Wiederholung von 4 Glutamatresten (vgl. Abb. 18)

Mit einer Identität < 30% wurde erst kürzlich im Menschen und in der Maus das durch Retinolsäure-induzierte Gen GRASP (GRP-1-associated scaffold protein) beschrieben (Nevrivy *et al.*, 2000). GRASP wird in den Geweben Herz, Lunge und Hirn exprimiert und interagiert spezifisch mit Cytohesin-2 und -3. Trotz der geringen Sequenzidentität enthält auch GRASP eine PDZ und „coiled-coil“-Domäne. Die restlichen Sequenzabschnitte unterscheiden sich bis auf das carboxyterminale Ende zum Teil recht stark.

```

[CYTIP]: 1  MSLQRL--LQ HSS----- -NGNLADFCA -----G -PAYSSYSTL
[GRASP]: 1  MTLRRLRKLO QKEEAAATPD PAARTPDSEV APAAPVPTPG PPAAAATPGP

[CYTIP]: 31 ---TGSLTMN DNRRIQM--- LADTVATLPR GRKQLALTRS SLSDFSWSQ
[GRASP]: 51 PADELYAALE DYHPAELYRA LAVSGGTLPR -RKGSGF-RW KNLSQSPEQQ

[CYTIP]: 75  RKLVTVEKQD NETFGFEIQS YRPQNQNACS SEMFTLICKI QEDSPAHCAG
[GRASP]: 99  RKVLTLEKED NQTFGFEIQT YGLHHREEQR VEMVTFVCRV HESSPAQLAG

[CYTIP]: 125 LQAGDVLANI NGVSTEGFTY KQVVDLIRSS GNLLTIETLN GTMILKRTEL
[GRASP]: 149 LTPGDIIASV NGLNVEGIRH REIVDIIKAS GNVLRLETLY GTSI-RKAEL

[CYTIP]: 175  EAKLQVLKQT LKQKWVEYRS LQLQEHRLH GDAANCPSL- ENMDLDELST
[GRASP]: 198  EARLQYLKQT LYEKWGEYRS LMVQEQLVH GLVVKDPSIY DTLESVRSCL

[CYTIP]: 224  FGP--LPGPG PALVDRNRLS SESSCKSWLS SMTMDSEGD- YQTCV---SE
[GRASP]: 248  YGAGLLPG-- -SLPFGPLLA VPRPARGGAR RARGDADDAV YHTCFFGDSE

[CYTIP]: 266 DSS-----RGAFSRQTST DDECIFPKEG DDFLRRSSSR RNRSISNTSS
[GRASP]: 395 PPALPPPPPP ARAFPGGPAE TPAVPGPPGP RAALSRSASV RCAGPGGGGG

[CYTIP]: 311 -GMSPLW-E GNLSSMFGTL PRKSRKGSVR KQLLKFIPLG HRAVEEEESRF*
[GRASP]: 345 GCAPGALWTE AREQALCGAG LRKTKYRSFR RRLKFIPLG NRSLEEEESQL*

```

Abb. 20: Sequenzvergleich von humanem CYTIP und GRASP.

Der gelbe Bereich markiert die PDZ-Domäne, der blaue die „coiled-coil“-Domäne. Violette Markierungen zeigen identische Aminosäuren in den Proteinsequenzen an.

GRASP ist mit einer Größe von 395 Aminosäuren um 36 länger als CYTIP (359).

5.3 Eingrenzung der Bindungsregion zwischen CYTIP und Cytohesin-1 mit Hilfe des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems

Untersucht man die Domänenstruktur von CYTIP und Cytohesin-1, so fällt bei beiden Proteinen die „coiled-coil“-Proteinbindungsdomäne auf. Wie erläutert (vgl. 5.2) stellt diese Domäne eine Protein-Protein-Bindungsdomäne bzw. Oligomerisierungsdomäne dar. Bisher durchgeführte Experimente (unveröffentlichte Mitteilung, Prof. Kolanus) erbrachten keine Evidenz für eine Dimerisierung bzw. Multimerisierung von Cytohesin-1. Die Vermutung lag nahe, daß Cytohesin-1 und CYTIP über ihre jeweilige „coiled-coil“-Domäne eine Bindung ausbilden können.

Für die Interaktionsanalysen zweier Proteine wird häufig das „Yeast-Two-Hybrid“-System von Gyuris *et al.* (1993) verwendet, wobei die Interaktion zweier Proteine über die transkriptionelle Aktivierung von Reportergenen vermittelt wird. Einer der beiden potentiellen Interaktionspartner wird als Fusionsprotein mit der spezifischen DNA-Bindungsdomäne *lexA* (*lexA202*) exprimiert und auch als „bait“-Protein bezeichnet. Der zweite Interaktionspartner, als „prey“-Protein bezeichnet, trägt als Fusionsanteil die Transaktivierungsdomäne B42. Als Reportergen für die Interaktion beider Proteine dient *lacZ*, welches das Protein β -Galaktosidase codiert. Dieses Enzym setzt das chromogene Substrat X-Gal unter Bildung eines blauen Farbstoffes um. Interagieren die beiden zu testenden Proteine im Hefesystem, so führt dies zur Transkription der β -Galaktosidase und in Folge zu einer Blaufärbung der Zellen.

In den hier beschriebenen Experimenten wurden unterschiedliche Deletionsmutanten von CYTIP und Cytohesin-1 gegeneinander ausgetestet. Zur Expression des jeweiligen „bait“-Proteins wurde der Expressionsvektor pEG202 verwendet, der zusätzlich als Selektionsmarker ein *his3*-Gen codiert. Der Vektor pJG4-5 wurde zur Expression des „prey“-Proteins verwendet. Dieses Plasmid codiert zur Selektion ein zusätzliches *trp1*-Gen. Zur Kotransfektion der Plasmide wurde der Hefestamm EGY48/JK103 verwendet, der Defekte in diesen beiden Genen aufweist und folglich nur auf HW-negativem Medium wachsen kann, wenn eine Hefezelle beide Plasmide aufgenommen hat und Histidin und Tryptophan exprimiert.

Die Deletionsmutanten wurden über PCR-Reaktion mittels spezifischer, komplementärer Oligodesoxyribonukleotide, die den zu amplifizierenden Sequenzbereich flankieren generiert und über die Restriktionsschnittstellen *MluI* und *NotI* in die Plasmidvektoren pEG202 bzw. pJG4-5 kloniert.

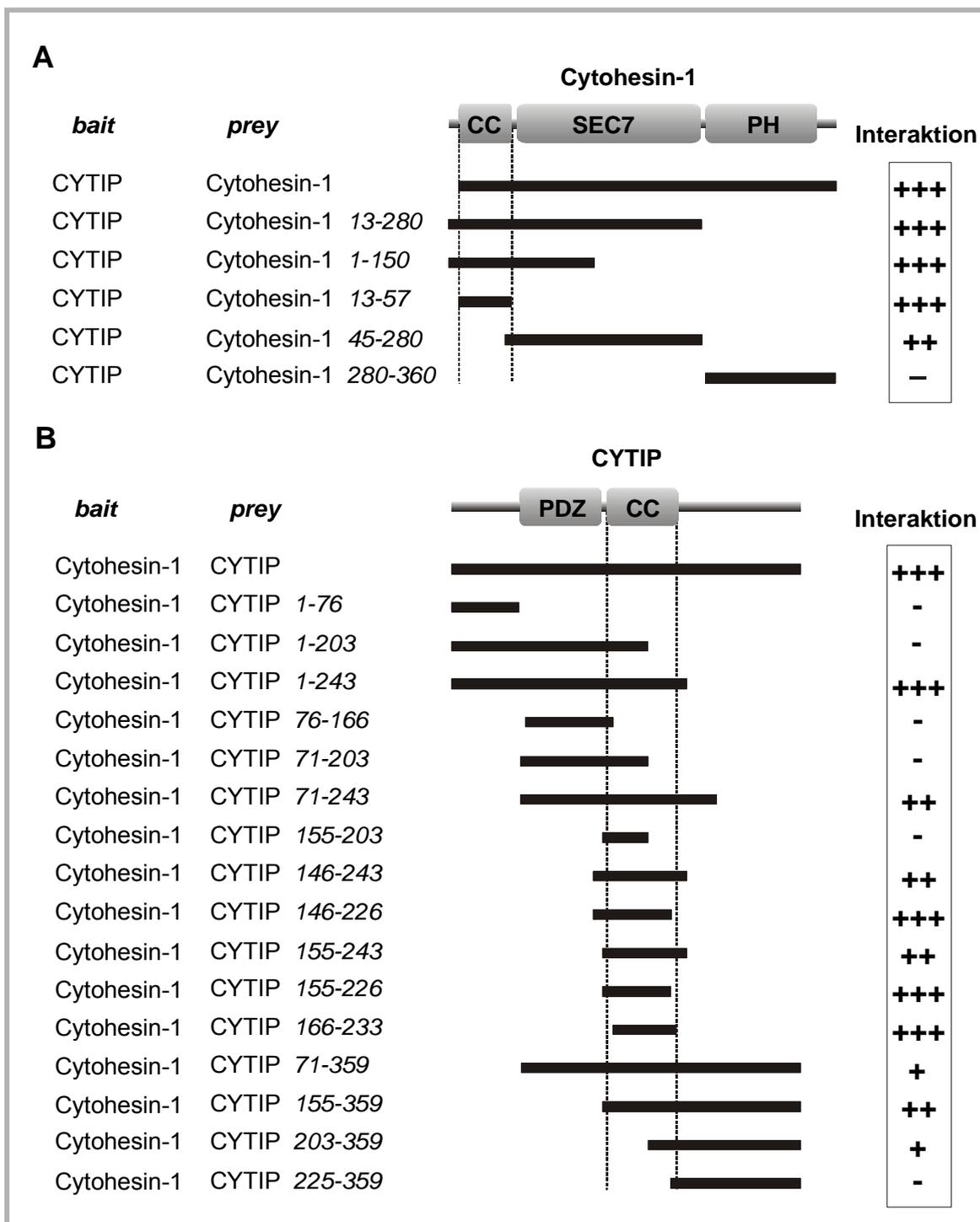


Abb. 21: Protein-Protein-Interaktionsanalysen in *S. cerevisiae* mit unterschiedlichen Konstrukten der Proteine CYTIP und Cytohesin-1.

(A) CYTIP wurde als „bait“-Protein exprimiert, die verschiedenen Domänen von Cytohesin-1 als „prey“-Proteine.

(B) Als „bait“-Protein wurde Cytohesin-1 eingesetzt. Die CYTIP Deletionsmutanten wurden als „prey“-Protein koexprimiert.

Die relative Intensität der Interaktionen wurde als Blaufärbung der Hefekulturen auf UHW/X-Gal-Selektionsplatten analysiert und ist als +++ (starke Blaufärbung), ++ (mittelstarke Blaufärbung), + (schwache Blaufärbung) und - (keine Blaufärbung) dargestellt.

Wie aus Abb. 21 ersichtlich wird, interagieren wie vermutet CYTIP und Cytohesin-1 im Hefesystem über ihre jeweilige „coiled-coil“-Domäne. Weitere Punktmutationen zur Analyse der für eine Bindung essentiellen Aminosäuren wurden im Zuge dieser Arbeit nicht durchgeführt.

5.4 Bindungsstudie zwischen CYTIP und den humanen Cytohesin-Homologen im „Yeast-Two-Hybrid“-System

Über das „Two-Hybrid-System“ konnten die „coiled-coil“-Domänen von Cytohesin-1 und CYTIP als Bindungsdomäne identifiziert werden. In den folgenden Analysen, die ebenfalls im Hefesystem durchgeführt wurden (analog zu 5.4), sollte die Spezifität der Bindung zwischen CYTIP und den Proteinen der Cytohesin-Familie untersucht werden. Besonders die Aminosäuresequenzen im Bereich der „coiled-coil“-Domäne zeigen bei den sonst sehr homologen Proteinen eine Abweichung von bis zu 35% (vgl. Abb. 22). Durch einen computergestützten Algorithmus (Lupas *et al.*, 1991; [http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)) wurde für alle drei Cytohesin-Proteine die „coiled-coil“-Struktur jedoch klar hervorgesagt. Unterschiede in der Bindungsspezifität zwischen CYTIP und den Cytohesin-Homologen sind aufgrund der großen Unterschiede in der Aminosäuresequenz in dieser Region nicht auszuschließen.

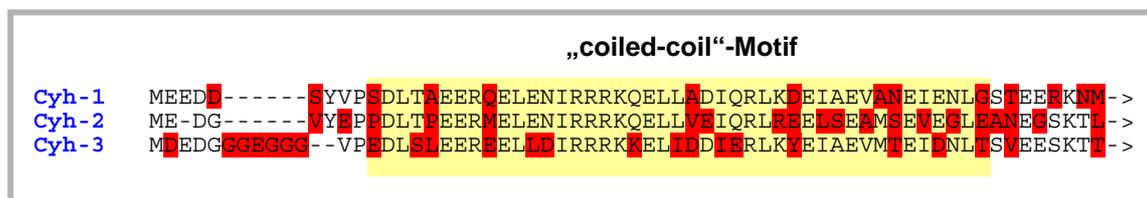


Abb. 22: Vergleich der „coiled-coil“-Regionen der Cytohesin-Homologe.

Die „coiled-coil“-Region wurde gelb hinterlegt, rote Markierungen zeigen Unterschiede in der Aminosäuresequenz von Cytohesin-1 (Cyh-1), Cytohesin-2 (Cyh-2) und Cytohesin-3 (Cyh-3). Zum Zeitpunkt dieser Experimente war Cytohesin-4 noch nicht identifiziert worden und konnte nicht in diese Experimente eingesetzt werden.

Cytohesin-1, Cytohesin-2 (ARNO) und Cytohesin-3 (Grp-1) wurden jeweils als „bait“ mit der DNA-Bindungsdomäne *lexA* fusioniert, CYTIP als „prey“ mit der Transaktivatordomäne B42 exprimiert. Hefezellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden kotransformiert und die Intensität der Protein-Protein-Interaktion anhand der Umsetzung des Substrates X-Gal analysiert (vgl. Abb. 23).

Als positive Kontrolle diente dabei in jedem Fall die Interaktion der SEC7-Domäne von Cytohesin-1 (SEC7<sub>Cyh-1</sub>) und der cytoplasmatischen Domäne von CD18 (CD18<sub>cyt</sub>). Als negative Kontrollen wurde Syk und der Fusionsanteil *lexA202* allein (nicht dargestellt) getestet. Alle Konstrukte wurden über *MluI/NotI*-Klonierung in die Vektoren pEG202 bzw. pJG4-5 kloniert.

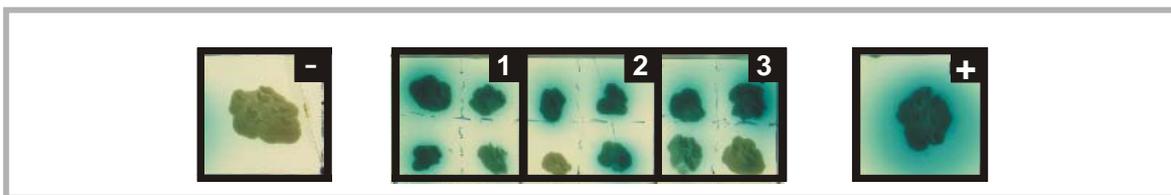


Abb. 23: Vergleich der Bindungsspezifität zwischen CYTIP und den Cytohesin-Homologen im Hefe-System.

(1) Interaktion von CYTIP mit Cytohesin-1.

(2) Interaktion von CYTIP mit Cytohesin-2.

(3) Interaktion von CYTIP mit Cytohesin-3.

Zur Analyse wurden von jeder Interaktion vier unabhängige Klone dargestellt.

(-) und (+) stellen jeweils Negativ- bzw. Positivkontrollen dar.

Im Hefesystem binden alle drei Cytohesin-Homologe mit ähnlicher Intensität an CYTIP. Trotz der großen Sequenzunterschiede in der „coiled-coil“-Region sind die Strukturen einer α -Helix jedoch gleichwertig ausgebildet. Da Interaktionsstudien im Hefesystem zum Teil falsch positive Ergebnisse liefern können, sollten die Interaktionen mit molekularbiologischen Mitteln weiter verifiziert werden (siehe 5.5).

5.5 Kopräzipitation zwischen Ig-CYTIP und endogenem Cytohesin-1 in Jurkat E6 Zellen

Der biochemische Interaktionsnachweis zwischen CYTIP und Cytohesin-1 wurde mittels einer Kopräzipitation untersucht. CYTIP wurde über die Restriktionsschnittstellen *MluI/NotI* in den Vektor pTKg kloniert. Über die Restriktionsschnittstellen *HindIII/MluI* wurde N-terminal CYTIP mit der C<sub>H</sub>2/C<sub>H</sub>3-Domäne (cIg, F<sub>c</sub>-Anteil) von humanem Immunglobulin IgG<sub>1</sub> fusioniert (vgl. 5.2). Der Vorteil dieses Fusionsanteils besteht darin, daß rekombinante Fusionsproteine mit hoher Affinität fast vollständig an Protein A immobilisiert werden können. Ferner stabilisiert der relativ große Fusionsanteil (ca. 33 kDa) oft instabile Proteine und ist sehr gut über kommerziell erhältliche (konjugierte) Antikörper nachweisbar.

Neben Methoden der exogenen Genexpression, wie Elektroporation (4.2.3) oder Transfektion (DEAE/Dextran-Transfektion; 4.2.2), die mit einer Transfektionseffizienz von ca. 10-40% für viele Experimente ausreichend ist, wurden in dieser Arbeit zur transienten Expression von Genen in eukaryontischen Zellen meist das Vaccinia-Vektor-System (4.2.4) verwendet (Pancali und Paoletti, 1982; Macket *et al.*, 1982). Der Vorteil des Systems liegt im breiten Wirtsbereich und einer sehr hohen und gleichmäßigen Expression (bis zu 100%) im Gegensatz zu den oben genannten Methoden. Das Vaccinia-Virus setzt die zelleigene Proteinbiosynthese außer Kraft und nutzt die Wirtszelle nur zur Produktion viraler Proteine. Durch den massiven Eingriff des Virus kann es zu unphysiologischen Reaktionen wie z.B. Cytoskelett-Umlagerungen kommen, die zum Teil

Ergebnisse verfälschen können und den größten Nachteil des Systems darstellen. Eine Validierung durch Kontrollen oder andere Expressionssysteme ist aus diesem Grund stets nötig.

Das Fusionsprotein (Ig-CYTIP) wurde mit Hilfe des Vaccinia-Systems (4.2.4.6) überexprimiert und nach Lyse der Zellen (4.6.9.2) über den Ig-Fusionsanteil an Protein A-Sepharose gebunden (4.6.10.2). Durch mehrmaliges Waschen sollten möglichst alle unspezifischen Binder entfernt werden und nur noch spezifische endogene Proteine an der immobilisierten Matrix gebunden sein. Als Negativkontrolle wurde der Ig-Fusionsanteil allein überexprimiert.

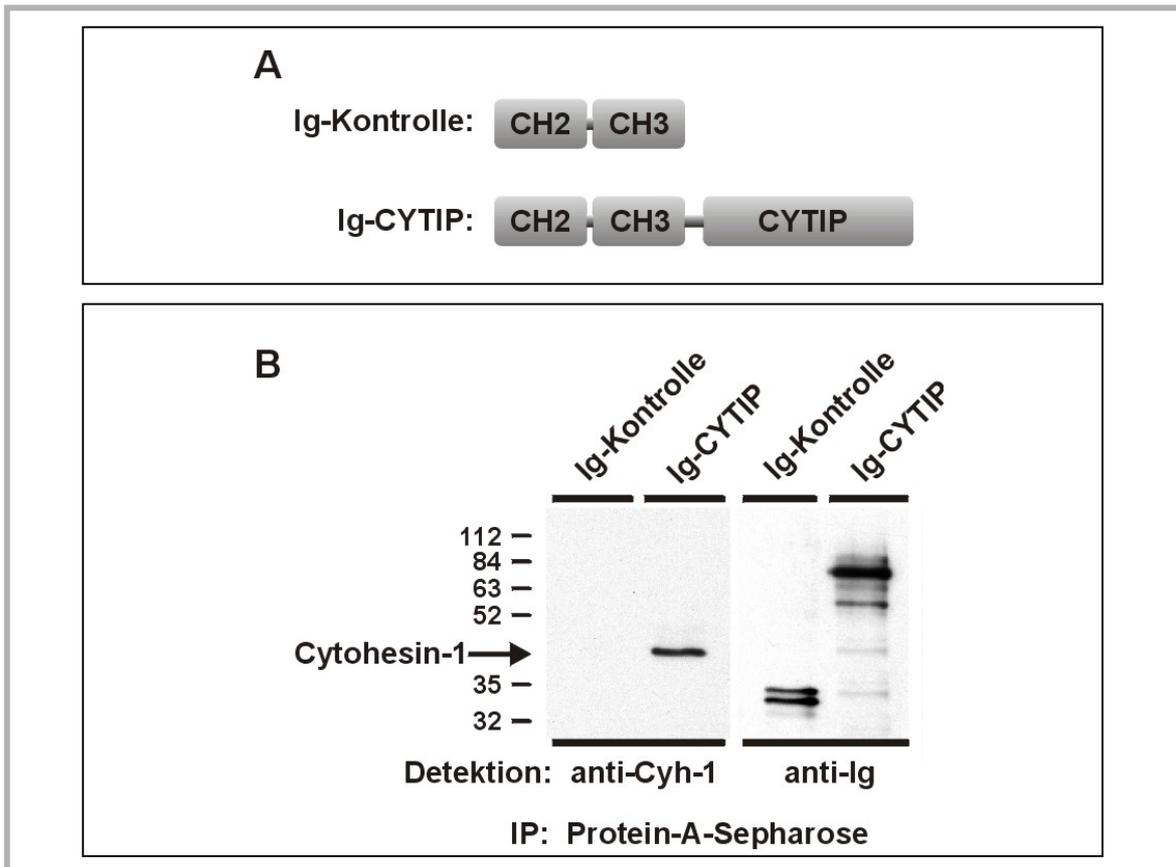


Abb. 24: Kopräzipitation von Ig-CYTIP mit endogenem Cytohesin-1.

(A) Schematische Darstellung der clg-Fusionskonstrukte.

(B) Rekombinante Vaccinia-Viren wurden zur Expression der clg-Fusionsproteine generiert und die Proteinexpression über einen anti-Human-IgG-Western-Blot nach Präzipitation an Protein A-Sepharose bestimmt (rechter Blot). Zur Detektion von an Ig-CYTIP gebundenem endogenem Cytohesin-1 wurde der monoklonale Antikörper mab 7H2 verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Ratte-IgG-Peroxidase-konjugierter Antikörper verwendet.

Die Proben wurden über ein 10%-Polyacrylamidgel (4.6.1) aufgetrennt und mit der „Westen-Blot“-Technik auf Nitrozellulose (4.6.4) übertragen. Mit dem Antikörper 7H2 konnte Cytohesin-1 sehr spezifisch im Totallysat von Jurkat E6 Zellen nachgewiesen werden (Spur 2). Die Negativkontrolle hingegen zeigt keinerlei Bindung.

Endogenes Cytohesin-1 bindet mit hoher Affinität an überexprimiertes Ig-CYTIP-1 in Jurkat E6-Zellen.

5.6 Molekularbiologischer Interaktionsnachweis zwischen CYTIP und den Cytohesin-Homologen

Im Hefesystem wurde bereits eine Interaktion zwischen CYTIP und Cytohesin-1/-2/-3 gezeigt (vgl. 5.3). Die Spezifität der Bindungen sollte im folgenden Ansatz molekularbiologisch verifiziert werden. Die verschiedenen Cytohesin-Homologe wurden N-terminal mit der clg-Domäne von humanem IgG<sub>1</sub> fusioniert und in den pRK5C7-Expressionsvektor über die Restriktionsschnittstellen *HindIII/NotI* kloniert (vgl. 5.2; Abb. 17). Da zur Detektion von CYTIP keine Antikörper zur Verfügung standen, wurde CYTIP ebenfalls als Fusionsprotein im pRK5C7-Vektor exprimiert. In diesem Fall kam die Flag-Fusionsdomäne, eine Peptidsequenz (MDYKDDDDK) von 9 Aminosäuren zum Einsatz, welche durch kommerziell erhältlich Antikörper detektierbar ist. Auch der Flag-Tag wurde N-terminal über eine *HindIII/MluI*-Klonierung an CYTIP fusioniert (vgl. Abb. 25/A).

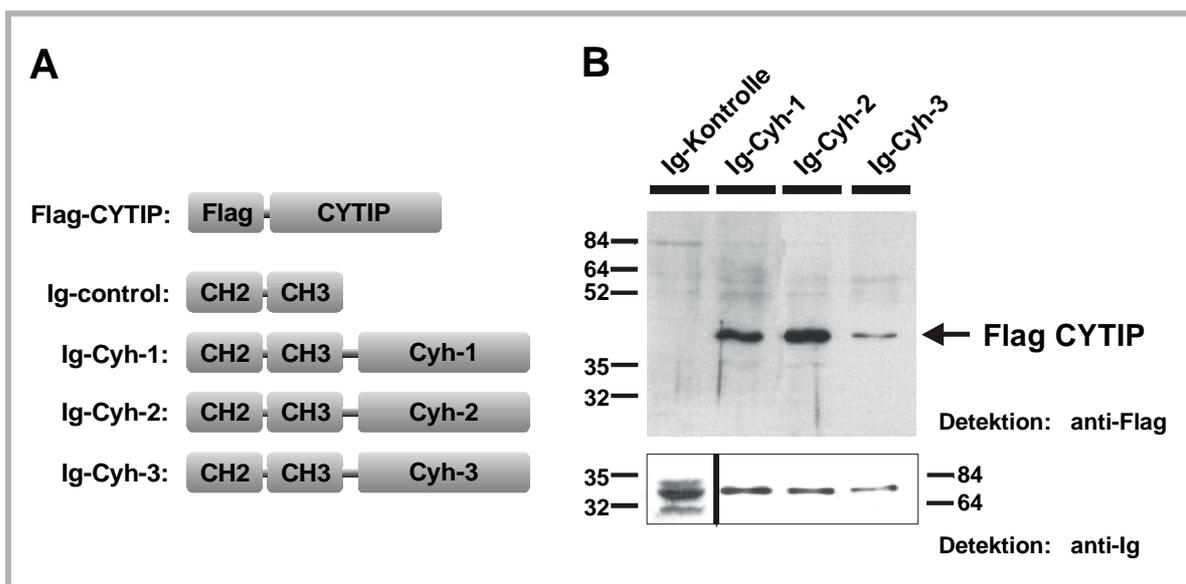


Abb. 25: Biochemische Analyse der Interaktion zwischen CYTIP und den Cytohesin-Homologen.

(A) Die CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Domäne von humanem IgG<sub>1</sub> (clg) wurde N-terminal an die Cytohesin-Homologe, der Flag-Tag (MDYKDDDDK) N-terminal an CYTIP fusioniert. Als negative Kontrolle diente der clg-Fusionsanteil alleine.

(B) Die Konstrukte wurden mit Hilfe von DEAE-Dextran/Chloroquin in COS7-Zellen kotransfiziert und nach 48 h Inkubation das Gesamtzelllysate zur Präzipitation mit Protein A-Sepharose versetzt. Das an Ig-Cytohesin gebundene CYTIP wurde nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulose über einem anti-Flag-Western-Blot detektiert (oberes Gel). Detektion der clg-Fusionsproteine nach Präzipitation an Protein A-Sepharose durch einen anti-Human-IgG-Western-Blot zur Expressionskontrolle der Ig-Cytohesin-Konstrukte (unteres Gel).

Beide Konstrukte wurden in COS7 Zellen kotransfiziert (vgl. 4.2.2) und nach 2-tägiger Inkubation (37°C) lysiert (4.6.9.1). Die Lysate wurden mit Protein A-Sepharose inkubiert, um einen potentiellen Cytohesin/CYTIP-Komplex über den Ig-Fusionsanteil an die Matrix zu binden und für eine Detektion aufzukonzentrieren. Die Proben wurden anschließend über SDS-Page (4.6.1) und einen

„Western-Blot“ (4.6.4, 4.6.5) analysiert und CYTIP über den Flag-Fusionsanteil mit einem spezifischen anti-Flag-Antikörper detektiert.

Wie schon die Analysen in der Hefe zeigten, konnten alle drei Cytohesin-Homologe mit CYTIP *in vitro* präzipitiert werden. Cytohesin-1 und Cytohesin-2 binden CYTIP mit ähnlicher Affinität, Cytohesin-3 mit einer etwas geringeren, wobei auch etwas geringere Mengen von Ig-Cytohesin-3 an die Protein A-Matrix immobilisiert wurde. Es stellt sich nach diesem Ergebnis die Frage nach dem *in vivo* Interaktionspartner für CYTIP. Stellen alle Cytohesin-Proteine einen physiologischen Interaktor für CYTIP dar?

Wie in Kapitel 5.1 beschrieben, werden in dendritischen Zellen (DC) nur CYTIP und Cytohesin-1 exprimiert. Die Spezifität der Bindung könnte somit durch die Expression der Proteine in bestimmten Zelltypen limitiert sein.

5.7 Assoziation von endogenem CYTIP und Cytohesin-1 in unterschiedlichen Zelltypen

Die bisherigen Bindungsanalysen zwischen Cytohesin und CYTIP basierten auf überexprimierten Fusionsproteinen. Zur Detektion von endogenem CYTIP mußten zuerst Antikörper generiert werden. Zu diesem Zweck wurde CYTIP als 6xHis-Fusionsprotein in einem bakteriellen Expressionsvektor (pT7Hxpflu) kloniert. 6xHis-Fusionsproteine können nach Expression durch Bindung an Ni-Agarose aufgereinigt und aufkonzentriert werden (4.6.8.2). Zur Überexpression diente der *E.coli*-Stamm BL21(LysS). Leider konnte kein 6xHis-CYTIP im Totallysat oder nach Präzipitation an Ni-Agarose nachgewiesen werden.

In einem zweiten Ansatz sollte CYTIP über den GST-Fusionsanteil (Glutathion S-Transferase) an GSH-Sepharose aufgereinigt werden. Hierzu wurde CYTIP in den Vektor pGEX-2T kloniert und als GST-Fusionsprotein in dem *E.coli*-Stamm MC1061 überexprimiert (4.6.8.1). Aber auch GST-CYTIP konnte nicht nach erfolgter Gelelektrophorese (4.6.1) und Coomassie-Färbung (4.6.2) detektiert werden. Scheinbar ist CYTIP als Fusionsprotein sehr instabil oder wird aufgrund falscher Faltung schnell wieder abgebaut. Es ist jedoch in manchen Fällen möglich Subdomänen instabiler Proteine überzuexprimieren. Als besonders erfolgversprechend erschien hierbei die PDZ-Domäne von CYTIP, da bereits PDZ-Domänen anderer Proteine überexprimiert und aufgereinigt werden konnten. Freundlicher Weise generierte C.Geiger (Labor Kolanus) 6xHis-PDZ-Konstrukte und konnte die Domäne über Ni-Agarose in ausreichenden Mengen aufreinigen. Monoklonale Antikörper gegen dieses Fusionsprotein wurden anschließend von E.Kremmer (GSF, München) generiert. Die zwei Klone mAbs 1G1 und 2F9 erkennen im Totallysat CYTIP sehr spezifisch.

In einem ersten Ansatz sollte endogenes CYTIP in unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen werden. Jurkat E6 Zellen, LCL-721-Zellen und PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) wurden lysiert (4.6.9.2) und das Totalzellysat über Gelelektrophorese (4.6.1) aufgetrennt. Nach

Transfer der Proteine auf Nitrozellulose (4.6.4) wurde endogenes CYTIP mit dem primären monoklonalen Antikörper 2F9 markiert und mit einem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper nachgewiesen (4.6.5). Interessanter Weise ist CYTIP sehr stark in den Lysaten der B-Zelllinie 721 und in PBMCs, nicht jedoch in Jurkat E6 Zellen detektierbar (Abb. 26/C).

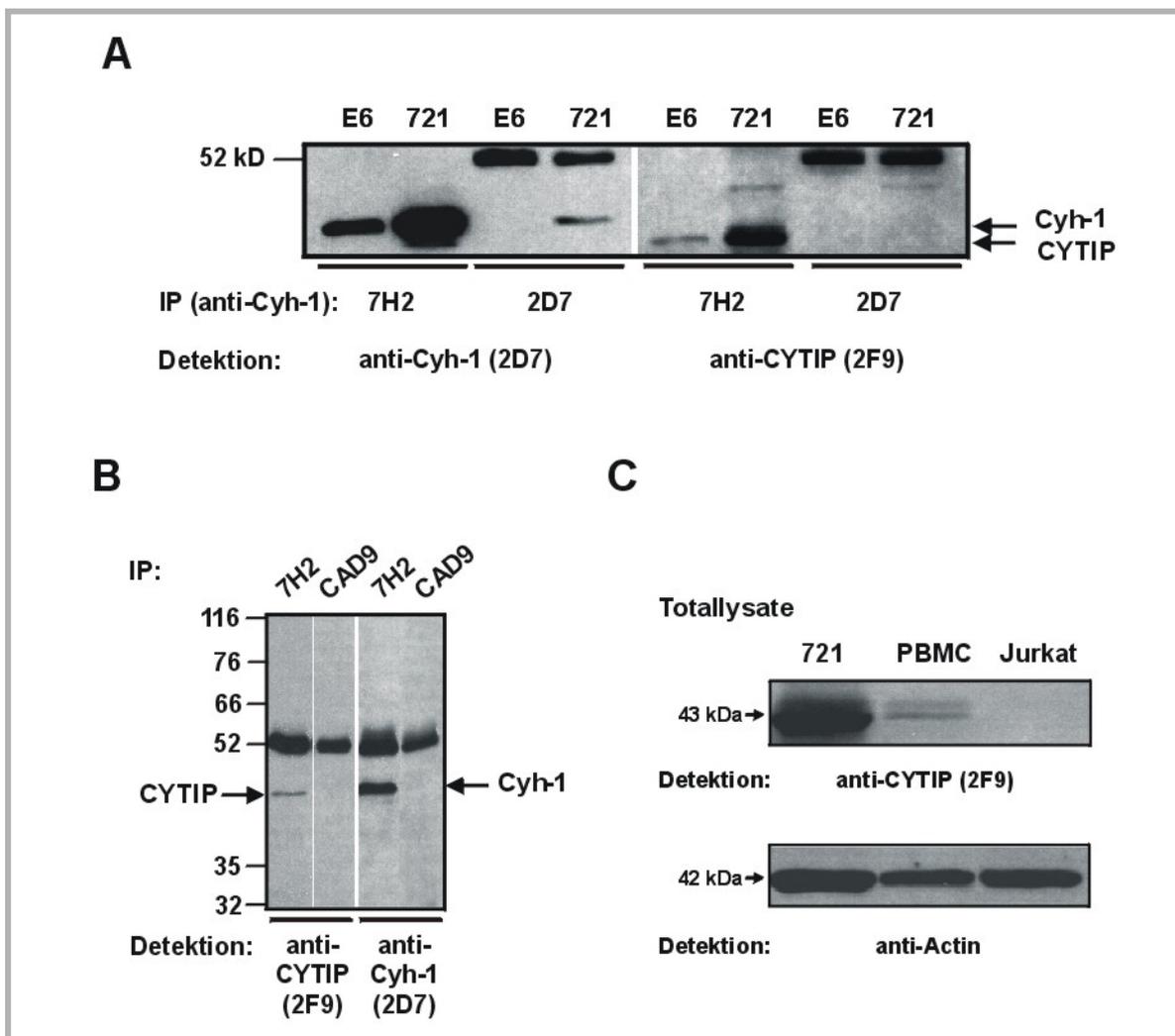


Abb. 26: Interaktionsnachweis zwischen endogenem Cytohesin-1 und CYTIP.

Aus Totalzelllysaten von Jurkat E6 und LCL-721 Zellen wurde endogenes Cytohesin-1 mit den Antikörpern 7H2 oder 2D7 immunpräzipitiert (A), bei PBMCs wurde der Antikörper 7H2 und ein unspezifischer Isotypkontrollantikörper CAD9 verwendet (B). Präzipitiertes Cytohesin-1 wurde mit dem monoklonalen Antikörper 2D7, kopräzipitiertes CYTIP mit dem monoklonalen Antikörper 2F9 detektiert.

(C) Aus jeweils 3×10^5 Jurkat E6 Zellen, 721-Zellen oder PBMCs wurden Totalzelllysate hergestellt und endogenes CYTIP über einen anti-CYTIP-Western-Blot detektiert (obere Abbildung). Zum Vergleich der aufgetragenen Gesamtproteinmengen wurde Aktin mit einem spezifischen Peroxidase-konjugierten Antikörper nachgewiesen (untere Abbildung).

Mit dem monoklonalen Antikörper 2F9 konnte weiterhin eine Interaktion von endogenem CYTIP und endogenem Cytohesin-1 gezeigt werden (Abb. 26 A/B). Aus Totalzelllysaten von Jurkat E6

Zellen, 721-Zellen und PBMCs wurde Cytohesin-1 mit dem Antikörper 7H2 immunopräzipitiert (4.6.10.3). Das Cytohesin-1-Präzipitat wurde anschließend mit dem Antikörper 2D7 nachgewiesen. Kopräzipitiertes CYTIP konnte mit dem spezifischen anti-CYTIP-Antikörper 2F9 in allen Zelltypen detektiert werden. Interessanter Weise konnte auch in Jurkat E6 Zellen geringe Menge an CYTIP nachgewiesen werden. Die geringen Mengen an CYTIP im Totalzelllysat werden durch die Präzipitation über Cytohesin-1 aufkonzentriert und somit detektierbar.

5.8 Die Membranlokalisation von CYTIP in Jurkat E6 Zellen wird durch Bindung an Integrine induziert

Die vorangegangenen Experimente zeigten eine klare Interaktion zwischen CYTIP und Cytohesin-1 in verschiedenen Systemen (vgl. 5.4, 5.5, 5.6). Wie bereits in der Einleitung erläutert vermittelt Cytohesin-1 die Adhäsion von LFA-1 an seinen Liganden (ICAM-1), durch Membranrekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran über die PH-Domäne und durch direkte Interaktion mit der cytoplasmatischen Domäne der β_2 -Kette von LFA-1. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation (Cytoplasma, Plasmamembran) von Cytohesin-1 bei der Regulation der Zelladhäsion und aufgrund der sehr stabilen Interaktion mit CYTIP, war die Lokalisation von CYTIP in der Zelle von großem Interesse.

Die Analyse der Lokalisation von endogenem CYTIP war aufgrund der anfänglich fehlenden Antikörper nicht möglich, folglich wurden überexprimierte Fusionsproteine untersucht.

Rekombinantes CYTIP wurde im Vaccinia-System als Ig-Fusionsprotein in Jurkat E6 Zellen für 6 h überexprimiert (vgl. 5.5). Objektträger wurden mit verschiedenen Integrinliganden (Fibronektin, ICAM-1, VCAM-1) beschichtet (vgl. 4.6.11), die transfizierten Zellen aliquotiert und für 30 min bei 37°C auf den Unterlagen zur Adhäsion gebracht. Als unspezifische Kontrollbeschichtung wurden käuflich erworbene poly-L-Lysin Objektträger verwendet. ICAM-1 wurde als lösliches Fusionsprotein eingesetzt, das im Folgenden als ICAM-1-F<sub>c</sub> bezeichnet wird. Das Fusionsprotein setzt sich aus der extrazellulären Domäne von ICAM-1 zusammen, die über eine „Hinge“-Region (Gelenkregion) amino-terminal an die C<sub>H</sub>2- und C<sub>H</sub>3-Domäne des humanen IgG<sub>1</sub>-Proteins fusioniert war (Kolanus *et al.*, 1996). Auch der lösliche VCAM-1-Ligand (VCAM-1-F<sub>c</sub>) wurde in gleicher Weise hergestellt.

Die Zellen wurden anschließend mit 2% Paraformaldehyd fixiert, mit Glycin freie Bindungsstellen abgesättigt und zur Membranpermeabilisierung 10 min mit einer 0,2%-igen Triton-X-100-Lösung behandelt (siehe 4.6.11). Das Ig-CYTIP-Fusionsprotein wurde mittels anti-Human-IgG<sub>1</sub>-FITC-Antikörper detektiert und mit der konfokalen Lasermikroskopie sichtbar gemacht.

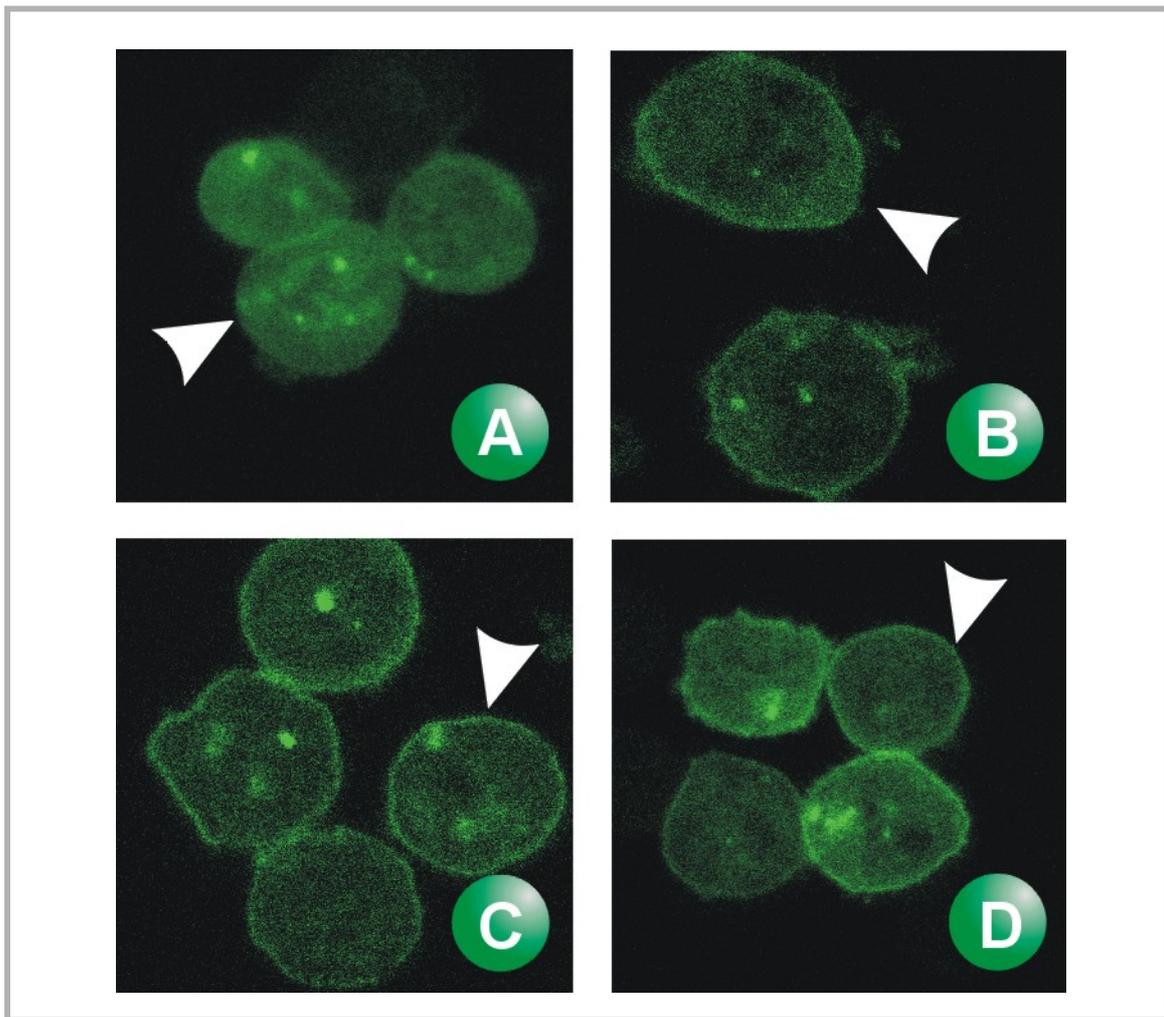


Abb. 27: CYTIP wird durch Integrin-vermittelte Mechanismen an die Plasmamembran rekrutiert.

Jurkat E6 Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia-Viren infiziert und auf verschiedenen Substraten (poly-L-Lysin **(A)**; Fibronektin **(B)**; ICAM-1-F<sub>c</sub> **(C)**, VCAM-1-F<sub>c</sub> **(D)**) zur Adhäsion gebracht. Das Ig-CYTIP-Fusionsprotein wurde nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit einem FITC-gekoppelten Antikörper, der gegen humanes IgG<sub>1</sub> gerichtet ist, detektiert und mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie visualisiert.

Wie aus den Aufnahmen (Abb. 27) zu entnehmen ist, kann Ig-CYTIP in bemerkenswerten Mengen an der Plasmamembran und im Cytoplasma lokalisiert werden, wenn transfizierte Jurkat E6 Zellen auf Integrinliganden adhären. Bei unspezifischer Bindung der Zellen auf poly-L-Lysin konnte das Fusionsprotein fast ausschließlich im Cytosol detektiert werden.

Die Membranlokalisation von CYTIP ist abhängig von der Bindung der transfizierten Jurkat E6 Zellen an spezifische Integrinliganden.

5.9 Die Membranlokalisation von CYTIP wird über die zentrale PDZ-Protein-Interaktionsdomäne vermittelt

Der Aspekt der Membranlokalisation von CYTIP warf die Frage auf, über welche Mechanismen und Proteinbausteine die Membranlokalisation von CYTIP vermittelt wird? Eine Möglichkeit wäre z.B. eine Translokation von CYTIP direkt über die Membranrekrutierung von Cytohesin-1. Neben einer Modifikation von CYTIP (z.B. Myristoylierung) stellen auch Rekrutierungsdomänen, ähnlich der PH-Domäne von Cytohesin, eine Alternative dar. Das Augenmerk richtete sich im Fall von CYTIP besonders auf die PDZ-Domäne.

5.9.1 Die PDZ-Domäne, eine modulare Interaktionsdomäne

PDZ-Domänen stellen modulare Protein-Protein-Interaktionsdomänen in eukaryontischen Organismen dar, die selektiv an definierte C-terminale Peptidmotive binden können (Sheng & Sala, 2001). PDZ-Domänen wurden erstmalig als Homologieregion in verschiedenen Signal leitenden Proteinen entdeckt (Cho *et al.*, 1992; Woods & Bryant, 1993; Kim *et al.*, 1995). Der Name der PDZ-Domäne setzt sich aus den drei Proteinbezeichnungen zusammen in denen diese Domäne erstmals identifiziert wurde: PSD-95 („post synaptic density“), DLG („disc large protein“) und ZO-1 („Zonula Occludens-1“). In der Literatur wird die PDZ-Domäne weiterhin auch als DHR-Domäne (Disc large homology repeat) oder als GLGF-Motif (aufgrund einer konservierten Aminosäuresequenz im Proteininteraktionsbereich) bezeichnet.

Als Protein-Protein-Interaktionsdomäne dient dieses Modul zur Komplexbildung von Signalkomponenten nahe der Zellmembran. Dort binden PDZ-Domänen oft an die cytoplasmatischen Domänen von Oberflächenrezeptoren, aber auch an Lipasen, Kinasen oder sonstige Signalproteine. Beispiele für solche PDZ-Domänen-vermittelte Komplexe stellt die menschliche Synapse oder die Photorezeptorzellen in der Fliege *Drosophila* dar. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel ist die Phototransduktionskaskade in den Augen von *Drosophila*. Verschiedene Signalkomponenten, wie PLC, PKC, Calmodulin werden über einen PDZ-Adapter (INAD) an den Kanalrezeptor (TRP, transient receptor potential) gekoppelt, der über Rhodopsin aufgenommenen Lichtimpulse verarbeiten kann. Der Signalkomplex muß die Signalkaskade schnell aktivieren und deaktivieren können, wobei die einzelnen Proteinkomponenten der Kaskade nah beieinander liegen, um die Signale schnell verarbeiten zu können (Tsunoda & Zuker, 1999). INAD selbst enthält fünf PDZ-Domänen (Shieh & Zhu 1996) und stellt die zentrale Kopplungseinheit des Komplexes dar.

Die meisten bisher bekannten Proteine mit PDZ-Domäne(n), besitzen mehrere PDZ-Einheiten, die verschiedene Spezifität für unterschiedliche Liganden besitzen. Zum Teil sind auch weitere Proteininteraktionsdomänen, wie SH2, SH3 oder WW-Domänen in diesen Proteinen vorhanden.

PDZ-Domänen selbst sind zum Teil in der Lage über ihre N-terminalen Region zu multimerisieren (Hsueh *et al.*, 1997), ohne dabei die Ligandenbindungsspezifität zu beeinflussen.

5.9.1.1 Struktur der PDZ-Domäne

Die 3-dimensionale Struktur wurde bereits von PDZ-Domänen unterschiedlicher Proteine gelöst, wie z.B. die PDZ2-Domäne und PDZ3-Domäne von PSD-95 (Tochio *et al.*, 2000; Doyle *et al.*, 1996) oder die PDZ2 Domäne der Tyrosin-Phosphatase PTP1E (Kozlov *et al.*, 2000). Alle PDZ-Domänen besitzen eine sehr ähnliche Architektur, aus sechs β -Faltblatt und zwei α -Helices (vgl. Abb. 28/A). Die β -Faltblatt-Strukturen sind paarweise parallel angeordnet und bilden zusammen ein „Sandwich“, das von den beiden α -Helices flankiert wird. Zwischen dem β B-Faltblatt und der α B-Helix befindet sich eine Bindungstasche, die für eine Ligandbindung nötig ist (Abb. 28/B). Der N- und C-Terminus der PDZ-Domäne liegen räumlich eng beieinander und befinden sich auf der entgegengesetzten Seite der Bindungstasche. Dies stellt oft ein charakteristisches Merkmal für Protein-Interaktions-Module dar.

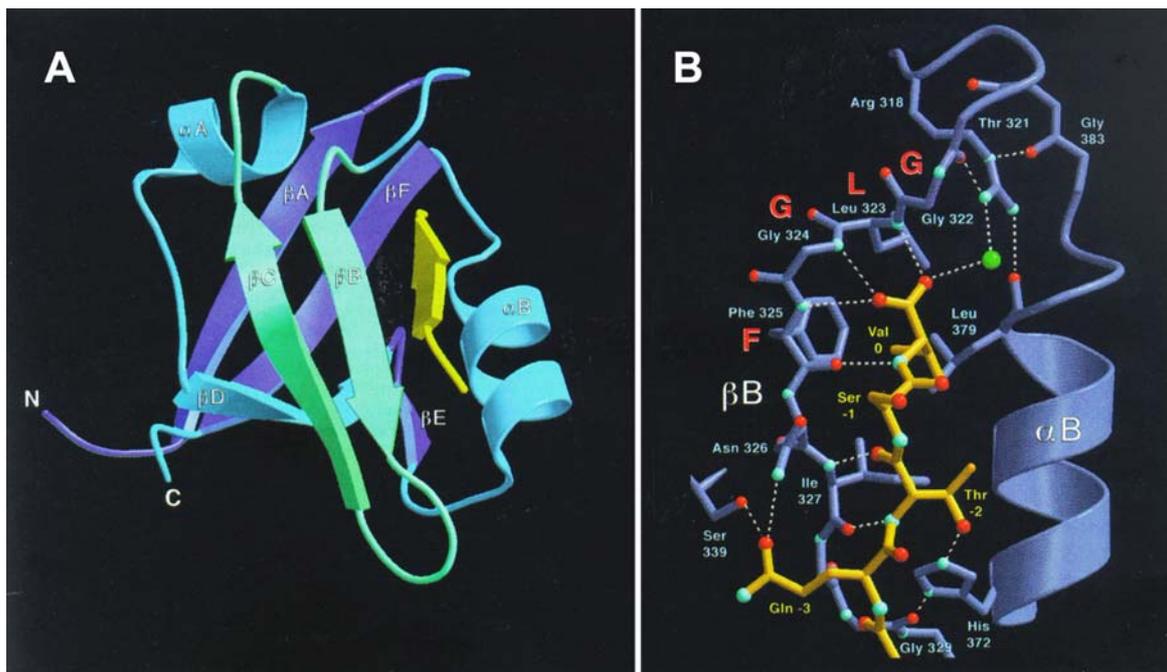


Abb. 28: Strukturdiagramm der PDZ3-Domäne von PSD-95. (Modifiziert nach Doyle *et al.*, 1996).

(A) Das Peptid (gelb) liegt in einer Bindungstasche, die vom β B-Strang und von der α B-Helix ausgebildet wird. Die Struktur der PDZ-Domäne besteht aus drei paarweise angeordneten β -Faltblattstrukturen, die von zwei α -Helices flankiert werden.

(B) Strukturmodell der Bindungstasche. Ausgebildete Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen der PDZ-Domäne (blau) und Ligand (gelb) sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. Hochkonserviert ist die GLGF-Sequenz in der Bindungstasche sowie das Arg<sub>118</sub>, welches über ein Wassermolekül (grüner Punkt) eine Bindung zum Liganden an der P<sub>0</sub>-Position ausbildet. Ile<sub>327</sub> sowie His<sub>372</sub> stellen Aminosäuren dar, die wichtig für die Spezifität der Ligandenbindung sind.

Die vier carboxyterminalen Aminosäuren des Interaktorproteins (Ligand) sind besonders wichtig für die Bindungsaffinität an die PDZ-Domänen, da sie über Wasserstoffbrückenbindungen Kontakt zu den angrenzenden Aminosäuren der Bindungstasche herstellen. Für die Position P_0 (letzte C-terminale Aminosäure) sind bisher nur hydrophobe Aminosäuren wie Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin oder Alanin bekannt (Songyang *et al.*, 1997).

An der P_{-1} Position sind prinzipiell alle Aminosäuren erlaubt, da diese Aminosäure meist keine direkte Bindung zur PDZ-Domäne ausbildet (Doyle *et al.*, 1996). Wie gezeigt werden konnte sind sie jedoch für die Bindungsspezifität durch Ausbildung der Sekundärstruktur des Peptidrestes von großer Wichtigkeit (Niethammer *et al.*, 1998).

Auch die Aminosäuren an der P_{-2} Position haben einen großen Einfluß auf die Bindungsspezifität und sind für die Einteilung der Liganden in bisher drei Klassen verantwortlich. Klasse-I Proteine zu der auch die Liganden der PDZ-Domäne von PSD-95 gehören, zeigen Serin oder Threonin an dieser Position. Hydrophobe Aminosäuren an P_{-2} charakterisieren Klasse-II Peptide, wobei Tyrosin und Phenylalanin die bevorzugten Aminosäuren darstellen. Negativ geladen Aminosäurereste an P_{-2} , wie z.B. Aspartat bilden die letzte Klasse (Klasse-III) der PDZ-Domänen-Liganden (Stricker *et al.*, 1997). Auch die Aminosäure an der P_{-3} Position bildet einen spezifischen Kontakt mit der PDZ-Domäne aus, wobei alle Aminosäuren an dieser Stelle involviert sein können.

| Klasse | C-terminale Sequenz | Interagierendes Protein | PDZ-Domäne von | Referenz |
|----------------------|--|---|---|---|
| Klasse-I | $P_{-3}P_{-2}P_{-1}P_0$ | | | |
| X-S/T-X-V | E - T - D - V
Q - S - S - V
T - T - R - V | Shaker channel
Citron
Neurologin | PSD-95 (PDZ2)
PSD-95 (PDZ3)
PSD-95 (PDZ3) | Kim <i>et al.</i> , 1995
Zhang <i>et al.</i> , 1999
Irie <i>et al.</i> , 1997 |
| X-S/T-X-L | Q - T - R - L
D - S - S - L | GKAP
β -Adreneric Rezeptor | Shank
NHERF (PDZ1) | Naisbitt <i>et al.</i> , 1999
Hall <i>et al.</i> , 1998 |
| Klasse-II | $P_{-3}P_{-2}P_{-1}P_0$ | | | |
| X- Φ -X- Φ | E - Y - Y - V
E - F - Y - A
E - Y - F - I
S - V - K - I
G - I - Q - V
Y - Y - K - V | Neurexin
Syndecan
Glycophorin C
GluR2
EphA7
EphrinB1 | CASK
CASK, syntenin
p55
GRIP (PDZ5)
PICK-1, syntenin
PICK-1 syntenin | Hata <i>et al.</i> , 1996
Hsue <i>et al.</i> , 1998
Marafatia <i>et al.</i> , 1997
Dong <i>et al.</i> , 1997
Torres <i>et al.</i> , 1998
Torres <i>et al.</i> , 1998 |
| Klasse-III | $P_{-3}P_{-2}P_{-1}P_0$ | | | |
| X-D-X-V | V - D - S - V | Melatonin Rezeptor | nNOS | Stricker <i>et al.</i> , 1997 |

Tab. 8: Einteilung der an PDZ-Domänen-bindenden Ligandenklassen.

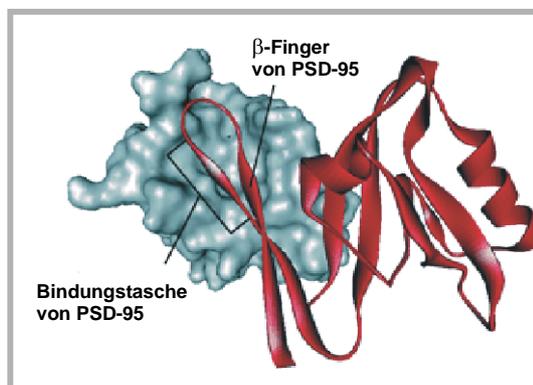
In der Tabelle sind nur die letzten vier Aminosäuren des mit der PDZ-Domäne interagierenden Liganden dargestellt. Hydrophobe Aminosäuren wurden mit Φ markiert, X stellt einen Platzhalter für eine unspezifische Aminosäure dar.

$P_{-3} P_{-2} P_{-1} P_{-0}$ bezeichnen die Position der vier carboxyterminalen Aminosäuren vom C-terminalen Ende aus gezählt.

In der Literatur wird die Bindungskonsensussequenz meist nur als C-terminales Tripeptid (T/SXV) angegeben. Aufgrund von Strukturanalysen konnte gezeigt werden, daß jedoch mindestens vier Aminosäuren für eine stabile Bindung nötig sind.

Für einen stabilen Kontakt zwischen dem C-Terminus des Fas-Oberflächenrezeptors und der PDZ2-Domäne der Tyrosin-Phosphatase PTP1E sind sogar mind. sechs Aminosäuren beteiligt, wie NMR-Messungen von Kozlov *et al.* (2000) zeigen.

Weniger üblich ist die Bindung von PDZ-Domänen an interne Aminosäuresequenzen. Die am besten charakterisierte Bindung, ist die Interaktion zwischen nNOS (neuronal nitric oxide synthase) und der PDZ-Domäne von PSD-95 (Brennan *et al.*, 1996). Kristallographische Daten zeigen eine primäre Interaktion zwischen der PDZ-Domäne von PSD-95 und einer Haarnadel-Schleife („ β -Finger“) an der „Rückseite“ der PDZ-Domäne (nicht Bindungstasche) von nNOS (Hillier *et al.*, 1999). Die Bindungstasche von nNOS bleibt frei für weitere Interaktionen mit anderen Liganden. PDZ-Peptid-Interaktionen können durch Phosphorylierung der C-terminalen Region an Serin, Threonin oder auch Tyrosin reguliert werden, wobei ein breites Spektrum an Kinasen, wie z.B. PKA, PKC, involviert sein können (Cao *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 1999).



5.9.2 Mögliche Bindungspartner für die PDZ-Domäne von CYTIP

Welche Proteine stellen potentielle Bindungspartner für die PDZ-Domäne von CYTIP dar? Proteine mit PDZ-Domänen sind häufig in membrannahen Signal-Komplexen integriert. Einige PDZ-Domänen-Proteine binden an die cytoplasmatische, C-terminale Domäne von Transmembranproteinen. In Bezug auf die LFA-1 vermittelte Zelladhäsion wäre eine Bindung an die α - oder β -Kette des LFA-1 Integrins oder eines Korezeptors denkbar.

5.9.2.1 β_2 -Kette von LFA-1 zeigt keine Interaktion in Kopräzipitationsstudien

Betrachtet man die C-terminalen Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Integrine (vgl. Tab. 9), so besitzt keines eine Bindungssequenz für PDZ-Domänen (vgl. Tab. 8).

| Bezeichnung | Letzten 10 C-terminalen Aminosäuren |
|-------------|-------------------------------------|
| CD18 | -> T V M N P K F A E S |
| CD11a | -> K D S E S G G G K D |
| CD11b | -> E G G P P G A E P Q |
| CD11c | -> T Q T P S P P S E K |
| CD28 | -> Y A P P R D F A Q Y |
| CD29 | -> T V V N P K Y E G K |

Tab. 9: Vergleich der 10 C-terminal-ständigen Aminosäuren verschiedener Integrine.

Rot markiert sind die für eine Klassifizierung von PDZ-bindenden Proteinen notwendigen Aminosäuresequenzen. Keines dieser aufgeführten Proteine kann in die in Tab. 8 aufgeführten Klassen eingeordnet werden.

Aufgrund der engen funktionalen Verknüpfung von Cytohesin-1 mit CD18 sollte, trotz fehlender Konsensussequenz, eine Interaktion zwischen CYTIP und CD18 auch experimentell ausgeschlossen werden. COS7-Zellen wurden mit den in Tab. 10 beschriebenen Konstrukten kotransfiziert (4.2.2), die Zellen anschließend lysiert und an Protein A-Sepharose präzipitiert. slg-CD18<sub>TM/cyt</sub> und slg-CD29<sub>TM/cyt</sub> stellen Konstrukte dar, die jeweils die Transmembranregion und die cytoplasmatische Domäne exprimieren (slg = auf Zelloberfläche exprimiertes Ig). Alle Konstrukte besitzen als Grundgerüst den pRK5C7-Vektor, nur natives Cytohesin-1 wurde im Expressionsvektor CDM7 in die Transfektion eingesetzt. Die Integrinkonstrukte wurden mir freundlicher Weise von C.Geiger (Genzentrum, Abt. Kolanus) zur Verfügung gestellt.

| Plasmid 1 | Plasmid 2 | Plasmid 3 | PMA |
|----------------------------|---------------------|------------|-------|
| slg-Kontrolle | natives Cytohesin-1 | Flag CYTIP | - / + |
| slg-CD18 <sub>TM/cyt</sub> | natives Cytohesin-1 | Flag CYTIP | - / + |
| slg-CD29 <sub>TM/cyt</sub> | natives Cytohesin-1 | Flag CYTIP | - / + |
| slg-Kontrolle | - | Flag CYTIP | - / + |
| slg-CD18 <sub>TM/cyt</sub> | - | Flag CYTIP | - / + |
| slg-CD29 <sub>TM/cyt</sub> | - | Flag CYTIP | - / + |

Tab. 10: Verwendete Konstrukte für einen Interaktionsnachweis zwischen CD18 und CYTIP.

COS7-Zellen wurden mit der DEAE/Dextran-Methode kotransfiziert und nach Inkubation über Nacht aliquotiert und mit 40 ng/ml PMA stimuliert. Nach Lyse der Zellen und Präzipitation über Protein A-Sepharose wurden die Proteine über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. slg-Konstrukte wurden mit einem anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Antikörper, Flag-CYTIP mit einem anti-Flag-Antikörper und Cytohesin über den Antikörper mab 7H2 detektiert. Als Negativkontrolle wurde die transmembrane und cytoplasmatische Domäne von CD29 (slg-CD29<sub>TM/cyt</sub>) eingesetzt.

Im Zellysat wurden alle Konstrukte in äquivalenten Mengen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Wie jedoch vermutet wurde, konnte keine Interaktion zwischen den Komponenten detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

CD18 stellt in diesem System somit keinen Liganden für die PDZ-Domäne von CYTIP dar. Auch weiter durchgeführte Interaktionsanalysen zwischen CD18<sub>TM/cyt</sub> und CYTIP im Hefesystem (4.3) deuteten auf keine Interaktionen hin (Ergebnisse nicht gezeigt).

5.9.2.2 ARF-Proteine: Ein Target für die PDZ-Domäne von CYTIP?

Neben der Bindung an cytoplasmatische Aminosäurereste von Oberflächenrezeptoren binden PDZ-Domänen auch an Signalkomponenten, wie Lipasen, Kinasen oder sonstige Signalproteine. Neben der direkten Bindung der β_2 -Kette von LFA-1 an Cytohesin-1 ist bisher nur eine funktionale Interaktion mit ARF1 und ARF6 (ADP\_riboseylation\_factor) nachgewiesen worden (Meacci *et al.*, 1997; Knorr *et al.*, 2000). Cytohesin-1 wirkt als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor und katalysiert den GDP/GTP-Austausch dieser Proteine (vgl. 1.5). Die ARF-Proteine können in drei Klassen eingeteilt werden (Klasse1: ARF1/ARF3; Klasse2: ARF4/ARF5; Klasse 3: ARF6), die sich in Aminosäuresequenz, Genstruktur und phylogenetischen Analysen unterscheiden. Betrachtet man die C-terminale Aminosäuresequenz der ARF-Proteine, so erfüllt keines die geforderte PDZ-Bindungs-Konsensussequenz (ARF1: -RNQK; ARF6: -NYKS; vgl. Kapitel 5.9.1.2). Interessanter Weise konnte für das humane Protein, PICK1 (protein\_interacting\_with\_C\_kinase\_1) eine Interaktion mit ARF1 und ARF3 im „Two-Hybrid“-System nachgewiesen werden, die über eine PDZ-Domäne vermittelt wird. Die Bindung kommt jedoch nur Zustände, wenn ARF1/ARF3 in GTP-gebundener Form vorliegen. In GDP-gebundener Form von ARF1/3 ist keine Interaktion mit PICK1 detektierbar (Takeya *et al.*, 2000).

Aufbauend auf diese Daten wurden verschiedene ARF-Konstrukte auf eine Interaktion mit CYTIP im „Two-Hybrid-System“ (4.3.2) getestet. Als „bait“ wurden die ARF-Konstrukte eingesetzt, als „prey“ CYTIP, welches über eine *MluI/NotI*-Klonierung in den Expressionsvektor pJG4-5 überführt wurde. Die ARF-Konstrukte wurden von T.Knorr (Abt. Kolanus, Genzentrum) in den Vektor pEG202 kloniert und mir freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Die Mutanten ARF1 T31N, ARF6 T27N sind nicht mehr in der Lage GTP zu binden und liegen somit in GDP-gebundener Form vor, dem inaktiven Zustand der ARF-Proteine. Durch Mutation des Glutamins 71 (ARF1 Q71L) bzw. Glutamins 67 (ARF6 Q67L) zu Leucin entsteht eine konstitutiv aktive Variante, bei der die intrinsische Aktivität der Hydrolyse zerstört wurde und die Proteine deshalb in GTP-gebundener Form arretiert sind.

In gleicher Weise, wie unter 5.4 beschrieben, wurden die Konstrukte in den Hefestamm EGY48/JK103 kotransfiziert und die Intensität der Protein-Protein-Interaktion anhand der Blaufärbung durch Umsetzung des Substrates X-Gal analysiert.

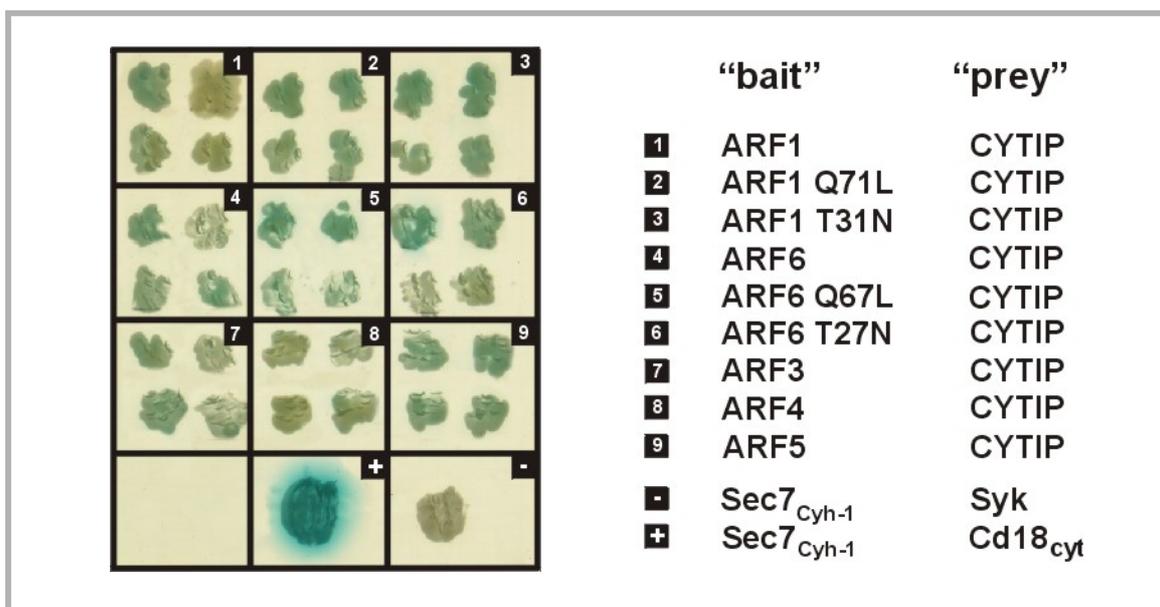


Abb. 30: Protein-Protein-Interaktionsanalysen in *S. cerevisiae* zwischen CYTIP und Proteinhomologen der ARF-Proteine sowie konstitutiv aktiven und dominant negativen ARF-Varianten.

Die ARF-Konstrukte wurden als „bait“-Protein exprimiert, CYTIP als „prey“-Protein koexprimiert. Als Positivkontrolle (+) wurde die bekannte Interaktion zwischen CD18 und der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 (Sec7<sub>Cyh-1</sub>) eingesetzt. Eine Kofransfektion der cytoplasmatischen Domäne von CD18 (CD18<sub>cyt</sub>) und der Tyrosinkinase Syk diente als Negativkontrolle (-).

Zur Analyse wurden von jeder Interaktion vier unabhängige Klone dargestellt.

Die Klone wurden für 60 h inkubiert, die Positivkontrolle zeigt sehr starke Interaktion, die Negativkontrolle auch nach drei Tagen Inkubation keinerlei Färbung. Die Interaktionen zwischen CYTIP und den verschiedenen ARF-Konstrukten ist in allen Proben sehr schwach, aber dennoch detektierbar.

Zwischen den GDP- oder GTP-gebundenen Formen von ARF1 und ARF6 sind keine Unterschiede erkennbar. Es ist anzunehmen, daß keine dieser ARF-Proteine einen physiologischen Interaktionspartner für CYTIP darstellt.

Wie von Knorr *et al.* (2000) gezeigt wurde, kann Cytohesin-1 den GDP/GTP-Austausch von ARF1 und ARF6 *in vitro* katalysieren. *In vivo* Daten deuten aber darauf hin, daß beide Proteine jedoch nicht die physiologischen Targets darstellen. Mögliche Kandidaten sind sicherlich noch unbekannte ARF-Proteine oder eine wachsende Gruppe von Proteine mit einer ARF-Domäne, wie z.B. ARLs (ARF-like-proteins) oder ARD-1 (ADP-riboseylation factor domain protein 1).

In einem weiteren Experiment sollte durch einen biochemischen Nachweis eine Interaktion zwischen CYTIP und ARF-Proteinen weiter untersucht werden. Ig-CYTIP wurde im Vaccinia-System in Jurkat E6 Zellen und der humanen lymphoblastoiden B-Zelllinie LCL-721 überexprimiert, die Zellen lysiert und an Protein A-Sepharose immobilisiert. Die präzipitierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem pan-anti-ARF-Western-Blot analysiert.

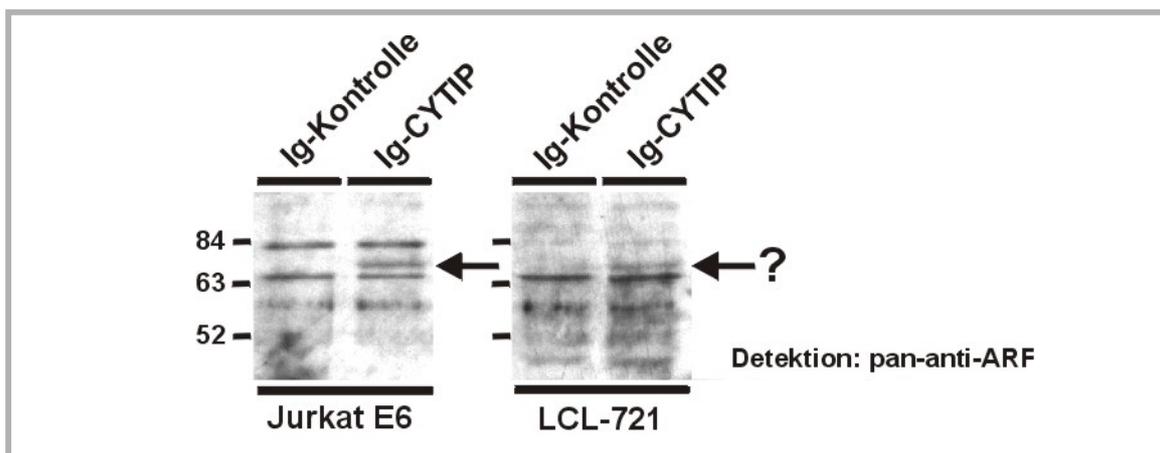


Abb. 31: Kopräzipitation von Ig-CYTIP mit endogenen ARF-Proteinen bzw. mit unbekanntem Proteinen mit einer ARF-Domäne.

Rekombinante Vaccinia-Viren wurden zur Expression von Ig-CYTIP verwendet und nach Lyse der Zellen Ig-CYTIP an Protein A-Sepharose immobilisiert und gebundene Proteine über SDS-Page aufgetrennt. ARF-Proteine wurden mit einem pan-anti-ARF-Western-Blot detektiert (Antikörper erkennt alle ARF-Proteine).

Es wurde keine Bande im Bereich von ca. 21 kDa (molekulare Größe der ARF-Proteine) detektiert (nicht gezeigt). Auffallend ist jedoch in beiden Zelllinien eine Proteinbande bei ca. 75-80 kDa. Es könnte sich hierbei um eine ARF-Domänen enthaltendes Protein handeln. Im Zuge dieser Arbeit wurde diese Bande nicht weiter analysiert, stellt aber sicherlich einen Ausgangspunkt für weitere Analysen dar.

5.9.3 Generierung von PDZ-Mutanten in CYTIP

Zur Generierung dominant negativer PDZ-Mutanten in CYTIP wurde das Augenmerk auf die Bindungstasche gelegt. Die Absicht war möglichst Aminosäuren zu mutieren, die besonders wichtig für die Strukturausbildung und Spezifität der Ligandenbindung sind. Zentrale Aminosäure ist Lysin 82 (in CYTIP), ein hochkonserviertes Bindungselement in fast allen bekannten PDZ-Domänen (R/K-XXX-GLGF). Mit der positiv geladene Amidgruppe bindet K82 über ein Wassermolekül an die P<sub>0</sub>-Aminosäure des Liganden (vgl. Abb. 32). Durch Mutation in die hydrophobe Aminosäure Alanin sollte diese Struktur nachhaltig gestört werden. Eine wichtige Aminosäure für die Bindungsspezifität stellt die P<sub>-2</sub> Position des Liganden dar. Diese Aminosäure (P<sub>-2</sub>) bindet über Isoleucin (I90) mit der CYTIP-PDZ-Domäne und wurde in Alanin (I90A) mutiert.

Als dritte Mutante wurde die Mutation F90A eingeführt. Auch diese Aminosäure ist in vielen PDZ-Domänen sehr konserviert. Weiterhin bildet sie zwei Wasserstoffbrücken zum Liganden aus.

Da nicht hervorzusehen war, inwieweit die beschriebenen Einzelmutanten eine ausreichende Inhibierung einer PDZ-Peptid-Interaktion induzieren und somit dominant negative Mutanten darstellen, wurde zusätzlich die Trippelmutante K82E/F90A/I92A generiert. Im Verlauf dieser Arbeit wird diese Trippelmutante einfach als CYTIP 82/90/92 bezeichnet.

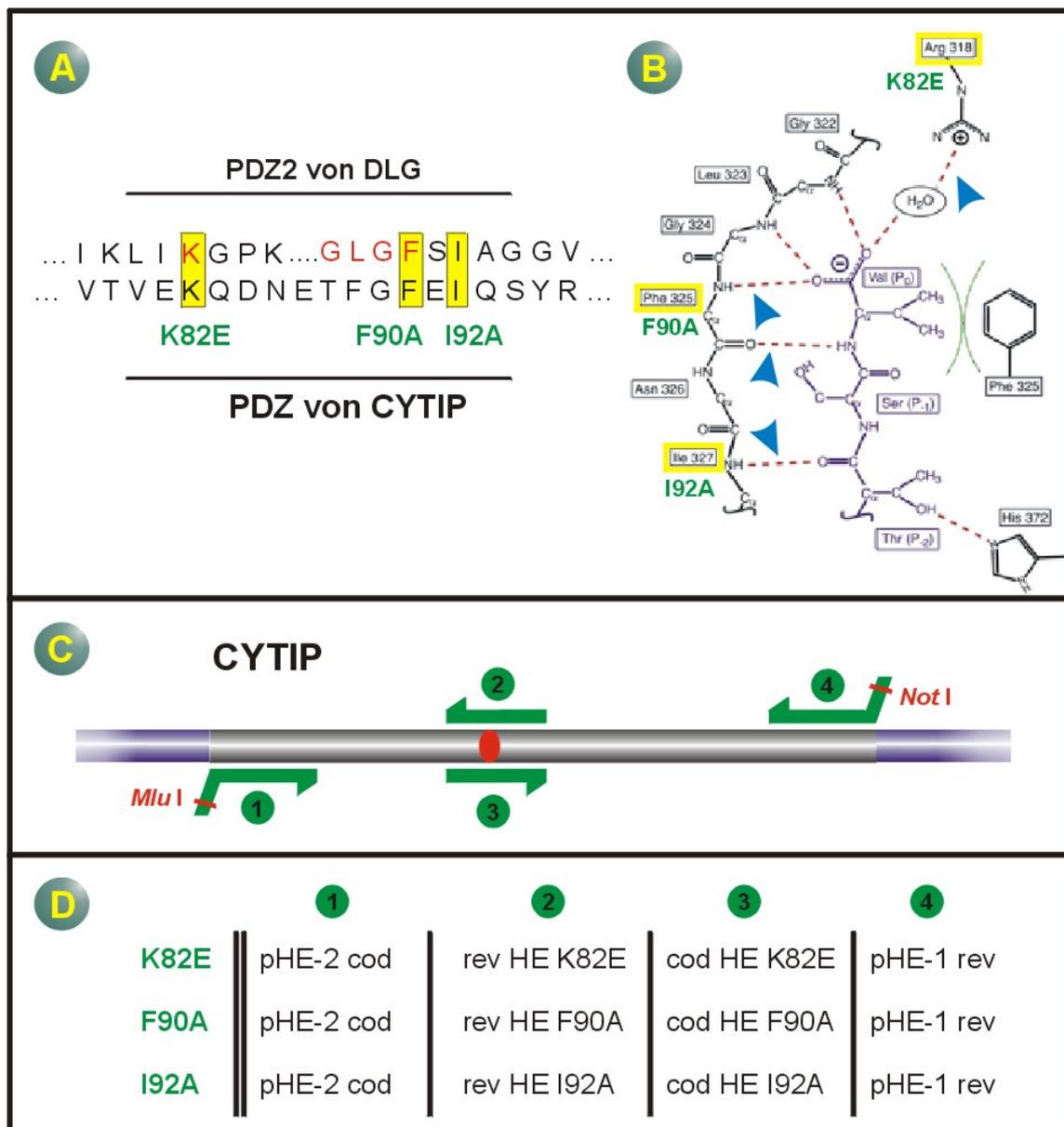


Abb. 32: Konstruktion von dominant negativen PDZ-Mutanten in CYTIP.

(A) Vergleich der Aminosäuresequenzen im Ligandbindungsbereich der zweiten PDZ-Domäne von DLG und der PDZ-Domäne von CYTIP. Mit **Rot** markiert sind die besonders konservierten Aminosäuren in PDZ-Domänen. **Gelb** markiert wurden die mutierten Aminosäuren.

(B) Schematische Darstellung der wichtigsten Aminosäuren der Bindungstasche von PSD-95 (Harris *et al.*, 2001) und Liganden.

(C) Die Mutanten wurden über PCR-Reaktionen in zwei Schritten generiert. Im ersten Schritt wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt, wobei in die eine Reaktion die Primer 1 und 2, in einer weiteren Reaktion die Primer 3 und 4 verwendet wurden. In die überlappenden Primer 2 und 3 wird durch Austausch eines Nukleotids eine Mutation eingeführt. Anschließend wird eine dritte PCR-Reaktion mit den Primern 1 und 4 durchgeführt, wobei DNA-Produkte der ersten beiden Reaktionen im 1:1 Verhältnis als Template eingesetzt werden. Die Primer 1 und 4 enthalten überlappende DNA-Sequenzen, in die Restriktionsschnittstellen zur späteren Klonierung enthalten sind.

(D) Zusammenstellung der für die Mutanten verwendeten Oligodesoxyribonukleotide.

5.9.4 Die Membranlokalisation von CYTIP wird über die PDZ-Domäne vermittelt

Wie schon in den vorangegangenen Experimenten mit überexprimiertem CYTIP wurden auch die PDZ-Mutanten als rekombinante Ig-Fusionsproteins im Vaccinia-System überexprimiert (vgl. 5.5). Jurkat E6 Zellen wurden mit den jeweiligen Konstrukten infiziert und nach 6 h Inkubation auf Fibronectin-beschichteten Objektträgern (vgl. 4.6.11) für 30 min bei 37°C zur Adhäsion gebracht. Die Zellen wurden anschließend mit 2% Paraformaldehyd fixiert, zur Membranpermeabilisierung mit einer 0,2% Triton-X-100-Lösung behandelt. Zur Detektion des Ig-Fusionsanteil wurde ein anti-Mensch-IgG<sub>1</sub>-FITC-Antikörper verwendet und das Expressionsmuster mittels konfokaler Lasermikroskopie sichtbar gemacht (4.6.11).

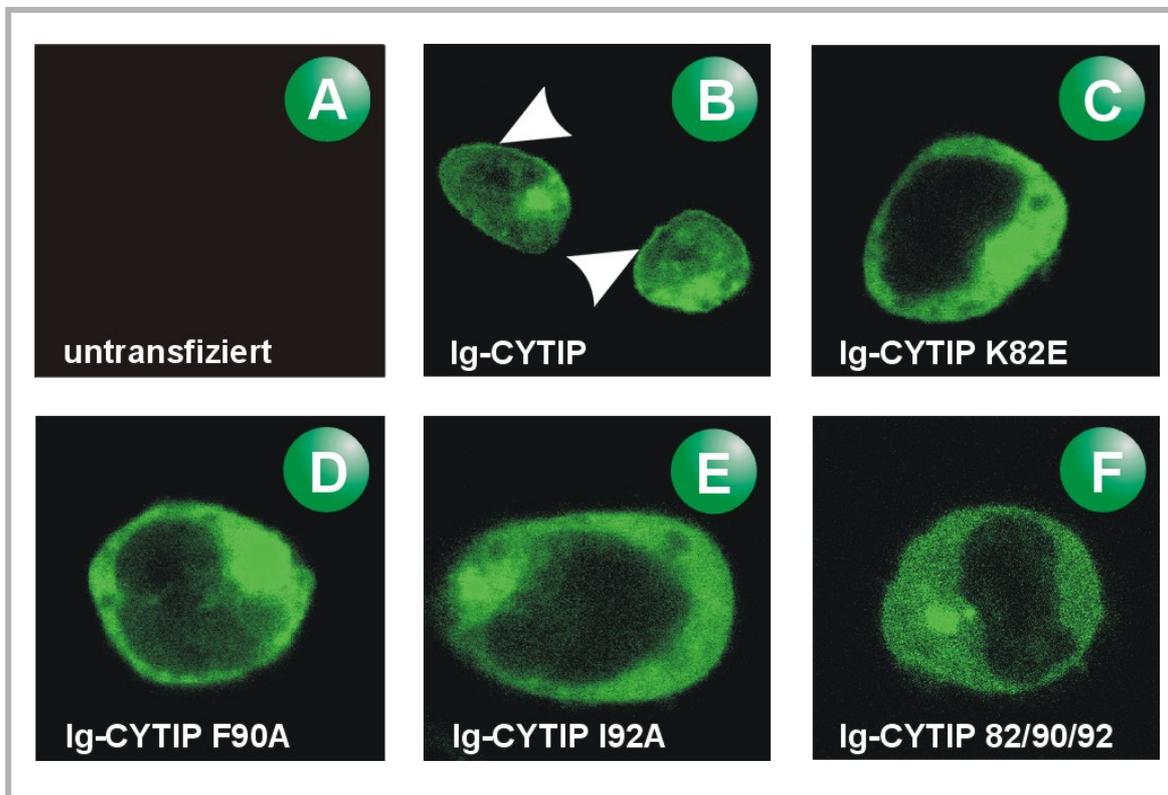


Abb. 33: Die PDZ-Domäne von CYTIP ist für eine Membranlokalisation des Proteins in Jurkat E6 Zellen notwendig.

Jurkat E6 Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia-Viren infiziert und auf einer Fibronectin-beschichteten Unterlage zur Adhäsion gebracht, anschließend fixiert, permeabilisiert und mit FITC gekoppelten anti-Mensch-IgG<sub>1</sub>-Antikörper gefärbt. Zum Nachweis der Antikörperspezifität wurden auch untransfizierte Zellen (A) gefärbt. Wildtyp CYTIP (B) zeigt eine deutliche Membranlokalisation, wobei die Trippelmutante (F), wie auch die Einzelmutanten (C, D, E) nur cytoplasmatisch exprimiert werden.

Alle Proteine waren ähnlich gut exprimierbar. Das Fusionsprotein Ig-CYTIP (B) zeigte, wie bereits beschrieben, neben cytoplasmatischer Expression auch eine klare Membranlokalisation, wenn transfizierte Jurkat E6 Zellen auf dem Integrinliganden Fibronectin adhärirt wurden. Die Einzelmutanten (C, D, E) wie auch die Trippelmutante (F) hatten jedoch die Fähigkeit verloren mit

der Plasmamembran zu interagieren. Identische Ergebnisse der cytoplasmatischen Lokalisation der CYTIP-PDZ-Mutanten wurden auch auf den Integrinliganden ICAM-1-F<sub>c</sub> und VCAM-1-F<sub>c</sub> erhalten, die jedoch aufgrund hoher Hintergrundfärbung nicht dargestellt wurden. Der hohe Hintergrund wird durch den Antikörper Ziege-anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Antikörper erzeugt, der für die Kopplung der ICAM-1-F<sub>c</sub>- und VCAM-1-F<sub>c</sub>-Liganden an das Trägermaterial notwendig ist (4.6.11). Der zur Detektion der Ig-Konstrukte verwendete FITC-gekoppelten anti-Human-IgG-Antikörper erkennt den Kopplungsantikörper. Bei Fibronektin entfällt diese Kopplungskomponente, der Hintergrund ist deshalb störungsfrei.

Wie in 5.3 erläutert interagieren CYTIP und Cytohesin-1 über ihre „coiled-coil“-Domänen miteinander. Cytohesin-1 wird bei der LFA-1 vermittelten Zelladhäsion über die PH-Domäne an die Plasmamembran rekrutiert. Es besteht somit die Möglichkeit, daß CYTIP über die Aktivierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran translokalisiert wird. Wäre dies der Fall, so hätte aufgrund des eben beschriebenen Ergebnisses die PDZ-Domäne von CYTIP einen Einfluß auf die Bindung zwischen Cytohesin-1 und CYTIP. Im folgenden Experiment sollte molekularbiologisch überprüft werden, ob die PDZ-Mutante CYTIP 82/90/92 noch in der Lage ist mit Cytohesin-1 zu interagieren.

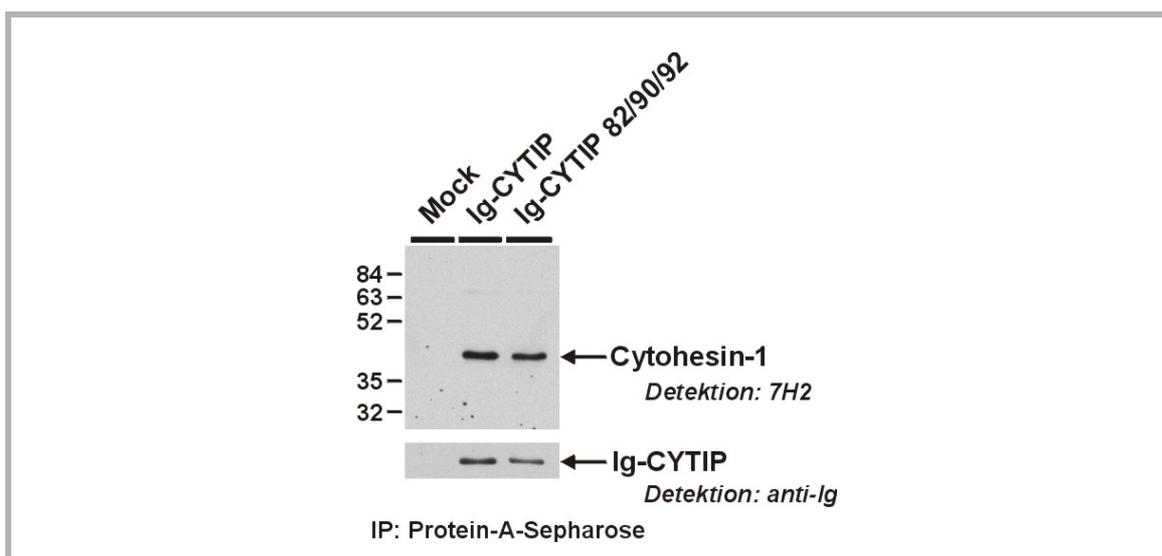


Abb. 34: Koimmunpräzipitation von endogenem Cytohesin-1 an Ig-CYTIP oder der Trippelmutante Ig-CYTIP 82/90/92.

Rekombinante Vaccinia-Viren wurden zur Expression von Ig-CYTIP und Ig-CYTIP 82/90/92 in Jurkat E6 Zellen verwendet und die Konstrukte über einen anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Western-Blot nach Präzipitation an Protein A-Sepharose (unterer Blot) nachgewiesen. An CYTIP bzw. an die Mutante gebundenes endogenes Cytohesin-1 wurde über den anti-Cytohesin-1 Antikörper mab 7H2 nachgewiesen (oberer Blot). Als sekundären Antikörper wurde ein anti-Ratte-Peroxidase-konjugierter Antikörper verwendet.

Beide Ig-Konstrukte konnten in vergleichbaren Mengen exprimiert werden. (Abb. 34 unterer Blot). Sowohl Wildtyp Ig-CYTIP wie auch die Mutante Ig-CYTIP 82/90/92, mit dominant negativer PDZ-Domäne, bindet in Jurkat E6 Zellen mit äquivalenten Mengen an endogenes Cytohesin-1. Die Membranlokalisierung von CYTIP wird somit nicht über die Membranrekrutierung von Cytohesin-1

durch Interaktion der „coiled-coil“-Domänen vermittelt, sondern ist direkt von der Bindung der PDZ-Domäne an Membran-ständige Liganden abhängig.

5.10 Die Behandlung von Jurkat Zellen mit Phorbol ester (PMA) führt zur Relokalisation von CYTIP von der Plasmamembran

Cytohesin-1 stellt einen wichtigen Faktor bei der β_2 -Integrin vermittelten Regulation der Adhäsion von Jurkat E6 Zellen dar (vgl. 1.5). In der Regel wird LFA-1 in einer inaktiven Form auf der Zelloberfläche exprimiert und erst durch intrazelluläre Signalkaskaden zur Ligandenbindung aktiviert. Die Induktion solcher Signalkaskaden in hämatopoetischen Zellen kann z.B. durch die Stimulierung von T-Zell-Oberflächenrezeptoren erfolgen. Auf diese Weise werden Tyrosinkinasen aktiviert, die u.a. die Stimulierung von Phosphatidylinositol-Phospholipasen (B oder C) induzieren. Diese spalten das Phospholipid Phosphatidylinositol in Diacylglycerin und Inositoltrisphosphat (IP_3). Während Diacylglycerin Proteinkinase C stimuliert, bewirkt IP_3 die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Für beide Ereignisse wurde gezeigt, daß sie zur Aktivierung von LFA-1 führen können (Kolanus & Seed, 1997; Lub *et al.*, 1995).

In experimentellen Ansätzen wird zur Aktivierung von LFA-1 häufig Phorbol ester (PMA, Tetradecanoylphorbol-13-acetat) eingesetzt (Dustin & Springer, 1989; Ganpule *et al.*, 1997; van Kooyk *et al.*, 1989, Rothlein & Springer, 1986; Burn *et al.*, 1988), der als Aktivator der Proteinkinase C gilt (Nishizuka, 1986) und ein Struktur analogon von Diacylglycerin darstellt.

Kolanus *et al.*, 1996 und Geiger *et al.*, 2000 konnte zeigen, daß die Überexpression von Wildtyp Cytohesin-1, die LFA-1 vermittelte Adhäsion von Lymphozyten auf ICAM-1- F_c gegenüber der Grundadhäsion um das 8-fache steigern kann. Durch zusätzliche Stimulation der Zellen mit PMA konnte einer weitere Steigerung der Adhäsion um das 1,5-fache erreicht werden.

Aufgrund der bereits funktionalen Daten war die zelluläre Lokalisation von CYTIP nach Stimulation mit Phorbol ester von großem Interesse.

Jurkat E6 Zellen wurden mit rekombinanten Ig-CYTIP Vaccinia-Viren infiziert und nach 5-stündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank aliquotiert und für 20 min mit 40 ng/ml PMA bei 37°C stimuliert. Eine Kontrollgruppe wurde ohne Reagenz in gleicher Weise behandelt. Die Zellen wurden auf Fibronectin oder ICAM-1- F_c beschichteten Objektträgern für eine halbe Stunde bei 37°C zur Adhäsion gebracht und nicht-adhärenente Zellen anschließend mit HBSS-Puffer abgewaschen. Zur Färbung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und Ig-CYTIP mit FITC-gekoppelten anti-Human IgG<sub>1</sub>-Antikörper detektiert. Die Färbungen wurden anschließend mit der konfokalen Lasermikroskopie analysiert (4.6.11).

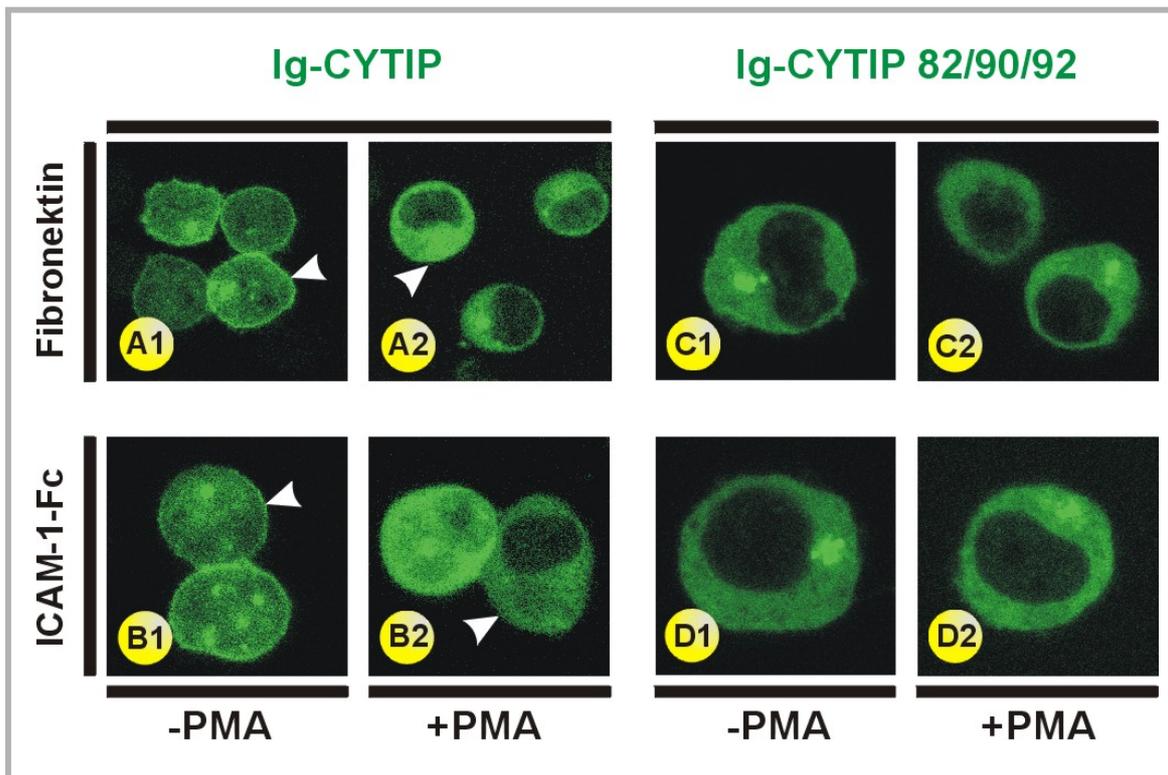


Abb. 35: Verlust der Membranlokalisation von Ig-CYTIP in Jurkat E6 Zellen wird durch PMA-Stimulation induziert.

In Jurkat E6 Zellen wurden mit dem Vaccinia-Expressions-System Ig-CYTIP (A, B) oder die Mutante Ig-CYTIP 82/90/92 (C, D) überexprimiert und für 20 min mit PMA (40 ng/ml) inkubiert, bevor die Zellen auf Fibronectin (A, C) oder ICAM-1-F<sub>c</sub> (B, D) beschichteten Trägermaterial zur Adhäsion gebracht wurden. Angefärbt wurden die Fusionsproteine mit einem FITC-konjugierten anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Antikörper. Ig-CYTIP zeigt auf Fibronectin (A1) oder ICAM-1-F<sub>c</sub> (B1), ohne PMA-Stimulierung, eine klare Membranlokalisation, während nach Inkubation mit PMA Ig-CYTIP nur noch cytoplasmatisch exprimiert wird (A2, B2).

Wie schon unter 5.8 beschrieben zeigt in Jurkat E6 Zellen überexprimiertes Ig-CYTIP nach einer Adhäsion auf dem Integrinliganden Fibronectin (A1) oder ICAM-1-F<sub>c</sub> (B1) eine deutliche Membranlokalisation, während die Trippelmutante Ig-CYTIP 82/90/92 aufgrund einer defekten Bindungstasche in der PDZ-Domäne die Fähigkeit verloren hat Kontakt mit Membrankomponenten aufzunehmen (C1, D1). Auch nach PMA-Stimulation zeigt sich bei der Trippelmutante keine Veränderung der Lokalisation (C2, D2).

Interessanter Weise lokalisiert Ig-CYTIP nach PMA-Stimulation jedoch nicht mehr an der Plasmamembran. Während der Durchführung des Experiments zeigte sich auch, daß weniger Zellen auf dem ICAM-1-F<sub>c</sub> Liganden banden, wenn die Zellen zuvor stimuliert worden waren. Die Adhäsion mit der Unterlage scheint vermindert zu werden.

Die Stimulierung von Jurkat E6 Zellen mit Phorbol ester (PMA) führt zu einer Relokalisation von CYTIP von der Plasmamembran in das Cytoplasma.

5.11 Plasmamembran lokalisiertes Cytohesin-1 wird durch Expression von CYTIP und Phorbol esterstimulation von der Plasmamembran relokalisiert

Die bisherigen Ergebnisse machen eine stabile Assoziation zwischen CYTIP und Cytohesin-1 deutlich, wobei Cytohesin-1 eine starke Membranlokalisation auch nach Phorbol esterstimulation zeigt. Die Relokalisation von CYTIP von der Plasmamembran deutete auf einen regulatorischen Einfluß von CYTIP hin. Zur Analyse der Regulation wurden die folgenden Kollokalisationsexperimente in Jurkat E6 Zellen durchgeführt.

DNA-Plasmide der jeweiligen Konstrukte wurden jeweils über Elektroporation (4.2.3) in Jurkat E6 Zellen eingebracht und die Zellen über Nacht bei 37°C weiterkultiviert. CYTIP wurde als eGFP-Fusionsprotein exprimiert, und das eGFP über *HindIII/MluI* Restriktion im Austausch mit dem Ig-Fragment des pN1 Ig-CYTIP-Vektors kloniert. Cytohesin-1 stand bereits als pN1 Ig-Cytohesin-1 Konstrukt im Labor zur Verfügung.

Nach erfolgter Inkubation wurde ein Teil der Zellen für 20 min mit 40 ng/ml PMA stimuliert und die nicht-stimulierten/stimulierten Proben anschließend auf Objektträger zur Adhäsion gebracht, die zuvor mit Fibronectin beschichtet worden waren. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das Ig-Cytohesin-Konstrukt mit einem TRITC-gekoppelten anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Antikörper detektiert. Die Abbildungen (Abb. 35) wurden mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie erzeugt (4.6.11).

eGFP-CYTIP kann wie die im Vaccinia-System überexprimierten Ig-CYTIP-Konstrukte an der Plasmamembran und im Cytoplasma detektiert werden (C). Nach PMA-Stimulation ist auch in diesem Fall keine Membranlokalisation mehr detektierbar (D). Überexprimiertes Ig-Cytohesin zeigt eine deutliche Membranlokalisation in unstimulierten und in stimulierten Jurkat E6 Zellen (A, B).

Bei einer Kotransfektion von eGFP-CYTIP und Ig-Cytohesin-1 kolokalisieren beide Proteine in unstimulierten Jurkat E6 Zellen deutlich an der Plasmamembran (E3).

Durch Stimulation der Zellen mit Phorbol ester (PMA) wird die Membranlokalisation von CYTIP und Cytohesin-1 aufgehoben, beide Proteine sind nur noch im Cytoplasma nachweisbar (F3).

CYTIP ist aufgrund dieser Experimente für eine Relokalisation von Cytohesin-1 von der Plasmamembran (mit-)verantwortlich und stellt somit einen neuen Faktor für die Regulierung von Cytohesin-1 dar.

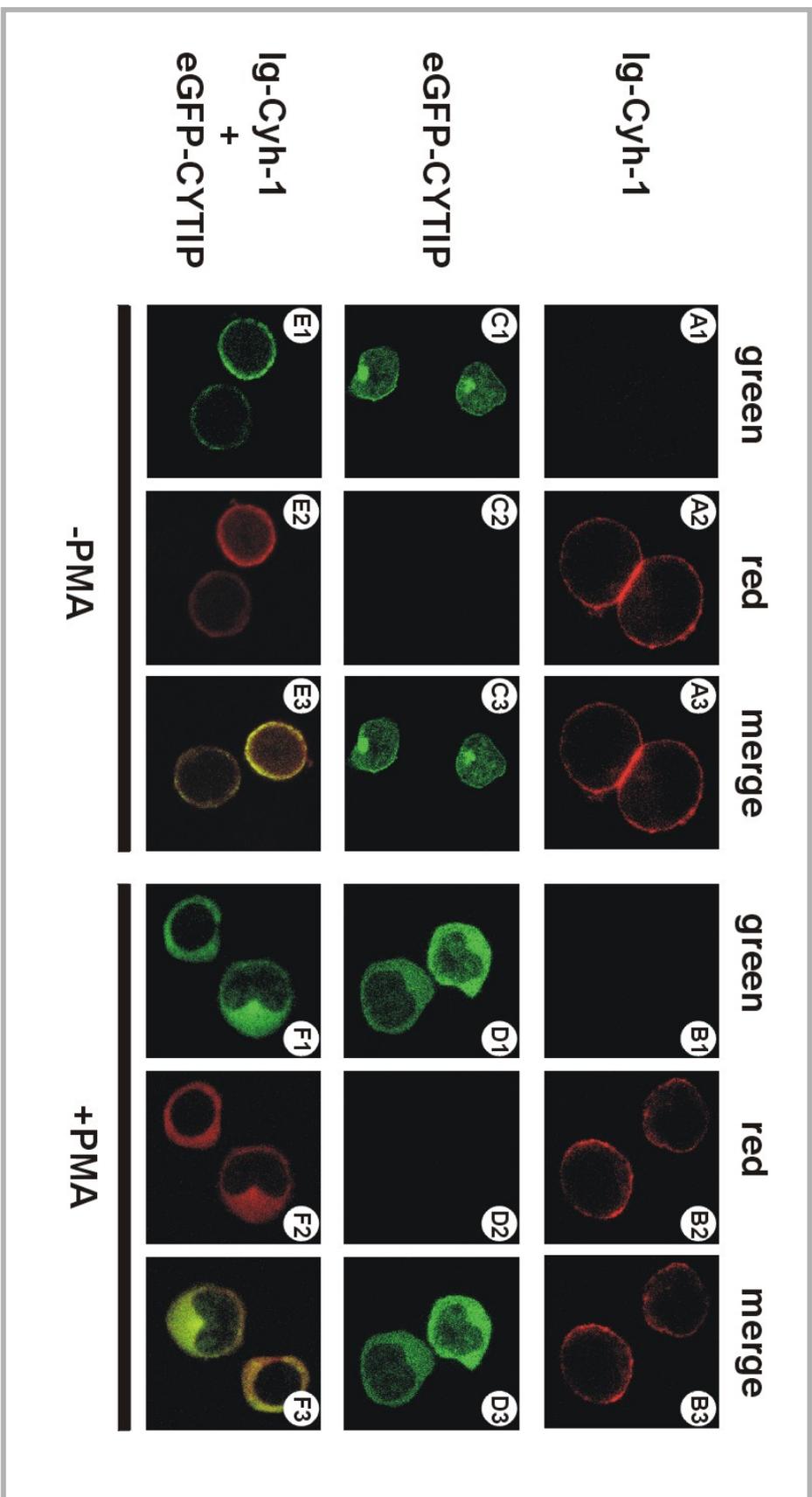


Abb. 36: Koloalkalisation von CYTIP und Cytohesin-1 in Jurkat E6 Zellen.

Jurkat E6 Zellen wurden mittels Elektroporation, entweder mit Ig-Cytohesin-1 (A, B), mit eGFP-CYTIP (C, D) oder beiden Konstrukten (E, F) transfiziert, wobei die absolute DNA-Menge (30 µg) jeweils identisch war. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurde ein Aliquot des jeweiligen Ansatzes mit PMA (40 ng/ml) inkubiert und anschließend die unstimulierten/stimulierten Zellen jeweils auf Fibronectin-beschichteten Objektträger ausgebracht. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und Ig-Cytohesin-1 mit einem TRITC-konjugierten anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Antikörper gefärbt. Aufnahme F3 zeigt eine Relokalisation von Cytohesin-1 in das Cytoplasma nach PMA-Stimulation und Koexpression von CYTIP.

5.12 Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 beeinflusst nicht die Bindung zwischen CYTIP und Cytohesin-1

Von Dierks *et al.*, 2001 konnte in Cytohesin-1 eine Phosphorylierung der Aminosäuren Serin 394 und Threonin 395 am C-Terminus (C-Domain) des Proteins nachgewiesen werden. *In vitro* konnte Cytohesin-1 durch PKC δ phosphoryliert werden, Serin 394/Threonin 395 wurden aber auch *in vivo* durch PMA-Stimulation phosphoryliert. Biochemische und funktionale Analysen zeigten eine Interaktion von phosphoryliertem Cytohesin-1 mit unlöslichen Komponenten des Aktincytoskeletts, wobei die Membranlokalisation nicht verloren geht. Ferner ist die Phosphorylierung von Cytohesin-1 für eine maximale LFA-1 vermittelte Zelladhäsion notwendig (Dierks *et al.*, 2001).

Im Folgenden wurde der Einfluß der Phosphorylierung von Cytohesin-1 auf die Bindung von CYTIP untersucht. Analog zu Dierks *et al.*, 2001 wurde aufgereinigtes GST-Cytohesin-1 mit Zelllysaten, von denen Membranen und Zellkerne abgetrennt worden waren, versetzt und *in vitro* durch Zugabe von PKC δ und ATP phosphoryliert. Die unlöslichen Cytoskelettkomponenten wurden von der löslichen Fraktion durch Zentrifugation abgetrennt. Das normalerweise lösliche Fusionsprotein (Abb. 37/B; Spur 1) kann nach der Behandlung mit PKC δ und ATP ausschließlich in der unlöslichen Fraktion (Abb. 37/B; Spur 4) detektiert werden. Eine erfolgreiche Phosphorylierung von Cytohesin-1 kann durch diese Fraktionierungsmethode nachgewiesen werden.

Um die Interaktion zwischen CYTIP und Cytohesin-1 zu untersuchen wurde Ig-CYTIP transient überexprimiert, *in vitro* mit (un-)phosphorylierten GST-Cytohesin-1 inkubiert und anschließend der Proteinkomplex über GSH-Sepharose präzipitiert.

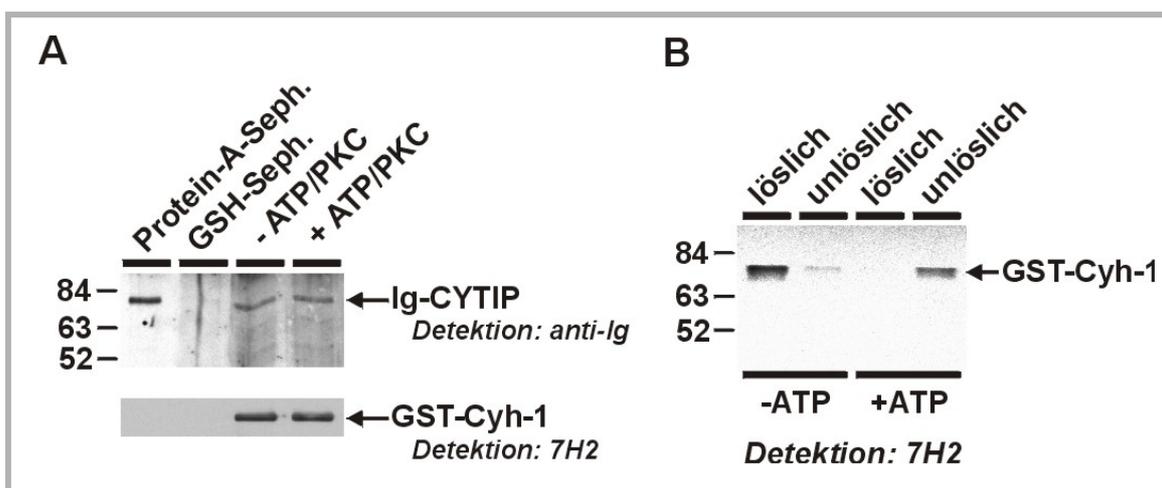


Abb. 37: Die direkte Interaktion zwischen CYTIP und Cytohesin-1 wird nicht durch die Phosphorylierung von Cytohesin-1 beeinflusst.

(A) Western-Blot-Analyse: Überexprimiertes Ig-CYTIP wurde *in vitro* mit unphosphoryliertem GSH-Cytohesin-1 (-ATP/PKC, Spur 3) oder phosphoryliertem GSH-Cytohesin-1 (+ATP/PKC, Spur 4) komplexiert und über GSH-Sepharose immobilisiert. Spur 1 zeigt die Positivkontrolle, wobei Ig-CYTIP direkt an Protein A-Sepharose immobilisiert wurde. Als Negativkontrolle (Spur 2) wurde kein GST-Cytohesin-1 zur Präzipitation an GSH-Sepharose eingesetzt. GST-Cytohesin-1 wurde

mit dem Antikörper mab 7H2 detektiert, Ig-CYTIP über einen anti-Human-IgG<sub>1</sub> Antikörper (Peroxidase konjugiert) nachgewiesen.

(B) Funktionale Prüfung der Phosphorylierung von GST-Cytohesin-1 nach Dierks *et al.*, 2001. GST-Cytohesin-1 wurde mit Zelllysaten (Zellkerne und Membranen wurden vorher abgetrennt) inkubiert und anschließend zur *in vitro* Phosphorylierung mit PKC δ und ATP versetzt. Das normalerweise lösliche Fusionsprotein (Spur 1) assoziiert mit der unlöslichen Fraktion der cytoskeletalen Bestandteile (Spur 4). GST-Cytohesin-1 wurde mit dem Antikörper mab 7H2 detektiert, als sekundärer Antikörper kam ein Peroxidase-konjugierter Ratte-anti-Mensch-IgG-Antikörper zum Einsatz.

Die Abb. 37/A zeigt deutlich eine äquivalente Bindung von unphosphoryliertem oder phosphoryliertem GST-Cytohesin-1 an Ig-CYTIP (Abb. 37/A, Spur 3, 4). Es wurden äquivalente Mengen an (un-)modifizieren GSH-Cytohesin-1 eingesetzt wie aus dem unteren Gel in Abb. 37/A ersichtlich wird. Die Phosphorylierung von Cytohesin-1 hat somit keinen direkten Einfluß auf die Interaktion mit CYTIP.

5.13 Durch Überexpression von CYTIP wird der Guanin-Nukleotid-Austausch durch Cytohesin-1 nicht beeinflusst

Die Proteine der Cytohesin-Familie stellen alle Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) für kleine ARF-Proteine der Super-Ras-Familie dar, wobei die SEC7-Domäne der Cytohesin-Moleküle den GDP/GTP-Austausch katalysieren (Meacci *et al.*, 1997; Chardin *et al.*, 1996). Für Cytohesin-2 wurde das katalytische Zentrum der SEC7-Domäne durch Mutation der Aminosäure Glutamat 156 (E156K) durch Lysin außer Kraft gesetzt (Mossessova *et al.*, 1998). Die analoge Mutation in Cytohesin-1 (E157K) ist ebenfalls katalytisch inaktiv (Knorr *et al.*, 2000) und zeigt eine Inhibierung des „cell spreading“ (Veränderung der Zellmorphologie) in Jurkat E6 Zellen (Geiger *et al.*, 2000). Aufgrund der engen Assoziation zwischen Cytohesin-1 und CYTIP sollte im folgenden Experiment der Einfluß von CYTIP auf die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 untersucht werden.

Der durch Cytohesin-1 katalysierte GDP/GTP-Austausch an ARF1 wurde in Anlehnung an das von Chardin etablierte Verfahren durchgeführt (Chardin *et al.*, 1996; Knorr *et al.*, 2000).

In Gegenwart von Liposomen (16 μ l/ml) und 1 mM Mg<sup>2+</sup> als Kofaktor wurde 2 mM myristoyliertes ARF1-Protein mit 100 nM aufgereinigtem 6xHis-Cytohesin-1 (unphosphoryliert/phosphoryliert; Dierks *et al.*, 2001) und 20 μ l Ig-CYTIP inkubiert, welches zuerst an Protein A-Sepharose zur Aufkonzentrierung gebunden wurde. Durch Zugabe von Liposomen (Franco *et al.*, 1995) und 1 mM Mg<sup>2+</sup> kann der durch Cytohesin-1 katalysierte GDP/GTP-Austausch gesteigert werden (Franco *et al.*, 1995, Knorr *et al.*, 2000), wie von Franco *et al.* und Knorr *et al.* gezeigt werden konnte. Myristoyliertes ARF1 Protein wurde mir freundlicher Weise von Dr.J.Haas (Max von Pettenkofer Institut) zur Verfügung gestellt. Die Myristoylierung der ARF-Proteine am N-terminalen Glycin durch die Myristoyltransferase ist essentiell für die Membranassoziiierung der ARF-Proteine und einer effektiven Guanin-Nukleotid-Austauschaktivität (Franco *et al.*, 1996). So postulierte Pacheco-

Rodriguez *et al.* (1999) aufgrund kristallographischer Daten, daß ARF_{GDP} zuerst mit Membranen assoziieren muß, um von GEF-Proteinen erkannt zu werden. Auch Beraud-Dufour *et al.* (1999) zeigte, daß die Interaktion von ARF1 mit Membranlipiden für die Katalyse der GDP-Dissoziation durch Cytohesin-2 als GEF notwendig ist.

Der GDP/GTP-Austausch wurde durch Zugabe von 1 μCi radioaktivem $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ gestartet und bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Messzeitpunkten (1, 2, 4 und 8 min) wurden jeweils 40 μl des Ansatzes auf eine Nitrozellulosemembran punktförmig aufgebracht und die Reaktion durch Waschen der Membran mit GDP/GTP-Waschpuffer gestoppt. Die an der Nitrozellulosemembran gebundene Radioaktivität wurde mittels eines Phosphoimagers bestimmt.

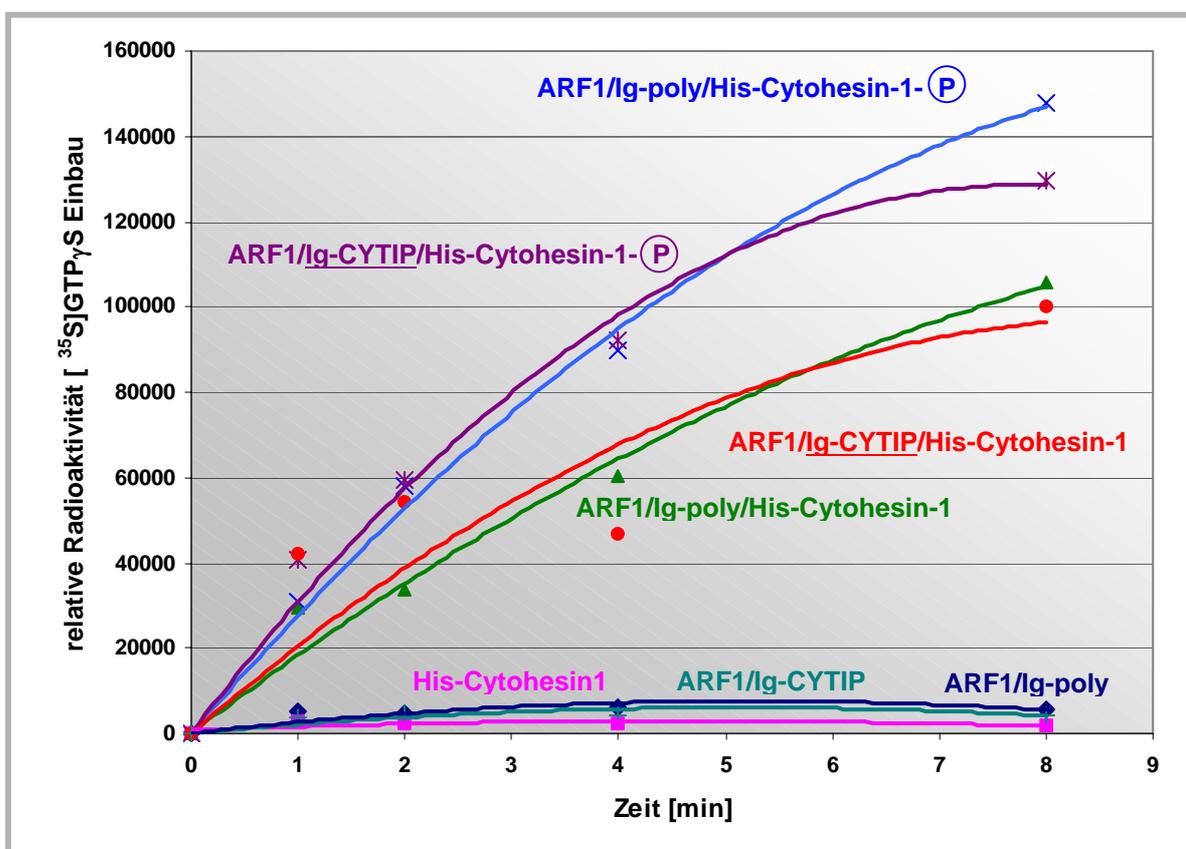


Abb. 38: *CYTIP* beeinflusst die GEF-Aktivität, weder von unphosphoryliertem noch von phosphoryliertem Cytohesin-1.

Bindung von 0,02 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ an 2 μM myristoyliertes ARF1-Protein in Gegenwart von 1 mM Mg^{2+} und 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Liposomen bestehend aus 70% (w/w) β -Palmitoyl- γ -oleoyl-L- α -Phosphatidylcholin und 30% (w/w) Dioleoyl-L- α -phosphatidyl-DL-Glycerol, katalysiert durch 100 nM phosphoryliertes 6xHis-Cytohesin-1 (Cytohesin-1-P) oder 100 nM unphosphoryliertes 6xHis-Cytohesin-1 und Zugabe von 20 μl an Protein-A gebundenes Ig-CYTIP in einem Gesamtvolumen von 200 μl . Unspezifische ARF-Aktivität durch Liposomen, die Nitrozellulosemembran selbst oder Ig-poly wurden durch entsprechende Ansätze (siehe untere Kurven) ausgeschlossen. Messungen wurden zu den Zeitpunkten 1, 2, 4 und 8 min durchgeführt. Die aus den erhaltenen Messpunkten berechneten Kurven stellen polynomische Annäherungen 2.Ordnung dar.

Abb. 38 zeigt den zeitlichen Verlauf des [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>-Einbaus an ARF1. Wie schon in der Dissertation von Dierks (2002) gezeigt wurde, verläuft die Inkorporation von [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S in ARF1 in Gegenwart von phosphoryliertem Cytohesin-1 signifikant schneller, als in Gegenwart von unphosphoryliertem Cytohesin-1. Durch Phosphorylierung von Cytohesin-1 in der polybasischen Region wird die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 und somit der GDP/GTP-Austausch an ARF1 *in vitro* reguliert.

Die Zugabe von Ig-CYTIP beeinflusst die Austauschkapazität von Cytohesin-1 weder im unphosphoryliertem noch im phosphoryliertem Zustand. Die Steigungen der Kurven sind nahezu identisch, auch wenn sie im oberen Zeitbereich etwas flacher erscheinen. Dies ist auf die polynomische Annäherung zurückzuführen. Bei weiteren Versuchen (nicht dargestellt) mit Messpunkten bis 30 min verliefen die Kurven mit bzw. ohne Ig-CYTIP Zugabe bis 30 min annähernd mit identischer Steigung.

5.14 Die Adhäsion von Jurkat E6 Zellen an den Integrinliganden ICAM-1 wird durch die Überexpression von CYTIP inhibiert

Ersten Hinweise auf einen funktionalen Einfluß von CYTIP auf die Zelladhäsion zeigten sich in den in 5.10 skizzierten Experimenten. Bei Überexpression von Ig-CYTIP und nach PMA-Stimulierung banden offensichtlich weniger Zellen an die Integrinliganden. Die Adhäsionsvorgänge sollten deshalb in weiteren Experimenten molekularbiologisch verifiziert werden.

Die Überexpression von Cytohesin-1 (Ig-Cytohesin-1) in Jurkat E6 Zellen führt zur Steigerung der LFA-1 vermittelten Adhäsion an ICAM-1-F<sub>c</sub> (Kolanus *et al.*, 1996) im Gegensatz zur Ig-Kontrolle. Durch Stimulierung der Zellen mit PMA kann eine weitere Steigerung der Adhäsion beobachtet werden. Die PH-Domäne (Ig-PH) stellt hingegen eine dominant negative Form dar und blockiert die Zelladhäsion vollständig, auch nach PMA-Stimulation (vgl. Abb. 39). Von Geiger *et al.* (2000) konnte gezeigt werden, daß neben der Interaktion von Cytohesin-1 mit CD18, auch der über die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 katalysierte Guanin-Nukleotid-Austausch für eine Zelladhäsion notwendig ist. Die Mutante Ig-Cytohesin-1 E157K besitzt keine GEF-Funktion mehr und blockiert wie die dominant negative PH-Domäne die Zelladhäsion vollständig (Dierks *et al.*, 2001). Die molekularen Prozesse, die durch die Katalyse des GDP/GTP-Austausches induziert werden und schließlich zur Aktivierung des Integrins führen, sind jedoch noch unklar.

Um den Einfluß von CYTIP auf die Zelladhäsion zu untersuchen, wurden Ig-CYTIP sowie die Trippelmutante Ig-CYTIP 82/90/92 in Jurkat E6 Zellen überexprimiert und die Adhäsion dieser Zellen auf ICAM-1-F<sub>c</sub> untersucht. ICAM-1-F<sub>c</sub> besteht wie bereits beschrieben aus der extrazellulären Domäne von ICAM-1 und ist über eine Gelenk-Region („Hinge“-Region) Amino-terminal an die C<sub>H</sub>2- und C<sub>H</sub>3-Domäne des humanen IgG<sub>1</sub> fusioniert (Kolanus *et al.*, 1996).

Für Zelladhäsionsstudien wurde ICAM-1-F<sub>c</sub> an Zellkulturplastik immobilisiert und den zu analysierenden Zellen präsentiert. Zuvor wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid-H33342-Fluorochrom, der in die DNA der Zellen interkaliert, markiert. Dies ermöglichte die anschließende fluorometrische Detektion transfizierter adhärenter Zellen (4.7.1) und eine quantitative Auswertung.

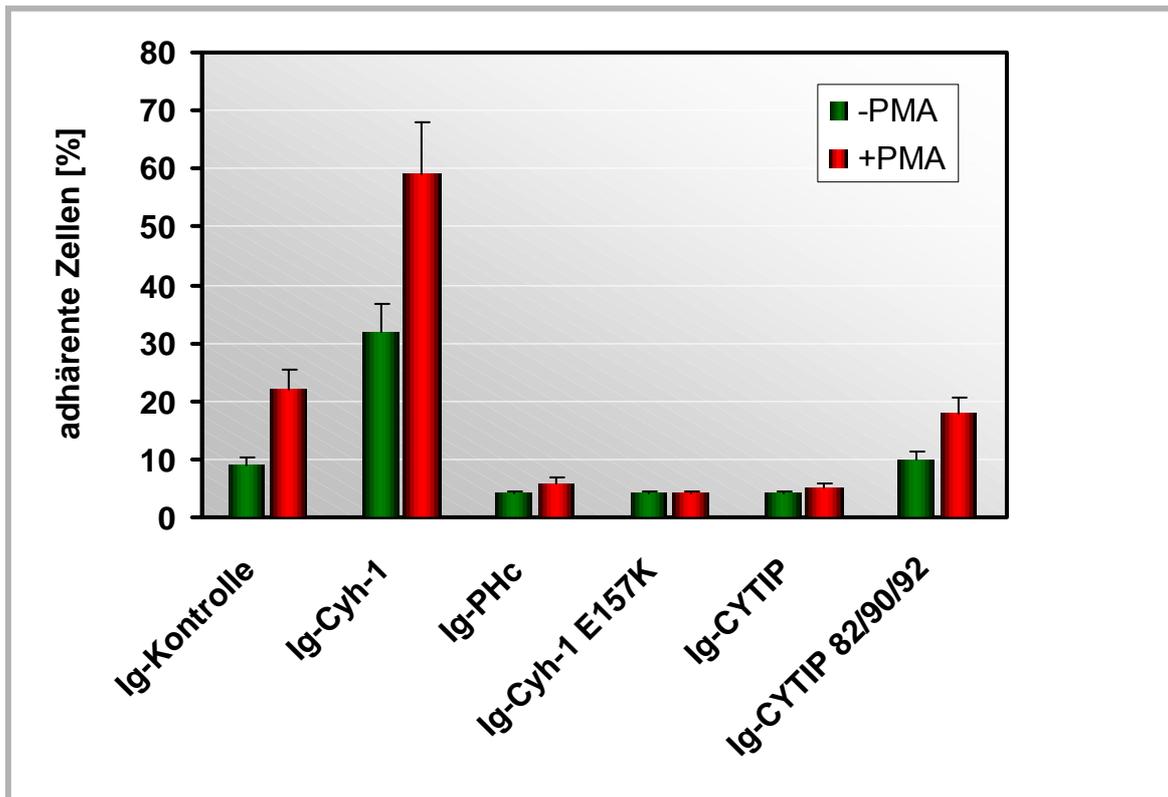


Abb. 39: Adhäsionsanalysen mit Jurkat E6 Zellen auf ICAM-1-F<sub>c</sub> nach Überexpression von clg-CYTIP oder Ig-CYTIP 82/90/92.

Die verschiedenen clg-Fusionsproteine wurden mittels rekombinanter Vaccinia-Viren für 6 h in Jurkat E6 Zellen überexprimiert und ihre Adhäsion an immobilisiertes ICAM-1-F<sub>c</sub> analysiert. Eine Stimulierung der Zellen erfolgte mit 40 ng/ml PMA (rote Säulen) für 30 min. Die Graphik zeigt einen Durchschnittswert von 8 unabhängigen Messungen, wobei jeder Wert der Messungen dreifach bestimmt wurde.

Wie bereits von Kolanus *et al.* (1996) und Geiger *et al.* (2000) veröffentlicht wurde, zeigt die Überexpression von Ig-Cytohesin-1 im Gegensatz zur clg-Kontrolle eine mehrfach gesteigerte Grundadhäsion, die durch PMA-Stimulation noch weiter erhöht werden kann. Die dominant-negativen Konstrukte Ig-Cytohesin-1 E157K und Ig-PH reprimieren hingegen die Adhäsion von Jurkat E6 Zellen ICAM-1-F<sub>c</sub> fast vollständig.

Interessanter Weise zeigt auch die Überexpression von Ig-CYTIP eine dominant negative Inhibition der Zelladhäsion, während die PDZ-„Null“-Mutante Ig-CYTIP 82/90/92 weder einen positiven noch negativen Einfluß auf die Zelladhäsion zeigt und sich annähernd wie die clg-Kontrolle verhält.

Im folgenden Experiment sollte nun die Ligandenspezifität der Adhäsionseffekte weiter untersucht werden. Statt dem Liganden ICAM-1-F<sub>c</sub> wurde Fibronectin, ein Ligand für β_1 , β_3 und β_5 -Integrine, eingesetzt. Sind die durch Cytohesin-1 und CYTIP regulierten Adhäsionsvorgänge LFA-1-spezifisch, so darf eine Überexpression der Cytohesin-1- bzw. CYTIP-Konstrukte keinen Einfluß auf die Adhäsion von Zellen auf einer Fibronectin-beschichteten Unterlage haben.

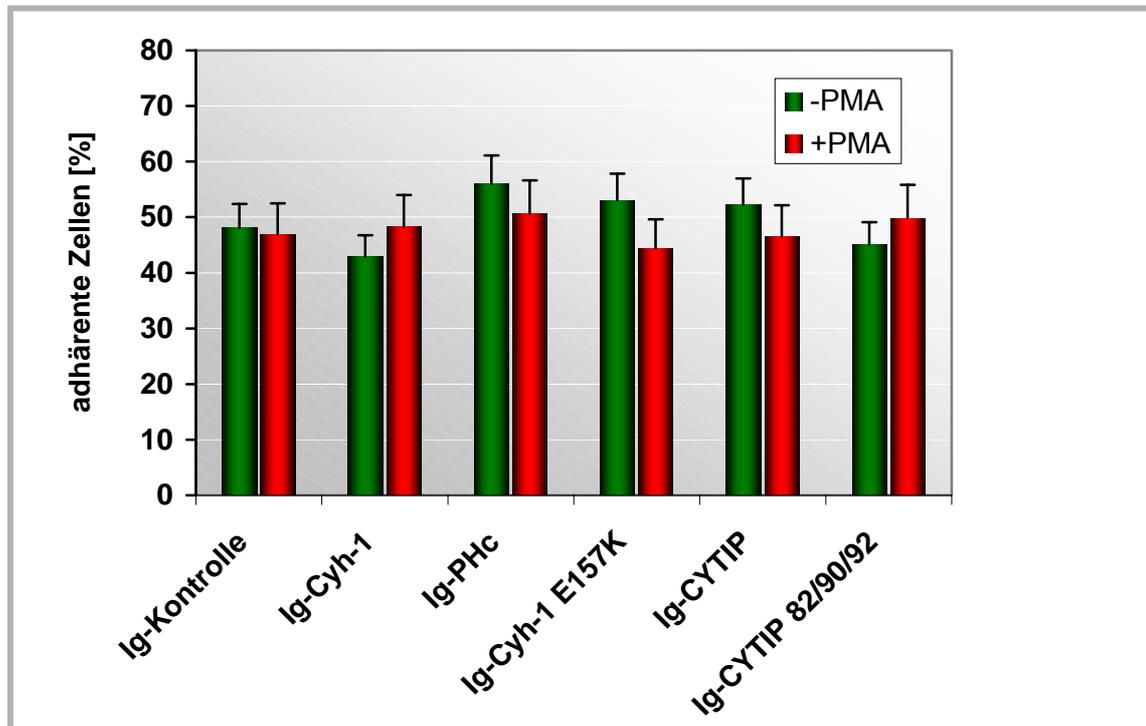


Abb. 40: Adhäsionsanalysen mit Jurkat E6 Zellen auf Fibronectin nach Überexpression von clg-CYTIP oder Ig-CYTIP 82/90/92.

Die verschiedenen clg-Fusionsproteine wurden mittels rekombinanter Vaccinia-Viren für 6 h in Jurkat E6 Zellen überexprimiert und ihre Adhäsion an immobilisiertes Fibronectin (4.6.11) analysiert. Eine Stimulierung der Zellen erfolgte mit 40 ng/ml PMA (rote Säulen) für 30 min. Die Graphik zeigt einen Durchschnittswert von 2 unabhängigen Messungen, wobei jeder Wert der Messungen dreifach bestimmt wurde.

Wie vermutet wurde sind die durch Cytohesin-1 und CYTIP vermittelten Adhäsionsvorgänge abhängig vom Integrinliganden. Eine Überexpression von Cytohesin-1 führt zu keiner Steigerung der Grundadhäsion auf Fibronectin. Die dominant negativen Konstrukte (Ig-PH, Cytohesin E157K) zeigen keine Inhibierung der Adhäsion. Auch Ig-CYTIP und Ig-CYTIP 82/90/92 verhalten sich wie die clg-Kontrolle.

CYTIP kann aufgrund dieser Ergebnisse als negativer Regulator der LFA-1 vermittelten Zelladhäsion bezeichnet werden. Durch Komplexbildung von CYTIP mit Cytohesin-1 werden beide Proteine von der Plasmamembran rekrutiert. Für diese Funktion ist eine intakte PDZ-Domäne von CYTIP nötig.

5.15 Erste Hinweise auf eine Steigerung der Migration von Jurkat Zellen durch Koexpression von CYTIP und Cytohesin-1

Leukozyten, wie auch Lymphozyten, werden wie bereits in der Einleitung dargelegt über die Blutbahn oder das lymphatische System durch den Körper transportiert. Um in periphere Gewebe oder in lymphatische Gewebe (ein-)wandern zu können, müssen die Zellen aktive Mechanismen einsetzen, um z.B. Endothelialzellen passieren oder durch Gewebe an ihren Zielort wandern zu können. Bei der Migration von Zellen sind u.a. verschiedene Integrine beteiligt. Um die Richtung der Zellwanderung bestimmen zu können, werden chemische Botenstoffe wie Chemokine verwendet. So schütten z.B. Makrophagen Chemokine aus, um T-Zellen an einen inflammatorischen Ort zu dirigieren.

Bei der „Migration“ von Zellen müssen Zell/Zell- sowie Zell/Matrix-Kontakte immer wieder neu ausgebildet und gelöst werden. In Kapitel 5.14 wurde bereits der Einfluß von CYTIP auf die LFA-1 vermittelte Zelladhäsion beschrieben. CYTIP inhibiert die durch Cytohesin-1 ausgelöste Zelladhäsion und wirkt somit als negativer Regulator. Auch bei der Migration müssen Adhäsionsvorgänge wieder gelöst werden. Der Einfluß von CYTIP auf Migrationseffekte sollte mit folgendem Versuchsansatz untersucht werden.

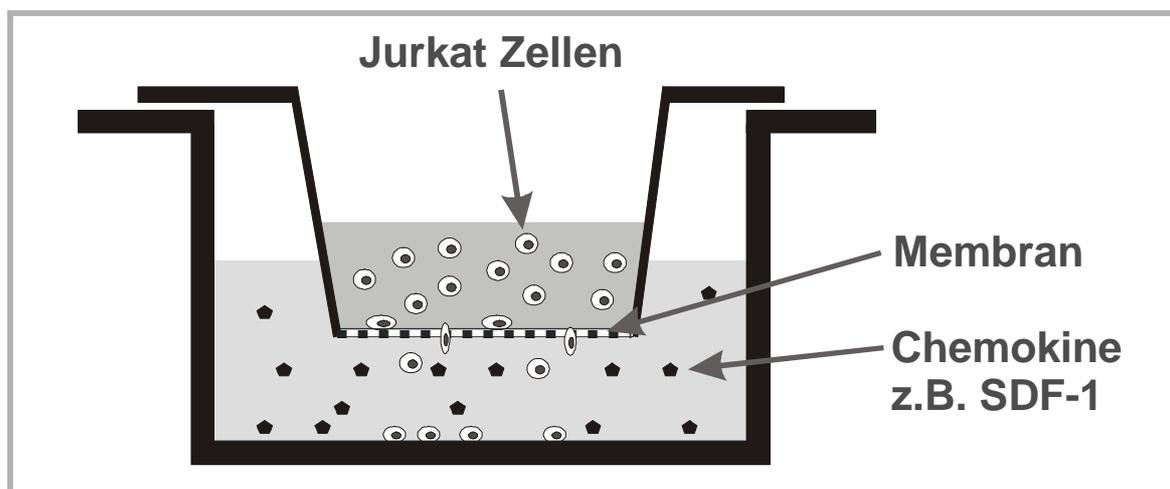


Abb. 41: Schematische Darstellung einer „Boyden-Kammer“ zur Migrationsimulation.

Die „Boyden-Kammer“, von Costar besteht aus einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen (24-well) und jeweils einem Einsatz. Der Einsatz besitzt einen Boden aus einer Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 5,0 μm . In das untere Reservoir wird eine Chemokin- oder Kontrolllösung vorgelegt, in die obere Kammer die Zellsuspension. Die Darstellung zeigt einen seitlichen Querschnitt durch eine Vertiefung der Kammer.

Um eine Migration von Zellen imitieren zu können, wurde die sog. „Boyden-Kammer“ von Costar verwendet. Diese besitzt eine Polycarbonat-Membran die nur von migrierenden Zellen passiert werden kann. Zur Induktion einer Migration wird in das untere Reservoir (siehe Abb. 41) ein Chemokin, in diesem Fall SDF-1, in einer Konzentration von 100 ng/ml vorgelegt. SDF-1 wirkt auf

Monozyten, Lymphozyten *in vivo* als starkes chemotaktisches Reagenz und induziert weiterhin intrazelluläre Aktinpolymerisation. In das obige Reservoir werden Zellen in 1xPBS (ohne Chemokin) pipettiert. Auf diese Weise wird ein Chemokingradient imitiert, werden die Zellen aktiviert, so wandern sie durch die Membran in das untere Gefäß.

Um eine möglichst homogene Expression der Ig-Konstrukte zu erreichen, wurden Jurkat E6 Zellen mit rekombinante Vaccinia-Viren infiziert und jeweils 5 Mio. Zellen nach 6h Inkubation in 150 µl 1xPBS in den oberen Boyden-Kammer-Einsatz transferiert.

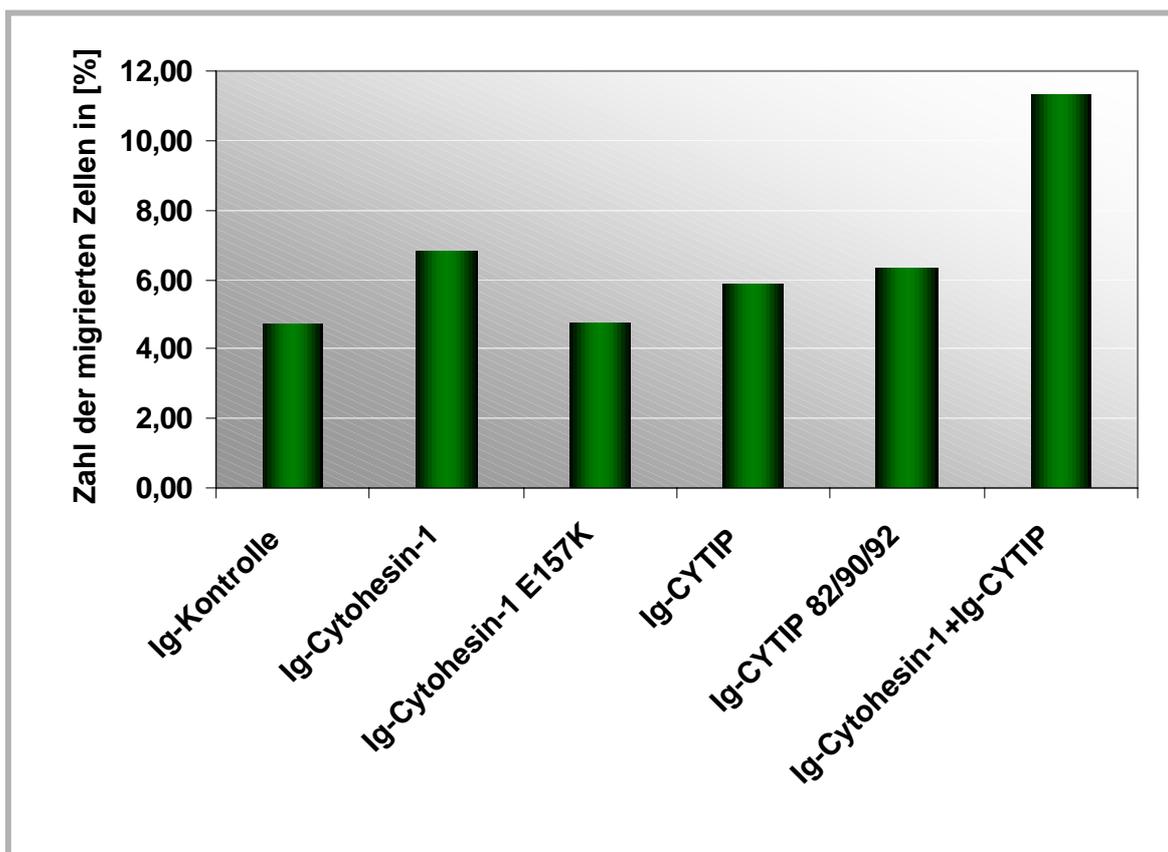


Abb. 42: Die Koexpression von Ig-Cytohesin-1 und Ig-CYTIP steigern *in vitro* die Migration von Jurkat E6 Zellen.

Die verschiedenen clg-Fusionsproteine wurden mittels rekombinanter Vaccinia-Viren für 6 h in Jurkat E6 Zellen überexprimiert. Als Chemokin wurde das Chemokin SDF-1 in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Die Abbildung zeigt nur ein einzelnes Experiment.

Das Experiment zeigt eine Verdopplung der Migrationsaktivität der Zellen, bei Koexpression von Ig-Cytohesin und Ig-CYTIP. Leider beruht dieses Ergebnis nur auf einem einzelnen Experiment, so daß eine Interpretation mit großer Vorsicht zu genießen ist. Zwei weitere Versuchsdurchführungen blieben ohne ein wirklich interpretierbares Ergebnis. Ein Effekt der Cytohesin-1/CYTIP-Interaktion auf die Migration von Lymphozyten kann aber auch nicht völlig ausgeschlossen werden, wurde aber in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

5.16 Ergebnisse zu temporären Lokalisationen und Modifikationen von CYTIP

5.16.1 Überexprimiertes CYTIP zeigt Kern- und Golgi-Lokalisation

5.16.1.1 Visualisierung mittels der konfokalen Lasermikroskopie

Überexprimiert man CYTIP als Ig-Fusionsprotein in Jurkat E6 Zellen und lässt diese auf verschiedenen Integrinliganden, wie Fibronectin, ICAM-1-F<sub>c</sub> oder VCAM-1-F<sub>c</sub> adhären, so kann wie unter Kapitel 5.8 beschrieben eine Membranlokalisierung detektiert werden. Eine Stimulierung mit Phorbol ester (PMA), der als Aktivator der Proteinkinase C gilt (Nishizuka, 1986), führt zu einer Relokalisation von CYTIP von der Plasmamembran in das Cytoplasma (siehe 5.10).

In 10-15 % der Zellen ist zusätzlich eine Anfärbung in einer kernnahen Region erkennbar (siehe Abb. 43), die aufgrund der Struktur, Lokalisation und Ausdehnung auf den Golgi-Apparat deutet (A1, B1). Neben dieser Region sind weiterhin meist mehrere kleine vesikuläre Bereiche im Cytosol verteilt sichtbar. Durch die Technik der konfokalen Lasermikroskopie stellen die Aufnahmen (Abb. 43) nur ein Abbild einer diskreten Schicht der Zelle dar, so daß räumlich (in Z-Achse) höher bzw. tiefer liegende Vesikel in den Abbildungen nicht erkennbar sind.

Bei diesen Akkumulationen handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Golgi- bzw. Transportvesikel. Eine Verifizierung durch Organell-spezifische Marker wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Wurden die Zellen vor der Adhäsion auf die Integrinliganden mit PMA stimuliert war weiterhin eine deutliche Anfärbung des Golgi-Apparats erkennbar (A2, B2), wobei die beschriebenen Vesikel weitgehend nicht mehr auftraten.

Neben den eben beschriebenen Organellen können auch in 1-5% der Zellen kleine Vesikel im Zellkern lokalisiert werden. Diese werden in GFP-CYTIP transfizierten Zellen (C1) besonders deutlich, treten aber auch in Ig-CYTIP transfizierten Zellen auf. Durch Stimulation der transfizierten Zellen mit Phorbol ester (PMA) ist die Akkumulation von GFP-CYTIP in den Kernvesikeln nicht wesentlich in ihrer Stärke und Anzahl verändert (C2).

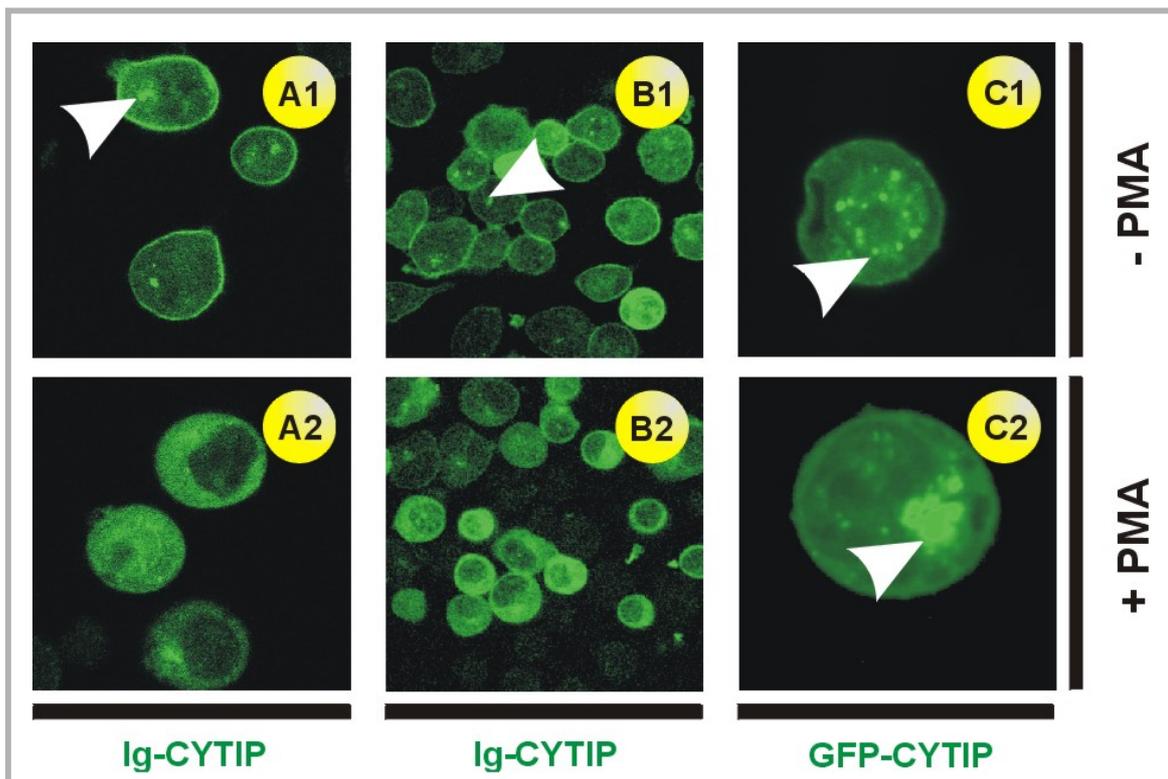


Abb. 43: Überexprimiertes Ig-CYTIP ist neben der Plasmamembran und dem Cytoplasma, auch in Kernvesikeln und in Golgi-Strukturen lokalisiert.

Jurkat E6 Zellen wurden durch Elektroporation (A, C) mit Ig-CYTIP bzw. GFP-CYTIP oder mit Hilfe des Vaccinia-Expressions-Systems (B) überexprimiert und 20 min vor der Adhäsion, auf einem mit Fibronectin beschichteten Trägermaterial, mit PMA (40 ng/ml) inkubiert (A2, B2, C2). Die Ig-Fusionsproteine wurden mit einem FITC-konjugierten anti-Human-IgG-Antikörper markiert, das exprimierte GFP-CYTIP ohne Färbung direkt durch Anregung bei 488 nm im konfokalen Lasermikroskop visualisiert.

5.16.1.2 Zellzyklusabhängigkeit der Kernlokalisierung von CYTIP

Die Vermehrung und das Wachstum von Organismen beruht auf der Teilung von Zellen. Diese Teilung erfordert die Verdopplung aller zellulären Bestandteile der Zelle. Proteine und Membranen, insbesondere auch die DNA muß unversehrt an die Tochterzelle weitergegeben werden. Die beschriebenen Ereignisse und ihre Kontrolle werden unter dem Begriff „Zellzyklus“ zusammengefaßt.

Die im letzten Kapitel (5.16.1.1) beschriebene Lokalisation von CYTIP in Kernvesikeln kann auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein. CYTIP könnte u.a. als Transportprotein für regulierende Proteine vom Cytoplasma in den Zellkern dienen oder selbst als Aktivator/Regulator der Zellproliferation wirken.

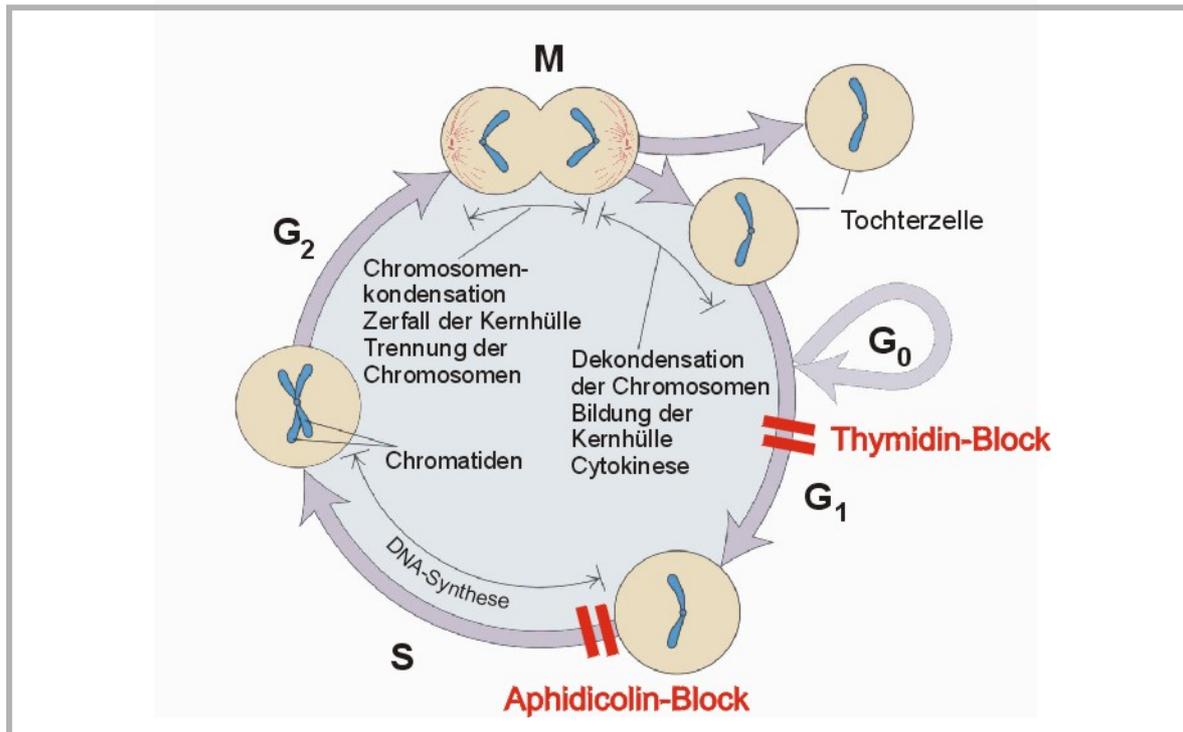


Abb. 44: Blockierung des Zellzyklus durch Aphidicolin und Thymidin. (adaptiert nach Lodish H., Molekulare Zellbiologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH)

In eukaryontischen Zellen werden die Chromosomen in der S-Phase repliziert. Während der G<sub>2</sub>-Phase bereitet sich die Zelle auf die Mitose (M-Phase) vor, die selbst in vier Schritte unterteilt wird. In der Prophase kondensieren die replizierten Chromosomen zu kompakten Gebilden und werden nach Auflösung der Kernmembran in das Cytoplasma freigesetzt. Während der Metaphase und Anaphase werden die Chromosomen sortiert und die Chromatiden eines jeden Paares wandern an die jeweils entgegengesetzten Pole des Spindelapparates der Zelle. In der Telophase wird um den jeweiligen Chromosomensatz eine neue Membran ausgebildet. In der G<sub>1</sub>-Phase werden anschließend Proteine aktiviert, die am Replikationsursprung Präreplikationskomplexe aufbauen und somit die Zelle für den Eintritt in die nächste S-Phase vorbereiten. Bei den Säugetieren verlassen die meisten nicht-proliferierenden Zellen den Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase und treten in den G<sub>0</sub>-Zustand ein. Abhängig vom Zelltyp und der Entwicklungsphase dauert ein Zyklus rund 24 Stunden. Dabei fallen 30 min auf die Mitose, 9 Stunden auf die G<sub>1</sub>-Phase, 10 h auf die S-Phase und 4,5 h auf die G<sub>2</sub>-Phase.

Der Zellzyklus kann durch Thymidin am Ende der G<sub>1</sub>-Phase, durch Aphidicolin zu Beginn der S-Phase unterbrochen werden.

Betrachtet man einen Pool von Zellen unter üblichen Zellkulturbedingungen, so befinden sich diese in den unterschiedlichsten Zellzyklusphasen. Um die Expression einzelner Proteine in einer diskreten Phase untersuchen zu können, ist eine Synchronisation des Zellwachstums notwendig.

In der Literatur wurden bereits unterschiedliche Reagenzien, wie Colchizin (Vial *et al.*, 1997), Nocodazol (Sager *et al.*, 1986) oder GeO<sub>2</sub> (Chiu *et al.*, 2002) beschrieben, um den Zellzyklus in verschiedenen Phasen zu arretieren. Besonders effektiv wirkt ein sequenzieller Thymidin-Aphidicolin-Doppelblock an der G<sub>1</sub>/S-Phasengrenze (Li & Yeh, 1992).

Thymidin blockiert reversibel in hohen Konzentrationen (2 mM) die Ribonukleotidreduktase, welche Ribonukleotide in Desoxyribonukleotide konvertiert. Aufgrund der fehlenden Desoxyribonukleotide

wird die DNA-Synthese eingestellt. Zellen die sich in der G2-, M- oder G1-Phase befinden durchlaufen den Zellzyklus in gewohnter Weise bis zur G1/S-Phasengrenze. Entfernt man das Thymidin aus dem Kulturmedium wird die Ribonukleotidreduktase wieder aktiv und die Zellen setzen den Zellzyklus synchron fort. Zellen die sich vor dem Thymidinblock bereits in der S-Phase befanden laufen jedoch weiterhin asynchron. Aus diesem Grund wurde ein zweiter Block angeschlossen, nicht jedoch durch Inhibition der Ribonukleotidreduktase, sondern durch Inhibition der DNA-Polymerase. Ein gut untersuchter Inhibitor der Polymerase alpha, delta und epsilon (Mieko *et al.*, 1978) ist das Diterpen Aphidicolin, das aus dem Pilz *Cephalosporium aphidicola* gewonnen wird. Auch Aphidicolin arretiert reversibel die Zellen in der G1/S-Phasengrenze des Zellzyklus (Pedrali-Noy *et al.*, 1980).

Für das durchgeführte Experiment wurde Ig-CYTIP mit Hilfe des Vaccinia-Expressions-System in 20 Mio. Jurkat E6 Zellen überexprimiert und zur Synchronisation des Zellwachstums dem Thymidin-Aphidicolin-Doppelblock unterzogen (Li & Yeh, 1992; Everett *et al.*, 1999). Nach 0, 2,5, 5,5, 8,5, 11,5 und 23,5 h wurden Proben entnommen und die Zellen jeweils auf Fibronectin-beschichteten Objektträger für 30 min bei 37°C im Brutschrank zur Adhäsion gebracht und das Fusionsprotein abschließend mit einem FITC-konjugiertem anti-Human-IgG-Antikörper markiert und mit einem UV-Mikroskop visualisiert.

Die Proben der jeweiligen Zeitpunkte zeigten keine Unterschiede im Expressionsmuster. Überexprimiertes Ig-CYTIP war im Cytoplasma und Plasmamembran gut erkennbar. Bei allen Proben waren auch Kernlokalisationen in ca. 5 % der Zellen sichtbar. Eine Akkumulation in einer Zellzyklusphase war nicht erkennbar. CYTIP wird nach diesen Untersuchungen unabhängig vom Zellzyklus in den beschriebenen Kernvesikeln exprimiert.

5.16.2 Wird CYTIP durch chemische Gruppen oder Peptide modifiziert?

5.16.2.1 Detektion einer Größenverschiebung von CYTIP im „Western-Blot“

Überexprimiert man Ig-CYTIP in unterschiedlichen Zellsystemen kann neben einer Bande bei ca. 76 kDa, die auch mit den empirisch berechneten Wert übereinstimmt (CYTIP mit ca. 41 kDa, Ig-Anteil mit ca. 35 kDa), eine zweite, meist sehr schwache Bande mit einer Verschiebung von ca. 10 kDa detektiert werden. Werden die Zellen zusätzlich mit Phorbol ester (PMA) stimuliert wird der Effekt noch verstärkt und beide Banden sind dann ca. in einem 1:1-Verhältnis detektierbar (Abb. 45).

Um eine Spezifität des Phänomens zu bestätigen, wurden Jurkat E6 Zellen und Zellen der B-Zell-Linie LCL-721 mit Ig-CYTIP und Ig-Cyh-1 als Kontrolle mit Hilfe des Vaccinia-Expressions-Systems (4.2.4.6) überexprimiert, die Fusionsproteine unstimuliert sowie stimuliert (PMA) über SDS-

Polyacrylamidgel-Elektrophorese (4.6.1) und einem anti-Mensch-Ig-Western-Blot (4.6.4, 4.6.5) analysiert.

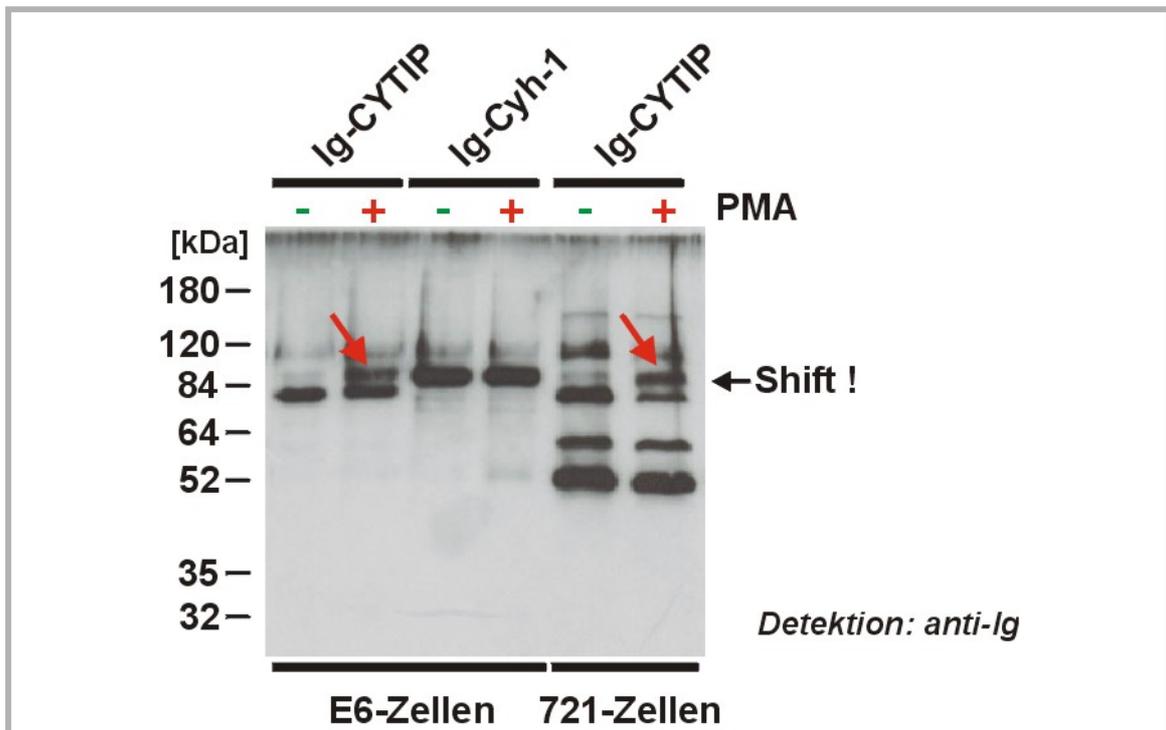


Abb. 45: Überexprimiertes Ig-CYTIP wird von einem, gegen die Ig-Domäne gerichteten Antikörpern, in zwei unterschiedlichen Größen detektiert.

Rekombinante Vaccinia-Viren wurden zur Expression von Ig-CYTIP und Ig-Cyh-1 in Jurkat E6 Zellen und der B-Zell-Linie LCL-721 verwendet. Zur Stimulation der Zellen wurde PMA in einer Konzentration von 40 ng/ml Medium verwendet. Die Fusionsproteine wurden anschließend über einen anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Western-Blot nach Präzipitation an Protein A-Sepharose nachgewiesen.

In Abb. 45 wird klar deutlich, daß in unstimulierten Jurkat E6 Zellen bzw. LCL-721-Zellen neben der Ig-CYTIP-Bande (ca. 76 kDa), eine schwache zweite Bande in einer Höhe von ca. 88 kDa auftritt, die durch PMA-Stimulierung der Zellen noch weiter verstärkt werden kann.

Der beschriebene Shift scheint spezifisch für CYTIP zu sein, da er nur bei Ig-CYTIP, nicht jedoch bei überexprimiertem Ig-Cytohesin-1 (Ig-Cyh-1) oder dem Ig-Fusionsanteil alleine (Daten nicht gezeigt) auftritt. Die weiteren Banden (55, 60, 150 kDa) die in den LCL-721-Zellen auftreten sind auf Antikörperfragmente bzw. -abbauprodukte zurückzuführen. Bei LCL-721 Zellen handelt es sich um Antikörper-präsentierende B-Zellen, deren präsentierter Antikörper vom Detektions-Antikörper anti-Human-IgG<sub>1</sub> ebenfalls erkannt wird.

5.16.2.2 Mögliche Sumofizierung von CYTIP?

Eine Vielzahl von Mechanismen steuern die *in vivo* Funktion der Proteine. Neben der Regulation von Proteinen über deren Lokalisation oder Expressionsmenge, stellen konstitutive oder reversible post-translationale Modifikationen einen wichtigen Teil der Regulation dar. Diese Modifikationen werden meist durch enzymatische Reaktionen erzeugt. Acetylierung, Phosphorylierung, Carboxylierung oder Methylierung bilden nur eine Auswahl der häufigsten Modifikationen. Die Masse des Zielproteins wird aufgrund der geringen Masse dieser Gruppen auch bei Mehrfachmodifikation meist unwesentlich verändert.

Im Gegensatz dazu können Peptidmodifikationen die Masse der Proteine deutlich ändern. Zu den bekanntesten Peptidmodifikationen gehört die Ubiquitylierung (Bonifacino & Weissman 1998), die eine 9-kDa enzymatisch katalysierte Polypeptidmodifikation darstellt. Die Markierung eines Zielmoleküls mit Ubiquitinketten führt meist zu einem kompletten Abbau des Komplexes in den 26S Proteasomen. Bei dieser Ubiquitin-abhängigen Degradation wird das Zielmolekül mehrfach modifiziert, wobei eine Isopeptidbindung zwischen dem Lysin 48 eines Ubiquitins mit dem C-terminalen Glycin eines weiteren Ubiquitins ausgebildet wird und somit eine Ubiquitinkette entsteht. In manchen Fällen spielt eine Mono-Ubiquitylierung auch bei der Rezeptor vermittelten Endozytose (Hicke, 1997) eine Rolle oder führt zu einer kontrollierten Aktivierung eines Proteins über limitierte Proteolyse.

In den letzten Jahren wurden weitere Ubiquitin-ähnliche Peptidmodifikationen entdeckt. Zu der interessantesten Gruppe zählt hierbei die Ubiquitin-verwandten, 8 kDa großen SUMO-Proteine (small ubiquitin-related modifier). Während die Ubiquitylierung meist zu einem Abbau des Zielproteins führt, wirkt SUMO wie im Fall des NF κ B Inhibitors I κ B α als Antagonist zu Ubiquitin und schützt I κ B α vor Degradation (Desterro *et al.*, 1998). Weiterhin spielt die Markierung mit SUMO bei der Regulation von Protein-Protein Interaktionen und/oder der Steuerung einer Lokalisation in subzelluläre Kompartimente eine Rolle, wie z.B. bei RanGAP1 (Mahajan *et al.*, 1997), HIPK2 (Kim *et al.*, 1999) oder PML (Duprez *et al.*, 1999). Derzeit sind 3 Mitglieder der SUMO-Familie identifiziert worden, die aufgrund ihrer Sequenzanalogien in 2 Gruppen (SUMO1 und SUMO2/3) eingeteilt wurden.

Der Mechanismus der SUMO-Modifikation ist im wesentlichen analog zu einer Ubiquitylierung (vgl. Abb. 46). Zur Vorbereitung der Konjugation muß das SUMO-Protein am C-terminalen Gly-Gly Motif mittels einer Hydrolase gespalten werden. Beim Menschen sind derzeit die beiden Enzyme SUSP1 (Kim *et al.*, 2000) und Senp1 (Gong *et al.*, 2000) bekannt. Zur Aktivierung der Konjugation wird SUMO am C-Terminus mit Hilfe des Proteinkomplexes Sua1/Uba2 (Dohmen *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1997, Desterro *et al.*, 1999) durch Ausbildung einer Thioesterbindung an ein Cysteinrest des E2-Enzym Ubc9 (Seufert *et al.*, 1995) gebunden. Zur Ausbildung einer Amidbindung zwischen SUMO und dem Zielprotein wird ähnlich dem Ubiquitinsystem eine E3-Ligase vermutet, die bisher jedoch noch nicht identifiziert werden konnte (Saitoh & Hinchey, 2000). Einen Hinweis zeigt die *in vitro* Sumofizierungen von RanGap1, I κ B α und p53 mit rekombinanten

E1 und E2 Proteinen. Sie ist sehr ineffektiv im Gegensatz zu einer *in vitro* Konjugation von RanGap1 mit Zellextrakten (Desterro *et al.*, 1998; Mahajan *et al.*, 1997).

Die Hydrolasen SUSP1 und Senp1 wirken ebenfalls als Isopeptidasen und können SUMO vom Zielprotein wieder abspalten, was auf eine kontrollierte Regulation schließen lässt.

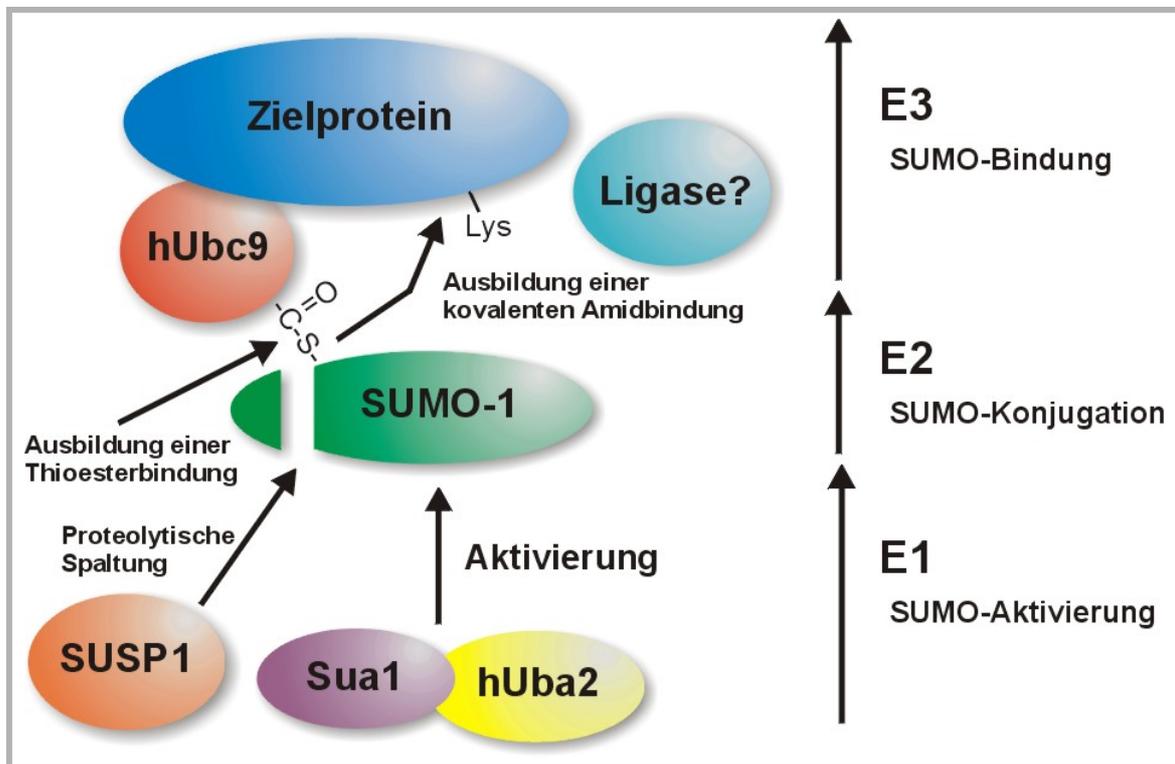


Abb. 46: Modell zur Modifikation eines Zielproteins mit SUMO-1.

Nach einer proteolytischen Spaltung des SUMO-Proteins durch eine Hydrolase (SUSP1 oder Senp1) am C-terminalen Gly-Gly Motif von SUMO und einer ATP-abhängigen Aktivierung durch den E1-Komplex Sua1/hUba2 wird SUMO an das E2-Enzym Ubc9 über eine Thioesterbindung gekoppelt. Die Ausbildung der kovalenten Amidbindung zwischen der freien Carboxylgruppe des C-terminalen Glycins in SUMO und der ϵ -Aminogruppe von einem Lysin des Akzeptorproteins wird anschließend über den hUbc9/SUMO-Komplex vermittelt.

Mehrere Gründe, neben der Größenverschiebung von CYTIP um etwa 8-10 kDa, sprechen für eine Modifikation von CYTIP durch das Polypeptid SUMO-1. Ein ersten Hinweis stellt die Lokalisation von CYTIP in Kernvesikeln dar, ähnlich dem SUMO-modifizierten Transkriptionsrepressor TEL (Chakrabarti *et al.*, 2000). Weiterhin konnte bisher keine Abbaureaktionen von CYTIP, die bei einer Ubiquitylierung auftreten würden, detektiert werden. Außerdem konnte eine Interaktion zwischen dem E2-Enzym Ubc9 und dem CYTIP-Bindungspartner Cytohesin-1 im Two-Hybrid-System detektiert werden (unveröffentlichte persönliche Mitteilung, Prof.W.Kolanus).

In der Aminosäuresequenz von CYTIP sind insgesamt 16 Lysine (K) vorhanden, wobei keines von der Minimalkonsensussequenz aKX(E,D) umgeben ist. Es sind jedoch bereits SUMO-konjugierte Proteine bekannt, die nicht dieser Sequenz folgen und trotzdem mit SUMO modifiziert werden.

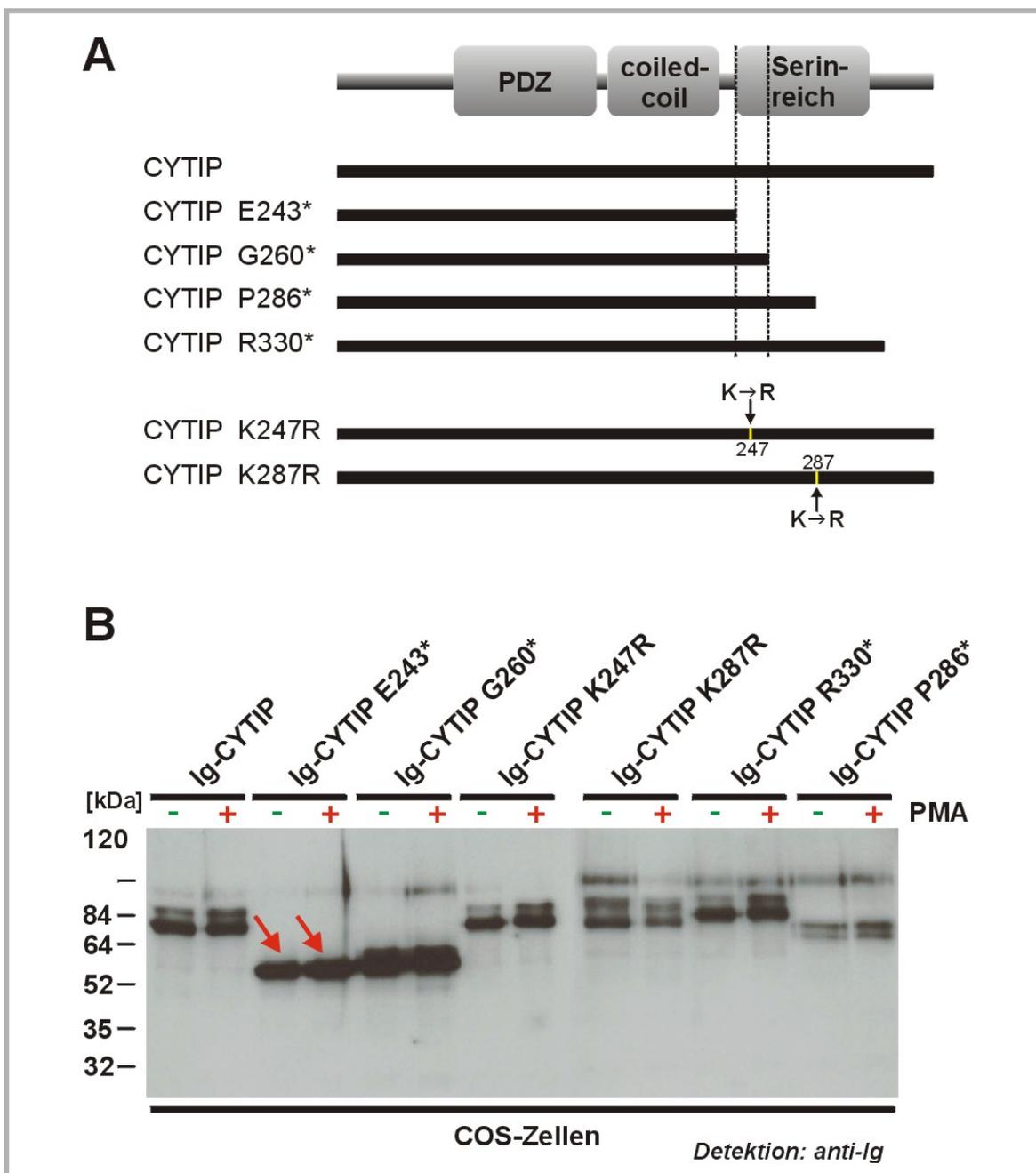


Abb. 47: Eingrenzung der Modifikationsstelle(n) in CYTIP sowie Mutation der potentiellen Lysine für eine SUMO-Konjugation.

(A) Schematische Darstellung der eingesetzten clg-Fusionskonstrukte sowie Punktmutanten in CYTIP.

(B) COS7-Zellen wurden mit der jeweiligen Plasmid-DNA mittels der DEAE-Dextran/Chloroquin-Methode transfiziert und die Fusionsproteine über einen Peroxidase-konjugierten anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Western-Blot nach Präzipitation an Protein A-Sepharose nachgewiesen.

Um die Modifikationsstelle in CYTIP einzugrenzen wurde in einem ersten Ansatz Ig-CYTIP sowie die C-terminal verkürzten Mutanten Ig-CYTIP E243\* und Ig-CYTIP R330\* in COS7-Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden lysiert und nach Präzipitation an Protein A-Sepharose und erfolgter Gelelektrophorese die überexprimierten Produkte mittels der Western-Blot-Technik (4.6.4,

4.6.5) analysiert. Interessanter Weise verschwand die höherliegende Bande bei dem Ig-CYTIP E243\* Konstrukt, jedoch nicht bei dem Fusionsprotein Ig-CYTIP R330\* (vgl. Abb. 47). In diesem Sequenzbereich E243 bis R330 befinden sich zwei Lysine (K), die für eine SUMO-Konjugation in Frage kommen könnten.

Aus diesem Grund wurden Punktmutanten generiert, deren Lysine (K) durch Arginine (R) ersetzt wurden. Neben den beiden Punktmutanten K247R und K287R wurden zusätzlich noch zwei weitere vorhandene Deletionsmutanten eingesetzt und das Experiment wiederholt. Die Deletionsmutanten, wie auch die Punktmutanten, wurden in gleicher Weise wie die PDZ-Mutanten (Kapitel 5.9.3) über PCR-Reaktionen (4.5.1, 4.5.3) generiert und über die *MluI/NotI*-Restriktionsschnittstellen in das Plasmid N1 Ig-CYTIP kloniert (4.5.7).

Weder bei der Punktmutante K247R, noch bei K287R konnte ein Verlust der Modifikation detektiert werden. Aufgrund dieses Ergebnisses kann es sich bei dieser Modifikation weder um eine SUMO-Modifikation noch um eine Ubiquitynylierung handeln, da diese wie beschrieben spezifisch über Lysine konjugiert werden. Durch die weiteren Deletionsmutanten konnte die Region für eine Modifikation jedoch weiter eingeschränkt werden. Außer der Deletionsmutante Ig-CYTIP E243\* zeigten alle weiteren Konstrukte eine zweite ca. 10 kDa größere Bande, so daß die nun doch unbekannte Modifikation zwischen den Aminosäure E243 und G260 liegen muß.

5.16.2.3 Antikörperdetektion von SUMO und in vitro SUMO-Konjugation

Neben der im letzten Kapitel 5.16.2.2 beschriebenen Eingrenzung einer Modifikation durch Deletions- und Punktmutanten sollte in weiteren Experimenten SUMO-konjugiertes Ig-CYTIP direkt mit spezifischen SUMO-Antikörpern nachgewiesen werden.

COS7-Zellen wurden mit Plasmid-DNA von Ig-CYTIP (DEAE/Chloroquin-Methode, 4.2.2) bzw. Jurkat E6 Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren transfiziert (4.2.4.6). Nach Inkubation der Zellen bei 37°C, wurde ein Teil der Zellen zur Stimulation für 30 min mit Phorbol ester (40 ng/ml Medium) behandelt. Nach Lyse der Zellen (4.6.9.1, 4.6.9.2) und Präzipitation von Ig-CYTIP an Protein A-Sepharose wurden die Proben jeweils in drei Aliquots aufgeteilt und nach erfolgter Gelelektrophorese (4.6.1) auf Nitrozellulose (4.6.4) transferiert. Zur Expressionskontrolle wurde Ig-CYTIP mit Peroxidase-konjugierten anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Antikörpern nachgewiesen. Die zwei weiteren Membrane wurden einmal mit SUMO1-Antikörper oder mit SUMO2/3-Antikörper behandelt, der mir freundlicher Weise von F. Melchior (Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt wurde. Als sekundärer Antikörper kam ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper zum Einsatz.

Weder mit SUMO1-, noch mit SUMO2/3-Antikörpern konnte die zweite Bande von Ig-CYTIP als SUMO-Modifikation detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

In Zusammenarbeit mit F. Melchior wurden weiterhin der Versuch unternommen Ig-CYTIP und Ig-Cytohesin-1 direkt *in vitro* mit SUMO1 zu modifizieren. Rekombinantes Ig-CYTIP bzw. Ig-

Cytohesin-1 wurde zusammen mit aufgereinigtem SUMO1, E1- und E2- Enzymen sowie einem Zellextrakt inkubiert. Der Zellextrakt ist nötig, um die bisher unbekannte Ligase bereitzustellen und eine möglichst effektive Ausbildung der Amidbindung zwischen Zielprotein und SUMO1 zu gewährleisten. Aber auch in diesem Experiment konnte weder bei CYTIP noch bei Cytohesin-1 eine SUMO-Konjugation detektiert werden.

Es muß nach den bisherigen Ergebnisse davon ausgegangen werden, daß CYTIP nicht durch SUMO modifiziert wird und die zweite auftretende Bande von CYTIP auf eine andere Modifikation zurückzuführen ist.

5.16.2.4 Modifikation von Serinen oder Threoninen in CYTIP?

Mit Hilfe der in Kapitel 5.16.2.2 eingesetzten Deletionsmutanten konnte der Bereich eingeschränkt werden, der für das Auftreten der zweiten Bande im „Western-Blot“ mit größerer Molekularmasse von CYTIP verantwortlich ist. Der Sequenzabschnitt liegt am Anfang einer relativ Serin-reichen Region in CYTIP, zwischen den Aminosäuren E243 und G260 (Abb. 48). Neben dem schon mutierten Lysin 247 stechen als weitere mögliche Modifikationsstellen besonders die Serine und Threonine ins Auge. Um diese Aminosäuren als mögliche Modifikationsstellen zu untersuchen, wurden die durch ihre Hydroxygruppe hydrophileren Serine bzw. Threonin in das aliphatische Alanin mutiert.

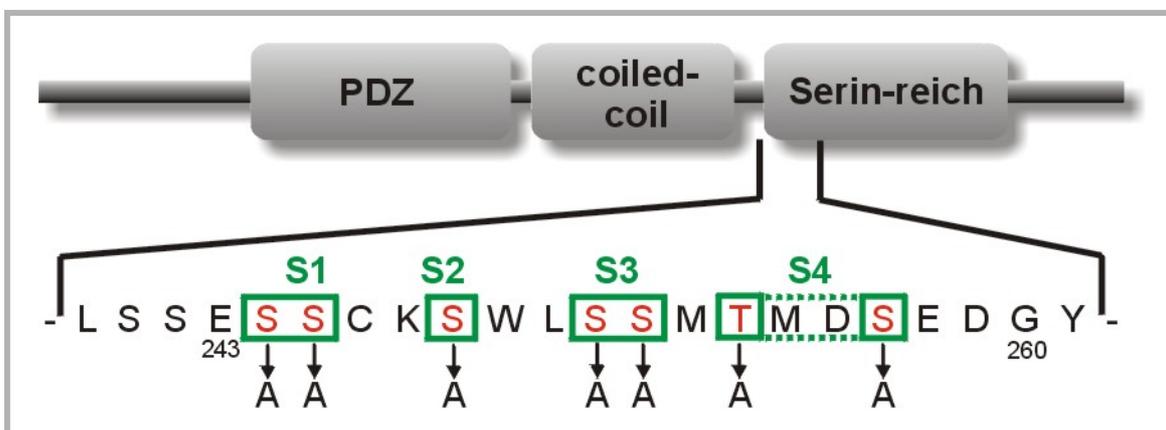


Abb. 48: Darstellung der generierten Ig-CYTIP Punktmutanten zwischen den Aminosäure E243 und G260.

Über PCR-Reaktionen wurden vier Punkt- bzw. Doppelpunktmutanten S1-S4 generiert. Die jeweiligen Serine (S) bzw. das Threonin (T) wurden in die Aminosäure Alanin (A) geändert.

Die Punktmutanten wurden durch PCR-Mutagenese (4.5.2) mittels geeigneter Oligodesoxyribonukleotide generiert und in den N1-Expressionvektor als Ig-Fusionsprotein kloniert. Um die 7 vorhandenen Serine/Threonin möglichst mit geringem Zeitaufwand untersuchen zu

können, wurden statt 7 Einzelmutanten 4-Doppelmutanten, die mit S1-S4 bezeichnet werden, verwendet. Die Serine bzw. das Threonin 254 wurden dabei in Alanin transferiert.

Die Konstrukte wurden in COS7-Zellen mit der DEAE-Dextran/Chloroquin-Methode transfiziert und nach Kultivierung der Zellen über Nacht zur Stimulation mit bzw. ohne Phorbol ester (40 ng/ml Medium) behandelt. Nach Lyse der Zellen wurden die überexprimierten Fusionsproteine mit Protein A-Sepharose präzipitiert und mittels der Western-Blot-Technik auf Nitrozellulose transferiert. Zur Detektion der Proteine wurde anschließend ein Peroxidase-konjugierter anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Antikörper verwendet.

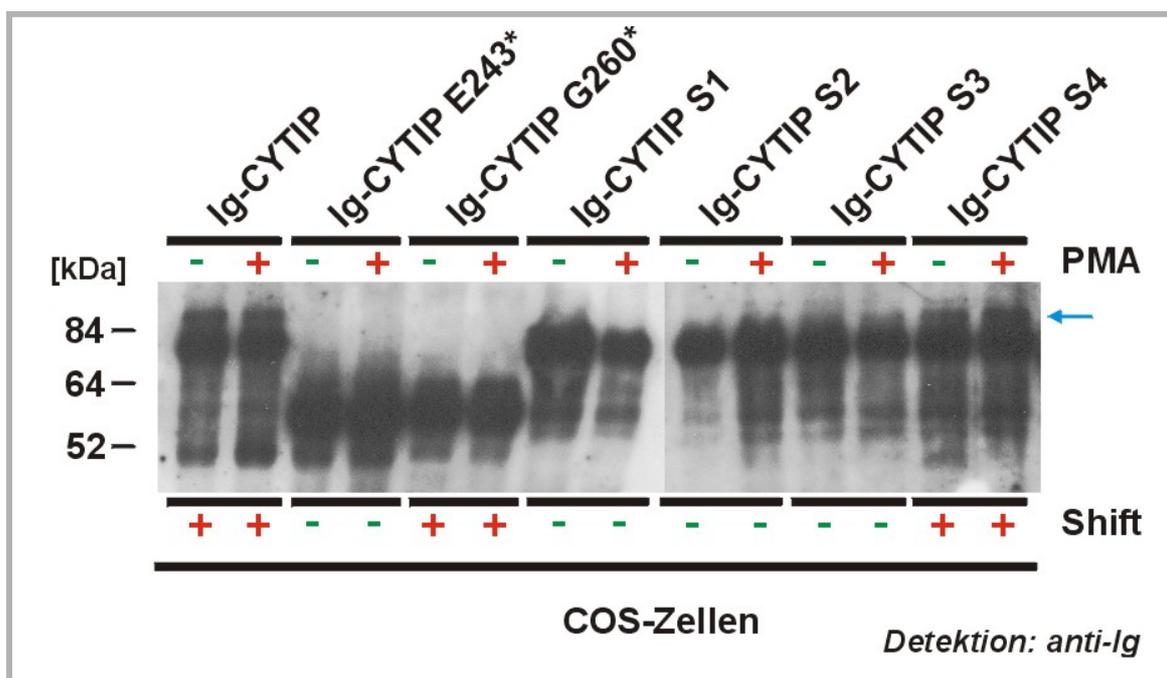


Abb. 49: Verlust der Modifikation bei Austausch von Serine/Threonin in Alanine im Sequenzbereich E243/G260 von CYTIP.

Die Deletions- und Punktmutanten wurden 48 h als clg-Fusionsproteine in COS7-Zellen überexprimiert. Nach Lyse der Zellen und Präzipitation an Protein A-Sepharose wurde nach erfolgter Gelelektrophorese und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran die Fusionsproteine mit einem Peroxidase-konjugiertem anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Antikörper detektiert.

Die Doppelmutanten Ig-CYTIP S1, Ig-CYTIP S3 und die Einzelpunktmutante Ig-CYTIP S2 zeigen einen Verlust der Modifikation an, wobei die Serin/Threonin-Doppelmutante sich wie Ig-CYTIP verhält. Da es sich bei Ig-CYTIP S1 bzw. Ig-CYTIP S3 um Doppelmutanten handelt, kann an dieser Stelle nicht bestimmt werden, welches der Serine modifiziert wird. Mit Sicherheit kann aber von einer Mehrfachmodifikation von 2-5 Serinen im Bereich E243-G260 ausgegangen werden.

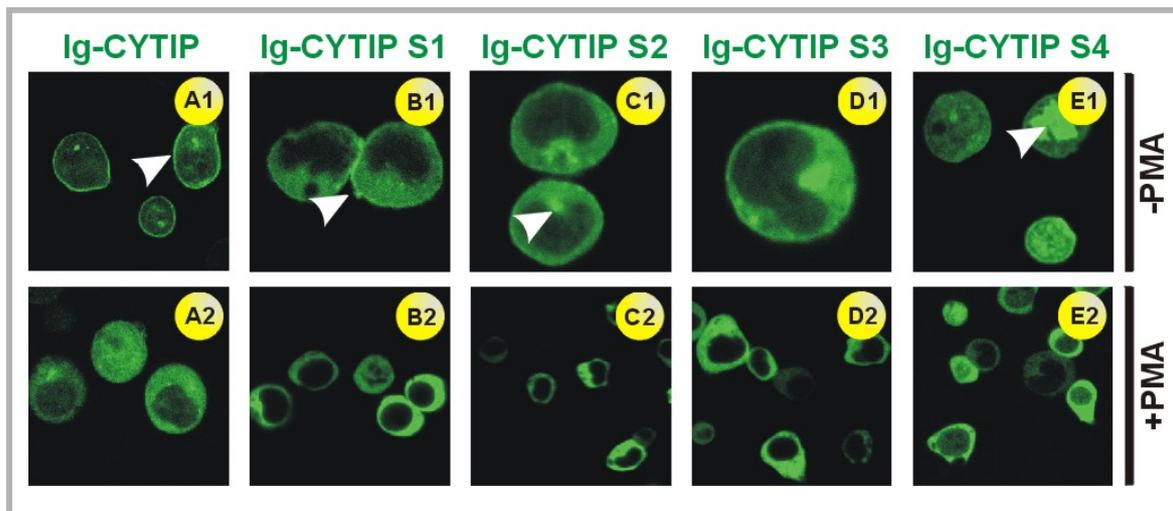


Abb. 50: Lokalisation von Ig-CYTIP und verschiedener Serin/Threonin-(Doppel-) Punktmutanten in Jurkat E6 Zellen, die auf Fibronectin zur Adhäsion gebracht wurden.

Jurkat E6 Zellen wurden 6 h mit rekombinanten Vaccinia-Viren, zur Expression von Ig-CYTIP (A) bzw. der Serin/Threonin-Mutanten Ig-CYTIP S1 (B), Ig-CYTIP S2 (C), Ig-CYTIP S3 (D) und Ig-CYTIP S4 (E) infiziert. Die Zellen wurden anschließend unbehandelt (A1-E1) oder nach Inkubation (A2-E2) mit PMA (40 ng/ml Medium) auf Fibronectin-beschichteten Objektträgern zur Adhäsion gebracht. Die Visualisierung der Fusionsproteine erfolgte mittels der Immunfluoreszenz an einem konfokalen Lasermikroskop, nach Anfärbung des cIg-Fusionsanteils mit Hilfe FITC-konjugierter anti-Human-IgG-Antikörper.

Zur Analyse der Lokalisation der Mutanten *in vivo* wurden in einem weiteren Ansatz Jurkat E6 Zellen mit Ig-CYTIP und den unterschiedlichen Ig-CYTIP-Mutanten transfiziert und auf Fibronectin zur Adhäsion gebracht.

Die Mutante Ig-CYTIP S4 (E1) zeigt das gleiche Expressionsmuster wie Ig-CYTIP (A1). Anfärbungen der Plasmamembran, des Cytosols wie auch Golgi- und Kernvesikel (5-10%) sind erkennbar. Nach PMA-Stimulation ist in beiden Fällen (A2, E2) keine Plasmamembranenfärbung mehr zu detektieren. Im Falle der Mutanten Ig-CYTIP S1-S3 zeigten sich keine Kern- und kaum Golgi-Lokalisationen, nach PMA-Behandlung (B2-D2) verhalten sich die Mutanten ähnlich dem Wildtyp-CYTIP und verlieren ihre Plasmamembranlokalisation. Auch in diesen Zellen sind kaum Golgi-Anfärbungen im Gegensatz zu stimuliertem Ig-CYTIP zu sehen.

5.16.2.5 Modifikation von CYTIP durch Phosphorylierung?

Die exprimierten Serin-Mutanten zeigten einen deutlichen Verlust der Modifikation, die eine zweite Bande neben der Wildtypbande bewirkt (vgl. Abb. 49). Durch Phorbolsterstimulation wird dieser Effekt meist noch verstärkt. Phorbolster (PMA) wirkt als Aktivator der Proteinkinase C (Nishizuka, 1986), die Zielproteine direkt phosphorylieren kann. Aus diesem Grund wurde in einem Experiment (Abb. 51/B) überexprimiertes Ig-CYTIP mit einer 1:1 Mischung aus PKC α /PKC δ behandelt, um eine *in vitro* Phosphorylierung zu erreichen. Durch die Inkubation mit diesen

Enzymen konnte jedoch, im Gegensatz zu PMA-behandelten Zellen, keine Phosphorylierung erreicht werden.

In einem zweiten Ansatz sollte überprüft werden, ob es sich bei der Modifikation wirklich um eine Phosphorylierung handelt. Proben mit Ig-CYTIP wurden mit PMA inkubiert und anschließend zur Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die zweite Bande blieb unverändert bestehen. Nach diesen Experimenten werden die Serine nicht durch Phosphatgruppen modifiziert, die Modifikation wird aber durch einen PMA-abhängige Signalwege induziert.

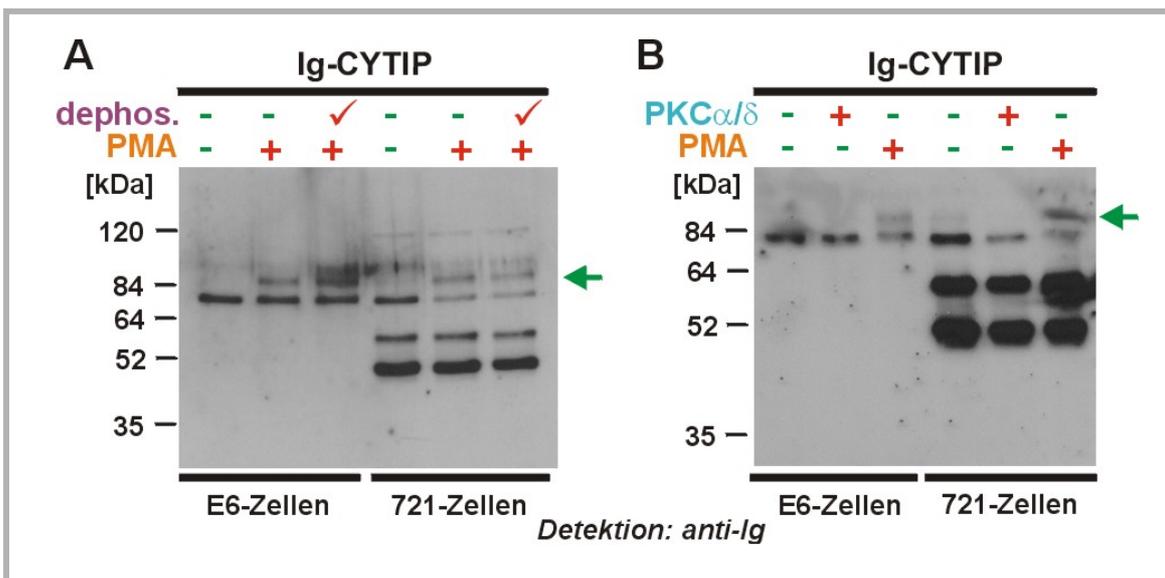


Abb. 51: *In vitro* Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Ig-CYTIP.

Ig-CYTIP wurde mittels rekombinanter Vaccinia-Viren für 6 h in Jurkat E6 Zellen und in der B-Zell-Linie LCL-721 überexprimiert.

(A) Die Zellen wurden anschließend für 30 min unbehandelt oder mit PMA (40 ng/ml Medium) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und an Protein A-Sepharose präzipitiert. Vor der Gelelektrophorese wurde zur Dephosphorylierung, einer weiteren vorher stimulierten Probe, 5 Units alkalische Phosphatase pro 50 μ l Präzipitationsansatz zugesetzt. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das Fusionsprotein über den clg-Fusionsanteil im Immunoblot mit einem POX-anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Antikörper visualisiert.

(B) Die unbehandelten, wie auch die mit PMA stimulierten Zellen wurden lysiert und das Fusionsprotein nach Bindung an Protein A-Sepharose auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die mit PKC behandelten Proben wurden abzentrifugiert, in hypotonischem Puffer resuspendiert und durch eine Spritzenkanüle geschert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation entfernt und die cytoplasmatische Fraktion 2 h bei 30°C mit PKC-Reaktionspuffer (enthält jeweils 20 μ g/ml PKC α und PKC δ) versetzt (4.7.2), anschließend wie die vorherigen Proben präzipitiert und auf ein 10%-PAA-Gel aufgetragen. Die Fusionsproteine wurden zur Analyse auf Nitrozellulose transferiert und mit Peroxidase-konjugierten anti-Human-IgG<sub>1</sub>-Antikörpern detektiert.

Die für die Modifikationssuche durchgeführten Experimente sind nur als initiale Experimente zu verstehen und wurden in dieser Arbeit zur Archivierung der Daten abgelegt. Für gesicherte Daten müssen noch weitere Experimente geplant und durchgeführt werden, die den Rahmen dieser Arbeit aber sprengen würden.

5.17 Weiterführende Untersuchungen zu dem intrazellulären Protein Cytohesin-1 im Modellorganismus *C.elegans*

Das cytoplasmatische Protein Cytohesin-1 spielt, wie in dieser Arbeit bereits erläutert wurde, eine wichtige Rolle bei der Integrin (LFA-1) vermittelten Zelladhäsion. Oft stößt man jedoch bei *in vitro* Untersuchungen von Proteinen oder regulatorischen Mechanismen an Grenzen der Durchführbarkeit. Eine Deutung von Experimentergebnissen ist zum Teil aufgrund unbekannter Komponenten oder Wirkungszusammenhängen schwierig, da die Experimente nur einen Ausschnitt eines komplex regulierten Zellsystems darstellen.

Analysen *in vivo* sind in den mit uns genetisch sehr verwandten Säugetieren jedoch häufig nur mit großem Aufwand durchzuführen oder zeigen keine eindeutig interpretierbaren Ergebnisse. Beispielsweise ist es problematisch einen „Gen-Knockout“ von Cytohesin-1 im Maussystem zu generieren, da mehrere Proteinisotypen der Cytohesin-Familie im gleichen Zelltyp exprimiert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese sich aufgrund der hohen Homologie zum Teil funktional ersetzen können.

Um weitere Einblicke in die Funktionsweise von Proteine zu erhalten bzw. neue Interaktoren zu identifizieren, werden oft leichter zu untersuchende Modellorganismen verwendet. Viele Proteinklassen, Signalwege und Funktionsmechanismen haben sich schon sehr früh in der Evolution bei einfacher gebauten Organismen etabliert und können oft direkt auf Vertebraten übertragen werden. Häufig verwendete Organismen sind z.B. die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* oder der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. In dieser Arbeit wurde das *C.elegans* System verwendet, da in diesem Organismus nur ein Cytohesin-Homolog vorhanden ist.

Die Proteine der Cytohesin-Familie wurden ursprünglich in Zellen des hämatopoetischen Systems entdeckt, werden aber auch in anderen Zelltypen und Geweben exprimiert.

Interessanter Weise besitzt der Fadenwurm kein den Säugetieren ähnelndes Immunsystem. Zur Abwehr von Eindringlingen werden weder Antikörper ausgeschüttet, noch Fresszellen aktiviert. Nach Außen hin sind *C.elegans* Tiere durch eine Oberhaut geschützt, die aus drei Schichten bestehen, die mit Kollagen versetzt sind. Parasiten die in den Darmtrakt eindringen werden durch Enzyme, wie Proteasen oder Endonukleasen bekämpft, die von den Intestinalzellen sekretiert werden.

Neben der Regulierung der Zelladhäsion über Integrine (LFA-1) in Leukozyten ist die Expression von Cytohesin-Molekülen auch in nicht-hämatopoetischen Zelltypen denkbar. Zell/Zell- sowie Zell/Matrix-Interaktionen spielen neben der Leukozytenfunktion auch bei der Zellwanderung, Wundheilung (Hynes, 1992) oder dem neuronalen Gedächtnis (Grotewiel *et al.*, 1998) eine wichtige Rolle. Ob Cytohesin-Moleküle diese Funktionen nur über Integrine regulieren oder andere Rezeptoren beteiligt sind ist noch unklar und die Grundlage vieler Forschungsarbeiten.

5.17.1 Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, ein idealer Modellorganismus für molekularbiologische Forschung

C.elegans ist ein bodenbewohnender, nicht parasitärer Fadenwurm mit ca. 1 mm Länge. Im Labor werden die Tiere auf Agar beschichteten Petrischalen bei 15-25°C kultiviert. Als Futter dienen *E.coli*-Bakterien. *C.elegans* hat sich aufgrund vieler Vorteile als Modellorganismus für biologische Fragestellungen etabliert und bereits bewährt:

Der Fadenwurm besitzt eine relativ kurze Generationszeit von ca. drei Tagen bei 20°C (Abb. 52), mit einer hohen Nachkommenszahl von 200-300 Eier pro Tier.

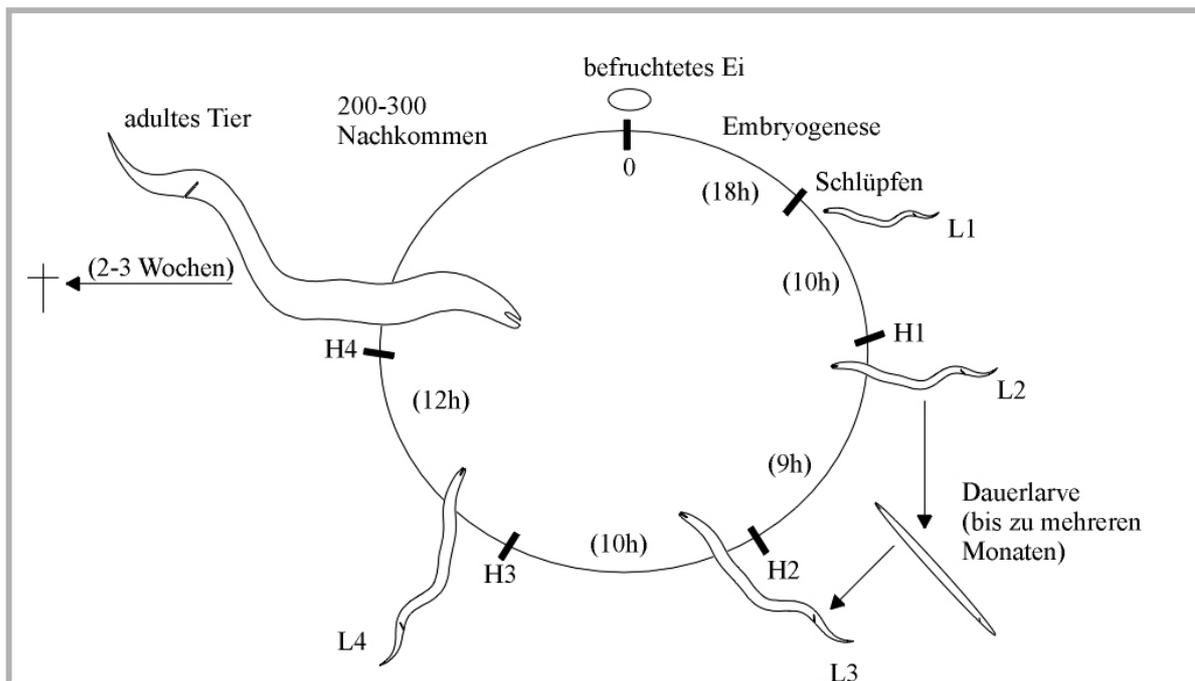


Abb. 52: Lebenszyklus von *C. elegans* bei 20°C (modifiziert nach Schierenberg und Cassada, 1986).

Ein befruchtetes Ei entwickelt sich innerhalb von drei Tagen zum adulten Tier, wobei vier Larvenstadien (L1-L4), die jeweils durch Häutungen (H1-H4) voneinander getrennt sind, durchlaufen werden. Fakultativ entsteht, bei ungünstigen äußeren Bedingungen, nach der zweiten Häutung eine Dauerlarve. Diese ist mehrere Monate auch ohne Nahrung überlebensfähig.

Die größte Anzahl der Tiere bilden die Hermaphroditen, allerdings ist auch eine geschlechtliche Fortpflanzung möglich, da Männchen spontan mit einer Frequenz von ~0,2% auftreten (Abb. 53). Diese sind für die genetische Vielfalt und im Labor besonders für Kreuzungsexperimente wichtig.

Der Stammbaum und die Position jeder Zelle in *C.elegans* ist bekannt und in allen Tieren gleich (Bauplankonstanz). Jeder adulte Hermaphrodit besteht aus 959 und jedes Männchen aus 1031 somatischen Zellen. Im Jahr 2001 wurde das „Sequenzierungsprojekt *C.elegans*“ mit Erfolg abgeschlossen. Das gesamte Genom mit ca. 8×10^7 Basenpaare wurde in Computerdatenbanken abgelegt und ist für jedermann frei verfügbar.

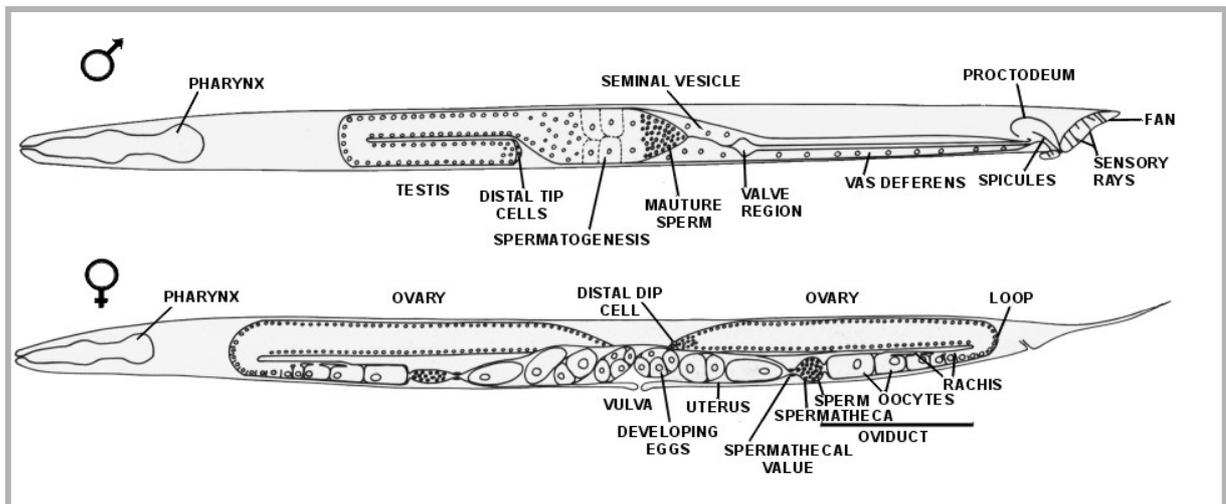


Abb. 53: Schematische Darstellung eines Hermaphroditen und eines männlichen Tieres.

Hervorgehoben sind die primären Geschlechtsmerkmale in männlichen Tieren (oben) und Hermaphroditen (unten). Äußerlich lassen sich Männchen durch ihren mit Sensorrezeptoren besetzten, fächerförmigen Schwanzbereich von Hermaphroditen unterscheiden.

Die Gonaden der Hermaphroditen sind symmetrisch aufgebaut und von einer Basalmembran umgeben. Die Struktur wurde von Hish (1976) und von Kimble und Hish (1979) genauer beschrieben. Die röhrenförmigen Arme der beiden Gonaden bilden einen „Loop“ im Kopf- bzw. Schwanzbereich.

Jeder Arm kann in 7 Regionen eingeteilt werden: Die Ovarien, der „Loop“, das Ovidukt, die Spermatheka, eine Verbindungsröhre zwischen Spermatheka und Uterus, der Uterus der schließlich in der Vulva mündet.

Ein großer Vorteil von *C. elegans* ist die Transparenz der Tiere. Schon im Lichtmikroskop lassen sich Veränderung in der Physiologie erkennen. Durch Einsatz von GFP-Reporterkonstrukten (transgene Tiere, die das „grün fluoreszierende Protein“ aus *Aequoria victoria* exprimieren) lässt sich die Expression von Proteinen im lebenden Tier in allen Stadien des Lebenszyklus studieren.

Transgene Tiere lassen sich leicht durch Mikroinjektion (4.4.2.2) in den Fadenwurm generieren. Diese Methode wird auch zum Einbringen von Reagenzien oder für RNA-Interferenzstudien verwendet.

Transgene Tiere können auch für längere Zeit durch Einfrieren bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und wieder rekultiviert werden (4.4.1.3).

Durch chemische Mutagenese ist eine Etablierung von Deletionsbibliotheken möglich (4.4.4). Eine Vielzahl genetischer Phänotypen/Markern wurde bereits charakterisiert. Diese Vorteile machen *C. elegans* als Modell für viele biologische Fragestellungen besonders attraktiv.

5.17.2 Homologieanalyse der Cytohesin-Familie in *Caenorhabditis elegans* und *Homo Sapiens*

Zur Homologieanalyse wurde die Datenbank des Sanger-Institutes mit der Internetadresse ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/C\\_elegans/blast\\_server.shtml](http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/blast_server.shtml)) verwendet und Sequenzhomologien zu humanem Cytohesin-1, -2, -3 und -4 ermittelt. Es konnten hierbei mehrere Proteine mit partiellen Übereinstimmungen bestimmt werden. Meist lag die Homologie nur im Bereich der Sec7-Domäne oder im Bereich der PH (Pleckstrin Homologie) Domäne. Das Protein K06H7.4 (grp-1) mit 393 Aminosäuren zeigte die beste Übereinstimmung in Sequenz und Länge und kann als echtes und einziges Cytohesin-Homolog in *C.elegans* angesehen werden.

K06H7.4 besitzt zu humanem Cyh-1 und Cyh-2 eine Identität von 40%, zu Cyh-3 eine Identität von 41% und 38% zu Cyh-4. Die größten Sequenzunterschiede liegen in der α -helikalen Superhelix, der sog. „coiled-coil“-Domäne, wobei die Lysine die für eine Ausbildung der „coiled-coil“-Struktur essentiell sind, in allen Proteinen der Cytohesin-Familie in *Homo Sapiens* und *C.elegans* stark konserviert sind (Abb. 54). Die „coiled-coil“-Domäne ist ein sehr verbreitetes Motiv für Proteinoligomerisierungen und Protein-Protein-Interaktionen (vgl. 5.2).

Die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) stellt ein Modul zur Membranrekrutierung von einer Vielzahl von Proteinen dar, die über Membranlipide vermittelt wird (Shaw, 1996; Pawson, 1995; Lemmon *et al.*, 1996). Cytohesin-1-Moleküle interagieren spezifisch mit Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) über die Bindungssequenz (WKRR) der PH-Domäne (Lemmon *et al.*, 1998 Nagel *et al.*, 1998). Die polybasische C-Domäne trägt zur Stabilisierung der Bindung und ist essentiell für die maximale Bindungsaffinität wie Nagel *et al.* (1998 a, b) belegen konnte.

Weiterhin ist in allen Cytohesin-Homologen ein diskretes Glutamat (E157 in Cyh-1; E156 in Cyh-2; Abb. 54, pinker Rahmen) in der SEC7-Domäne konserviert. Mutation des Glutamats in ein Lysin führt zum Verlust der ARF-GEF-Funktion von Cytohesin-1 und somit zur Einstellung der LFA-1 vermittelten Zelladhäsion und „cellspreading“ auf dem Immunglobulin ähnlichen Liganden ICAM-1. (Geiger *et al.*, 2000).

Unterschiede bei den humanen Cytohesin-Homologen zeigen sich jedoch in der Phosphorylierung nach PMA-Stimulation. Dierks *et al.* (2001) konnte zeigen, daß Cyh-1 an Serin 394 und Threonin 395, Cyh-2 an Serin 392 phosphoryliert und Cyh-3 jedoch nicht phosphoryliert wird (vgl. Abb. 54). Über Cyh-4 liegen bisher keine experimentelle Daten vor. Eine Phosphorylierung an Serin 392 in Cytohesin-4 ist theoretisch durchaus denkbar. Aber auch das *C.elegans* Protein K06H7.4 (grp-1) besitzt an dieser Stelle eine Protein-Kinase-C (PKC) Erkennungssequenz und könnte somit auch an Threonin 392 phosphoryliert werden. Vergleicht man die Sequenzen bzw. die C-Domänen der Proteine, so besitzt das humane Cytohesin-1 die größte Homologie zu K06H7.4 (grp-1).

| | | | | | | |
|---------|-------------------|------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
| Cyh-1 | MEEDD-----S-V-VPS | DLTAEERQET | ENIRRRKQET | LADIQRLKDE | IAEVANETIEN | LGSIEERKNNM |
| Cyh-2 | ME-DG-----VY-EPP | DLTPEERMET | ENIRRRKQET | LVETQRLREE | LSFAMSEVEG | LEANEGSKTL |
| Cyh-3 | MDEDGGEGGG--VPE | DLGLEEREEL | LDIRRRKKEI | IDDLERLKYE | IAEVMTEIDN | LTSVEBSKTT |
| Cyh-4 | MDLCH-----PEPA | ELSSGETEET | QRIRKWRKQI | LEDIQQLKDE | IADVFAQIDC | FESAEESRMA |
| K06H7.4 | MSSR-----VSERN | GLSETEKWTI | PKVIRKKAQI | VDEIEALKNE | VRREVDEILDQ | VYYT-HPKSK |
| Cyh-1 | QRNKOIAMGR | KKFNMDPKKG | IQFTIENDLL | KNTCEDIAQF | LYKGEGLNKT | AIGDYLGGERD |
| Cyh-2 | QRNRKMAMGR | KKFNMDPKKG | IQFTIVENELL | QNTFEEIARF | LYKGEGLNKT | AIGDYLGERE |
| Cyh-3 | QRNKOIAMGR | KKFNMDPKKG | IQFTIENDLL | QSSREDVAQF | LYKGEGLNKT | VIGDYLGGERD |
| Cyh-4 | QKEKELCIGR | KKFNMDPKKG | IQYFIEHKLL | TPFVODIARF | LYKGEGLNKT | AIGTYLGGERD |
| K06H7.4 | EYHKIVVNGR | KKFNQDPWKA | LDWIASRNVV | AKDPOALALW | MKAGEGLSKS | VYIQLGDNRR |
| Cyh-1 | EFNIQVLHAF | VELHEFTDLN | LVQALRQFLW | SFRLPGEAOK | IDRMMEAFAPQ | RYCQCNGVVF |
| Cyh-2 | ELNIAVLHAF | VDLHEFTDLN | LVQALRQFLW | SFRLPGEAOK | IDRMMEAFAPQ | RYCCLNPGVVF |
| Cyh-3 | EFNIKVLQAF | VELHEFADLN | LVQALRQFLW | SFRLPGEAOK | IDRMMEAFAT | RYCCLNPGVVF |
| Cyh-4 | PINIQVLQAF | VDCHEFANLN | LVQALRQFLW | SFRLPGEAOK | IDRMMEAFAT | RYCCLNPGVVF |
| K06H7.4 | PFALETLDRF | TKEIKLHDVP | IYPALROYLF | SFRLPGEAOK | INRILEKFAE | VYANQNSYSG |
| Cyh-1 | QSTDTCYVLS | FAIIMLNTSL | HNPVVKDKPT | VERFTAMNRG | INDGGDLPEE | LIRNLYESIK |
| Cyh-2 | QSTDTCYVLS | FAVIMLNTSL | HNPVVRDKPG | LERFVAMNRG | INEGCDLPEE | LIRNLVDSIR |
| Cyh-3 | QSTDTCYVLS | FAIIMLNTSL | HNHVVRDKPT | AERFTAMNRG | INEGCDLPEE | LIRNLYESIK |
| Cyh-4 | QSTDTCYVLS | FSIIMLNTSL | HNPVVRDRPP | FERFVSMNRG | INNGSDLPEE | QIRNLFDSIK |
| K06H7.4 | NA-DQAHTVA | YSCIMVNTLL | HNPVVKDKPS | LEKYTEMNEQ | LLKCAITIE | QITFVYESVS |
| Cyh-1 | NEPFKIPED- | ---DGNDLTH | TFPNPDREGW | LLKLGGRV- | ---KTWKRWF | FILTDNCLYY |
| Cyh-2 | NEPFKIPED- | ---DGNDLTH | TFPNPDREGW | LLKLGGRV- | ---KTWKRWF | FILTDNCLYY |
| Cyh-3 | NEPFKIPED- | ---DGNDLTH | TFPNPDREGW | LLKLGGRV- | ---KTWKRWF | FILTDNCLYY |
| Cyh-4 | SEPFKIPED- | ---DGNDLTH | TFPNPDREGW | LLKLGGRV- | ---KTWKRWF | FILTDNCLYY |
| K06H7.4 | VTQFKIPDEV | STSGKGTVND | ILLHAEREGW | LFQSSNPLF | SGALSWKKFW | FVLSNCLYY |
| Cyh-1 | FEYTDKKEPR | GIIPLENLSI | REVEDSKKEN | CFELYIPDNK | QVTRACKTE | ADGRVVEGNN |
| Cyh-2 | FEYTDKKEPR | GIIPLENLSI | REVDDERKEN | CFELYIPNNK | GQLIKACKTE | ADGRVVEGNN |
| Cyh-3 | FEYTDKKEPR | GIIPLENLSI | REVEDERKEN | CFELYINPHK | GQVIKACKTE | ADGRVVEGNN |
| Cyh-4 | FEFTDKKEPR | GIIPLENLSV | QKVDDPKKPF | CFELYINPSCR | GQVIKACKTD | GDGRVVEGKH |
| K06H7.4 | EDQMTDKKEPK | GIITLANVGT | RKVEAPSRRP | MFEIF--SLS | DGQIKACKTE | QDGRVVEGRH |
| Cyh-1 | TVYRISAPTP | EEKEEWIKCI | KAATSRDPFY | EMLAARKKKV | S--STIKRH | |
| Cyh-2 | MVYRISAPTP | EEKDEWIKSI | QAATSVDPFY | EMLAARKKRI | ---SVKCKQE QP | |
| Cyh-3 | VVYRISAPSP | EEKEEWIKSI | KASTSRDPFY | DMLATRKRRR | A---NKK | |
| Cyh-4 | ESYRISATSA | EERDQWIESI | RASTTRVPFY | DLVSTRKKKI | A---SKQ | |
| K06H7.4 | SIVKICAVND | EDMRSWIN-- | --ATSR---- | MMAQQHLL | ARPKST--H | |

Abb. 54: Sequenzvergleich der humanen Cytohesin-Familie und dem Homolog aus *C.elegans*.

Die coiled-coil Domäne, Sec7-Domäne, Pleckstrin-Homologie-Domäne und C-Domäne sind jeweils farblich gekennzeichnet. Die PIP<sub>3</sub>-Bindungssequenz (WKKR) ist mit einem blauen Rahmen gekennzeichnet. Mit einem grünen Rahmen markiert wurde das konservierte Glutamat (E157 in Cyh-1), welches essentiell für die ARF-GEF-Funktion des Proteins ist. Die Phosphorylierungsregion wurde mit einem pinken Rahmen markiert.

Die rot markierten Bereiche zeigen Aminosäurehomologien der humanen Cytohesin-Homologen in Bezug zu dem *C.elegans* Protein K06H7.4 (grp-1).

5.17.3 Antikörperfärbung in *C.elegans* mit humanen anti-SEC7-Antikörpern

Der spezifische Nachweis endogener sowie rekombinanter Proteine *in vitro* wie auch *in vivo* stellt einen wesentlichen Teil biochemischer Analysen dar. Im Gegensatz zum Cytohesin-Homolog K06H7.4 in *C.elegans* sind für die humane Cytohesin-Familie gute spezifische monoklonale Antikörper verfügbar. In einem ersten Ansatz wurden zwei verschiedene monoklonale Antikörper (7H2, 2D7) getestet, die jeweils gegen die SEC7-Domäne gerichtet sind. Der monoklonale Antikörper 7H2 erkennt spezifisch die SEC7-Domäne von Cytohesin-1, wobei 2D7 Cytohesin-1, -2 und -3 detektieren kann.

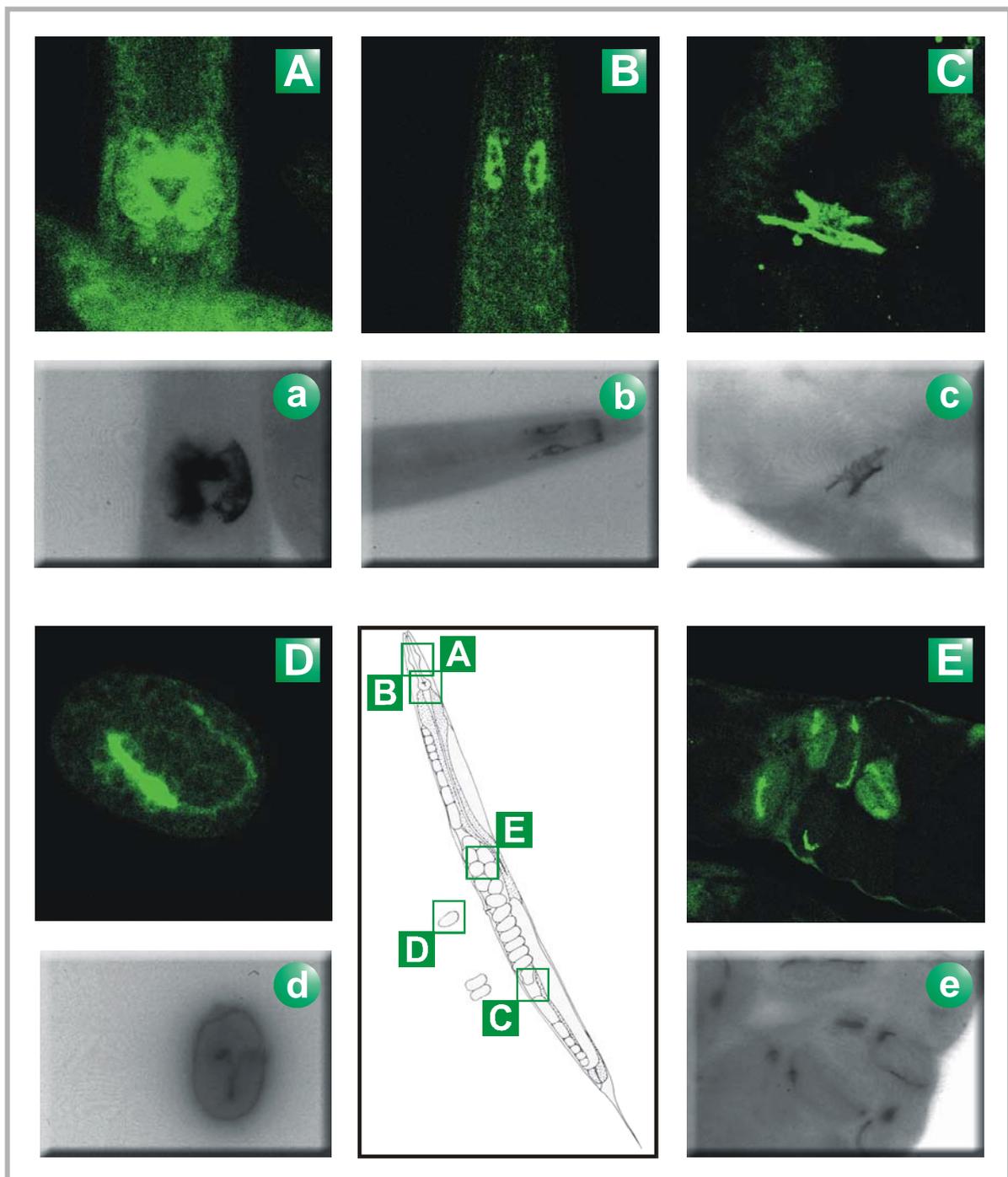


Abb. 55: Antikörperfärbung von endogenem K06H7.4 (*grp-1*) in *C.elegans* mit dem humanem monoklonalen Antikörper 2D7.

Die mit A-E beschrifteten Bilder zeigen Aufnahmen mit einem konfokalen Lasermikroskop. Mit Hilfe dieses Mikroskops können Aufnahmen diskreter Schichten in z-Richtung aufgenommen werden. Die mit a-e beschrifteten Fotos zeigen Aufnahmen mit einem Durchlicht-UV-Mikroskop. Zur Visualisierung wurden die Bilder mit einer Schwarz-Weiß-Kamera aufgenommen. Die schematische Darstellung eines *C.elegans* Tieres erleichtert die Lokalisation der Abfärbungen (Mitte, unten).

Die Antikörperfärbungen wurden wie unter 4.4.3.2 beschrieben durchgeführt und mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops oder einem Durchlicht-UV-Mikroskop ausgewertet. Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC konjugierter anti-Ratte-Antikörper (Dianova) verwendet.

Der monoklonale Antikörper 7H2 erwies sich für diese *in vivo* Experimente als nicht geeignet. Die Anfärbungen waren nur sehr schwach und kaum auswertbar (nicht dargestellt). Im Gegensatz dazu konnten sich mit dem monoklonalen Antikörper 2D7 reproduzierbare Färbungen generieren lassen.

Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-gekoppelter- α -Ratte-Antikörper eingesetzt. Eine deutliche Färbungen zeigte sich bei 99% der Tiere in den Muskelzellen der zweiten Wölbung des Pharynx (Abb. 55/A). Bei einer geringen Anzahl von Tieren (~1%) ist eine Struktur, die einem „Ambos“ gleichsieht deutlich erkennbar (Abb. 55/C). Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die Spermatheka. Oocyten werden in den Ovarien gebildet und über das Ovidukt, welches über Muskelfilamente verfügt durch die Spermatheka in den Uterus gepresst. Die Spermatheka selbst besteht aus 22 kleinen endothelialen Zellen und einer Röhre die nur aus einer Zelle mit vier Nuklei besteht. Bei der Passage durch diese Öffnung werden die Oocyten befruchtet. Ein junges erwachsenes Tier besitzt mind. 150 Spermien, die je in den beiden symmetrisch angeordneten Spermatheken gespeichert werden. Wie in Abb. 53 ersichtlich sind die Gonaden in *C.elegans* zweimal, symmetrisch zueinander angeordnet, vorhanden.

In Abb. 55/B sind zwei ovale Anfärbungen im vorderen Kopfbereich erkennbar, die wie in Abb. 55/b dargestellt, zum Teil miteinander verbunden sind. Eine Zuordnung dieser Struktur war jedoch auf Grund fehlender Marker nicht möglich. Der Lage der Anfärbungen im Kopfbereich deuten aber auf Motorneuronen im Pharynx hin.

Abb. 55 D und E zeigen Tiere im Embryonalstadium. Das Ei in Abb. 55/D wurde bereits abgelegt, während Abb. 55/E mehrere Eier im Elterntier zeigt. Im Gegensatz zu adulten Tieren ist in diesem embryonalen Stadium der gesamte Pharynx angefärbt. Weiterhin ist etwas schwächer der Intestinaltrakt erkennbar.

Da die Spezifität des Antikörpers in *C.elegans* noch nicht geklärt ist, lässt sich jedoch noch keine klare Aussage über die Lokalisation des Cytohesin-Homologs K06H7.4 (grp-1) geben. Möglicherweise werden von diesem Antikörper (2D7) auch SEC7-Domänen anderer Proteine erkannt.

5.17.4 Nachweis endogener SEC7-Elemente in *C.elegans* mit humanen anti-Cytohesin-Antikörpern

Um die Spezifität der beiden humanen α -SEC7-Antikörper 7H2 (mab10) und 2D7 (mab18) im *C.elegans*-System zu untersuchen wurde folgende Versuchsanordnung durchgeführt.

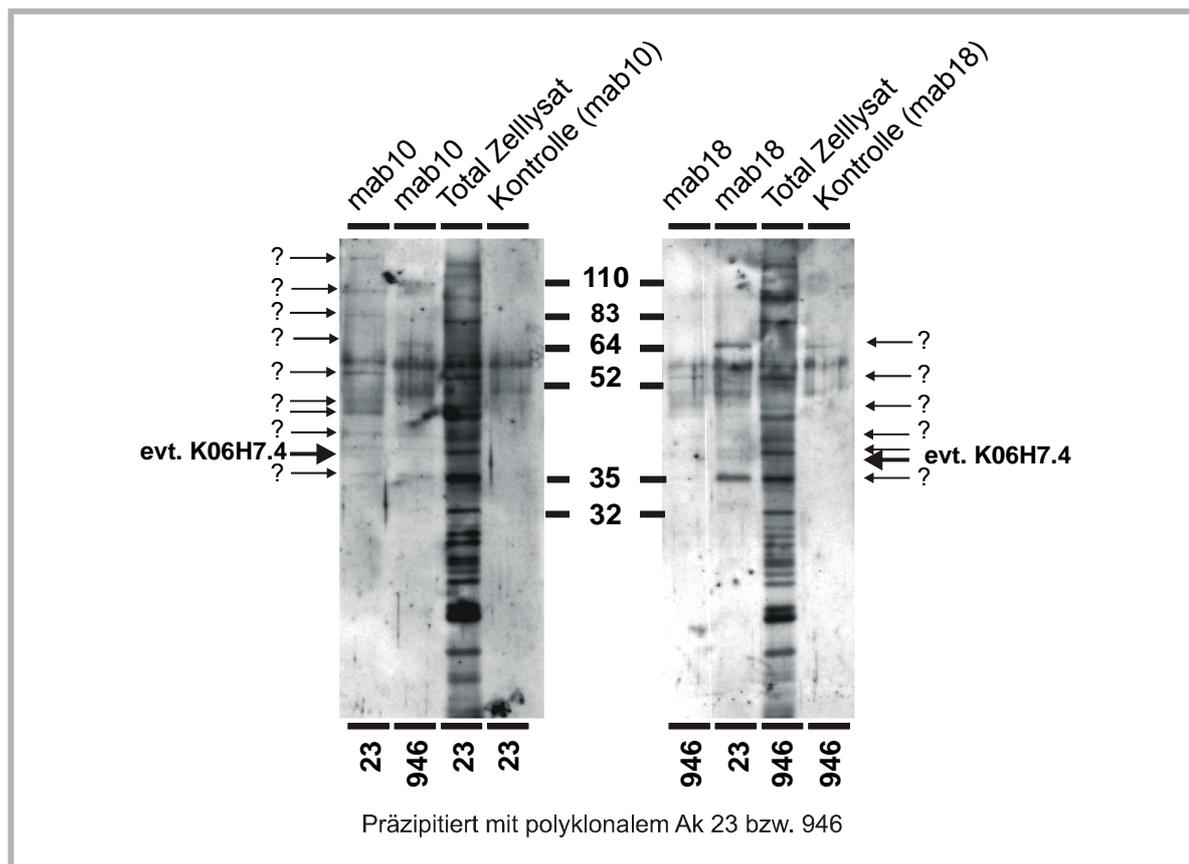


Abb. 56: Detektion von SEC7-Domänen in *C.elegans* mit humanen Antikörpern.

C.elegans Lysate wurden mit den polyklonalen Antikörpern α -Sec7 (23) und α -Sec7 (946) und Protein A-Sepharose versetzt und gebildete SEC7-Protein/Antikörper/Protein A-Sepharose-Konjugate präzipitiert. Nach Gelelektrophorese und Transfer auf Nitrozellulosemembranen wurden die SEC7-Proteine mit zwei spezifischen monoklonalen Antikörpern (7H2 (mab10) bzw. 2D7 (mab18)) detektiert.

Drei 9 cm Kulturschalen von *C.elegans* Tiere (in allen Stadien) wurden kurz nachdem das Futter verbraucht war abzentrifugiert und mit Proteaseinhibitoren versetztem WLP-Lysispuffer lysiert. Die polyklonalen Antikörper α -Sec7 (23) und α -Sec7 (946) sind gegen die Sec7-Domäne gerichtet und wurden zur Markierung von Sec7-Domänen enthaltenden Proteinen verwendet. Zur Aufkonzentrierung wurden die Protein/Antikörperkomplexe an Protein A-Sepharose gebunden und über Western-Blot-Techniken (4.6.4) analysiert. Zur Detektion wurden die monoklonalen Antikörper 7H2 und 2D7 verwendet. Als sekundärer Antikörper kam ein Peroxidase-konjugierter anti-Ratte-Antikörper (Dianova) zum Einsatz. Weder der monoklonale Antikörper 7H2 noch 2D7 erkennt explizit das Protein K06H7.4 (grp-1). Es werden von beiden Antikörpern mehrere Proteine

unterschiedlicher Größe detektiert. Das Cytohesin-Homolog mit ca. 43,3 kDa ist evt. von beiden Antikörpern schwach detektierbar (siehe Abb. 56, Pfeil). Für spezifische Analysen sind beide Antikörper jedoch relativ wertlos.

5.17.5 Interaktionsanalyse von *grp-1* und *pat-3* in Hefe

Von C.Geiger *et al.* (2000) konnte eine direkte Interaktion zwischen Cytohesin-1 und dem humanen Integrin LFA-1 (CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$) nachgewiesen werden. Integrine sind Heterodimere, bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit und sind maßgeblich an Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontakten beteiligt. Sie arbeiten als bidirektionale Einheiten, welche Informationen zwischen extrazellulären Bereichen und dem Inneren der Zellen verarbeiten können. Diese Rezeptoren haben in einer Vielzahl von biologischen Aspekten, wie z.B. Entwicklung, Leukozytenfunktion, Wundheilung eine große Bedeutung. Cytohesin-1 bindet an die cytoplasmatische Domäne der β_2 -Untereinheit und ist an der Aktivierung des Integrins LFA-1 beteiligt (siehe auch Einleitung).

Die Vermutung lag Nahe, daß auch das *C.elegans* Cytohesin-Homolog K06H7.4 (*grp-1*) an Integrine binden kann bzw. mit ihnen interagiert. Durch Literatur- und Datenbankrecherche konnten in *C.elegans* zwei Integrindimere identifiziert werden, die sich jeweils nur durch die α -Untereinheit unterscheiden und in verschiedenen Geweben exprimiert werden.

α -INA-1/ β -PAT-3 Heterodimere werden in *C.elegans* in den vier Gruppen von Neuronen (CANs, ALMs, HSNs und Q Neuroplasten) exprimiert (Hedgecock *et al.*, 1987), die über weite Wege während der Entwicklung der Tiere migrieren. Mutationen in INA-1 zeigen Defekte in der Migration von Neuronen und der Bündelung von Axons, jedoch keine Wachstumsdefekte der Axons sowie Defekte in der Morphogenese im Kopfbereich, Pharynx, Gonaden, Vulva, Uterus und Schwanzbereich des männlichen Tieres (P.D. Baum *et al.*, 1997). α -INA-1 ist in Vertebraten mit α_3 , α_6 und α_7 Untereinheiten, in *Drosophila melanogaster* mit α PS1 vergleichbar (Wehrli *et al.*, 1993).

Im Gegensatz dazu ist das Heterodimer α -PAT-2/ β -PAT-3 in epithelialen Zellen sowie in regelmäßigen Strukturen der Muskelzellen in der Körperwand exprimiert. Diese Strukturen sind in Vertebraten vergleichbar mit den Muskelstrukturen der Z- und M-Linie der Skelettmuskulatur.

α -PAT-2 Mutanten zeigen Entwicklungsstörungen in der Muskelausbildung bzw. eine Lähmung im Embryonalstadium durch einen Verlust der Ankerstrukturen im Kontraktionsapparat der Muskulatur. PAT-2 besitzt im humanen System die größte Homologie zu α_5 bzw. α_8 -Untereinheiten, in *Drosophila melanogaster* zur α PS2-Untereinheit (N.H. Brown, 2000).

Das gemeinsame β -Integrin *pat-3* wurde von Gettner (1995) kloniert und besitzt die größte Homologie zu der β_1 -Untereinheit in Vertebraten (Abb. 57). Immunocytochemische Analysen zeigten eine Expression im Embryo sowie viele postembryonale Zelltypen, einschließlich Muskeln und Gonaden. Mutationsanalysen der extrazellulären Domäne ergaben Defekten in der

Morphogenese der Gonaden sowie Defekte in der Muskelstruktur. Unkoordinierten Bewegungen und Defekte bei der Eiablage sind die Folge (M. Lee *et al.*, 2001). Manche Mutationen in PAT-3 führen auch zu einem Entwicklungsstopp aufgrund einer fehlenden Ausbildung der Körpermuskulatur (McDonald *et al.*, 1998). Dieses Erscheinungsbild wird als PAT (paralyzed arrested elongation at two-fold) Phänotyp bezeichnet.

Um eine mögliche Interaktion zwischen PAT-3 und K06H7.4 (*grp-1*) rasch untersuchen zu können, wurde eine Protein-Protein-Interaktionsanalyse in *S. cerevisiae* durchgeführt. Hierzu wurde erneut das "Two-Hybrid-System" von Gyuris *et al.* (1993), wie schon unter 4.3.2 beschrieben, eingesetzt. Die cytoplasmatische Domäne von PAT-3 wurde über PCR-Reaktion aus einer cDNA-Bibliothek (*C. elegans*) die mir freundlicher Weise von Inge Röcklein (Genzentrum, München) zur Verfügung gestellt wurde generiert und als „bait“ über die Restriktionsschnittstellen *MluI/NotI* in den Vektor pEG202 kloniert. Mit den Oligodesoxyribonukleotidpaaren *pat3cdwcod/pat3cdrev* wurde ein längeres Fragment PAT-3<sub>cyt759</sub>, welches die letzte Aminosäure der Transmembrandomäne beinhaltet erzeugt. Ein zwei Aminosäure kürzeres Fragment PAT-3<sub>cyt761</sub> wurde mit den Oligodesoxyribonukleotidpaaren *pat3cdlcod/pat3cdrev* generiert. Als „prey“ wurde die SEC7-Domäne von K06H7.4 (*grp-1*) in gleicher Weise in den Vektor pJG4-5 kloniert. Die SEC7-Domäne aus Cytohesin-1 wurde von Kolanus *et al.* (1996) als die Domäne identifiziert, die mit der cytoplasmatischen Domäne von CD18 (β_2 -Integrin) in Wechselwirkung tritt. Da die SEC7-Domäne im Gegensatz zum vollständigen Cytohesin-1 im Hefe-System oft ein stärkeres Signal zeigt wurde nur die SEC7-Domäne (ceSEC7<sub>Y36-1239</sub>) von K06H7.4 (*grp-1*) verwendet.

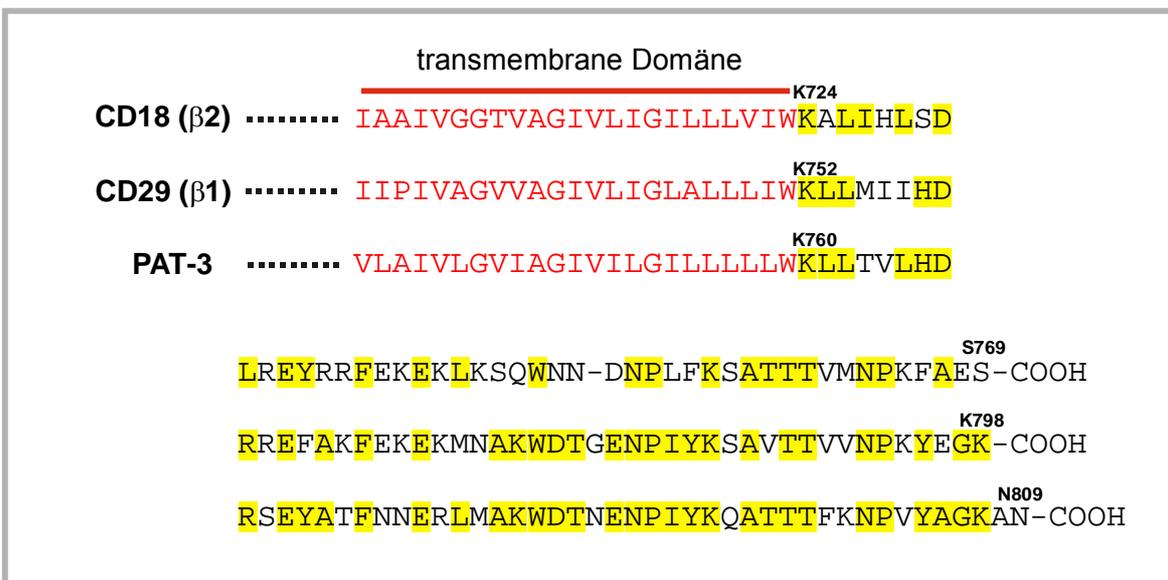


Abb. 57: Vergleich der transmembranen und cytoplasmatischen Domänen von beta-Integrinen.

Das einzige in *C. elegans* identifizierte β -Integrin, PAT-3, zeigt die größte Homologie zu dem humanen β_1 -Integrin CD29. Cytohesin-1 bindet spezifisch an die cytoplasmatische Domäne von CD18. Dargestellt sind nur die Transmembran- sowie die cytoplasmatische Domäne der Integrine. Gelb markiert sind Aminosäurehomologien in Bezug zu PAT-3.

Die Klonierung erfolgte durch PCR mittels spezifischer, komplementärer Oligodesoxyribonukleotide (ce cyt SEC cod/ce cyt SEC rev), die den zu amplifizierenden Sequenzbereich flankieren und mit spezifischen Restriktionsschnittstellen ausgestattet sind, die eine Klonierung in den gewünschten Vektor erlauben.

Die Konstrukte wurden in den Hefe-Stamm EGY48/JK103 kotransformiert (4.3.5) und in beschriebener Weise (4.3.6) die Protein-Protein-Interaktionen über das lacZ-Reportergen mittels Blaufärbung der Zellen analysiert.

| “bait”-Protein fusioniert mit lexA202 | “prey”-Protein fusioniert mit der B42-Domäne | relative Intensität der Blaufärbung auf UHW/X-Gal-Platten |
|---------------------------------------|--|---|
| CD18 <sub>cyt725</sub> | SEC7 <sub>Cyh-1</sub> | +++ |
| CD18 <sub>cyt725</sub> | Cytohesin-1 | ++ |
| CD29 <sub>cyt</sub> | SEC7 <sub>Cyh-1</sub> | - |
| Syk | SEC7 <sub>Cyh-1</sub> | - |
| - | SEC7 <sub>Cyh-1</sub> | - |
| PAT-3 <sub>cyt759</sub> | ceSEC7 <sub>Y36-1239</sub> | - |
| PAT-3 <sub>cyt759</sub> | K06H7.4 | - |
| PAT-3 <sub>cyt759</sub> | - | - |
| PAT-3 <sub>cyt761</sub> | ceSEC7 <sub>Y36-1239</sub> | - |
| PAT-3 <sub>cyt761</sub> | K06H7.4 | - |
| PAT-3 <sub>cyt761</sub> | - | - |

Tab. 11: Protein-Protein-Interaktionsanalysen in *S.cerevisiae* mit der cytoplasmatischen Domäne des β -Integrins PAT-3 und der SEC7-Domäne von K06H7.4 in *C.elegans*.

PAT-3-Konstrukte bzw. Kontrollproteine wurden als “bait” eingesetzt und an lexA202 fusioniert. Die SEC7-Domäne wurde als Fusionsprotein mit der transaktivierenden Domäne B42 exprimiert. Die Interaktionsanalysen wurden im Hefestamm EGY48/JK103 durchgeführt. Die relative Intensität der Interaktionen wurde als Blaufärbung der Hefeklone auf UHW-/X-Gal-Selektionsplatten analysiert. +++ stellt eine starke Blaufärbung, - keine Färbung dar.

Zur Verifizierung des Systems wurde als Positivkontrolle eine Interaktion zwischen der cytoplasmatischen Domäne von CD18 (CD18<sub>cyt725</sub>) und der SEC7 von Cytohesin-1, wie von C.Geiger *et al.* (2000) durchgeführt, bestätigt. Als negative Kontrollen wurden die cytoplasmatische Domäne von CD29, Syk sowie der lexA202-Anteil alleine eingesetzt. Diese Konstrukte wurden mir freundlicher Weise von C.Geiger, Genzentrum) zur Verfügung gestellt.

Eine Interaktion zwischen dem β -Integrin PAT-3 und ceSEC7<sub>Y36-1239</sub> zeigte keine Blaufärbung der Klone und somit keine Interaktion an. PAT-3 ist aufgrund dieses Experiments als β 1-Integrin ähnliches Molekül kein Interaktionspartner für K06H7.4 (grp-1). Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnisse im humanen System. Auch hier interagiert die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 nur mit dem β 2-Integrin, nicht jedoch mit der β 1-Kette. Integrine als Interaktionspartner für K06H7.4 (grp-1) fallen aufgrund dieser Ergebnisse aus.

5.17.6 Promotoranalyse von K06H7.4 (*grp-1*) in *C.elegans*

Da bisher kein bekannter Interaktor für K06H7.4 (*grp-1*) in *C.elegans* bekannt war und auch keine Aussagen über die Lokalisation des Proteins über Antikörperfärbungen (vgl. 5.17.3) getroffen werden konnten, sollten im Anschluss weitere *in vivo* Untersuchungen in Bezug auf Funktionsort und Expressionsmuster des Proteins während der Entwicklung durchgeführt werden.

Häufig verwendet man hierzu in *C.elegans* chimäre Reporterkonstrukte. Frei verfügbare modulare Plasmide (Fire *et al.*, 1990) erlauben eine variable Klonierung von spezifischen Promotoren und Reportersystemen (z.B. *lacZ*, GFP) in *C.elegans*.

In dieser Arbeit wurde ein Vektor verwendet, der das GFP-Protein („green fluorescent protein“) als Reporter enthält. Auf diese Weise lassen sich Expressionsmuster von Proteinen in allen Stadien eines Tieres *in vivo* verfolgen, da die Plasmide z.T. als weiteres Chromosom angesehen werden.

5.17.6.1 Konstruktion des GFP-Reporterplasmids für K06H7.4 (*grp-1*)

Das Gen K06H7.4 liegt auf Chromosom III des *C.elegans* Genoms und wird von den Proteinen K06H7.6, K06H7.3 und K06H7.7 (mit entgegengesetztem Leserahmen) flankiert (Abb. 58/A). Die genomische DNA von K06H7.4 ist 2309 bp lang, das Gen wird durch 7 Exons codiert (Abb. 58/B).

Der Expressionsvektor Ppd 95.75 wurde von Fire. A, White-Harrison S. und Dixon D. (Department of Embryology, Carnegie Institution of Washington, Baltimore) entwickelt bzw. optimiert und mir freundlicher Weise von Ralf Baumeister (Genzentrum, München) zur Verfügung gestellt. Das Vektorsystem baut auf dem Plasmidgrundgerüst des pUC19-Vektors auf (Fire A., 1990) und enthält zwei Klonierungskassetten (MCS1, MCS2). Als Reporter wird das „grün fluoreszierende Protein“ (GFP) aus der Qualle *Aequora victoria* verwendet (Charlfie *et al.*, 1994). Zur Verbesserung der Fluorochromaktivität (Heim R., 1994, 1995) besitzt das verwendete GFP-Protein die Mutation S65C sowie zur Expressionssteigerung des Fusionsproteins drei synthetische Introns (Okkema P., 1993) (Abb. 58/D).

Dem GFP-Protein nachgeschaltet ist der 3'-Sequenzbereich des *unc-54* Proteins. Die Sequenz beinhaltet Terminationssignale und einen Sequenzbereich für die Bindung einer spezifischen Endonuklease, die durch die Spaltung des mRNA Primärtranskripts die Polyadenylierung initiiert.

Da keinerlei Daten über die Promotorregion von K06H7.4 vorhanden sind, konnte die Region nur grob abgeschätzt werden. Das verwendete Fragment wurde schließlich durch klonierungsstrategische Maßnahmen gewählt.

Durch Restriktionshydrolyse des Cosmids K06H7 mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *BamHI* wurden 9 DNA-Fragmente (7136, 3265, 3036, 2062, 2061, **1388**, 1338, 1247 und 545 bp) mit unterschiedlichen Größen generiert. Das 1388 bp Fragment enthält dabei 850 bp des Promotorbereichs sowie 538 bp des codierenden Sequenzbereichs von K06H7.4 (siehe Abb. 58/C) und wurde deshalb für die Promotoranalyse verwendet. Über die genannten

Restriktionsendonukleasen wurde das DNA-Fragment im Leserahmen zum GFP-Protein in den Expressionsvektor PpD95.75 ligiert (Abb. 58/D).

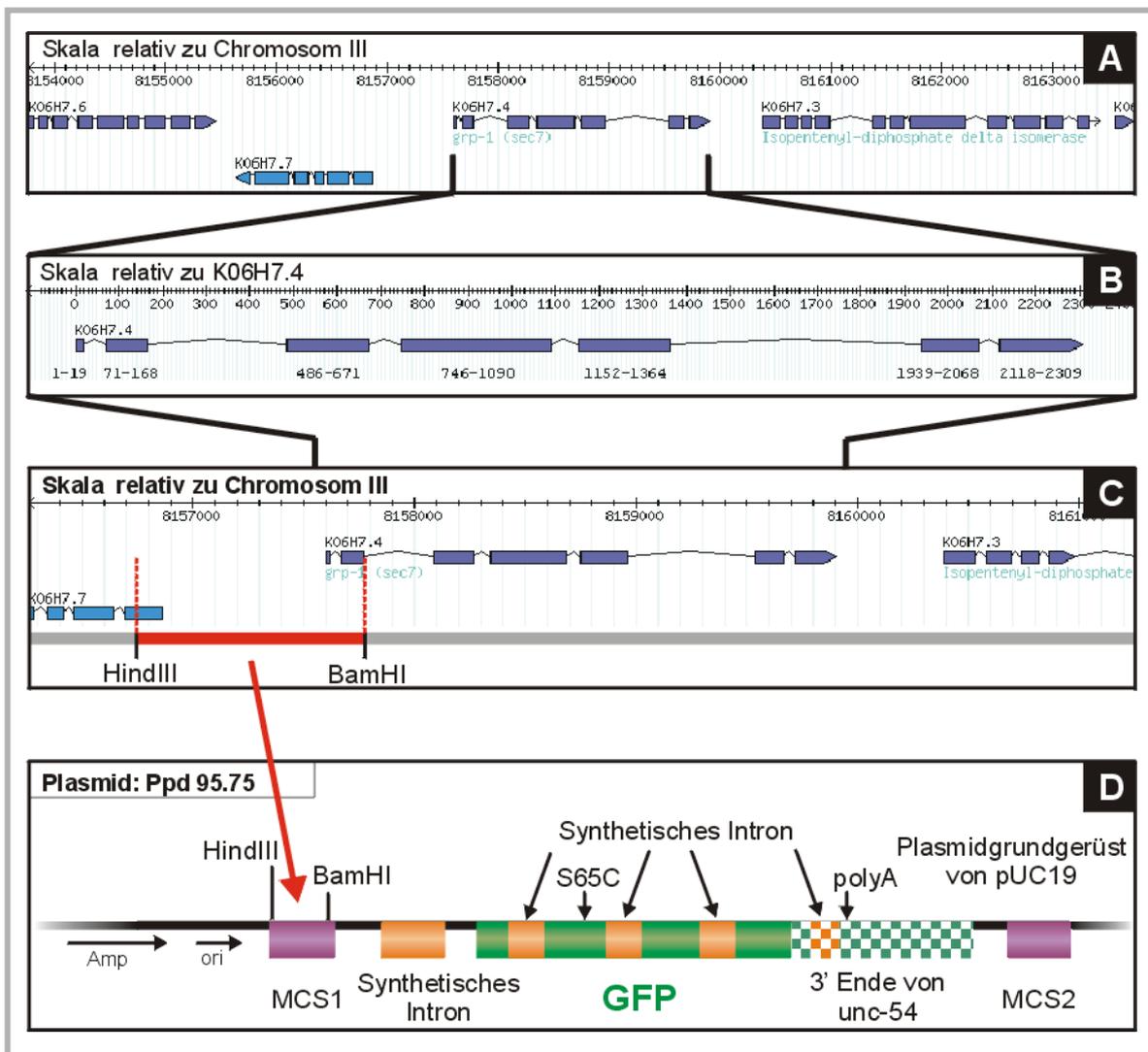


Abb. 58: Vektorkonstruktion für die Promotoranalyse von K06H7.4.

- (A) K06H7.4 ist auf Chromosom III lokalisiert und wird von den Proteinen K06H7.3, K06H7.6 und K06H7.7 flankiert.
- (B) Die cDNA von K06H7.4 ist 2300 bp lang und wird von 6 Introns unterbrochen.
- (C) Das Genfragment, welches zur Promotoranalyse verwendet wurde, ist mit einem roten Balken markiert.
- (D) Schematische Darstellung des Expressionsvektors Ppd95.75.

Die Injektion der DNA in die Gonaden der Tiere erfolgte wie unter 4.4.2.2 beschrieben. Es wurde in diesem Fall kein Injektionsmarker verwendet, da die Expression des GFP-Reporterkonstrukts in den Tieren direkt unter einem UV-Mikroskop überprüft werden konnte.

Für eine stabile Expression und Weitervererbung des Konstrukts ist eine Integration in das Genom nötig. Durch Bestrahlung der Tiere mit hochenergetischem UV-Licht werden DNA-Bruchstellen initiiert (4.4.2.3). Durch zelleigene Reparaturmechanismen werden diese Brüche wieder

geschlossen, zu einem geringen Prozentsatz aber auch Fremd-DNA mit eingebaut. Die Konstrukte werden dann von Generation zu Generation weitervererbt und stabil exprimiert.

5.17.6.2 Ergebnisse der Promotoranalyse von K06H7.4 (*grp-1*)

Rekombinante *C.elegans*-Tiere wurden bei 20°C kultiviert, anschließend mit 10 mM NaN<sub>3</sub> in PBS getötet und auf Objektträger aufgebracht. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem UV-Mikroskop oder mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leica) bei einer Absorptionswellenlänge von 488 nm.

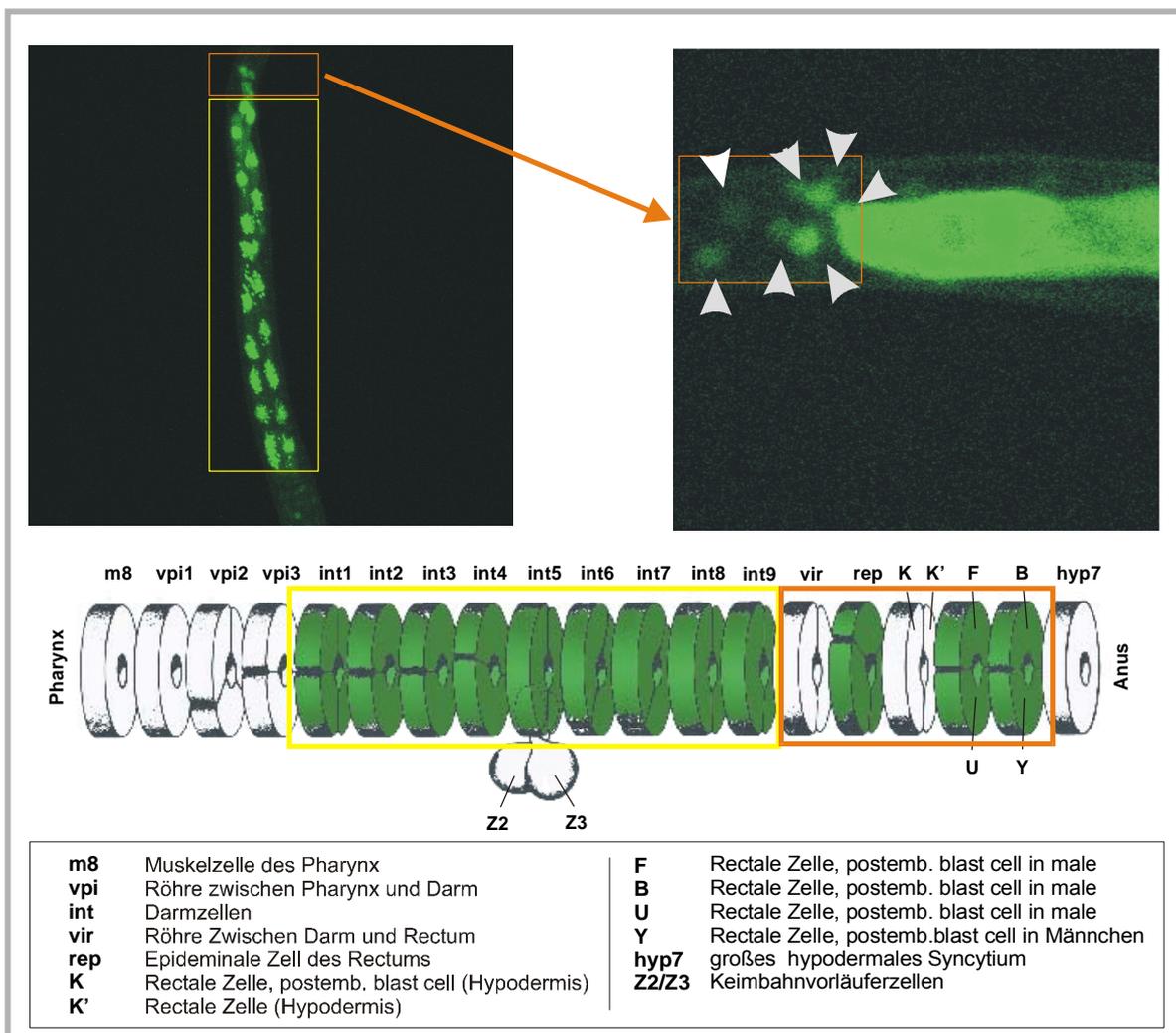


Abb. 59: Promotoranalyse des Proteins K06H7.4 in *C.elegans*.

Die linke Aufnahme zeigt eine GFP-Färbung eines Tieres. Der Kopfbereich befindet sich am unteren Bildrand, der Schwanzbereich im oberen. Der gelb umrandete Bereich markiert den Intestinaltrakt. Der orangeumrandete Rahmen zeigt Zellen in der Rektalregion, die in der rechten Aufnahme noch vergrößert dargestellt ist.

Das Konstrukt zeigt klare Expression im intestinalen und rektalen Bereich der Tiere. Der Intestinaltrakt besteht aus 18 Zellen, wobei jeweils zwei Zellen eine Röhre bilden. Die Zellpaare

werden mit int1-9 bezeichnet. Im Anschluss an den Intestinaltrakt schließt der rektale Bereich an, der aus 11 Zellen besteht. Auch hier bilden Zellpaare, wie im Intestinaltrakt, eine Röhre aus (vgl. Abb. 59). Eine Ausnahme besteht bei dem epidermalen Zellverband *rep*, der die Röhre mit drei Zellen ausbildet. Eine Expression zeigte sich in 7 der 11 Zellen, mit den Bezeichnungen *rep* (besteht aus drei Zellen), *F*, *U*, *B*, und *Y* (bestehen jeweils aus zwei Zellen).

Der Darm stellt in *C.elegans* eine zentrale Rolle dar. Neben der Nährstoffaufnahme werden verdauungsfördernde Enzyme in das Lumen sekretiert. Weiterhin dient der Darm als Speicherorgan. Lipide, Proteine und Carbohydrate werden in Granula eingelagert. Der Darm spielt zusätzlich auch eine wichtige Rolle bei der Versorgung von Keimzellen. Bestimmte Proteine werden in adulten Tieren von intestinalen Zellen hergestellt und zu Oocyten transportiert (Kimble & Sharrock, 1983).

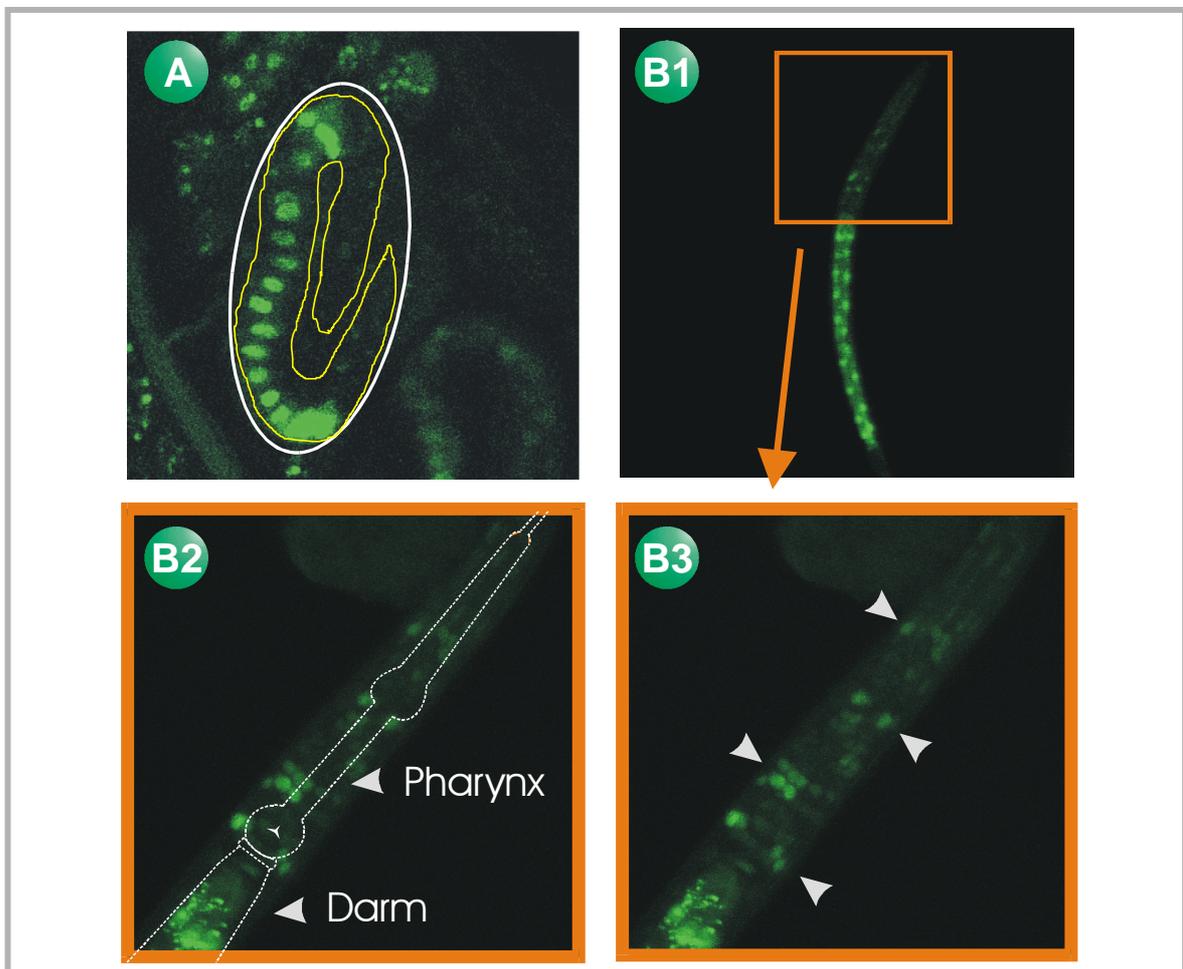


Abb. 60: Neben der Expression im Intestinal- und Rektaltrakt sind auch Anfärbungen im Kopfbereich erkennbar.

- (A) GFP-Expression im Darm eines Jungtieres. Das Ei befindet sich noch im Elterntier, steht aber kurz vor dem Ablegen durch das Muttertier. Die Umriss des Tieres sind gelb markiert. In Weiß wurde die Eihülle des Jungtieres skizziert.
- (B) Tier im L4-Larvenstadium. Neben der dominanten Darmexpression auch Färbungen im Kopfbereich. B2 und B3 zeigen eine Vergrößerung des Kopfbereichs mit skizziertem Darmansatz und Pharynx.

Die dominante Expression im Darm ist in allen Lebensstadien von *C.elegans* dokumentierbar. Wie in Abb. 60/A gezeigt, ist schon bei Jungtiere die sich noch im Elterntier befinden eine starke Expression im Darm vorhanden. Erst im L3-L4 Larvenstadium bzw. in adulten Tieren ist eine wesentlich schwächere Expression im Kopfbereich der Tiere erkennbar. Die Hauptbestandteile des Kopfbereichs bilden das Nervensystem und der Pharynx. *C.elegans* pumpt über den Pharynx Nahrung in den Darm, wobei in der zweiten Wölbung die Nahrung mechanisch zerkleinert wird. Über ein kurzes röhrenförmiges Verbindungsstück ist der Pharynx mit dem Intestinaltrakt verbunden. Das Nervensystem des Fadenwurms besteht aus ca. 300 Neuronen und ist zum größten Teil im Kopfbereich angesiedelt.

Die Zuordnung der Zellen gestaltete sich aufgrund fehlender Marker als sehr schwierig. Die Stärke der Expression war jedoch von Tier zu Tier sehr unterschiedlich. Auffallend ist jedoch ein symmetrisches Expressionsmuster. Das Nervensystem des Pharynx besitzt zum Großteil eine bilaterale Symmetrie, im Gegensatz zu einer dreifachen Symmetrie der Muskulatur oder des Epitheliums. Aus diesen Gründen ist anzunehmen, daß es sich bei den angefärbten Bereichen um neuronale Zellen handelt. Genauere Analysen wurden aber im Zuge dieser Arbeit nicht unternommen.

5.17.7 Spezifische genetische Interferenz mittels doppelsträngiger RNA im Modellorganismus *C.elegans*

In vielen Fällen kommt man bei der Erforschung von Genen und deren Wirkungsmechanismen *in vitro* an Grenzbereiche. Es wurden aus diesem Grund verschiedene Ansatzpunkte entwickelt um Gene *in vivo* zu manipulieren bzw. ganz aus einem Organismus zu eliminieren. Neben dem „Gen-Knockout“ (siehe 5.17.8), bei dem Gene gezielt auf der Stufe der genomischer DNA manipuliert werden können, stellt die „RNA-Interferenz-Methode“ eine interessante Alternative dar. Die experimentelle Injektion von RNA in Zellen kann in den verschiedensten biologischen Systemen verwendet werden, um die Funktion endogener Gene zu unterbinden (Izant, J., *et al.*, 1984).

Der Mechanismus basiert auf einem einfachen Antisense-Mechanismus der von der Hybridisation zwischen injizierter RNA und endogenem mRNA-Transkript resultiert. 1991 wurde diese Methode von A. Fire *et al.* erstmalig erfolgreich benutzt, um in *C.elegans* die Genexpression von Proteinen in Muskelzellen zu unterdrücken. A. Fire konnte durch weitergehende Experimente zeigen, daß eine Inhibition noch gesteigert werden kann, wenn dsRNA, eine 1:1 Mischung zwischen Sense- und Antisense-RNA, injiziert wurde (Fire A., *et al.*, 1998). Die Effekte der Hemmung durch dsRNA sind bei dem injizierten Tier wie auch bei dessen Nachkommen nachweisbar. Die dsRNA ist so stabil, daß sie z.T. der nächsten Generationen weitergegeben werden kann.

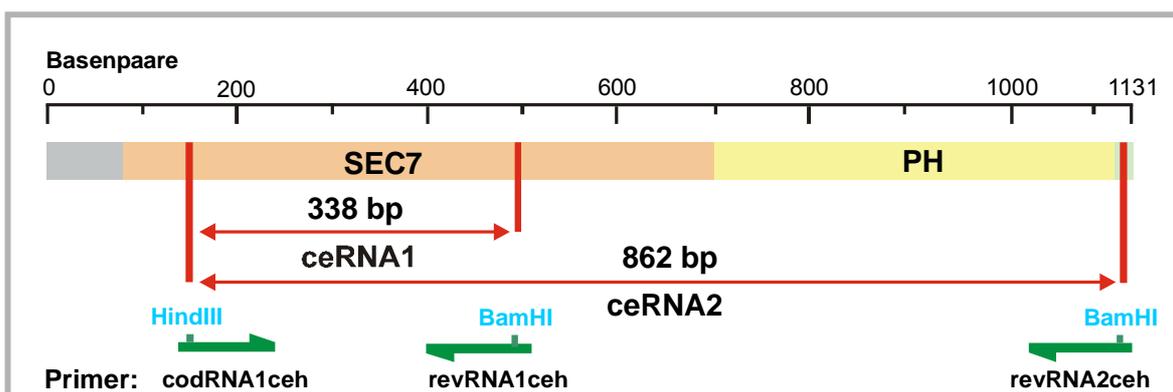


Abb. 61: Schematische Darstellung des Proteins K06H7.4 und die Sequenzfragmente, die zur RNA-Interferenz eingesetzt wurden.

Für die Transkription wurden cDNA Fragmente in das Plasmid pBS KS II (+) kloniert. Das Fragment ceRNA1 wurde mittels PCR-Reaktion mit den Oligodesoxyribonukleotide codRNA1ceh und revRNA1ceh erhalten. Für ceRNA2 kamen die Oligodesoxyribonukleotide codRNA1ceh und revRNA2ceh zum Einsatz.

Zur Interaktionsanalyse wurden zwei dsRNA-Konstrukte erzeugt. Ein kürzeres Konstrukt (ceRNA1) mit 338 bp, welches ca. die Hälfte der SEC7-Domäne absteckt. Das zweite Konstrukt (ceRNA2) ist mit 862 bp länger gewählt und deckt ~76% des Proteins ab (Abb. 61).

Die Klonierung erfolgte durch PCR (Kapitel 4.5.1) mittels spezifischer, komplementärer Oligodesoxyribonukleotide, die den zu amplifizierenden Sequenzbereich flankieren und mit spezifischen Restriktionsschnittstellen ausgestattet sind, die eine Klonierung in den gewünschten Vektor erlauben. Ein cDNA-Bibliothek von *C.elegans* wurde mir freundlicher Weise von Inge Röcklein (Genzentrum, München) zur Verfügung gestellt.

Die PCR-Produkte wurden über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *BamHI* in die multiple Klonierungskassette (multiple cloning site) des Plasmidvektors pBS KS II (+) ligiert (Abb. 62), der mir von Ralf Baumeister (Genzentrum, München) überlassen wurde.

Diese Klonierungsregion wird von den Promotorregionen T3 bzw. T7 von Bakteriophagen flankiert, so daß durch Zugabe der jeweiligen RNA-Polymerase (T3 oder T7 RNA-Polymerase) die Sense- oder Antisense-RNA transkribiert werden kann.

Zur Generierung der ssRNA Transkripte wurde jeweils 12 µg der Plasmide pBS II KS ceRNA1 und pBS II KS ceRNA2 mit Restriktionsverdau (4.5.4) linearisiert. Wurde die geschnittene Plasmid-DNA im Transkriptionsansatz mit der T3 RNA-Polymerase versetzt, kam das Restriktionsenzym *BamHI* zum Einsatz. Andernfalls wurde *HindIII* als Restriktionsendonuklease verwendet. Die anschließende Transkription wurde wie unter 4.4.5 beschrieben durchgeführt, die Konzentration der transkribierten ssRNA bestimmt (ca. 0,5 µg/µl), Sense- und Antisensestrang dann im molaren Verhältnis (1:1) für 5 min bei 65°C hybridisiert.

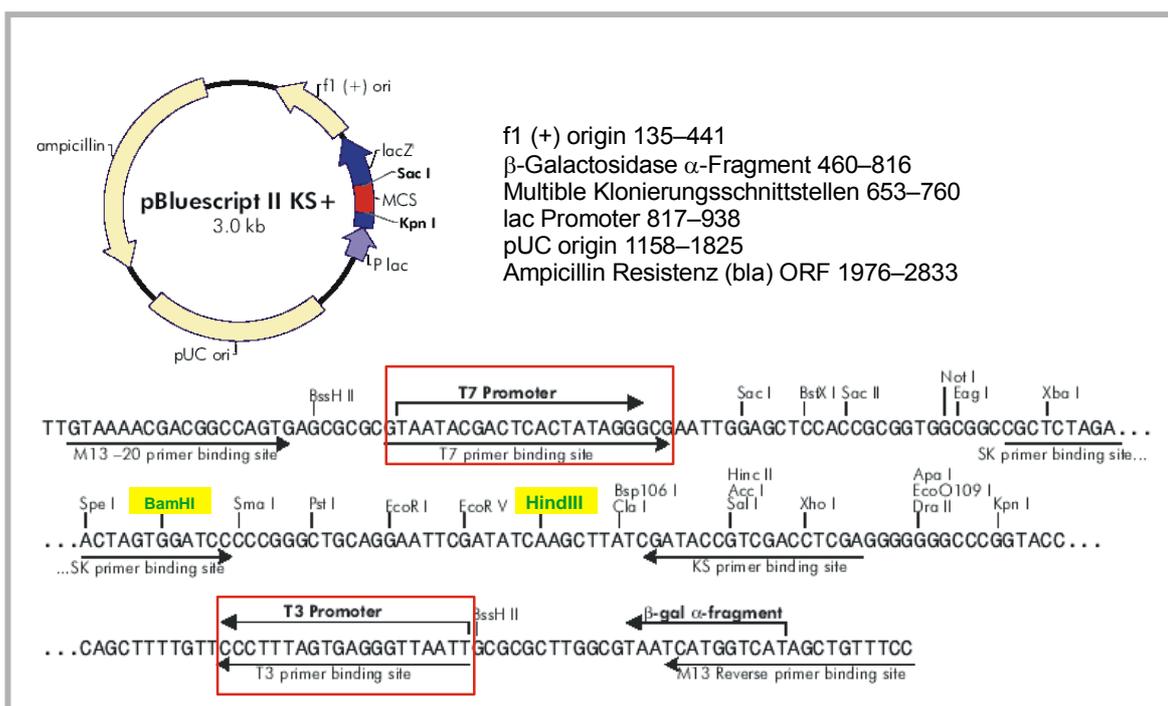


Abb. 62: Schematische Darstellung des Vektors für die *in vitro* RNA Transkription mit T3 oder T7 RNA Polymerase.

Die cDNA Fragmente ceRNA1 und ceRNA2 wurden über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *BamHI* in das Plasmid pBS KS II (+) kloniert. Die roten Boxen markieren die T3 bzw. T7 Promotorregionen.

Zur Beurteilung der Injektionseffizienz wurde zusätzlich 100 ng eines Markers zugegeben. Das verwendete Plasmid TTX-3 GFP enthält das „grün fluoreszierende Protein“ (GFP) aus *Aequoria victoria*. Unter UV-Licht können so transfizierte von nicht-transfizierten Tieren unterschieden werden.

Um ein Verstopfen der Injektionsnadel zu verhindern wurden die Ansätze über micro-Filter (0,2 µm) nochmals gereinigt.

Die Injektion erfolgte in die Gonaden von adulten Tieren. Die Tiere wurden anschließend weiter für 6-12h bei 20°C kultiviert und anschließend auf Verhaltensänderungen sowie physiologische Merkmale/Veränderungen untersucht. Aufgrund der hohen Stabilität der dsRNA wird diese auch an die nächste Generation weitergegeben. Der genaue Mechanismus ist bis jetzt noch nicht geklärt. Auf diese Weise ist es möglich *C.elegans* Tiere in allen Lebensstadienstadien zu untersuchen.

Mit den beiden dsRNA-Konstrukt wurden jeweils ca. 15 Tiere injiziert und jeweils etwa 50 Nachkommen analysiert.

Es konnte jedoch bei keinem der beiden Konstrukte ein auffallender Phänotyp analysiert werden.

5.17.8 „Gen-Knockout“ des Cytohesin-Homologs *grp-1* in *C.elegans*

Die RNA-Interferenzmethode (vgl. 5.17.7) stellt eine relativ neue Technik dar, Proteinexpression in Organismen zu unterdrücken. Die Suppression findet jedoch relativ spät, auf mRNA-Ebene statt und ist nicht in allen Zelltypen gleich effizient. Bei einem „Gen-Knock-out“ werden Gene gezielt auf der Stufe der genomischer DNA manipuliert. Die Expression des entsprechenden Proteins wird völlig unterdrückt.

Die dabei generierten Tiere zeigen aufgrund des Gendefekts häufig Phänotypen auf, die Rückschlüsse auf Signalwege oder Funktionsorte eines Proteins zulassen. Bei höheren Organismen wie z.B. Mäusen wurden Methoden entwickelt, um Gene gezielt anzusteuern und zu verändern.

Bei der „homologen Rekombination“ werden klonierte Kopien des Zielgens so verändert, daß dieses seine Funktion verliert. In den meisten Fällen wird das Zielgen durch die Kopie einer Antibiotikaresistenz unterbrochen (häufig Neomycin), die auch für das folgende Selektionsverfahren notwendig ist. Anschließend wird die präparierte DNA in embryonale Stammzellen transferiert, wo eine Rekombination mit dem homologen Gen des zellulären Genoms erfolgt und das funktionstüchtige Gen durch das funktionslose mutierte Gen ersetzt wird. Der Prozess der homologen Rekombination tritt bei Säugetierzellen jedoch nur relativ selten ein, so daß mittels des eingefügten Selektionsmarkers (Neomycingen) selektiert werden kann.

Bringt man DNA-Fragmente in Zellen ein, so können diese als ganzes Fragment in zufällige chromosomale Bruchstellen eingebaut werden. Bei der homologen Rekombination ist jedoch nur der zentrale Bereich des Zielgens beteiligt. Homologe Rekombinationen lassen sich durch zufällige Insertionen unterscheiden, wenn sich das Gen für die Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase HSV-tk an einem oder beiden Enden des Zielgens befindet. Bei einer zufälligen DNA-Integration bleibt die HSV-tk-Aktivität vorhanden. Dieses Enzym macht Zellen empfindlich gegenüber der antiviralen Substanz Ganciclovir. Bei einer homologen Rekombination des Konstruktes und der chromosomalen DNA kommt es zum Austausch der homologen DNA-Sequenzen, die nicht-homologen HSV-tk-Gene an den Enden des Konstruktes gehen verloren, die Zellen sind unempfindlich gegenüber Ganciclovir.

Wie beschrieben ist diese Methode mit größerem Aufwand bei der Selektion behaftet. Bei *C.elegans* wurde ein ganz unterschiedlicher Ansatz gewählt, um ein Zielgen zu reprimieren. Hierbei ist im Wesentlichen die kurze Regenerationsdauer und die große Anzahl von Nachkommen von Bedeutung. Mutationen werden nicht gezielt durch homologe Rekombination, sondern spontan durch chemische Reagenzien oder UV-Licht auf dem gesamte Genom verteilt erzeugt. In dieser Arbeit wurde die chemische Mutagenisierung mit dem hochtoxischen EMS-Reagenz (Methansulfonicethylester) durchgeführt (Sulston & Hodgkin, 1988), wobei Mutationen mit einer Frequenz von 5×10^{-4} auftreten. Bei durchschnittlich 13% der Mutationen handelt es sich um Deletionsmutationen die sich im weiteren Verlauf detektieren lassen. Um eine Mutation im gewünschten Zielgen zu erreichen, müssen große Mengen an Tieren mutagenisiert werden.

Statistisch müssen daher für eine Mutation im gewünschten Genbereich mind. 1×10^6 Tiere mutagenisiert werden. In dieser Arbeit wurden aus diesem Grund 2 Mutations-DNA-Banken wie unter 4.4.4 beschrieben generiert, mit ca. 2-3 Mil. Tieren auf 192 Proben verteilt.

Die Detektion der Mutationen erfolgt nicht über eine Selektion mit Antibiotika, sondern über einen direkten Nachweis der Mutation auf DNA-Ebene mittels PCR-Reaktionen (4.4.4.1). Geht man davon aus, daß ein Elterntier (P_0) durch die EMS-Behandlung Nachkommen (L_1) mit einer Deletion im Zielgen erhält, so wird diese, soweit die Mutation nicht letal ist oder wesentlich in die Reproduktivität eingreift, auch an die nächste Generation (L_2) weitervererbt. Isoliert man aus einem Teil der Tiere die genomische DNA so kann mittels geeigneter Oligodesoxyribonukleotidpaare, welche das Zielgen abstecken (Abb. 63/1), eine verkürztes Fragment im Gegensatz zum Wildtypgen detektiert werden (Abb. 63/4). Um die Spezifität der Detektion zu erhöhen, werden zwei ineinandergeschachtelte Oligodesoxyribonukleotidpaare verwendet. Einer ersten PCR-Reaktion mit einem äußeren Oligodesoxyribonukleotidpaar (A) wird eine zweite Reaktion mit einem weiter innen liegenden Oligodesoxyribonukleotidpaar (B) angeschlossen, wobei das PCR-Produkt der ersten PCR-Reaktion der zweiten als DNA-Template dient.

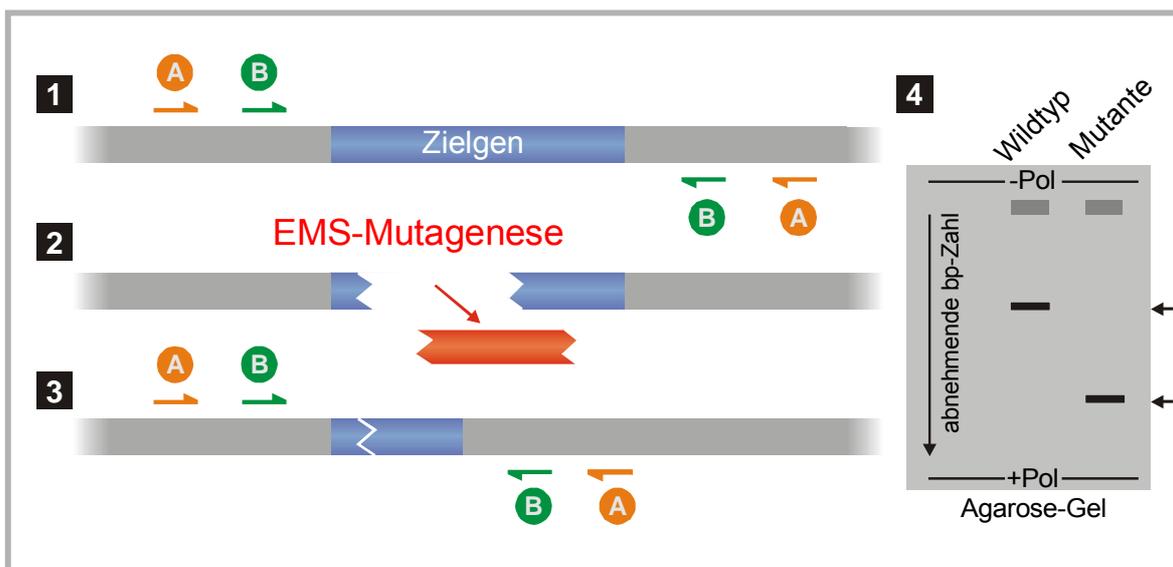


Abb. 63: Durch EMS-Mutagenese werden Deletionen auf dem Genom erzeugt.

- (1) Das Zielgen wird mit zwei äußeren (A) und zwei inneren (B) Oligodesoxyribonukleotidpaaren flankiert.
- (2) Durch die EMS-Mutagenese werden Deletionen im gesamten Genom verursacht.
- (3) Mutationen im Zielgen verursachen eine verkürzte Wildtypbande.
- (4) Schematische Darstellung eines Agarosegels mit Wildtyp- und Mutationsbande.

Um lebende Mutanten zu erhalten werden nur ein Drittel der Nachkommen (L_2) zur DNA-Gewinnung (4.4.4.4) verwendet. Zwei weitere Aliquote werden für weitere Analysen tiefgefroren und können bei Bedarf wieder rekultiviert werden (4.4.1.3). Zeigt eine Probe eine Deletion im Bereich des Zielgens so sind nur wenige Tiere unter mehreren 100.000 Tiere Träger der Mutation. Die äquivalente tiefgefrorene Probe wird rekultiviert und auf mind. 100 neue Kulturplatten (10 cm)

ausgebracht. Die Selektion wird dann fortgesetzt und dieser Vorgang so lange wiederholt, bis einzelne mutagene Tiere identifiziert werden können. Ein Problem bei dieser Methode ist jedoch, daß bei jedem Verdünnungsschritt Tiere mit mutationsbedingter langer Regenerationszeit, oder mit wenigen Nachkommen unterdrückt werden und evt. verloren gehen können. Aus diesem Grund sind derzeit mehrere Laboratorien mit großem personellen Aufwand beschäftigt cDNA-Banken mit geringer Tierzahl/Probe zu generieren.

Für die PCR-Reaktionen wurden die Oligodesoxyribonukleotidpaare CODoutCOS/REVoutCOS (äußere Paare) sowie CODinCOS/REVinCOS (innere Paare) verwendet. Die inneren Oligodesoxyribonukleotidpaare sind ca. 500 bp vor dem Startcodon bzw. 500 bp nach dem Stoppcodon platziert. Die äußeren Oligodesoxyribonukleotidpaare sind weitere 190 bp entfernt. Eine mögliche Mutation ist in einem Bereich von ca. 3300 bp detektiert (genomische DNA von K06H7,4~2300 bp).

Leider konnte mit den von mir erzeugten Mutations-DNA-Banken nur Wildtypbanden, jedoch keine Deletionsmutanten des Gens K06H7.4 identifiziert werden. Auch eine 2. Analyserunde mit dem äußeren Oligodesoxyribonukleotidpaar CODoutCOS2/REVoutCOS2 erbrachte keine Ergebnisse.

In Zusammenarbeit mit der Firma *Elegene* in Martinsried wurde ein zweiter Versuch gestartet mutagene *C.elegans* Tiere zu erhalten. Elegene hat sich darauf spezialisiert „Gen-Knockout“ in *C.elegans* durchzuführen. Die Firma verfügt über eine viel größere DNA-Bibliothek mit derzeit 20 Mil. mutagenisierten Tieren, die aber in der von mir beschriebenen Weise hergestellt wurde.

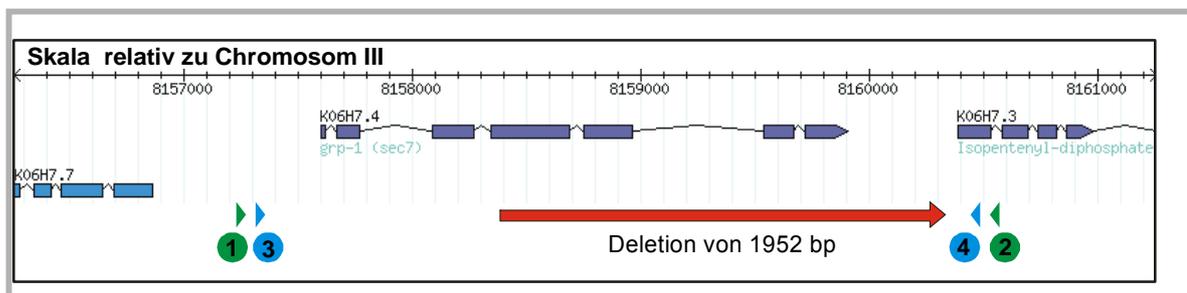


Abb. 64: Schematische Darstellung der durch EMS-Mutation erzeugten Deletion und Position der verwendeten Oligodesoxyribonukleotide.

Für die erste PCR-Reaktion wurden die Oligodesoxyribonukleotide (1) und (2) eingesetzt. Ein zweiter PCR-Ansatz wurde anschließend mit den Oligodesoxyribonukleotide (3) und (4) durchgeführt, um die Spezifität zu erhöhen.

Es wurde eine Deletion von 1952 bp detektiert, die den größten Teil des Proteins K06H7.4 abdeckt.

Elegene konnte aus ihrer Mutations-DNA-Bank eine Mutation von 1952 bp im Gen K06H7.4 detektieren. Zur PCR-Analyse wurden EG 3.1/EG 3.2 als äußere Oligodesoxyribonukleotidpaare, EG 3.3/EG 3.4 als innere Oligodesoxyribonukleotidpaare verwendet. Die Lage der Deletionsmutation ist in Abb. 64 dargestellt und umfaßt ca. 2/3 des Gens K06H7.4.

Heterozygote Tiere zeigten jedoch keinen auffallenden Phänotypen. Durch Kreuzungsexperimente (4.4.2.1) von heterozygoten Männchen mit heterozygoten Hermaphroditen wurde anschließend

versucht homozygote Tiere zu erhalten. Heterozygote Zwittertiere wurden mit Männchen verpaart und die Nachkommen mittels PCR-Reaktionen überprüft.

Bei einer erfolgreichen Auskreuzung sollte nur noch eine Mutationsbande, jedoch keine Wildtypbande mehr detektierbar sein.

Es konnten jedoch keine homozygote Tiere detektiert werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist dies auf die Letalität homozygoter Tiere schon in frühem Stadium zurückzuführen. Das Protein K06h7.4 (*grp-1*) würde somit ein essentielles Protein in einer frühen Phase der Entwicklung von *C.elegans* darstellen.

6 Diskussion

Die Integrin-vermittelte Zelladhäsion stellt ein wichtiges Regularium dar, biologische Funktionen wie Zellentwicklung, Fortbewegung, Blutgerinnung oder die Immunantwort zu steuern (Hynes *et al.*, 1992, 1999). Normalerweise ist die Bindung zwischen Integrinen und Liganden nicht konstitutiv, sondern wird durch bestimmte Aktivierungskaskaden, die z.B. durch (Ko-)Rezeptoren oder Integrine selbst ausgelöst werden können, aktiviert (Woodside *et al.*, 2001). Besonders die Zellen des Immunsystems müssen schnell auf Reize aus dem extrazellulären Milieu reagieren. Sie erkennen Pathogene und müssen effektive Vernichtungsprogramme starten. Um an jeden Infektionsherd im Organismus zu gelangen, benutzen sie das Blut- und lymphatische System. Bei Detektion inflammatorischer Stimuli, wie z.B. Chemokine, können die Immunzellen diese Bahnen verlassen und zu den Infektionsorten im Gewebe migrieren. Besonders interessant erscheint auch die Adhäsionsfunktion der Integrine bei Interaktionen zwischen T-Zellen und APC (antigenpräsentierende Zellen) an immunologischen Synapsen (IS) und der Steuerung von TCR-Antigenbindungen.

Das Integrin LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1; CD11a/CD18) stellt eines der wichtigsten Adhäsionsmoleküle dar und wird nur auf Zellen des Immunsystems exprimiert. LFA-1 vermittelt u.a. die Adhäsion der Leukozyten und Lymphozyten an Endothel- bzw. Epithelzellen, reguliert die temporäre Adhäsion bei der Diapedese von Immunzellen und ist in die Regulation der B-Zell-Antwort, T-Zell-Effektorfunktionen (Dimond & Springer, 1994) sowie in den durch NK-Zellen vermittelten Zelltod involviert (Springer, 1990).

Als aktivierendes Molekül für die LFA-1 vermittelte Zelladhäsion wurde bereits das cytoplasmatische Protein Cytohesin-1 beschrieben (Kolanus *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2001). Cytohesin-1 bindet an den cytoplasmatischen Teil der β_2 -Untereinheit des LFA-1 Heterodimers und dient als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für kleine ARF-GTPasen. ARF-Proteine haben eine wichtige Funktion bei der Bildung zellulärer Transportvesikel (Balch *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 1992; Chardin *et al.*, 1996; Hosaka *et al.*, 1996), der Endozytose (D'Souza-Schorey *et al.*, 1995) und der Aktincytoskelettorganisation während der Zellmigration (Palacois *et al.*, 2001; Santy & Casanova, 2001). Weiterhin spielen sie bei einer von C.Geiger beschriebenen Änderung der Zellmorphologie („cell spreading“), die als initialer Vorgang für die transendotheliale Migration von Lymphozyten nötig ist, eine wichtige Rolle (Geiger *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 2001).

Als Integrin-assoziiertes Molekül wird Cytohesin-1 über seine PH-Domäne an Plasmamembranverankerte Phosphatidyl-inositol-phospholipide (Klarlund *et al.*, 1997; Nagel *et al.*, 1998b; Venkateswarlu *et al.*, 1998b), wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) oder Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) gebunden.

Die Mechanismen die zu einer Auflösung der LFA/Ligand-Bindung führen und inwieweit die Funktion von Cytohesin-1 dabei eine Rolle spielt, war bisher noch völlig ungeklärt.

In dieser Arbeit wird das Polypeptid CYTIP (Cytohesin-Interacting-Protein) beschrieben, welches über eine Proteininteraktionsdomäne (PDZ-Domäne) an die Plasmamembran rekrutiert und mit Cytohesin-1 über eine weitere Protein-Protein-Interaktionsdomäne („coiled-coil“-Domäne) in einem Multiproteinkomplex exprimiert wird. CYTIP wirkt als Inhibitor für Cytohesin-1 und ermöglicht durch reversible Interaktion mit Cytohesin-1 eine schnelle und effektive Regulierung der LFA-1 vermittelten Zelladhäsion.

6.1 Charakterisierung und Expression von CYTIP

Das „Cytohesin-interagierende-Protein“, CYTIP, wurde 1998 von C.Heufler bei einer differentiellen Analyse von maturierten gegen nicht-maturierte dendritischen Zellen (DC) entdeckt. CYTIP wird durch 359 Aminosäuren codiert und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 41 kDa. Um Interaktionspartner von CYTIP zu identifizieren, wurde eine Interaktionsstudie im „Yeast-Two-Hybrid-System“ durchgeführt und sehr spezifisch das cytoplasmatische Protein Cytohesin-1 identifiziert.

Durch Computer-gestützte Sequenzvergleiche konnten zwei Proteininteraktionsdomänen in CYTIP identifiziert werden. Neben einer „coiled-coil-Struktur“, die als Protein-Protein-Interaktionen oder Dimerisierungsdomäne bekannt ist, besitzt CYTIP eine PDZ-Domäne. Diese Peptidstruktur ist schon aus einer Vielzahl von Proteinen bekannt und interagiert mit membranständigen Proteinen, wie Rezeptoren, Kinasen oder GTPasen. Der N-terminale, wie auch der C-terminale Bereich von CYTIP zeigt keine Homologien zu bisher bekannten Proteinen. Auffallend ist nur eine Anhäufung von Serinen im C-terminalen Sequenzabschnitt von CYTIP (vgl. Abb. 18).

Durch Analysen in Sequenzdatenbanken konnte in der Maus ein homologes Protein mit 65% Identität identifiziert werden (Abb. 18). In der Maus, wie auch im humanem System, wurde weiterhin eine Homolog mit ca. 35% Identität identifiziert (Abb. 20). GRASP (GRP-1-associated scaffold protein), in der Literatur (Kitano *et al.*, 2002) auch als Tamalin bezeichnet, ist ein durch Retinolsäure induziertes Gen, welches dominant in Gehirn, aber auch in Herz, Lunge, Niere und in den Ovarien exprimiert wird. Erstmalig entdeckt wurde GRASP in P19 embryonalen Krebszellen (Nevrivey *et al.*, 2000). Retinolsäure initiiert wichtige Prozesse bei der Entwicklung von Vertebraten, wie das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Homöostase. GRASP, mit 385 Aminosäuren um 26 Aminosäureeinheiten länger als CYTIP, besitzt wie auch CYTIP, eine PDZ- und eine „coiled-coil“-Domäne im zentralen Sequenzbereich. Im Gegensatz zu CYTIP fällt im N-terminalen Sequenzabschnitt eine Alanin-reiche Sequenz sowie eine Prolin- und eine Glycin-reiche Sequenz im C-terminalen Bereich auf. Am C-terminalen Ende besitzt GRASP im Gegensatz zu CYTIP ein PDZ-Bindungsmotif (SQL). Weiterhin wurden in GRASP eine mögliche Src

Bindungsstelle (PXXP) in der Alanin-reichen Sequenz sowie vier YXXL Motive die der Clathrin-vermittelten Endozytose (Ohno *et al.*, 1995; Mellman, 1996; Heilker *et al.*, 1999) involviert sind, identifiziert.

Experimente von Kitano *et al.* (2002) zeigten, daß GRASP für die Komplexformierung von Cytohesin-2 und dem Glutamatrezeptor mGluR (group 1 metabotropic glutamate receptor) in synaptischen Membranfraktionen verantwortlich ist und bei der molekularen Organisation der mGluRs an den Synapsen eine Rolle spielt.

Wie sich im Verlauf der Arbeit gezeigt hat stellt GRASP, wie auch CYTIP, eine neue Gruppe von Cytohesin-bindenden Adaptermolekülen dar, die über ihre konservierten Proteininteraktionsdomänen („coiled-coil“, PDZ) Membran-assoziierte Multiproteinkomplexe ausbilden können, sich aber durch verschiedene funktionale Gruppen unterscheiden. Auf diese Weise können die Funktionseinheiten eines Multiproteinkomplexes in unterschiedliche Zellkompartimente dirigiert werden oder einzelne Einheiten für spezifische Aufgaben ausgetauscht werden.

Analog zu Cytohesin-1 (Kolanus *et al.*, 1996) wird CYTIP primär in Zellen des Immunsystems exprimiert. CYTIP wurde stark in der Niere, Lymphknoten und in PBL-Zellen, schwach im Thymus und im Knochenmark nachgewiesen. In Totalzelllysaten konnte CYTIP direkt aus 721-Zellen, PBMCs, nicht jedoch aus Jurkat E6-Zellen nachgewiesen werden. Erst durch Koimmunpräzipitation von Cytohesin-1 und CYTIP konnte CYTIP auch in geringen Mengen in Jurkat E6-Zellen detektiert werden.

Die Expression von CYTIP ist in dendritischen Zellen nicht konstitutiv, sondern wird während der Reifung der Zellen reguliert. In maturierten dendritischen Zellen wird CYTIP, wie auch Cytohesin-1, um das 5-10-fache mehr exprimiert als in nicht-maturierten Zellen. Dieses Ergebnis konnte durch Messung der mRNA-Menge und direkt durch Detektion der Proteine *in vivo* verifiziert werden (Abb. 16/Abb. 24/Abb. 25). Eine Überexpression von adhäsionsregulierenden Proteinen während der Maturierung von dendritischen Zellen ist ohne Frage sehr sinnvoll. Dendritische Zellen müssen durch Gewebe und das lymphatische System wandern, um sich in den Lymphknoten festzusetzen und ihr Antigen den T-Zellen zu präsentieren. Hierbei müssen Zell/Zell- und Zell/Matrix-Interaktionen gebildet und wieder gelöst werden können.

Auch von Tang *et al.* (2002) wurde CYTIP, in dieser Veröffentlichung als Cybr bezeichnet, in hämatopoetischen Geweben entdeckt. Verstärkt exprimiert wurde CYTIP durch Inkubation von PBMCs mit den Cytokinen IL-2 und IL-12. Cytokine regulieren Immunzellen in allen Phasen ihrer Entwicklung, Differenzierung und Aktivierung (Gadina *et al.*, 2001). Während IL-2 für die Kontrolle und das Aufrechterhalten des Gleichgewichts des Immunsystems notwendig ist, wird IL-12 für die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup>-T Zellen zu Th1-Zellen benötigt. Welchen Einfluß CYTIP bei der Differenzierung und Entwicklung von Lymphozyten spielt, ist jedoch noch völlig unklar.

6.2 Interaktion von CYTIP mit Cytohesin-1 über eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne

Um die Interaktion zwischen CYTIP und Cytohesin-1 zu verstehen, wurden die Domänen der Proteine in verschiedenen molekularbiologischen Ansätzen untersucht.

Während die PH-Domäne von Cytohesin-1 für die Membranrekrutierung des Moleküls über Lipid-assoziierte Phosphoinositide verantwortlich ist, stellt die SEC7-Domäne einen intrazellulären Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor dar. Neben der enzymatischen Aktivität bindet die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 direkt an die β -Kette von LFA-1 (Geiger *et al.*, 2000). Der N-terminalen „coiled-coil“-Struktur konnte bisher noch keine Funktion in Cytohesin-1 zugeordnet werden. Als Protein-Protein-Interaktionsdomäne käme eine Dimerisierung oder Multimerisierung mehrerer Cytohesin-Moleküle in Frage. H.Dierks (Labor Kolanus) konnte durch Experimente belegen, daß Cytohesin-1 keine Multimere bildet (persönliche Mitteilung), sondern möglicher Weise mit einem weiteren Protein interagiert.

CYTIP kennzeichnen zwei Protein-Interaktionsdomänen, eine zentrale „coiled-coil“-Domäne und eine PDZ-Domäne. PDZ-Domänen binden meist über ihre Bindungstasche an cytoplasmatische Domänen von Oberflächenrezeptoren, aber auch an Lipasen, Kinasen oder sonstige Signalproteine. Die Konsensussequenz die für eine Bindung an PDZ-Domänen nötig ist wurde bereits bei vielen Proteinen bestimmt und in drei Klassen eingeteilt (vgl. Tab. 8). Cytohesin-1 fällt aufgrund seiner abweichenden C-terminalen Sequenz theoretisch als Binder für PDZ-Domänen aus, nicht jedoch als Binder für die „coiled-coil“-Domäne. Zur Analyse der Bindungselemente wurde eine Interaktionsanalyse in Hefe durchgeführt. Verschiedene Proteinfragmente bzw. Domänen von CYTIP und Cytohesin-1 wurden im Hefe-System gegeneinander ausgetestet. Die Ergebnisse weisen deutlich auf eine Interaktion von CYTIP und Cytohesin-1 über ihre jeweiligen „coiled-coil“-Domänen hin (Abb. 21).

In weiterführenden Analysen im Hefe-System (vgl. Abb. 23) konnte gezeigt werden, daß neben Cytohesin-1 die Cytohesin-Homologe Cytohesin-2 und Cytohesin-3 in der Lage sind mit CYTIP zu interagieren. Dies war nicht zwingend ableitbar, da sich die Cytohesin-Homologe in der „coiled-coil“-Region doch bis zu 35% in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Das jüngste Mitglied der Cytohesin-Familie, Cytohesin-4, stand während der Durchführung dieser Experimente noch nicht zur Verfügung. Aufgrund der relativ hohen Homologien der Cytohesin-Moleküle (vgl. Abb. 22) ist eine Interaktion zwischen CYTIP und Cytohesin-4 aber als sehr wahrscheinlich zu erachten.

Um die Interaktion zwischen Cytohesin und CYTIP auch mit molekularbiologischen Methoden zu untersuchen wurden Koimmunpräzipitationsexperimente mit überexprimierten Proteinen in humanen Zellen durchgeführt. In diesen Ansätzen konnte, ebenso wie im Hefe-System, eine Bindung von CYTIP mit allen drei Cytohesin-Homologen bestätigt werden, wobei Cytohesin-3 eine etwas geringere Interaktion (Abb. 25) zeigte. Wurde eine „coiled-coil“-Deletionsmutante von CYTIP (Ig-CYTIP Δ cc) in das Koimmunpräzipitationsexperiment eingesetzt konnte keine Interaktion

zwischen CYTIP und Cytohesin-1 nachgewiesen werden (Boehm *et al.*, 2003). Dies stellt einen weiteren klaren Beweis für eine Interaktion zwischen CYTIP und Cytohesin über die jeweiligen „coiled-coil“-Domänen dar. Durch Generierung CYTIP-spezifischer monoklonaler Antikörper konnte schließlich eine Interaktion von endogenem Cytohesin-1 und endogenem CYTIP in verschiedenen Zelltypen, wie Jurkat E6-Zellen, 721-Zellen oder PBMCs direkt gezeigt werden (vgl. Abb. 26).

Ob wirklich alle Cytohesin-Homologe *in vivo* Interaktionspartner für CYTIP darstellen, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Die Spezifität einer Proteininteraktion ist oft zellspezifisch. Werden mehrere Proteinhomologe in einem Zelltyp exprimiert, kann eine Interaktion auch auf bestimmte Zellkompartimente beschränkt sein, oder wird durch die Expressionsmenge der Komponenten reguliert. Auf mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, daß während der Maturierung von dendritischen Zellen CYTIP und Cytohesin-1, nicht jedoch Cytohesin-2 und Cytohesin-3 exprimiert werden (Abb. 16 & Boehm *et al.*, 2003). Dies lässt auf eine spezifische Interaktion zwischen Cytohesin-1 und CYTIP, jedenfalls in dendritischen Zellen, schließen.

Bei dem CYTIP-verwandten Molekül GRASP konnte nach der Differenzierung von P19 EC Zellen mRNA in großen Mengen von Cytohesin-2, in geringen Mengen von Cytohesin-3 und keine mRNA von Cytohesin-1 detektiert werden (Nevrivy *et al.*, 2000). Weitere Experimente konnten eine stabile Komplexbildung zwischen mGluR1, Cytohesin-2 und GRASP in Hirngewebe belegen. Auch diese Daten unterstützen die Vermutung einer Steuerung der Interaktionsspezifität durch zellspezifische Expression von CYTIP bzw. homologen Proteinen und einem Cytohesin-Homolog.

6.3 *In vivo* Lokalisation von CYTIP in Jurkat E6-Zellen

6.3.1 Lokalisation von überexprimiertem CYTIP

Nach der Ermittlung der Interaktionsdomänen zwischen CYTIP und Cytohesin-1 war anschließend besonders die Lokalisation von CYTIP *in vivo* von großem Interesse. Cytohesin-1 wird als cytoplasmatisch exprimiertes Protein beschrieben (Kolanus *et al.*, 1996). Eine Überexpression von Cytohesin-1 in Jurkat E6-Zellen führt zu einer Aktivierung der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion durch Rekrutierung des Proteins an die Plasmamembran. Nachfolgende Studien zeigten, daß die Membranassoziation von Cytohesin-1 über die C-terminal lokalisierte PH-Domäne und die anschließende polybasische Region durch Bindung an membranständiges Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat, einem Produkt der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase), reguliert wird (Nagel *et al.*, 1998 a, b; Venkateswaru *et al.*, 1999). Neben der Überexpression von Cytohesin konnte durch Zell-Stimulationsexperimente mit EGF, NGF oder Insulin, Faktoren welche die PI3-Kinase aktivieren, eine Translokation von Cytohesin-1, -2 oder -3 an die Plasmamembran festgestellt werden (Venkateswaru *et al.*, 1998, 1999).

Erste Überexpressionsexperimente von Ig-CYTIP in Jurkat E6-Zellen, die auf unspezifischen Untergründen wie z.B. poly-L-Lysin zur Adhäsion gebracht wurden, zeigten ein fast ausschließlich cytoplasmatisches Expressionsmuster. In einer geringen Zahl von Zellen (1-5%) konnten auch Kompartimente im Zellkern und im Golgi-Apparat detektiert werden.

6.3.2 Zellkernlokalisierung von CYTIP

Wurden Jurkat E6-Zellen mit Ig-CYTIP transfiziert, so waren in 1-5% der Zellen Anfärbungen im Zellkern nachweisbar. Die Translokation eines Proteins in den Zellkern kann auf die Regulation einer Genexpression oder der Zellproliferation hindeuten. Bei der Regulation des Zellwachstums setzen aktivierende Proteine an bestimmten Punkten im Zellzyklus an und können meist nur in diesen Zellzyklusphasen detektiert werden. Bei Zellen die in Kultur gehalten werden sind alle Stadien des Zellwachstums vertreten. Phasen-spezifische Proteine sind aus diesem Grund nur in einer gewissen Anzahl im Zellpool nachweisbar. Durch Synchronisation des Zellwachstums durch einen Aphidicolin-Thymidin-Doppelblock lassen sich Proliferationseffekte besser studieren. Eine Anreicherung von überexprimiertem Ig-CYTIP im Zellkern konnte nach Synchronisation des Zellwachstums in keiner Zellzyklusphase beobachtet werden (5.16.1.2). CYTIP scheint aufgrund der durchgeführten Experimente nicht direkt an der Zellteilungssteuerung beteiligt sein.

Bisher gibt es aber auch keine Hinweise dafür, daß CYTIP als genregulatorisches Protein oder als Transportprotein für andere Proteine vom Cytosol in den Zellkern fungieren könnte. Weiterhin sind keine Signale bekannt, die eine Translokation von CYTIP in den Zellkern auslösen.

Nicht auszuschließen sind jedoch auch Lokalisierungsartefakte aufgrund der hohen Proteindichte in Zellen mit überexprimierten Ig-CYTIP. Leider waren die generierten CYTIP-spezifischen Antikörper für den Nachweis von endogenem CYTIP mittels der Immunfluoreszenz nicht geeignet, so daß die Lokalisation von endogenem CYTIP nicht *in vivo* detektiert werden konnte.

6.3.3 Die PDZ-Domäne ist für die Translokation von CYTIP an die Plasmamembran notwendig

Überexprimiert man Ig-CYTIP in Jurkat E6-Zellen und lässt diese nicht auf unspezifischen Liganden wie poly-L-Lysin, sondern auf den Integrinliganden Fibronectin, ICAM oder VCAM adhären, so kann interessanter Weise eine Plasmamembranlokalisierung von Ig-CYTIP detektiert werden. Die Assoziation von Ig-CYTIP an die Plasmamembran wird folglich in transfizierten Jurkat Zellen-E6 durch Bindung des Integrins an seinen Liganden induziert. In einem nächsten Schritt wurde untersucht über welche Domäne die Membranlokalisierung von CYTIP vermittelt wird. Hierbei schien die PDZ-Domäne von besonderer Bedeutung. Sie stellt eine modulare Protein-Protein-

Interaktionsdomäne zur Komplexbildung von Signalkomponenten an Zellmembranen dar (Sheng & Sala, 2001) und ist in einer Vielzahl von Proteinen (PSD-95, DLG) bereits beschrieben worden. Oft interagieren PDZ-Domänen mit Membranrezeptoren und bilden Komplexe mit cytoplasmatischen Proteinen.

Durch Punktmutationen wurde die Bindungstasche der PDZ-Domäne von CYTIP derart verändert, daß eine Interaktion mit seinem bisher noch nicht identifizierten membranständigen Liganden verhindert wurde. Aufgrund der bereits bekannten dreidimensionalen Struktur der Bindungstasche (GLGF-Motif) von PDZ-Domänen anderer Proteine, konnten gezielt die Aminosäuren ausgetauscht werden, welche für die Bindungsspezifität und Ausbildung der korrekten Sekundärstruktur nötig sind (5.9.3). Interessanter Weise zeigten alle generierten Einzelpunktmutanten (Ig-CYTIP 82, Ig-CYTIP 90, Ig-CYTIP 92) und die Dreifachpunktmutante Ig-CYTIP 82/90/92 keine Membranlokalisation mehr, wenn transfizierte Jurkat E6-Zellen auf Integrinliganden (ICAM, VCAM, Fibronectin) adhären (5.9.4).

Theoretisch könnte die Relokalisation der Ig-CYTIP-Mutanten in das Cytoplasma durch endogenes Cytohesin-1 vermittelt werden. Dies würde neben einer Interaktion der beiden Interaktionspartner über die jeweiligen „coiled-coil“-Domänen auch auf eine direkt Interaktion zwischen Cytohesin-1 und der PDZ-Domäne von CYTIP hinweisen. Um diese Interaktion auszuschließen, konnte in Koimmunpräzipitationsexperimenten schließlich gezeigt werden, daß Ig-CYTIP, wie auch die Trippelmutante Ig-CYTIP 82/90/92, mit identischer Menge an endogenem Cytohesin-1 bindet (Abb. 34). Die Rekrutierung von CYTIP an die Plasmamembran ist folglich über die PDZ-Domäne von CYTIP vermittelt, wahrscheinlich durch einen bisher noch nicht identifizierten Membran-assoziierten Liganden.

Bekräftigt wurde diese Vermutung auch durch Lokalisationsstudien von Nevriy *et al.* (2000) mit dem Struktur-verwandten Protein GRASP in transfizierten HEK293-Zellen. Ein mit Myc-Epitop versehenes GRASP-Fusionsprotein wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mittels konfokaler Lasermikroskopie an der Plasmamembran der Zellen visualisiert. Eine Mutante deren PDZ-Domäne deletiert wurde, zeigte hingegen keine Plasmamembranassoziation aber Expression in vesikulären Strukturen diffus im Cytoplasma verteilt. Auch diese Experiment zeigt deutlich, daß die PDZ-Domäne ausschlaggebend für die Membranlokalisation von Adaptermolekülen der CYTIP bzw. CYTIP-ähnlichen Familie ist.

Stellt CYTIP aufgrund dieser Ergebnisse ein Transportmolekül dar, welches Cytohesin-1 nach Integrinstimulation an die Membran rekrutiert?

Wurden Jurkat E6-Zellen mit den Fusionsproteinen GFP-Cytohesin-1 und Ig-CYTIP kotransfiziert und auf Integrin-beschichteten Unterlagen zur Adhäsion gebracht (Abb. 36), konnte eine starke Kolokalisation der beiden Proteine an der Plasmamembran beobachtet werden.

Weiterführende Kolokalisationsexperimente von Nevriy *et al.* (2000) zeigten, daß GRASP für eine Stabilisierung von GRP1 an der Plasmamembran sorgt. Wurde nur GRP1 in HEK293-Zellen überexprimiert, so ist ein diffuses cytoplasmatisches Expressionsmuster mit geringer Lokalisation

an der Plasmamembran detektierbar. Bei Überexpression von GRASP und GRP1 kolokalisierten beide Proteine primär an der Plasmamembran.

Andererseits wurde für die Cytohesin-Familie ein PI3-Kinase abhängiger Weg zur Membranrekrutierung aufgedeckt. Wie bereits in der Literatur (Venkateswarlu *et al.*, 1998b; Nagel *et al.*, 1998a) beschrieben wird Cytohesin-1 über die PH-Domäne an die Membran-verankerte Lipide Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) oder Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>), einem *in vivo* Produkt der Phosphatidylinositol (3)-Kinase (PI3-K) gebunden.

Aufgrund der starken Assoziation zwischen Cytohesin-1 und CYTIP über ihre jeweiligen „coiled-coil“-Domänen ist denkbar, daß ein Cytohesin-1/CYTIP-Komplex über die PH-Domäne vermittelt an Membran-verankerte Lipide bindet.

Genau diesen Fall, die Translokation von CYTIP durch Cytohesin-1 beschreibt Mansour *et al.* (2002) in seiner Veröffentlichung. Pohajdak und Mitarbeiter identifizierten 2002 (Mansour *et al.*, 2002) CYTIP (In dieser Arbeit als CASP bezeichnet) in einer B-Zell-Bibliothek durch ein „Yeast Two-Hybrid“-Analyse, mit der „coiled-coil“-Domäne von Cytohesin-1 als „bait“. Durch Überexpression von Cytohesin-1 in COS7-Zellen und Stimulation mit EGF (epithelial growth factor, ein lösliches Peptidhormon, das die Teilung von Haut- und Bindegewebszellen stimuliert) wird Cytohesin-1 durch Bindung der PH-Domäne an Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat an die Plasmamembran assoziiert. Überexprimiert man CYTIP und stimuliert die Zellen mit EGF kann kein Membranexpression detektiert werden. Bei Überexpression beider Proteine ohne Stimulation wurden die Proteine primär cytoplasmatisch detektiert. Nach Stimulation mit EGF translokalisieren beide Proteine an die Plasmamembran. Wurde statt Wildtyp CYTIP eine „coiled-coil“-Deletionsmutante von CYTIP eingesetzt, konnte nur Cytohesin-1, nicht jedoch CYTIP, an der Plasmamembran detektiert werden.

Wie lassen sich nun diese beiden Rekrutierungswege miteinander vereinbaren?

Ein Möglichkeit besteht darin, daß beide Proteine auf getrennten autarken Wegen an die Membran rekrutiert werden. Cytohesin-1 über seine PH-Domäne in PI 3-Kinase abhängiger Weise, CYTIP durch Integrin-abhängige Assoziation mit Membran-assozierten Liganden. Erst an der Plasmamembran findet eine Komplexbildung zwischen Cytohesin-1 und CYTIP statt. Gegen diese Theorie spricht aber die hohe Affinität (fast 100%-ige Konjugation) der beiden Proteine in den durchgeführten Koimmunpräzipitationsstudien und auch die Ergebnisse von Mansour (2002).

Geht man von einer frühen Komplexbildung der Proteine z.B. im Cytoplasma aus, so kann die Translokation des Proteinkomplexes über Cytohesin-1 oder auch über CYTIP initiiert werden, d.h. die Translokation kann über mind. zwei Signalwege gesteuert werden. Es ist anzunehmen, daß beide Wege sich ergänzen bzw. verstärken und für eine effektive Translokation und (Ko-) Rezeptorassoziation an der Plasmamembran sorgen.

6.3.4 Golgi-Expression von CYTIP

In einer Vielzahl von Jurkat E6-Zellen die mit Ig-CYTIP transfiziert wurden, konnte eine Anfärbung von perinuklearen Kompartimenten und vesikulären Strukturen sichtbar gemacht werden. Das Auftreten der Anfärbungen war weitgehend unabhängig vom Adhäsionszustand und Adhäsionsuntergrund der Zellen. Aufgrund fehlender Marker im Labor war eine Klassifizierung der Kompartimente nicht mit absoluter Sicherheit möglich. Aufgrund der Lage der Anfärbungen schließe ich auf Regionen des Golgi-Apparats bzw. auf Golgi- und/oder Transportvesikel.

Mansour *et al.* (2002) konnte diese beschriebenen perinukleären Anfärbungen ebenfalls in intrazellulären Lokalisationsstudien von CYTIP (CASP) in COS7-Zellen zeigen. Kolo-kalisationsexperimente mit dem ER-Marker GRP78 oder den Golgi-Markern Mannosidase II bzw. Giantin zeigten keine Überlagerung. Mit dem ER/Golgi-Marker ERGIC-53, der Strukturen im ER/Golgi-Übergangsbereich markiert, konnte jedoch eine partielle Überlappung festgestellt werden. Durch Inkubation mit Brefeldin A (BFA) wurde CYTIP in röhrenförmige Strukturen umgelagert. Auch ERGIC-53 lagerte sich in ähnliche Strukturen um, die aber nicht identisch mit den von CYTIP sind. Brefeldin A (BFA), ein Stoffwechselprodukt aus Pilzen, inhibiert die GDP-GTP-Austauschaktivität gegenüber unterschiedlichen ARF-Proteinen, indem es an den GEF-GDP-ARF-Komplex bindet (Peyroche *et al.*, 1999) und die Golgi-Membranintegration von ARF-Proteinen über dessen N-terminalen Myristoylrest (Goldberg, 1998) vermindert bzw. verhindert. Folglich wird der Prozess der Vesikelbildung unterbrochen und der Golgi-Komplex bildet sich zurück.

Mansour und Kollegen nehmen an, daß CYTIP in einem dynamischen Kompartiment lokalisiert ist, welches zwischen dem Golgi-Apparat und vesikuläre Golgi-Strukturen interagiert.

Arbeiten von Franco *et al.* (1999), Lee *et al.* (2000) und Lee & Pohajdak (2000) konnten bei Überexpression der Cytohesin-Homologen sowie bei der Detektion endogener Cytohesin-Proteine ebenfalls eine Golgi-Lokalisation der Cytohesin-Homologe in COS7- und Jurkat E6-Zellen feststellen. Diese perinukleare Expressionsregion kolo-kalisierte partiell mit den Golgi-Markern Giantin, ERGIC-53 und TGN46 sowie mit dem Hüllprotein β -COP, nicht jedoch mit dem ER-Marker (GRP78) oder Endosom/Lysosom-Marker (LAMP1, Clathrin).

Die Überexpression von Cytohesin-1 (Lee & Pohajdak, 2000), Cytohesin-2 (Monier *et al.*, 1998) oder Cytohesin-3 (Franco *et al.*, 1998) führt zu einer Ausbreitung/Fragmentierung des Golgi-Apparats und ist somit direkt mit einer Golgi-Funktion assoziiert. Auch die Golgi-assozierten Marker ERGIC-53, Giantin und TGN46 zeigten eine ausgebreitetes Expressionsmuster im Gegensatz zu nicht-transfizierten Zellen. Die BFA-Behandlung transfizierter und nicht-transfizierter Zellen führte in ähnlicher Weise wie bei CYTIP (Mansour *et al.*, 2002) zu einer Umlagerung der Golgi-Struktur und Relokalisation von Cytohesin in cytoplasmatische Vesikelstrukturen, während die Golgi-assozierten Marker ERGIC-53 und Giantin ein anderes Muster zeigen und eher einer ER-Lokalisation gleichen. Interessanter Weise gehören auch die Cytohesin-Homologe zur Gruppe der BFA-resistenten Sec7-Proteine (Chardin *et al.*, 1996; Meacci *et al.*, 1997), während eine Gruppe größerer Sec7-Moleküle (p200, Gea1, Gea2) zu den BFA-sensitiven Proteinen gehören.

Die Lokalisation von Cytohesin ist dabei abhängig von der N-terminal lokalisierten „coiled-coil“ Domäne (Lee & Pohajdak, 2000), was darauf schließen lässt, daß Cytohesin durch CYTIP vermittelt in die Golgi-Strukturen translokalisiert wird. Deletionskonstrukte von Cytohesin-1 (Sec7-Domäne, PH-Domäne, Sec7+PH) zeigten keinerlei Assoziation mit dem Golgi-Komplex, die Golgi-Lokalisation von Cytohesin-1 ist folglich unabhängig von der PH-Domäne.

Entsprechende Ergebnisse wurden auch für Cytohesin-2 und Cytohesin-3 (Levine & Munro, 1998; Venkateswarlu *et al.*, 1998 a,b, 1999) gezeigt.

Aufgrund der dargelegten Daten stellt sich die Frage nach dem funktionalen Hintergrund einer Komplexbildung zwischen CYTIP und Cytohesin in Golgi-Strukturen?

Interessanter Weise gehören die Proteine der Cytohesin-Familie zur Gruppe der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren, die über ihre SEC7-Domäne den GDP/GTP-Austausch kleiner ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF), einer Familie kleiner GTPasen der RAS-Familie, regulieren.

Die Spezifität der Cytohesin-Homologe zu den einzelnen ARFs wird primär über die SEC7-Domäne vermittelt. Die SEC7-Domäne hat eine hohe Homologie zum Genprodukt Sec7p aus *S. cerevisiae* und ist in der Hefe für den Vesikeltransport im Golgi-Apparat notwendig (Franzoso & Schenkman, 1989). Alle Cytohesin-Mitglieder können ARF1 aktivieren (Franco *et al.*, 1998; Ogasawara *et al.*, 2000), wobei ARF6 nur von Cytohesin-1, -2 und -3 aktiviert werden kann (Ogasawara *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 1998a; Langille *et al.*, 1999). Cytohesin-1 und Cytohesin-4 können weiterhin ARF5 und nur Cytohesin-1 kann ARF3 aktivieren (Meacci *et al.*, 1997; Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1988).

Die ARF-GTPasen wurden in drei Gruppen, basierend auf ihre Genstruktur eingeteilt. Klasse-I-ARF-Proteine (ARF1-3) definieren Golgi-assoziierte GTPasen und regulieren Vesikelbildungsprozesse (Hosaka *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 1992). Wenig ist bisher über die Klasse-II-ARFs (ARF4, ARF5) bekannt, außer daß ARF5 evt. im Brefeldin A (BFA)-resistenten Golgi/ER retrograden Transport involviert ist (Claude *et al.*, 1999). ARF6, der einzige Vertreter der Klasse-III-ARFs assoziiert mit der Zellmembran und ist an der Endozytose und der Aktincytoskelettformierung beteiligt (D'Souza Schorey *et al.*, 1995; Schafer *et al.*, 2000; Radhakrishna *et al.*, 1999).

Die Studie der ARF-Funktion hat sich in den letzten Jahren primär auf die ER- und Golgi-Region fokussiert, wo verschiedene anterograde und retrograde Vesikeltransportmechanismen vorhanden sind. Alle Vesikelarten transportieren Proteine zwischen bestimmten Organellen. So sind z.B. Vesikel mit einer Clathrinhülle für den Transport von der Plasmamembran und vom *trans*-Golgi-Netzwerk zu den späteren Endosomen verantwortlich (Drake *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 1998). Andere Vesikel besitzen eine Hülle aus dem Protein COP-II (COP-II Vesikel) und befördern Proteine vom rauen ER zum Golgi-Apparat. Für den retrograden Transport zwischen den einzelnen Golgi-Zisternen und vom *cis*-Golgi-Apparat zum ER werden hingegen Transportvesikel mit dem Hüllprotein COP-I (COP-I Vesikel) verwendet (Allan & Balch, 1999). Zudem wurden Transportvesikel zwischen den späten Endosomen und den Lysosomen, kontinuierlich

sekretorische Vesikel und Vesikel die Proteine vom *trans*-Golgi-Kompartiment zur Zelloberfläche befördern beschrieben. Die Hüllproteine dieser Transportvesikel konnten jedoch bisher noch nicht identifiziert werden.

Für die Vesikelbildung sind verschiedene Adaptermoleküle, die Komplexe aus Membranproteinen, Hüllproteinen und löslichen Proteinen bilden sowie kleine GTP-bindende Proteine notwendig. Für die Clathrin- und COP-I-Vesikel ist bereits ARF1 als GTP-bindendes Protein identifiziert worden. Für COP-II Vesikel wird die GTPase Sar1 impliziert (Aridor *et al.*, 1998, 2001).

Aufgrund der bisher beschriebenen Ergebnisse und Erkenntnisse kann man sich für die Golgi-Assoziation von Cytohesin-1 und CYTIP folgendes Modell vorstellen.

Aufgrund der hohen Affinität zwischen Cytohesin-1 und CYTIP und seiner Domänenstruktur (PDZ-Domäne) dient CYTIP mit hoher Wahrscheinlichkeit als Adaptermolekül und bindet einen bisher noch nicht definierten (Ko-)Rezeptor oder Transmembranprotein (z.B. Integrin) und Cytohesin an die Transportmaschinerie. Cytohesin steuert hierbei über eine Guanin-Nukleotid-Austauschreaktion an z.B. einem ARF-Protein die Vesikelbildung. Über weitere Signale, die z.B. Integrin- und/oder PI 3-Kinase vermittelt sein können, wird der Komplex an die Plasmamembran rekrutiert. Welche weiteren Adapterproteine und/oder Hüllproteine dabei involviert sind ist derzeit noch unklar.

Für GRASP (Tamalin) konnte bereits eine starke Assoziation zwischen GRASP, Cytohesin-2 und einem Glutamaterezeptor (mGluR, group1 metabotropic glutamate receptor) nachgewiesen werden (Kitano *et al.*, 2002). Ohne GRASP-Expression war keine direkte Bindung zwischen Cytohesin-2 und dem mGluR detektierbar, was eine Adapterfunktion von GRASP bekräftigt. Durch Überexpression der drei Proteine (mGluR/GRASP/Cytohesin-2) konnte die Plasmamembranassoziation des mGluRs weiter verstärkt werden. Auch Kitano postulierte, daß GRASP als Schlüsselement das ARF-GEF-Molekül an die intrazelluläre Transportmaschinerie koppelt und den Transport von, in diesem Fall dem mGluR, reguliert. Bisher wurde in der Literatur zwar noch keine Golgi-Lokalisation von GRASP beschrieben, der Transportmechanismus des Komplexes an die Plasmamembran ist jedoch noch nicht geklärt, könnte aber ähnlich wie bei CYTIP verlaufen.

Eine interessante Parallelität einer Golgi-Plasmamembran-Translokation wird im Fall der *frizzled*-Homologe beschrieben (Yao *et al.*, 2001). Die Genprodukte von *frizzled* stellen Transmembranproteine dar, die mit dem Protein Wnt interagieren und bei der Ausbildung von planaren Polaritäten in Zellen eine Rolle spielen. *Frizzled* interagiert mit einem Protein, GOPC, das ähnlich zu CYTIP oder GRASP eine PDZ-Domäne, jedoch zwei „coiled-coil“-Motife trägt. Überexprimiertes *frizzled* ist als Transmembranrezeptor an der Plasmamembran lokalisiert, während überexprimiertes GOPC, ähnlich wie CYTIP, im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Werden jedoch beide Proteine in COS7-Zellen überexprimiert, kolokalisieren *frizzled* und GOPC 8 h nach der Transfektion im Golgi. Nach 20 h sind beide Proteine an die Plasmamembran translokalisiert, was auf einen sekretorischen Transport der Proteine hinweist. Die These wird noch dadurch unterstützt, daß *frizzled* nach 20 h nicht an der Membran detektiert werden kann, wenn die Probe mit BFA inkubiert worden war und somit eine Vesikelbildung unterbunden wurde.

Bei den in Kapitel 5.11 durchgeführten Experimenten konnte nach Überexpression von CYTIP und Cytohesin-1 in Jurkat E6-Zellen nur eine starke Lokalisation an der Plasmamembran, nicht jedoch in Golgi-Kompartimenten detektiert werden. Bezieht man die Experimente von Yao *et al.* (2001) mit in die Überlegung ein und geht bei dem Cytohesin-1/CYTIP-Komplex von einem ähnlichen Transportmechanismus wie bei *frizzled*/GOPC aus, wird deutlich, daß eine Golgi-Lokalisation von Cytohesin-1 und CYTIP nach 24 h Expressionszeit nicht mehr nachweisbar ist, da der Komplex bereits vollständig an die Plasmamembran translokalisiert ist.

Doch welche Transportvesikel verwendet der Cytohesin/CYTIP-Komplex bzw. welche Vesikel werden durch den Komplex vermittelt gebildet?

Wie in der Literatur (Franco *et al.*, 1998; Meacci *et al.*, 1997; Ogasawara *et al.*, 2000) beschrieben, aktivieren die Cytohesin-Moleküle kleine GTPasen der Ras-Familie, jedoch nicht die etwas ferner verwandten Rho-GTPasen (RhoA, Rac; CDC42Hs). Der interessanteste Kandidat stellt das von allen Cytohesin-GEFs aktivierte ARF1 dar, welches mit der Golgi-Membran assoziiert (Peters *et al.*, 1995). Die Überexpression von Wildtyp-ARF1 hat keinen Effekt auf die Golgi-Morphologie. Es ist anzunehmen, daß ARF1 kein limitierendes Element bei der Vesikelbildung darstellt (Zang *et al.*, 1994). Die Überexpression von ARF1Q71L, eine Mutante deren gebundenes GTP nicht hydrolysiert werden kann, führt wie die Überexpression von Cytohesin zu einer Golgi-Fragmentierung/Ausbreitung und Bildung vesikulärer Strukturen, wahrscheinlich durch Inhibierung der Abspaltung der Mantelproteine bzw. Verhinderung der Vesikelfusion mit einer Zielmembran (Tanigawa *et al.*, 1993). Hinzukommend wird durch ARF1Q71L+GTP *in vitro* die Assoziation des Hüllproteins β -COP (Teal *et al.*, 1994) an die Membran verstärkt. Auch eine Überexpression der Cytohesin-Homologe führt zur Einlagerung von β -COP und anderen im Golgi exprimierten Proteinen, wie Giantin oder p23 in große vesikuläre Strukturen (Franco *et al.*, 1998).

Weiterhin führt die Inkubation von Zellen mit BFA zur Auflösung der Golgi-Strukturen durch Inhibierung des GDP-GTP-Austausches am GEF-GTPase-Komplex. Im Gegensatz zu anderen GEFs sind die Cytohesin-Moleküle insensitiv gegen BFA. Dieser Befund deutet darauf hin, daß der ARF-Cytohesin-Komplex eine stabile Einheit darstellt und eine Vesikelbildung regulieren könnte. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß auch die anderen ARF-Proteine bei der Vesikelbildung von Bedeutung sind. So wird z.B. ARF3 (zweite Protein der ARF-Klasse-I) und ARF5 als BFA-resistentes Proteine diskutiert (Claude *et al.*, 1999).

Ebenfalls unklar ist der Aufbau der Vesikel, die einen Cytohesin/CYTIP-Komplex zur Plasmamembran transportieren. Den bisher bekannten Vesikeln ist gemein, daß die zu transportierenden Proteine mittels Adaptermoleküle vernetzt werden und die Vesikel mit Hüllproteine umgeben werden. Die Adaptermoleküle stellen dabei eine Verbindung zwischen z.B. Rezeptoren und der vesikelbildenden Maschinerie her. Die Regulierung der Vesikelbildung sowie die spätere Fusion mit einer Zielmembran wird mitunter über GTPasen reguliert. Spezifische Sortierungssignale lenken dabei Sekret- und Membranproteine in spezifische Transportvesikel.

Neben den Clathrin-ummantelten Vesikeln verwenden viele Vesikel das Hüllprotein COP. Das COP-II Hüllprotein wird für den Transport zwischen dem ER und dem *cis*-Golgi-Kompartiment

eingesetzt, die Vesikelbildung wird über die GTPase Sar1 vermittelt. Bisher ist nicht bekannt, daß Cytohesin-Moleküle als GEFs für Sar1 dienen können. Aus diesem Grund ist diese Vesikelart für einen Transport eines Cytohesin/CYTIP/Rezeptorkomplexes eher unwahrscheinlich. Mögliche Kandidaten stellen jedoch die COP-I Vesikel dar, deren vesikelbildende GTPase mit ARF1 identifiziert wurde. COP-I Vesikel sind für den retrograden Transport zwischen ER und dem cis-Golgi sowie dem Transport zwischen den einzelnen Golgi-Zisternen verantwortlich. Interessanter Weise konnte, wie bereits oben beschrieben, eine Umlagerung von β -COP bei Überexpression von Cytohesin-3 beobachtet werden. Bisher sind bereits 7 COP-I Homologe (α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ -, ζ -COP) identifiziert worden. Ob und welches der Hüllproteine bei dem Cytohesin-1/CYTIP vermittelten Vesikeltransport zur Plasmamembran verwendet wird, ist bisher noch absolut unerforscht.

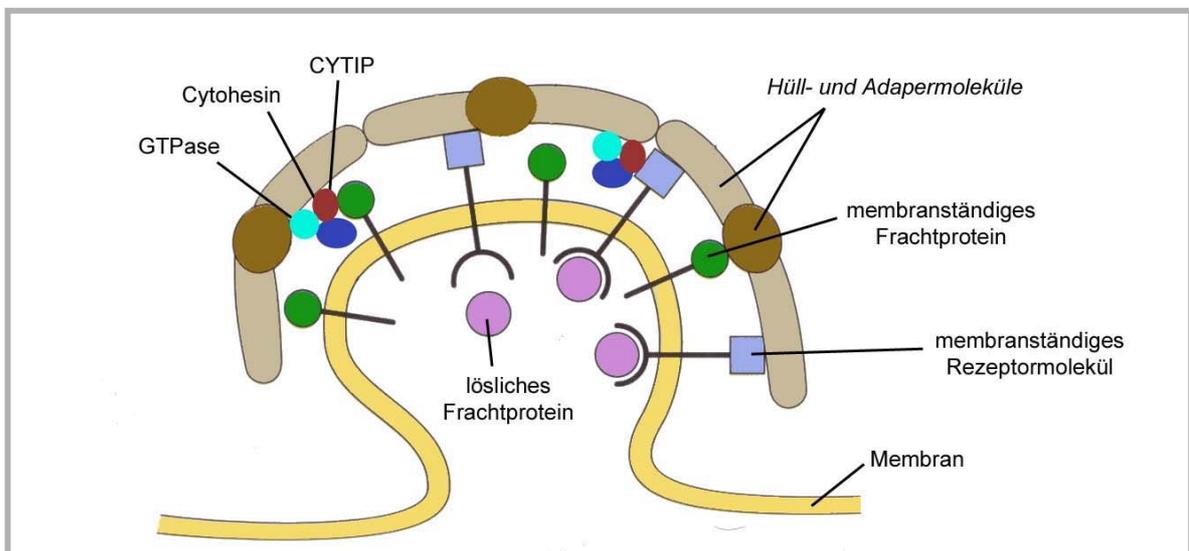


Abb. 65: Schematische Darstellung einer Bildung eines Vesikels. (verändert nach Lodish, 2001).

Die Ausknospung eines Vesikels beginnt mit der Anhäufung eines kleinen GTP-bindenden Proteins in einem Abschnitt der Zellmembran. Im nächsten Schritt binden Komplexe aus Hüll- und Adapterproteinen an die cytosolischen Domänen von membranständigen Proteinen (z.B. (Ko-)Rezeptoren, Frachtproteine). Diese Prozesse wie auch die Vesikelabschnürung wird mitunter über GTPasen reguliert. CYTIP könnte bei der Komplexbildung zwischen Cytohesin und der GTPase sowie als Adaptermolekül bei der Hüllbildung dienen.

Aber auch die Clathrin-ummantelten Vesikel könnten bei einem Transport von Cytohesin/CYTIP-vermittelten Proteinkomplexen an die Plasmamembran involviert sein. Bisher bekannt sind diese Vesikel bei der Endozytose, dem Transport von Plasmamembranproteinen zu den Endosomen sowie beim Vesikeltransport zwischen Golgi-Apparat und Endosomen. Bei den Clathrin-Vesikeln ist bereits ein Adapterkomplex identifiziert worden, der für die Spezifität verantwortlich ist. Es konnten vier AP-Hauptkomplexe (AP-1, -2, -3, -4) identifiziert werden, die alle einen ähnlichen Aufbau besitzen und Heterotetramere darstellen (Nakatsu & Ohno, 2003). Weiterhin wurden zwei zellspezifische Untergruppen (AP-1B, AP-3B) nachgewiesen. Als besonders interessant zeigt sich

der AP-1B und der AP-4 Komplex, die in polarisierten Epithelzellen exprimiert werden und für eine Sortierung von Proteinen an die basolaterale Plasmamembran verantwortlich sind. Wie Boehm *et al.*, 2001 zeigte, ist die Lokalisation des Komplexes BFA-abhängig und über ARF1 reguliert. Der β -Untereinheit des AP-4-Komplexes, die normalerweise für die Bindung mit dem Hüllprotein Clathrin verantwortlich ist, fehlt die Clathrin-Bindungssequenz, was für eine differenzierte Vesikelart ohne Clathrinhülle spricht.

Welche Vesikelart aber für den Cytohesin-1/CYTIP vermittelten Transport verwendet wird und welche Signalsequenzen oder Peptide für die Sortierung und Zielerkennung notwendig sind muß erst weiter untersucht werden. Die Identifikation von bisher unbekanntem Hüllproteinen, wie z.B. GGAs, Tip47, PACS-1 (Wan *et al.*, 1998) lässt darauf schließen, daß mehr unterschiedliche Vesikelarten mit bestimmten Spezifitäten existieren als bisher vermutet wurde.

6.4 Mögliche membranständige Interaktionspartner für die PDZ-Domäne von CYTIP

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, über welche Interaktoren die PDZ-Domänen abhängige Membranassoziation von CYTIP vermittelt wird? Im Fokus der Untersuchungen stand primär das Integrin LFA-1 aufgrund der direkten Interaktion mit der SEC7-Domäne von Cytohesin-1. Koimmunpräzipitationen zwischen CYTIP und dem cytoplasmatischen Teil von CD18 zeigten keine Interaktion. Auch der Nachweis einer Komplexbildung bei Überexpression der Protein CYTIP, Cytohesin-1 und dem cytoplasmatischen Teils von CD18 blieb ohne Erfolg. Betrachtet man die letzten drei C-terminalen Aminosäuren von CD18, so entsprechen diese nicht der in der Literatur (vgl. Kapitel 5.9.1.2) beschriebenen Bindungskonsensussequenz für PDZ-Domänen (Tab. 8, Tab. 9). Auch Integrinuntereinheiten wie CD28, CD29, CD11a,b,c entsprechen nicht der geforderten Sequenz für eine Interaktion mit der Bindungstasche einer PDZ-Domäne. Weitere interessante Liganden stellen sicherlich auch die ARF-Proteine dar. Über eine Modifikation, die Myristoylierung, werden die ARFs an die Plasmamembran rekrutiert (Goldberg, 1998). Obwohl auch die ARF-Proteine am C-terminalen Ende keine Bindungskonsensussequenz für eine Bindung mit einer PDZ-Domäne besitzen, konnte eine Interaktion zwischen der PDZ-Domäne des Proteins PICK1 (protein interacting with C kinase 1) und GTP gebundenem ARF1 oder ARF3 im „Two-Hybrid-System“ nachgewiesen werden (Takeya *et al.*, 2000). Aufbauend auf diese Daten wurden ARF1-6, Mutanten von ARF1/ARF6 die nicht mehr in der Lage sind GTP zu binden sowie konstitutiv aktive Mutanten von ARF1/ARF6 als „bait“ eingesetzt und gegen CYTIP als „prey“ im Hefesystem auf Interaktion getestet (5.9.2.2). In allen Ansätzen konnte eine leichte Blaufärbung nach 2 Tagen Inkubation der Hefekolonien detektiert werden, die weit über dem Hintergrund der Negativkontrolle lagen. In Folgeexperimenten wurde eine Interaktion zwischen CYTIP und einem ARF-Peptid molekularbiologisch untersucht.

Ig-CYTIP wurde in Jurkat E6-Zellen und 721-Zellen überexprimiert und an CYTIP präzipitierte ARF-Proteine mit einem pan-ARF-Antikörper (erkennt alle Proteinhomologe der ARF-Gruppe) nachgewiesen. Die 21 kDa großen ARF-Proteine konnten nicht nachgewiesen werden, allerdings ein Protein mit ca. 75-80 kDa.

Welches Protein detektiert wurde und ob es sich bei dem kopräzipitierten Protein um eine GTPase handelt wurde im Zuge dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Interessanter Weise stellt auch ARD1 (ARF domain protein) eine weitere 64 kDa GTPase dar, die durch Cytohesin-1 aktiviert werden kann (Vitale *et al.*, 2000) und in Lysosomen und dem Golgi-Apparat lokalisiert ist. Bisherige Ergebnisse zeigen, daß ARD1 spezifisch durch Cytohesin-1 nicht jedoch durch Cytohesin-2 aktiviert werden kann. Aufgrund der etwas geringeren Größe handelt es sich bei dem in dieser Arbeit präzipitierten Protein nicht um ARD1. Auch eine Antikörperdetektion mit einem anti-ARD-Antikörper bestätigte die Vermutung.

Die Entdeckung von neuen Proteine mit ARF-Domänen, wie z.B. ARD1 deuten darauf hin, daß die Cytohesin-Homologe nicht nur Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren für die kleinen ARF-Moleküle der Ras-Superfamilie sind, sondern auch andere größere GTPasen aktivieren können. Es ist anzunehmen, daß die Proteine der Cytohesin-Familie unterschiedlichen GTPasen aktivieren können, je nach Expressionsort und Zelltyp.

Neben den GTPasen kommen aber auch eine Vielzahl bekannte und bisher unbekannter Proteine wie z.B. (Ko-)Rezeptoren oder membranständige Kinasen als Interaktionspartner in Frage. Zur endgültigen Identifizierung des *in vivo* Interaktionspartners von CYTIP sollen in zukünftigen Projekten mit Hilfe des „Yeast-Two-Hybrid-Screens“ Proteinbibliotheken untersucht werden.

6.5 Wird CYTIP *in vivo* modifiziert?

Bei der Überexpression von Ig-CYTIP in verschiedenen Zellsystemen wie z.B. Jurkat E6-Zellen, COS7-Zellen, 721-Zellen und Einsatz unterschiedlicher Transfektionsmethoden (Elektroporation, Vaccinia-Expressions-System, DEAE/Dextran-Transfektion) konnte nach Präzipitation an Protein A-Sepharose neben der Wildtypbande ein um ca. 10 kDa größeres Fragment im „Western-Blot“ detektiert werden (vgl. Abb. 45, Abb. 47). Die Wildtypbande besitzt dabei eine etwa 10-mal stärkere Intensität als die im PAA-Gel höher laufende Bande. Wurden die Proben mit PMA behandelt, verschob sich das Verhältnis und beide Banden konnten mit etwa gleicher Intensität beobachtet werden. PMA kann PKCs *in vivo* direkt aktivieren (Nishizuka, 1984, Nishizuka, 1986) und zur Phosphorylierung von Zielproteinen führen. Normalerweise ist das Laufverhalten phosphorylierter Proteine aufgrund der geringen Masse der Phosphatgruppe kaum verändert. Auch bei einer poly-Phosphorylierung treten selten Masseveränderungen von 10 kDa auf.

Peptidmodifikationen können hingegen zu einer deutliche Zunahme der Masse eines Proteins führen. Zur Gruppe der Peptidmodifikationen gehört die Ubiquitylierung wohl zu den

bekanntesten Modifikationen (Bonifacio & Weissman, 1998). Während die Ubiquitinkette meist Proteine markiert die zum Abbau den Proteasomen zugeführt werden sollen, sind bereits weitere Ubiquitin-ähnliche Moleküle identifiziert worden. Hierzu gehören Polypeptide wie HUB, UCRP APG12, URM1 deren Funktion noch weitgehend unbekannt ist oder Modifikationen die vermutlich eine regulatorische (RUB1) oder eine stabilisierende Funktion (SUMO-1) besitzen. Allen Ubiquitin-ähnlichen Modifikationen ist gemein, daß die Peptide durch eine proteolytische Spaltung durch ein Enzym (E1) aktiviert und über eine Thioesterbindung an ein konjugierendes Enzym (E2) gebunden werden. Mittels einer Ligase (E3) wird eine kovalente Bindung mit einem Lysin (Lys, K) des Zielproteins ausgebildet (vgl. Abb. 46).

In dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf eine Modifikation mit dem SUMO-Peptid gelegt. Hierfür sprachen folgende zwei Punkte gegenüber einer Ubiquitynylierung. Erstens konnte bisher keine Abbaureaktion von CYTIP detektiert werden und zweitens wurde in Experimenten von W. Kolanus (persönliche Mitteilung) eine Interaktion von Cytohesin-1 und dem E2-Enzym Ubc9 im „Yeast-Two-Hybrid-System“ nachgewiesen.

In der Peptidsequenz von CYTIP sind 16 Lysine vorhanden, wobei keines von der Minimalkonsensussequenz aKX(E,D) umgeben ist. In der Literatur wurden bereits SUMO-konjugierte Proteine identifiziert deren modifiziertes Lysin nicht der beschriebenen Konsensussequenz entspricht. Aus diesem Grund stellten alle 16 Lysine in CYTIP potentielle Modifikationsstellen dar. Durch Deletionsmutanten wurde erst grob die Modifikationsregion eingegrenzt. Zwischen den Aminosäuren E243 und R330 liegen zwei Lysine (K247, K287) die durch Punktmutation in Arginin verändert wurden (vgl. Abb. 47).

Die folgenden Überexpressions- und Präzipitationsversuche der Punktmutanten zeigten weiterhin eine Modifikation von CYTIP auf. Entweder können andere Lysine in CYTIP beim Ausfall von K247 oder K287 das SUMO-Peptid übernehmen oder CYTIP wird nicht über diese beiden Lysine und somit nicht mit SUMO modifiziert.

In Zusammenarbeit mit F.Melchior (MPI Martinsried) sollte schließlich eine SUMO-Konjugation mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Aufgrund der negativen Ergebnisse konnte eine SUMO-Modifizierung nun mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Durch weitere Deletionsmutanten konnte die Modifikationsregion weiter eingeschränkt werden. Zwischen den Aminosäuren E243 und G260 sind auffallend viele Serine/Threonin vorhanden (Abb. 48). Die Serine wurden in verschiedenen Konstrukten durch Alanine ausgetauscht und die Deletionsmutanten wieder in COS7-Zellen überexprimiert (Abb. 48, Abb. 49). Interessanter Weise ist bei den Mutanten Ig-CYTIP S1, Ig-CYTIP S2 ein Verlust der zweiten höher laufenden Bande zu erkennen, das Ig-CYTIP S3 Konstrukt zeigt eine schwache, Ig-CYTIP S4 eine dem Wildtyp Ig-CYTIP vergleichbare Modifikationsbande. In der Immunfluoreszenz (Abb. 50) zeigte Ig-CYTIP S4 ein identisches Bild zu Ig-CYTIP in Jurkat E6-Zellen die auf Fibronectin-beschichteten Unterlagen adhärten. Besonders bei den Mutanten Ig-CYTIP S1 und Ig-CYTIP S2 fiel eine verminderte Golgi-Lokalisation und keine Kernlokalisation in den transfizierten Jurkat E6-Zellen auf. Das Bild der Mutante Ig-CYTIP S3 befindet sich zwischen den beiden Extrema. Auffallend war eine etwas

verstärkte Plasmamembranlokalisation insbesondere bei Ig-CYTIP S1 und Ig-CYTIP S2. Die Modifikation könnte CYTIP an der Membran stabilisieren. Bei PMA-Stimulation verhielten sich alle Mutanten gleich und verloren, wie auch Ig-CYTIP, ihrer Membranlokalisation und waren primär im Cytoplasma und Golgi-Apparat visualisierbar. Die Modifikation mehrerer Serine/Threonin deutete auf eine poly-Phosphorylierung hin. Da durch PMA-Zugabe eine Phosphorylierung von CYTIP erreicht werden konnte und PMA ein direkter Aktivator für PKCs darstellt, wurde zur Analyse der Kinase direkt PKC α/δ eingesetzt. PKC α und PKC δ führten jedoch in den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten zu keiner Phosphorylierungsmodifikation (5.16.2.5). Möglicherweise sind andere PKCs für die Phosphorylierung zuständig oder PKC α/δ aktivieren eine weitere Kinase, die erst dann CYTIP phosphoryliert.

Erst kürzlich konnte B.Kellersch (Mitarbeiterin von W.Kolanus) zur Klärung der Modifikationsfrage wesentlich beitragen. Sie konnte in ihren Experimenten eine PKC-vermittelte poly-Phosphorylierung in einer Region zwischen den Aminosäuren L240 und G260 nachweisen. Die Identifikation der diskreten phosphorylierten Serine/Threonine wird derzeit von ihr ermittelt.

Bei ihren Experimenten machte sie eine weitere erstaunliche Entdeckung. Bei der Überexpression von Ig-CYTIP in verschiedenen Zellsystemen und Stimulation der Zellen mit PMA stellte sie, wie in dieser Arbeit beschrieben, eine höhere laufende Bande nach Gelelektrophorese und Detektion im „Western-Blot“ fest. Wurde der Ig-Fusionsanteil gegen einen Myc-Fusionsanteil ersetzt und die Zellen in gleicher Weise behandelt, war weder die Bande mit Modifikation, noch die Wildtypbande von CYTIP detektierbar (bisher nicht veröffentlichte Daten von B.Kellersch). Schlussfolgernd findet ein Abbau von CYTIP nach Proteinmodifikation statt. In anschließend durchgeführten Experimenten konnte sie nachweisen, daß CYTIP doch durch Ubiquitin markiert wird. Der in dieser Arbeit verwendete Ig-Fusionsanteil stabilisiert anscheinend CYTIP und verhindert bzw. verzögert eine Ubiquitinierung und die damit verbundene Abbaureaktion.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man sich ein Modell für CYTIP anlehnen an die Aktivierung von NF- κ B vorstellen (Karin & Ben-Neriah, 2000). NF- κ B wird im inaktiven Zustand durch Bindung an das als I- κ B bezeichnete Inhibitorprotein festgehalten. Nach aktivierenden Signalen wird I- κ B an zwei Serinresten durch einen Kinase-Komplex phosphoryliert. Das phosphorylierte I- κ B verhält sich als Substrat für die anschließende Ubiquitinanheftung, wonach es im Proteasom abgebaut wird. Durch Entfernung von I- κ B wird NF- κ B schließlich aktiviert und als Transkriptionsfaktor in den Kern translokalisiert.

Welche Auswirkung dieses Modell auf Cytohesin-1, CYTIP und die Regulierung der LFA-1 abhängige Zelladhäsion besitzen könnte, wird in Kapitel 6.8 nach Vorstellung weiterer Ergebnisse erläutert.

6.6 Regulierung der LFA-1 vermittelten Adhäsion durch CYTIP

Einen großen Fortschritt für das Verständnis der Funktion von CYTIP wurde durch die Stimulierung von Zellen mit dem Phorbolster PMA erreicht. PMA dient als Strukturanalogon von Diacylglycerin und führt zur Aktivierung der Proteinkinase C und Cytohesin-1 vermittelt, zur Aktivierung des LFA-1 Integrins (Kolanus & Seed, 1997, Lub *et al.*, 1995). In der Literatur (Geiger *et al.*, 2000) wird bereits beschrieben, daß die LFA-1 abhängige Adhäsion durch Überexpression von Cytohesin-1 bis zum 8-fachen gesteigert werden kann. Eine Behandlung dieser Zellen mit PMA führte zu einer weiteren Steigerung der Adhäsion an den ICAM-1-Liganden um das 1,5-fache.

Wie bereits in Kapitel 5.8 beschrieben, wird CYTIP durch die Interaktion von Zellen mit Integrinliganden (Fibronektin; ICAM) an die Plasmamembran rekrutiert. Behandelt man Zellen mit PMA so verschwindet die Membranlokalisation, CYTIP fällt zurück in das Cytoplasma (5.10). Aufgrund der starken Assoziation zwischen Cytohesin-1 und CYTIP lassen die Ergebnisse auf eine Regulation der LFA-1-vermittelten Zelladhäsion durch CYTIP und Cytohesin-1 schließen. Wurden schließlich Cytohesin-1 und CYTIP in Jurkat E6-Zellen kotransfiziert und auf Integrinliganden zur Adhäsion gebracht, konnten beide Proteine eindeutig an der Plasmamembran in der Immunfluoreszenz detektiert werden (5.11). Stimulierte man nun die kotransfizierten Zellen mit PMA relokalisieren beide Proteine zurück in das Cytoplasma.

Diese Daten deuteten zunächst darauf hin, daß CYTIP als negativ regulierender Faktor wirkt und die durch Cytohesin-1 vermittelte Zelladhäsion aufweicht, indem Cytohesin-1 von der Plasmamembran rekrutiert wird. Um diese Theorie zu bestätigen, wurden Adhäsionsversuche mit Cytohesin-1, CYTIP und verschiedenen Mutanten in Jurkat E6-Zellen durchgeführt (Abb. 39). Die Überexpression von Cytohesin-1 führte zu einer erhöhten Zelladhäsion, die durch PMA noch gesteigert werden konnte. Die dominant negativen Mutanten Ig-PH und Ig-Cyh-1 E157K blockten die Adhäsion fast vollständig. Wurde jedoch Ig-CYTIP überexprimiert war bei unstimulierten wie auch stimulierten Zellen keine Zelladhäsion messbar. Die PDZ-Trippelmutante Ig-CYTIP 82/90/92 hatte keinen Einfluß auf die Zelladhäsion und verhielt sich wie die Ig-Kontrolle, da sie wahrscheinlich nicht in der Lage ist über die PDZ-Domäne einen Komplex mit Membran-assoziierten Proteinen (z.B. (Ko)-Rezeptoren) auszubilden.

Wäre CYTIP, wie oben postuliert, ein negativer Regulator für die Zelladhäsion müsste CYTIP zur Stabilisierung des Cytohesin-Komplexes an der Membran und folglich zu einer erhöhten Adhäsion führen. Erst durch PMA-Stimulation würde Cytohesin-1 und CYTIP von der Plasmamembran rekrutiert und die Zelladhäsion aufgehoben.

Bezieht man die oben beschriebenen Ergebnisse von B.Kellersch mit in diese Überlegung ein, (siehe 6.5) kann man folgendes Modell postulieren. Der Cytohesin-1/CYTIP-Komplex wird zunächst an die Plasmamembran rekrutiert. CYTIP inhibiert durch Interaktion mit Cytohesin-1 primär die Aktivierung der Zelladhäsion. Durch initiale Phosphorylierung und anschließende Ubiquitin-Modifikation, wird CYTIP von Cytohesin-1 gelöst und wahrscheinlich abgebaut.

Cytohesin-1 kann nun die Zelladhäsion über LFA-1 aktivieren. Da Ig-CYTIP aus noch ungeklärten Gründen sehr stabil gegenüber einem Abbau ist und die Interaktion zwischen Cytohesin-1 und CYTIP sehr stark ist, wird bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit Ig-CYTIP der gesamte Komplex von der Plasmamembran gelöst. Cytohesin-1 kann die Integrinaktivierung nicht induzieren, die Adhäsionsvorgänge wurden aus diesem Grund blockiert.

6.7 Einfluss von CYTIP auf die GTPase Aktivität von Cytohesin-1

Von C.Geiger *et al.*(2000) konnte gezeigt werden, daß Cytohesin-1 direkt an der Aktivierung von LFA-1 und der damit verbundenen Steigerung der Zelladhäsion beteiligt ist, einerseits durch direkte Bindung an das Integrin und andererseits durch seine ARF-GEF-Aktivität. Eine Punktmutante in der Sec7-Domäne von Cytohesin-1 (E157K) inhibiert dominant negativ die Zelladhäsion und Cytohesin-1 ist nicht mehr in der Lage als GEF für GTPasen zu wirken. Welche GTPase die *in vivo* Partner für Cytohesin-1 sind, wird noch kontrovers diskutiert.

Neben der Rolle intrazelluläre Vesikel zu bilden, wurden beide, ARF1 und ARF6, in Aktincytoskelettlagerungen an der Plasmamembran impliziert, ein Vorgang der wichtig bei der Zellmigration und bei der Ausbildung von APC/T-Zellkontakten ist. Eine Umlagerung des Strukturproteins Paxillin zu Fokalkontakten in Fibroblasten konnte z.B. durch eine dominant negative Mutante von ARF1 inhibiert werden (Norman *et al.*, 1998; Critchley *et al.*, 1999). Weiterhin führt eine konstitutiv aktive Mutante von ARF6 zu einer Aktinpolymerisation in den Fibroblasten, wahrscheinlich durch Kooperation mit Rac-1 und seinem Target POR-1 (D'Souza *et al.* 1997; Radhakrishna *et al.*, 1999).

ARF6 scheint auch ein guter GTPase-Kandidat für Cytohesin-1 zu sein, da beide Proteine im selben Kompartiment der Zelle, der Plasmamembran exprimiert werden (D'Souza *et al.*, 1998). Daten die von Knorr *et al.* (2000) vorgestellt wurden, sprechen jedoch gegen ARF6 als *in vivo* GTPase für Cytohesin-1. Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>), ein Phosphorylierungsprodukt der PI 3-Kinase rekrutiert Cytohesin-1 über die PH-Domäne an die Plasmamembran und führt zu einer Aktivierung der Integrin-abhängigen Zelladhäsion. Wurde ein GDP-GTP-Austausch mit myristoyliertes ARF6 in Anwesenheit von Liposomen durchgeführt, die PIP<sub>3</sub> enthielten, war die Reaktion völlig unterbunden. Weiterhin wird auch mit EFA6 (Franco *et al.*,1999) ein neuer Austauschfaktor für ARF6 beschrieben.

Wird hingegen myristoyliertes ARF1 in eine GDP-GTP-Austauschreaktion mit Cytohesin-1 und Liposomen/PIP<sub>3</sub> eingesetzt, verstärkt sich die GTP-Aufnahme von ARF1. Ähnliche Effekte wurden auch von Klarlund für Cytohesin-3 beschrieben (Klarlund *et al.*, 1998).

In den in dieser Arbeit durchgeführten GDP-GTP-Austauschexperimenten mit ARF1 sollte ein möglicher Einfluß von CYTIP auf die Austauschreaktion untersucht werden (5.13). In Gegenwart

von Liposomen und Mg^{2+} als Kofaktor wurde myristoyliertes ARF1-Protein mit aufgereinigtem 6xHis-Cytohesin-1 (unphosphoryliert/phosphoryliert; Dierks *et al.*, 2001) und Ig-CYTIP inkubiert, welches zuerst an Protein A-Sepharose zur Aufkonzentrierung gebunden wurde. Der GDP/GTP-Austausch wurde durch Zugabe von radioaktivem [^{35}S]GTP γ S gestartet und die GTP-Bindung zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Wie auch bei Dierks *et al.* (2001) beschrieben, steigert phosphoryliertes Cytohesin-1 den GDP-GTP-Austausch an ARF1 und führt zu einer Assoziation mit Cytoskelettkomponenten. Es wird vermutet, daß die Phosphorylierung für eine effiziente Positionierung von Cytohesin-1 an LFA-1 nötig ist. Phosphorylierungsmutanten zeigten eine deutlich verminderte Adhäsion der Zellen an ICAM-1. Wurde CYTIP mit in die Reaktion eingesetzt konnte keine Veränderung der Austauschaktivität detektiert werden (Abb. 38).

Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu den von Tang *et al.* (2001) veröffentlichten Daten. Die Autoren konnten eine Steigerung der GEF-Aktivität von Cytohesin-1 feststellen, wenn 50 pmol ARF1, 11 pmol Cytohesin-1 und 1.5 pmol His-6-CYTIP und in die Austauschreaktion eingesetzt wurden, d.h. es ist ein bestimmtes Mengenverhältnis der Komponenten für eine optimale Reaktion nötig. Der Guanin-Nukleotid-Austausch wurde zwar in dieser Arbeit in Anlehnung an das von Cherfils (Cherfils *et al.*, 1998) optimierte Verfahren durchgeführt, eine Titrierung von Ig-CYTIP war aufgrund der Kopplung an Protein A-Sepharose nicht optimal möglich, d.h. CYTIP wurde im Überschuss der Reaktion zugesetzt. Zu hohe und zu geringe Mengen an CYTIP zeigen, wie von Tang beschrieben, keine Änderung der Austauschaktivität.

An welchem Ort der Zelle ist eine über CYTIP vermittelte Steigerung der GDP-GTP-Austauschaktivität überhaupt sinnvoll?

Die Adhäsionsversuche in Kapitel 5.14 zeigen eine deutliche Inhibition der Zelladhäsion durch CYTIP. Wie bereits erläutert ist die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 an der Plasmamembran für eine LFA-1 vermittelte Steigerung der Adhäsion notwendig. Die Inhibition und gleichzeitige Aktivierung der Austauschaktivität an der Plasmamembran stellen *in vivo* kontraproduktive Vorgänge dar und können als äußerst unwahrscheinlich angesehen werden.

Anders verhält sich ein Guanin-Nukleotid-Austausch im Golgi-Apparat. Setzt man voraus, daß Cytohesin-1 durch seine GEF-Funktion eine Vesikelbildung über ARF1 regulieren kann, so stellt CYTIP ein wichtiger Gerüstfaktor dar die Komponenten zur Vesikelbildung zu positionieren. Die Komplexbildung kann zu einer Steigerung der GDP-GTP-Austauschaktivität und eine Regulierung der Vesikelbildung zur Folge haben.

Ob das bei der Vesikelbildung beteiligte ARF auch zur Plasmamembran transportiert wird und dort an der Regulierung der Zelladhäsion beteiligt ist, bleibt derzeit unklar. Möglicherweise sind an den beiden Funktionen verschiedene ARF-Proteine bzw. ARF-ähnliche Proteine beteiligt. Möglich ist auch eine sterische Inhibition der GEF-Aktivität an der Plasmamembran durch CYTIP, erst nach Ablösen von CYTIP kann Cytohesin-1 als GEF für ein ARF-Protein dienen. Besonders die Aufklärung der *in vivo* GTPasen für Cytohesin-1 stellen zukünftig eine wichtige Aufgabenstellung bei weiteren Forschungsvorhaben dar.

6.8 Modell zur Adhäsionsregulation durch CYTIP und Cytohesin-1

In Abb. 66 sollen die bisher vorgestellten Ergebnisse nochmals in einem Modell zusammengefaßt werden, um die Regulation der LFA-1 vermittelten Zelladhäsion über CYTIP und Cytohesin-1 zu verdeutlichen. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß Cytohesin-1 und CYTIP bereits im Golgi-Apparat einen Komplex bilden. Möglicher Weise fördert CYTIP die Positionierung zwischen dem GEF (Cytohesin-1) und einer GTPase (z.B. ARF1) und reguliert somit die Bildung von Transportvesikel am *trans*-Golgi. Ob CYTIP dabei zusätzlich als Adapter fungiert ein Transmembranprotein, wie z.B. eine (Ko-)Rezeptor zu binden und an die Plasmamembran zu rekrutieren ist bisher noch ungeklärt, da der Interaktionspartner für die PDZ-Domäne von CYTIP noch nicht identifiziert wurde.

Die Translokation des CYTIP/Cytohesin-1-Komplexes an die Plasmamembran wird anschließend über Integrine, PI 3-Kinase oder über kooperative Prozesse vermittelt. Über Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) gekoppelte Rezeptoren (z.B. T-Zellrezeptor), 7-Trans-Membran-Domänen-Rezeptoren (z.B. Chemokinrezeptoren), Korezeptoren (CD14/LPS) oder heterotrimere G-Proteine werden Signalkaskaden aktiviert, die zur Aktivierung von PKCs und der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) führen. Die PI3-Kinase phosphoryliert das Phosphatidyl-inositol-phospholipid PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub>. Cytohesin-1 besitzt eine erhöhte Affinität zu PIP<sub>3</sub> und wird über die PH-Domäne an die Plasmamembran rekrutiert. Die Integrin-vermittelte Membranrekrutierung wird hingegen über CYTIP reguliert, dessen Aktivierungssignale noch nicht identifiziert worden sind.

CYTIP dient an der Plasmamembran zunächst als Inhibitor für Cytohesin-1, die LFA-1-vermittelten Zelladhäsion ist initial blockiert. Über welche Mechanismen die Inhibition erfolgt, kann nur spekuliert werden. Möglich wäre eine Blockierung des GDP-GTP-Austausches durch Bindung an die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 oder eine sterische Hemmung der Interaktion von Cytohesin-1 mit dem cytoplasmatischen Teil der CD18-Kette. Über bisher noch unbekannte Signale wird CYTIP anschließend PKC-abhängig poly-phosphoryliert. Diese Modifikation führt zur Ubiquitynylierung des Proteins und zu einer Abspaltung von Cytohesin-1. Modifiziertes CYTIP wird anschließend wahrscheinlich in den Proteasomen abgebaut.

Über die SEC7-Domäne kann Cytohesin-1 nun mit der β -Kette von LFA-1 interagieren und die Integrinaffinität zum Liganden ICAM-1 regulieren. Diese Interaktion induziert vermutlich eine Konformationsänderung im extrazellulären Bereich des LFA-1-Integrins. Sie ist jedoch nicht hinreichend, um eine stabile Bindung an ICAM-1 zu gewährleisten. Vielmehr scheinen hierbei Aviditätsänderungen des Integrins entscheidend involviert zu sein (van Kooyk *et al.*, 1999; van Kooyk und Figdor, 2000). Studien von van Kooyk *et al.* (1999) legen die Vermutung nahe, daß eine Multimerisierung („Clusterbildung“) von LFA-1 entscheidend für eine stabile Zelladhäsion ist.

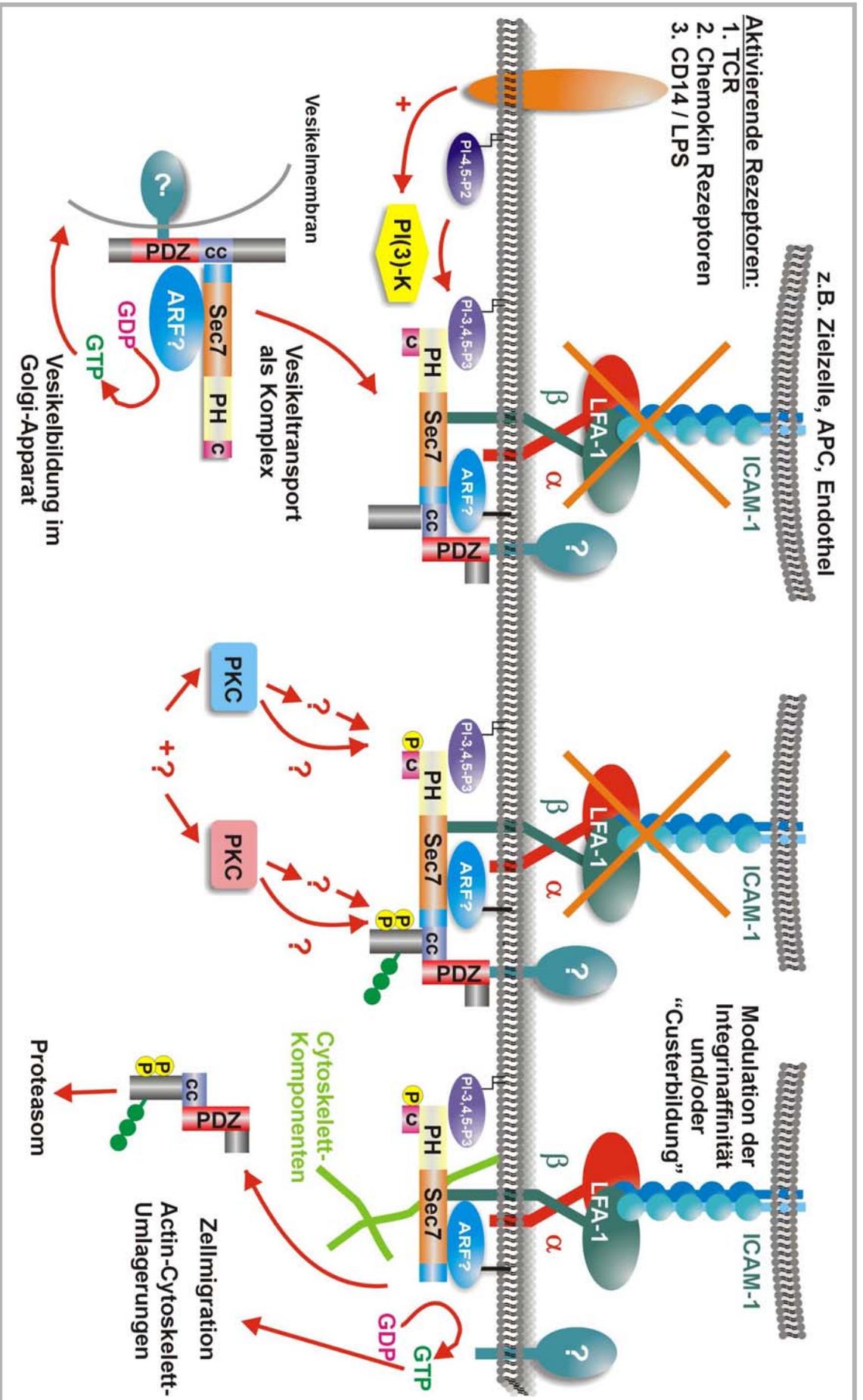


Abb. 66: Modell zur LFA-1 vermittelten Adhäsionsmodulation durch Cytohesin-1 und CYP1P.

Van Kooyk *et al.* (1999) diskutiert ein Modell, wonach das Integrin durch Interaktion mit dem Aktincytoskelett zunächst in einem inaktiven Zustand stabilisiert wird.

Durch den TCR selbst oder andere Zelloberflächenmoleküle werden sog. „inside-out“-Signale induziert. Diese Signale aktivieren PKCs, erhöhen die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration, die IP3-Kinaseaktivität und führen zur PKC-abhängigen Phosphorylierung von MacMARCKS oder L-Plastin (Jones *et al.*, 1998) und schließlich zur Auflösung des kortikalen Cytoskelettnetzwerks um LFA-1. Gleichzeitig werden Ca^{2+} spezifische Proteasen wie Calpain (Stewart *et al.*, 1998) aktiviert die diesen Prozess unterstützen. Durch diese Cytoskelettlagerung wird die laterale Mobilität der Integrinmoleküle und damit ihre Fähigkeit zur Aggregation erhöht. Erst diese induzierte Aviditätsänderung des Integrins gewährleistet eine stabile Adhäsion von LFA-1 an ICAM-1. Bei der „Clusterbildung“ müssen neue Cytoskelettverbindungen ausgebildet werden, die über GTPasen vermittelt werden. Hierbei ist eine Aktivierung von Cytohesin-1 durch Abspaltung von CYTIP essentiell. Ein weiterer Faktor bei der Regulierung der Cytoskelettorganisation stellt die Phosphorylierung von Cytohesin-1 dar. Nach PKC-abhängiger Phosphorylierung assoziiert Cytohesin-1 über einen bisher noch unbekanntem Faktor mit dem Aktincytoskelett (Dierks *et al.*, 2001). Es wird angenommen, daß diese Positionierung von Cytohesin-1 eine Interaktion mit der cytoplasmatischen Domäne CD18 ($\beta 2$) von LFA-1 weiter begünstigt. Zusätzlich wird die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 durch dessen Phosphorylierung positiv reguliert. Dadurch wird der GDP/GTP-Austausch an ARF-Proteinen (ADP-ribosylation factor) gesteigert. Dies führt zur „Clusterbildung“ der Integrine und zur Cytoskelettorganisation (Kooyk und Figdor, 2000). In diesem Prozess wird LFA-1 über Linkerproteine, wie α -Aktin (Critcheley *et al.*, 1999), Talin (Monks *et al.*, 1998) oder Filamin (Sharma *et al.*, 1995) mit dem Aktincytoskelett neu verknüpft.

Die Aktivierung von LFA-1 durch Erhöhung der Avidität mittels „Clustering“ der Integrine bewirkt schließlich zu einer stabilen Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion.

6.9 Mögliche *in vivo* Funktion von CYTIP

6.9.1 Einfluß von CYTIP auf die Zellmigration

Die Zellen des hämatopoetischen Systems stellen die mobilsten Zellen in den Vertebraten dar. T-Zellen verteilen sich mit der Blutbahn im ganzen Körper, wandern durch Blutgefäßwände (Diapedese) und das lymphatische System und migrieren durch das Körpergewebe (Extravasation) zu einem inflammatorischen Stimuli. Neben den Selektinen, Adressinen und C-Typ-Lektinen spielen die Integrine eine große Rolle bei der Migration von Zellen. Auch die dendritischen Zellen (DC) wandern nach Antigenaufnahme durch das lymphatische System zu den Lymphknoten. Dort erhalten sie ein Stopp-Signal und arretieren um ihr Antigen zu präsentieren (siehe 6.9.2). Dieses Stopp-Signal könnte dabei von CYTIP vermittelt werden. Durch vollständigen Abbau von CYTIP im

Proteasom wird die über Cytohesin-1 und LFA-1 vermittelte Adhäsion in einem aktivierten Zustand gehalten.

Aber besonders bei der Migration von dendritischen Zellen (DC) oder T-Zellen müssen schnell Kontakte gebildet und wieder gelöst werden. Bei polarisiert migrierenden Zellen bildet sich ein Leitsaum, in dem durch Cytoskelett-Umlagerungen neue Adhäsionskontakte ausgebildet werden. Am nachziehenden Ende werden schließlich die Interaktionen wieder gelöst und die Signalkomplexe wieder an den Leitsaum transportiert. Hierbei könnten die sog. Lipidrafts verantwortlich sein, spezialisierte Membranmikrodomänen die als Plattform für Adapter- und Signalproteine dienen und einen lateralen Transport erleichtern (Alonso & Millan, 2001; Cherukuri *et al.*, 2001). CYTIP könnte hierbei durch Aktivierung bzw. Blockierung von Cytohesin-1 die nötigen Aktincytoskelettumlagerungen steuern. Mit den in Kapitel 5.15 durchgeführten Migrationsexperimente konnte nur ansatzweise, jedoch kein eindeutiger Beleg für einen Einfluß von CYTIP auf die Zellmigration gefunden werden.

Besonders bei der Zellmigration könnte der Integrin-abhängige Rekrutierungsweg von CYTIP (siehe 5.8) eine wichtige Rolle spielen. Wie bereits beschrieben wird der Cytohesin/CYTIP-Multiproteinkomplex über Integrine, PI 3-Kinase oder über kooperative Prozesse vermittelt an die Plasmamembran translokalisiert. Die poly-Phosphorylierung und Ubiquitinylierung von CYTIP führt zu dessen Abspaltung von Cytohesin-1 und Aktivierung der LFA-1 vermittelten Zelladhäsion. Bei einer Migration müssen die LFA-1/Liganden-Interaktionen wieder gelöst werden. Hierbei könnten die Integrine selbst Signale induzieren, die zu einer Cytohesin-1 unabhängigen Rekrutierung von CYTIP an die Plasmamembran führen. Aufgrund der starken Assoziation zwischen CYTIP und Cythesin-1 wird die GEF-Funktion bzw. die Bindung mit der CD18-Kette des Integrins unterbunden, die LFA-1/Liganden-Bindung wird gelöst und die Zelle verliert seine Adhärenz. Durch eine weitere Ablösung von CYTIP beginnt der beschriebene Adhäsionskreislauf erneut.

6.9.2 Steuerung von Zellinteraktionen zwischen antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen

Neben der Zellmigration werden auch besonders Wechselwirkungen zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen durch Adhäsionsmoleküle reguliert. Haben sich professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC), z.B. die dendritischen Zellen (DC), in den Lymphknoten eingenistet, präsentieren sie naiven T-Zellen ihr Antigen. Diese binden über Interaktionen zwischen LFA-1, CD2 und ICAM-3 auf der T-Zelle und ICAM-1, ICAM-2, LFA-1 und LFA-3 auf der antigenpräsentierenden Zelle. Diese vorübergehende Interaktion ist wichtig, damit die T-Zelle ausreichend Zeit hat, um viele MHC-Moleküle auf das Vorhandensein spezifischer Peptide auf der antigenpräsentierenden Zelle prüfen zu können. In wenigen Fällen erkennt die T-Zelle ihren spezifischen Peptid/MHC-Liganden und der T-Zell-Rezeptor könnte Signale aussenden, die über eine PKC zur poly-Phosphorylierung, anschließend zur Ubiquitinylierung von CYTIP führen. Durch

die Abspaltung von CYTIP wird Cytohesin-1 nun aktiviert und durch Cytoskelettlagerungen kommt es zu einer Konformationsänderung von LFA-1. Diese Veränderungen stabilisieren die Assoziation zwischen T-Zelle und der APC und führen zur Ausbildung einer „immunologischen Synapse“. Initial wird eine zentrale Zone von LFA-1 mit TCR umgeben. Innerhalb von Minuten kehrt sich diese Struktur um und LFA-1 bildet einen Ring um eine zentrale TCR-Region (Kooyk *et al.*, 2000; Hogg *et al.*, 2003). Die naive T-Zelle proliferiert schließlich zu bewaffneten T-Effektorzelle. Es ist durchaus möglich, daß ubiquityliertes und von Cytohesin-1 abgespaltenes CYTIP nicht in den Proteasomen abgebaut wird, sondern in diesem Fall in den Zellkern translokalisiert (5.16.1). Hier könnte das Protein z.B. für die Proliferation nötige Signale übermitteln. Da CYTIP auch in maturierten dendritischen Zellen exprimiert wird und LFA-1 auch auf diesen Zellen als Adhäsionsmolekül vorhanden ist kann die stabile Assoziation zwischen T-Zelle und APC auch über den MHC-Komplex selbst oder Korezeptoren ausgelöst werden.

Da das Zusammentreffen einer antigenspezifischen T-Zelle mit einer spezifischen APC ein seltenes Ereignis darstellt, werden die meisten Zellkontakte wieder gelöst und die T-Zelle wandert im Lymphknoten zur nächsten APC. In diesem Fall muß der Adhäsionsmechanismus aufgelöst werden. CYTIP könnte entweder durch Deubiquitylierung recycelt werden oder aus anderen Kompartimenten Integrin-vermittelt an die Zelloberfläche rekrutiert werden und an Cytohesin-1 binden. Die Cytohesin-1 vermittelte Adhäsion würde schließlich wieder unterbunden werden.

Neben den APC/T-Zellinteraktionen werden ähnliche Vorgänge auch bei der Interaktion zwischen T-Effektorzellen und Zielzellen vermutet. Nach der Differenzierung und Abspaltung der T-Zelle migrieren diese zum Entzündungsherd. Die erstmalige Bindung einer T-Effektorzelle an eine Zielzelle ist ein antigenunspezifischer Vorgang und wird über Adhäsionsmoleküle, wie LFA-1 vermittelt. Diese Interaktion ist meist nur temporär, außer eine spezifische Erkennung von Antigen auf der Zielzelle bewirkt eine Veränderung der Affinität von LFA-1 für seine Liganden. Die T-Effektorzelle bildet einen stärkeren Kontakt zur Zielzelle aus, so daß Effektormoleküle freigesetzt werden können. Bei dieser Polarisation wird das Aktincytoskelett umorganisiert. Nachdem die Zielzelle eliminiert wurde löst sich die T-Effektorzelle wieder ab, um neue Zielzellen angreifen zu können. All diese Adhäsionsvorgänge werden u.a. über Integrine reguliert.

Bei der LFA-1 vermittelten Zelladhäsion, stellt die regulierbare temporäre Interaktion zwischen Cytohesin-1 und CYTIP einen neuen Mechanismus dar, in verschiedenen *in vivo* Situationen Zell/Zell-Interaktion schnell und effektiv zu steuern.

6.10 Cytohesin-1 und CYTIP in *C.elegans*

Einige Moleküle bzw. Molekülkomplexe sowie Signalwege haben sich in der Natur als besonders effektiv erwiesen, so daß sie sich im Laufe der Evolution manifestiert haben und in niedrigen, wie auch höheren Lebewesen eingesetzt werden. Oft verwendet man aus diesem Grund einfacher gebaute Lebewesen um Grundmechanismen in der Biologie leichter und schneller untersuchen zu können. Einer dieser Modellorganismen stellt der Fadenwurm *C.elegans* dar. Er ist u.a. aufgrund seiner kurzen Generationszeit, seiner Transparenz und dem bereits verfügbaren sequenzierten Genoms besonders wertvoll als Forschungsobjekt.

Durch eine Datenbankrecherche konnte ein Cytohesin-Homolog K06H7.4 (*grp-1*) identifiziert werden, jedoch war keinerlei Literatur über dieses Protein in *C.elegans* vorhanden. Im humanen System werden die Cytohesin-Homologe primär in hämatopoetischen Zellen, aber auch in Hirngewebe exprimiert. Der Fadenwurm *C.elegans* besitzt im Gegensatz zu Säugetieren weder ein erworbenes noch ein adaptives Immunsystem und schützt sich allein durch seine mehrschichtige Kutikula und im Darm sekretierte proteolytische Enzyme vor Pathogenen.

Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen konnte *grp-1* keinem der vier humanen Cytohesin-Homologen zugeordnet werden. In *grp-1* sind alle wichtigen Domänen wie auch die PIP<sub>3</sub>-Bindungssequenz (WKRR) und das konservierte Glutamat (E157 in *Cyh-1*) in der SEC7-Domäne (essentiell für die ARF-GEF-Funktion) konserviert. Vergleicht man die Anzahl der identischen Aminosäuren, so hat *Cyh-4* mit 38% die geringste Übereinstimmung mit *grp-1*. Die größten Unterschiede zwischen den Cytohesin-Homologen sind in der C-Domäne vorhanden (vgl. Abb. 54). Während *Cyh-1*, -2, -4 und *grp-1* Serine bzw. Threonin besitzen die in der C-Domäne phosphoryliert werden können, fehlen bei Cytohesin-3 diese Modifikationsstellen. Zusammenfassend hat *grp-1* beim Vergleich der Sequenzdaten die größte Homologie zu Cytohesin-1 und Cytohesin-2.

6.10.1 *In vivo* Lokalisation von *grp-1* in *C.elegans*

Zur *in vivo* Lokalisation von endogenem *grp-1* wurden monoklonale Antikörper eingesetzt, die gegen die humanen Cytohesin-Homologe gerichtet sind, da keine *grp-1* (*C.elegans*) spezifische Antikörper zur Verfügung standen. Die Färbungen zeigten eine Anfärbung des Pharynx, der Spermatheka, zwei Neuronen im Kopfbereich sowie Anfärbungen im Darmbereich von Jungtieren (noch in der Eischale) und im L1-Larvenstadium. Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurden Proteine die eine SEC7-Domäne enthalten mit humanen polyklonalen anti-SEC7-Antikörper an Protein A-Sepharose aufkonzentriert und mit den humanen anti-Cytohesin-Antikörpern im Immunoblot nachgewiesen. Detektiert wurden ca. 20 Protein unterschiedlichster Größe, wobei 4 Banden mit hoher Intensität auftraten (Abb. 56). In Höhe von *grp-1* (ca. 41 kDa)

war eine schwache Bande erkennbar. Aufgrund der geringen Spezifität der verwendeten Antikörper sind die endogenen Anfärbungen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf andere Proteine, die eine SEC7-Domänen enthalten, zurückzuführen. Durch eine Datenbankrecherche im *C.elegans* Genom konnte eine Vielzahl von Proteine mit SEC7-Domäne nachgewiesen werden. Eine klare *in vivo* Lokalisation von grp-1 ist durch Verwendung der humanen Antikörper daher nicht möglich.

Um die grp-1 Expression jedoch trotzdem analysieren zu können wurde anschließend grp-1 als GFP-Fusionskonstrukt überexprimiert. Mittels der konfokalen Lasermikroskopie konnten eine starke Expression in den Darmzellen int 1-9 in allen Lebensstadien dokumentiert werden (Abb. 59). Im L3-L4 Larvenstadium bzw. in adulten Tieren ist eine wesentlich schwächere Expression im Kopfbereich der Tiere erkennbar, die von Tier zu Tier unterschiedlich erschien (Abb. 60). Aufgrund fehlender Marker war eine genaue Typisierung der Zellen nicht möglich. Das symmetrische Expressionsmuster und die räumlich Lage der Anfärbungen weisen sehr stark auf Nervenzellen hin. Das Nervensystem des Pharynx besitzt zum Großteil eine bilaterale Symmetrie, im Gegensatz zu einer dreifachen Symmetrie der Muskulatur oder des Epitheliums.

6.10.2 grp-1 interagiert nicht mit Integrinen

Ein bereits identifizierter transmembraner Interaktionspartner für Cytohesin-1 stellt das Integrin LFA-1 (CD11a/CD18; $\alpha_L\beta_2$) dar (Kolanus *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 2000). Während im Menschen über 20 unterschiedliche Integrine bekannt sind, werden in *C.elegans* nur zwei Heterodimere exprimiert. Die beiden Transmembranproteine unterscheiden sich jedoch nur in ihrer α -Kette, die β -Domäne ist identisch und wird in *C.elegans* als PAT-3 bezeichnet.

Während das α -INA-1/ β -PAT-3 Heterodimere in Neuronen exprimiert wird (Hedgecock *et al.*, 1987), findet man das Heterodimer α -PAT-2/ β -PAT-3 in epithelialen Zellen sowie in regelmäßigen Strukturen der Muskelzellen.

α -INA-1 ist in Vertebraten mit α_3 , α_6 und α_7 Untereinheiten, in *Drosophila melanogaster* mit α PS1 vergleichbar (Wehrli *et al.*, 1993). PAT-2 besitzt im humanen System die größte Homologie zu α_5 bzw. α_8 -Untereinheiten, in *Drosophila melanogaster* zur α PS2-Untereinheit (N.H. Brown, 2000). PAT-3 besitzt die größte Homologie zu der β_1 -Untereinheit in Vertebraten (Abb. 57). Mutationsanalysen der extrazellulären Domäne ergaben Defekten in der Morphogenese der Gonaden sowie Defekte in der Muskelstruktur. Unkoordinierten Bewegungen und Defekte bei der Eiablage sind die Folge (M. Lee *et al.*, 2001). Manche Mutationen in PAT-3 führen auch zu einem Entwicklungsstopp aufgrund einer fehlenden Ausbildung der Körpermuskulatur (McDonald *et al.*, 1998). Dieses Erscheinungsbild wird als PAT (paralyzed arrested elongation at two-fold) Phänotyp bezeichnet und gab dem Protein auch seinen Namen.

Aufgrund dieser Daten erschien eine Interaktion von grp-1 mit einem der PAT-3-Heterodimeren relativ gering. Durch Analysen im Hefe-System (5.17.5) konnte schließlich eine Interaktion

zwischen grp-1 und PAT-3 ausgeschlossen werden. Das Cytohesin-Homolog grp-1 hat in *C.elegans* keinen Einfluß auf Zell/Zell- bzw. Zell/Matrix-Interaktionen, die über Integrine vermittelt werden und ist aus diesem Grund mit hoher Wahrscheinlichkeit funktional kein direktes Homolog für Cytohesin-1.

Andere Interaktionspartner stellen sicherlich z.B. Glutamatrezeptoren an Synapsen dar, die auch in *C.elegans* exprimiert werden. Für Cytohesin-2 wurde bereits eine solche Interaktion beschrieben (Kitano *et al.*, 2002). Für die stabile Interaktion war zusätzlich das Adaptermolekül GRASP nötig.

Interessanter Weise kann in *C.elegans* kein Homolog zu GRASP bzw. CYTIP identifiziert werden. Möglicher Weise werden unterschiedliche Adaptermoleküle exprimiert, die Cytohesin an unterschiedliche Orte dirigieren können. So wurde 2003 von Venkateswarlu mit IPCEF1 ein weiteres Molekül beschrieben, welches an die „coiled-coil“-Domäne von Cytohesin-1 binden kann, nicht jedoch eine PDZ-Domäne, sondern eine PH-Domäne besitzt. In *C.elegans* ist bisher weder der (Ko-)Rezeptor noch ein Adaptermolekül für grp-1 (Cytohesin) identifiziert worden. Die Funktion von grp-1 ist daher noch völlig unklar. Im Falle der Expression in Nervenzellen könnte grp-1 jedoch eine Rolle bei der Ausbildung von Zell/Zell-Kontakten in Synapsen spielen.

6.10.3 grp-1 ein elementares Protein in *C.elegans*

Für die Funktionsanalyse von Proteinen *in vivo* werden Gene gezielt ausgeschaltet oder derart verändert, daß deren Funktionen blockiert werden. Die dabei generierten Phänotypen lassen dann oft Rückschlüsse auf Signalwege und Funktionsorte der zu untersuchenden Proteine zu. Neben dem „Gen-Knockout“ (siehe 5.17.8), der bei Säugetieren durch homologe Rekombination erreicht wird und Gene gezielt auf der Stufe der genomischer DNA manipuliert, stellt die „RNA-Interferenz-Methode“ eine interessante Alternative dar. Der Mechanismus basiert auf einem einfachen Antisense-Mechanismus der von der Hybridisation zwischen injizierter RNA und endogenem mRNA-Transkript resultiert und somit eine Transkription in eine Aminosäuresequenz unterbindet. Aufgrund der hohen Stabilität der dsRNA wird diese auch an die nächste Generation der Tiere weitergegeben. Auf diese Weise ist es möglich *C.elegans* Tiere in allen Lebensstadien zu untersuchen. Im *C.elegans* System wird ein „Gen-Knockout“ nicht durch homologe Rekombination erreicht, sondern aufgrund der kurzen Regenerationszeit und hohen Nachkommenzahl durch chemische Mutagenisierung und ein anschließendes „Screeningverfahren“ (4.4.4.1).

Nach Injektion zweier unterschiedlicher dsRNA-Konstrukten (Abb. 61) konnte keine *C.elegans*-Tiere mit auffälligen Phänotypen entdeckt werden. Alle untersuchten Tiere zeigten keine Abweichungen in der Morphologie und Wachstum von Wildtyp-Tieren. Ein Problem bei dieser Methode ist jedoch, daß nicht immer alle Zellen, insbesondere Nervenzellen, die dsRNA aufnehmen und somit die Blockierung der mRNA nicht immer 100%-ig erfolgt und schwache Phänotypen nicht erkannt werden können.

Aus diesem Grund war besonders der „Gen-Knockout“ von besonderem Interesse. Wie gezeigt werden konnte, wurden Tiere mit einer 1952 langen Deletion im grp-1 Gen detektiert. Die Mutation

deckt ca. 2/3 des Gens vom C-terminalen Ende ab (vgl. Abb. 64). Heterozygote Tiere zeigten jedoch keinen auffallenden Phänotypen. Durch Kreuzungsexperimente (4.4.2.1) von heterozygoten Männchen mit heterozygoten Hermaphroditen wurde anschließend versucht homozygote Tiere zu generieren. Leider war es nicht möglich homozygote Tiere zu erhalten, so daß der Phänotyp als letal bezeichnet werden muß. Es ist anzunehmen, daß *grp-1* in *C.elegans* ein essentielles Gen darstellt. Die Expressionsanalysen von *grp-1* zeigten bereits in frühen Stadien (bereits in den Eiern im Muttertier) der Entwicklung hohe Expressionsdichten. Es ist anzunehmen, daß der Ausfall des Gens die Entwicklung bzw. Differenzierung von Zellen nachhaltig beeinflußt und zu einem Abbruch der Entwicklung führt.

7 Zusammenfassung

Adhäsionsvorgänge von Leukozyten spielen eine wichtige Rolle bei den verschiedensten biologischen Prozessen. Die Adhäsionsinteraktionen können Signalkaskaden aktivieren, die Funktionen wie die Zellmigration, Proliferation und Reifung von T-Lymphozyten steuern. Die Zellen des Immunsystems müssen schnell auf körperfremde Eindringlinge reagieren können und Adhäsionsvorgänge zwischen Zellen bzw. zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix effektiv regulieren. Um jeden Infektionsherd im Körper zu erreichen, benutzen die Immunzellen die Lymph- und Blutbahnen, können diese Systeme aber verlassen (Diapedese) und durch Gewebe migrieren. Am Infektionsort interagieren die Immunzellen mit infizierten Zellen und starten Vernichtungsprogramme. Weiterhin präsentieren antigenpräsentierende Zellen im Lymphknoten ihre Antigene vorbeiziehenden T-Zellen, die bei korrekter Antigenerkennung zu T-Effektorzellen proliferieren.

Bei all diesen regulierten Adhäsionsreaktionen spielen besonders die Integrine eine große Rolle. Von besonderem Interesse ist hierbei das Heterodimer LFA-1 (CD11a/CD18). LFA-1 wird nur auf Leukozyten exprimiert und bindet an die Liganden ICAM-1,-2,-3 der Immunglobulinsuperfamilie. Die kontrollierte Adhäsion bzw. Deadhäsion von Leukozyten bedarf einer spezifischen Regulation des LFA-1-Integrins und die Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser Vorgänge ist von großem Interesse. Die Bindung von Integrinen an ihre Liganden ist meist nicht konstitutiv, sondern ist von Aktivierungsprozessen abhängig, die z.B. durch andere Oberflächenrezeptoren initiiert und zu intrazellulären Signalkaskaden führen.

Die LFA-1-vermittelte Zelladhäsion kann u.a. über den intrazellulären Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Cytohesin-1 aktiviert werden. Die Aktivierung wird dabei u.a. über Inositid-abhängige Membranrekrutierung von Cytohesin-1 kontrolliert.

In dieser Arbeit wurde ein mit Cytohesin-1 interagierendes Protein, CYTIP, identifiziert, welches durch Cytokine in hämatopoetischen Zellen vermehrt exprimiert wird. CYTIP interagiert über seine „coiled-coil“-Proteininteraktionsdomäne direkt mit der N-terminalen „coiled-coil“-Domäne von Cytohesin-1 und inhibiert vollständig die Zelladhäsion auf Integrinliganden. Bisher noch nicht identifizierte Signale aktivieren eine PKC-abhängige poly-Phosphorylierung von CYTIP. Dieser Vorgang führt ähnlich dem Mechanismus der Aktivierung von NF- κ B (Karin & Ben-Neriah, 2000) zur Ubiquitylierung von CYTIP und folglich zu dessen Abspaltung vom Adhäsionskomplex an der Plasmamembran. Cytohesin-1 ist jetzt aktiviert und reguliert unterstützt durch seine eigene Phosphorylierung den GDP-GTP-Austausch an kleinen ARF-Proteinen der Ras-Superfamilie. Diese Prozesse führen zu Aviditätsänderungen am LFA-1-Integrin durch Umlagerungen von Cytoskelettkomponenten und zur festen Bindung an den Liganden.

Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob und durch welche Signale *in vivo* eine aktivierte Adhäsion durch Cytohesin-1, wieder durch CYTIP inhibiert werden kann. Ein möglicher Mechanismus stellt einerseits eine Deubiquitylierung von abgespaltenen CYTIP dar. Andererseits könnte CYTIP direkt über Integrin-vermittelte Signale an die Plasmamembran bzw. Cytohesin-1 rekrutiert werden. Für die Translokation an die Plasmamembran ist eine intakte PDZ-Domäne nötig. Welche (Ko-)Rezeptoren oder membranassoziierte Proteine an die PDZ-Domäne von CYTIP binden ist bisher nicht geklärt.

Die starke Assoziation zwischen Cytohesin-1 und CYTIP sowie die Golgi-Lokalisation von CYTIP lassen eine kooperative Plasmamembranrekrutierung des Proteinkomplexes evt. über Transportvesikel vermuten. Bei der Bildung von Vesikel sind meist kleine GTPasen wie ARF1 beteiligt. Als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor könnte Cytohesin-1 diesen Prozess steuern und CYTIP als Adaptermolekül die Komponenten optimal positionieren. Da momentan weder die Vesikelart noch die *in vivo* GTPase für Cytohesin-1 bekannt ist, stellen diese Daten nur erste Theorien dar.

CYTIP stellt eine neue Molekülklasse dar, die durch direkte Interaktion mit Cytohesin-1 die LFA-1 vermittelte Zelladhäsion negativ regulieren kann. Durch zwei Proteininteraktionselemente („coiled-coil“-Domäne, PDZ-Domäne) stellt CYTIP ein Adaptermolekül dar, um die Signalkomponenten in einem Multiproteinkomplex zu koppeln.

Die Regulation der CYTIP/Cytohesin-1 Bindung ist Teil weiterführenden Experimente, wie auch die Identifikation des Bindungspartners für die PDZ-Domäne von CYTIP.

8 Literaturverzeichnis

Achstetter, T., Franzusoff, A., Field, C. & Schekman, R. (1988).

SEC7 encodes an unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **263**, 11711-11717.

Allan, B.B. & Balch, W.E. (1999).

Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments. *Science* **285**, 63-66.

Andrew, D., Shock, A., Ball, E., Ortlepp, S., Bell, J. & Robinson, M. (1993).

KIM185, a monoclonal antibody to CD18 which induces a change in the conformation of CD18 and promotes both LFA-1- and CR3-dependent adhesion. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2217-2222.

Aridor, M., Weissman, J., Bannykh, S., Nuoffer, C. & Balch, W.E. (1998).

Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J. Cell Biol.* **141**, 61-70.

Aridor, M., Fish, K.N., Bannykh, S., Weissman, J., Roberts, T.H., Lippincott-Schwartz, J. & Balch, W.E. (2001).

The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *J. Cell Biol.* **152**, 213-229.

Arnaout, M.A. (1990).

Leukozyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunol. Rev.* **114**, 145-180.

Avery, L. (1997).

Gene Knockout with Conventional Mutagens. <http://www.eatworms.swmed.edu>

Baum, P.D. & Garriga, G. (1997).

Neuronal Migrations and Axon Fasciculation Are Disrupted in *ina-1* Integrin Mutants. *Neuron* **19**, 51-62.

Balch, W.E., Kahn, R.A. & Schwaninger, R. (1992).

ADP-ribosylation factor is required for vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and the cis-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* **267**, 13053-13061

Bennett, V. & Gilligan, D.M. (1993).

The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 27-66.

Bently, G.A. & Mariuzza, R.A. (1996).

The structure of the T cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 563-590.

Beraud-Dufour, S., Paris, S., Chabre, M. & Antony, B. (1999).

Dual interaction of ADP ribosylation factor 1 with Sec7 domain and with lipid membranes during catalysis of guanine nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* **274**, 37629-37636.

Berlin, C., Bargatze, R.F., Campbell, J.J., von Andrian, U.H., Szabo, M.C., Hasslen, S.R., Nelson, R.D., Berg, E.L., Erlandsen, S.L. & Butcher, E.C. (1995).

alpha 4 integrins mediate Lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* **80**, 413-422.

Berton, G. & Lowell, C.A. (1999).

Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal* **11**, 621-635.

Betz, S.F., Schnuchel, A., Wang, H., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Lipsky, B.P., Harris, E.A.S., Staunton, D.E. & Fesik, S.W. (1998).

Solution structure of the cytohesin-1 (B2-1) Sec7 domain and its interaction with the GTPase ADP ribosylation factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7909-7914.

Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979).

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

Bloom, H. Beier, H. & Gross, H.S. (1987).

Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.

Boehm, M., Aguilar, R.C. & Bonifacino, J.S. (2001).

Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs). *EMBO J.* **20**, 6265-6276.

Boehm T., Hofer S., Winklehner P., Kellersch B., Geiger C., Trockenbacher A., Neyer S., Fiegl H., Ebner S., Ivarsson L., Schneider R., Kremmer E., Heufler C. and Kolanus W. (2003).

Attenuation of cell adhesion in Lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration. *EMBO J.* **22**(5),1014-1024.

Bonifacio, J.S. & Weissmann, A.M. (1998).

Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 19-57.

Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C. & Bredt, D.S. (1996).

Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* **84**, 757-767.

Brenner, S. (1974).

The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.

Brown, N.H. (2000).

Cell-cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm. *Matrix Biology* **19**, 191-201.

Burkhard, P., Stetefeld, J. & Strelow, S.V. (2001).

Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends in Cell Biol.* **11**, 82-88.

Burn, P., Kupfer, A. & Singer, S.J. (1988).

Dynamic membrane-cytoskeletal interactions: specific association of integrin and talin arises in vivo after phorbol ester treatment of peripheral blood Lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **85**, 497-501.

Cao, T.T., Deacon, H.W., Reczek, D., Bretscher, A. & van Zastrow, M. (1999).

A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **401**, 286-290.

Carr, M.W., Alon, R. & Springer, T.A. (1996).

The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of β_1 and β_2 integrins on T Lymphocytes. *Immunity* **4**, 179-187.

Casadaban, M.J. & Cohen, S.N. (1980).

Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**, 179-207.

Cebral, J.H.M., Petosa, C., Sutcliffe, M.J., Raza, S., Byron, O., Poy, F., Marfatia, S.M., Chishti, A.H. & Liddington, R.C. (1996).

Crystal structure of a PDZ domain. *Nature* **382**, 649-652.

Chakrabarti, S.R., Sood, R., Nandi, S. & Nucifora, G. (2000).

Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *PNAS* **97**, 13281-13285.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. (1994).

Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.

Chan, B.M., Kassner, P.D., Schiro, J.A., Byers, H.E., Kuppers, T.S. & Hemler, M.E. (1992).

Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin alpha subunit cytoplasmic domains. *Cell* **68**, 1051-1060.

- Chan, A.S., Mobley, J.L., Fields, G.B. & Shimizu, Y.** (1997).
CD7-mediated regulation of integrin adhesiveness on human T cells involves tyrosine phosphorylation-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* **159**, 934-942.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C.L. & Chabre, M.** (1996).
A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**, 481-484.
- Charlie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. & Prasher, D.** (1994).
Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805
- Chen, Y.P., O'Toole, T.E, Shipley, T., Forsyth, J., LaFlamme, S.E., Yamada, K.M., Shattil, S.J. & Ginsberg, M.H.** (1994).
"Inside-out" signal transduction inhibited by isolated integrin cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* **269**, 18307-18310.
- Cherfils, J., Menetrey, J., Mathieu, M., Le Bras, G., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Antonny, B. & Chardin, P.** (1998).
Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature* **392**, 101-105.
- Chien, Y.H., Jores, R. & Crowley, M.P.** (1996).
Recognition by gamma/delta T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 511-532.
- Chiu, S.J., Lee, M.Y., Chen, H.W., Chou, W.G. & Lin, L.Y.** (2002).
Germanium oxide inhibits the transition from G2 to M phase of CHO cells. *Chem. Biol. Interact.* **141**, 211-228.
- Cho, K.O., Hunt, C.A. & Kennedy, M.B.** (1992).
The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* disc-large tumor suppressor protein. *Neuron* **9**, 929-942.
- Claude, A., Zhao, B.P., Kuziemy, C.E., Dahan, S., Berger, S.J., Yan, J.P. Arnold, A.D. Sullivan, E.M. & Melancon, P.** (1999).
GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J. Cell Biol.* **146**, 71-84.
- Clipstone, N.A. & Crabtree, G.R.** (1992).
Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-Lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695-697.
- Crick, F.C.H.** (1953).
The packing of a-helices: simple coiled coils. *Acta Crystallographica* **6**, 689-697.

- Critchley, D.R., Holt, M.R., Barry, S.T., Priddle, H., Hemmings, L. & Norman, J.** (1999).
Integrin-mediated cell adhesion: the cytoskeletal connection. *Biochem. Soc. Symposium* **65**, 79-99.
- Darribere, T., Skalski, M., Cousin, H.L., Gaultier, A., Montmory, C. & Alfandari, D.** (2000).
Integrins: regulators of embryogenesis. *Biol Cell* **92**, 5-25.
- Dedhar, S. & Hannigan, G.E.** (1996).
Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 657-669.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S. & Hay, R.T.** (1998).
SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF κ B activation. *Mol. Cell* **2**, 223-239.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., Kemp, G.D. & Hay, R.T.** (1999).
Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 10618-10624.
- Dib, K. & Andersson, T.** (2000).
BETA 2 integrin signaling in Leukozytes. *Front. Biosci.* **5**, 438-451.
- Dierks H., Kolanus J. & Kolanus W.** (2001).
Aktin Cytoskeletal Association of Cytohesin-1 Is Regulated by Specific Phosphorylation of Its Carboxyl-terminal Polybasic Domain. *J. Biol. Chem.* **276**, 37472-37481.
- Diamond, M.S. & Springer, T.A.** (1994).
The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr. Biol.* **4**, 506-517.
- Dohmen, R.J., Stappen, R., McGrath, J.P., Forrova, H., Kolarov, J., Goffeau, A. & Varshavsky, A.** (1995).
An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J. Biol. Chem.* **270**, 18099-18109.
- Donaldson, J.G. & Jackson, C.L.** (2000).
Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 475-482.
- Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. & MacKinnon R.** (1996).
Crystal structure of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* **85**, 1067-1076.
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M.I. & Stahl, P.D.** (1995).
A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* **267**, 1175-1178.

- D'Souza-Schorey, C., Boshans, R.L., McDonough, M., Stahl, P.D. & van Aelst, L.** (1997).
A role for POR1, a Rac1-interAKting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* **16**, 5445-5454.
- D'Souza-Schorey, C., van Donselaar, E., Hsu, V.W., Yang, C., Stahl, P.D. & Peters, P.J.** (1998).
Arf6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J. Cell Biol.* **140**, 603-616.
- Drake, M.T., Zhu, Y. & Kornfeld, S.** (2000).
The assembly of AP-3 adaptor complex-containing clathrin-coated vesicles on synthetic liposomes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3723-3736.
- Dransfield, I. & Hogg, N.** (1989).
Regulated expression of Mg<sup>2+</sup> binding epitope on Leukozyte integrin alpha subunits. *EMBO J.* **8**, 3759-3765.
- Dransfield, I., Cabanas, C., Craig, A. & Hogg, N.** (1992).
Divalent cation regulation of the function of the Leukozyte integrin LFA-1. *J. Cell Biol.* **116**, 219-226.
- Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V. Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de The, H., Jay, R.T. & Freemont, P.S.** (1999).
SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J. Cell Sci.* **112**, 281-393.
- Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A. & Springer, T.A.** (1986).
Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence moleculae (ICAM-1). *J. Immunol.* **137**, 245-254.
- Dustin, M.L. & Springer, T.A.** (1989).
T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**, 619-624.
- Dustin, M.L. & Springer, T.A.** (1991).
Role of Lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 27-66.
- Edelmann, G.M. & Crossin, K.L.** (1991).
Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 155-190.

Edwards, C.P., Champe, M., Gonzalez, T., Wessinger, M.E., Spencer, S.A., Presta, L.G., Berman, P.W. & Bodary, S.C. (1995).

Identification of amino acids in the CD11a I-domain important for binding of the Leukozyte functionassociated antigen-1 (LFA-1) to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J. Biol. Chem.* **270**, 12635-12640.

Eigenthaler, M., Hofferer, L., Shattil, S.J. & Ginsberg, M.H. (1997).

A conserved sequence motif in the integrin beta3 cytoplasmic domain is required for its specific interaction with beta3-endonexin. *J. Biol. Chem.* **272**, 7693-7698.

Everett, R.D., Earnshaw, W.C., Findlay, J. & Lomonte, P. (1999).

Specific destruction of kinetochore protein CENP-C and disruption of cell division by herpes simplex virus immediate-early protein Vmw110. *EMBO J.* **18**, 1526-1538.

Falkner, F.G. & Moss, B. (1988).

Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J Virol* **62**: 1849-54.

Fields, S. & Song, O. (1989).

A novel genetic system to detect protein-protein interaction. *Nature* **340**, 245-246.

Fields, S. & Sternglanz, R. (1994).

The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* **10**, 286-292.

Filardo, E.J. & Cheresh, D.A. (1994).

A beta turn in the cytoplasmic tail of the integrin alpha v subunit influences conformation and ligand binding of alpha v beta 3. *J. Biol. Chem.* **269**, 4641-4647.

Fire, A. (1986).

Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **5**, 10.

Fire, A., Harrison, S., & Dixon, D. (1990).

A modular set of *lacZ* fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **93**, 189-198.

Fire, A., Kondo, K. & Waterson, R. (1990).

Vectors for low copy transformation of *C.elegans*. *Nucl. Acids Res.* **18**, 4269-4270.

Fire, A., Albertson, D., Harrison, S. & Moerman, D. (1991).

Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C.elegans* muscle. *Development* **113**, 503-514.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998).

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **39**, 806-811.

Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S. (1995).

Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg<sup>2+</sup> levels. *J. Biol. Chem.* **270**, 1337-1341.

Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S. (1996).

Myristoylation-facilitated binding of the G protein ARF1GDP to membrane phospholipids is required for its activation by a soluble nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 1573-1578.

Franco, M., Boretto, J., Robineau, S., Monier, S., Goud, B., Chardin, P. & Chavier, P. (1998).

ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 9926-9931.

Franco, M., Peters, P.J., van Boretto, J.D.E., Neri, A., D'Souza, S.C. & Chavier, P. (1999).

EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and Aktin cytoskeleton organisation. *EMBO J.* **18**, 1480-1491.

Frank, S., Upender, S., Hansen, S.H. & Casanova, J.E. (1998a).

ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6. *J. Biol. Chem.* **273**, 23-27.

Frank, S.R., Hatfield, J.C. & Casanova, J.E. (1998b).

Remodeling of the Aktin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADPribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3133-3146.

Franke, T.F., Kaplan, D.R. & Cantley L.C. (1997).

PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**, 435-437

Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley L.C. & Toker A. (1997).

Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**, 665-668.

Franzusoff, A. & Schekman, R. (1989).

Functional compartments of the yeast Golgi apparatus are defined by the sec7 mutation. *EMBO J.* **8**, 2695-2702.

Frech, M., Andjelkovic, M., Ingley, E., Reddy, K.K., Falck, J.R. & Hemmings, B.A. (1997).

High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 8474-8481.

Fuortes, M., Jin, W.W. & Nathan, C. (1994).

Beta 2 integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* **127**, 1477-1483.

Gadina, M., Hilton, D., Johnston, J.A., Morinobu, A., Lighvani, A., Zhou, Y.J., Visconti, R. & O'Shea, J.J. (2001).

Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 363-373.

Gahmberg, C.G., Tolvanen, M. & Kotovuori, P. (1997).

Leukozyte adhesion-structure and function of human Leukozyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur. J. Biochem.* **245**, 215-232.

Ganpule, G., Knorr, R., Miller, J.M., Carron, C.P. & Dustin, M.L. (1997).

Low affinity of cell surface Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) generates selectivity for cell-cell interactions. *J. Immunol.* **159**, 2685-2692.

Garcia, P., Gupta, R., Shah, S., Morris, A.J., Rudge, S.A., Scarlata, S., Petrova, V., McLaughlin, S. & Rebecchi, M.J. (1995).

The pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5,-bisphosphate in bilayer membranes. *Biochemistry* **34**, 16228-16234.

Garnier, J., Gibrat, J.F. & Robson, B. (1996).

GOR secondary structure prediction method version IV. *Methods in Enzymology* **266**, 540-553.

Geiger, C., Nagel, W., Boehm, T., van Kooyk, Y., Figor, C.G., Kremmer, E., Hogg, N., Zeitlmann, L., Dierks, H., Weber, K.S.C & Kolanus, W. (2000).

Cytohesin-1 regulates β -2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF funktion and interaction with LFA-1. *EMBO Journal* **19**, 2525-2536.

Geourjon, C. & Deleage, G. (1995).

SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.* **11**, 681-684.

Gettner, S.N., Kenyon, C. & Reichardt, L.F. (1995).

Characterization of beta *pat-3* heterodimers, a family of essential integrin receptors in *C.elegans*. *J. Cell Biol.* **129**, 1127-1141.

Gluzman, Y. (1981).

SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182.

- Goldberg, J.** (1998).
Struktural basis for activation of ARF GTPase: mechanism of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* **95**, 237-248.
- Gong, L., Millas, S., Maul, G.G. & Yeh, E.T.** (2000).
Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J. Biol. Chem.* **275**, 3355-3359.
- Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Madrid, F.** (1999)
Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol.* **19**, 389-429.
- Grotewiel, M.S., Beck, C.D., Wu, K.H., Zhu, X.R. & Davis, R.L.** (1998).
Integrin-mediated short-term memory in *Drosophila*. *Nature* **391**, 455-460.
- Guan, J.L.** (1997).
Focal adhesion kinase in integrin signaling. *Matrix Biol.* **16**, 195-200.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. & Brent, R.** (1993).
Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**, 791-803.
- Haas, J., Park, E.C. & Seed, B.** (1996).
Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol.* **6**, 315-324.
- Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzler, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., Weinman, E.J., Grinstein, S. & Lefkowitz, R.J.** (1998).
The β 2-adrenergic receptor interacts with the Na^+/H^+ -exchanger regulatory factor to control Na^+/H^+ exchange. *Nature* **392**, 626-630.
- Hanahan, D.** (1983).
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C. & Dedhar, S.** (1996).
Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**, 91-96.
- Harris, B.Z. & Lim, W.A.** (2001).
Mechanism and role of PDZ domains in sigaling complex assembly. *J. Cell Sci.* **114**, 3219-3231.
- Hata, Y., Butz, S. & Südhof, T.C.** (1996).
CASK: a novel *dlg*/PSD-95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins. *J. Neurosci.* **16**, 2488-2494.

- Hayashi, Y., Haimovich, B., Reszka, A., Boettiger, D. & Horwitz, A.** (1990).
Expression and function of chicken integrin beta 1 subunit and its cytoplasmic domain mutants in mouse NIH 3T3 cells. *J. Cell Biol.* **110**, 175-184.
- Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., Hall, D.H. & Stern, B.D.** (1987).
Genetics of cell and axon migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **100**, 365-382.
- Heilker, R., Spiess, M. & Crottet, P.** (1999).
Recognition of sorting signals by clathrin adaptors. *BioEssays* **21**, 558-567.
- Heim, R., Prasher, D. & Tsien, R.** (1994).
Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 12501-12504.
- Heim, R., Cubitt, A., & Tsien, R.** (1996).
Improved Green Fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
- Hibbs, M.L., Jakes, S., Stacker, S.A., Wallace, R.W. & Springer, T.A.** (1991).
The cytoplasmic domain of the integrin Lymphocyte function-associated antigen 1 beta subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *J. Exp. Med.* **174**, 1227-1238.
- Hibbs, M.L., Xu, H., Stacker, S.A., & Springer, T.A.** (1991).
Regulation of adhesion of ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit. *Science* **251**, 1611-1613.
- Hicke, L.** (1997).
Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *FASEB J.* **11**, 1215-1226.
- Hillier, B.J., Christopherson, K.S., Prehoda, K.E., Bredt, D.S. & Lim, A.W.** (1999).
Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* **284**, 812-815.
- Hmama, Z., Knutson, K.L., Herrera-Velitz, P., Nandan, D. & Reiner N.E.** (1999).
Monocyte adherence induced by lipopolysaccharide involves CD14, LFA-1, and cytohesin-1. Regulation by Rho and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 1050-1057.
- Hogg, N., Landis, R.C., Bates, P.A., Stanley, P. & Randi, A.M.** (1994).
The sticking point: how integrins bind to their ligands. *Trends Cell Biol.* **4**, 379-382.
- Hogg, N., Smith, A., McDowall, A., Giles, K., Stanley, P., Laschinger, M. & Henderson, R.** (2004).
How T cells use LFA-1 to attach and migrate. *Immun. letters* **92**, 51-54.

Holmes, D.S. & Quigley, M. (1981).

A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.

Honda, A., Nogami, M., Yohozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A.J., Frohman, M.A. & Kanaho, Y. (1999).

Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* **99**, 521-532.

Hopp, T., et al. (1988).

A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *BioTechnology* **6**, 1204-1210 (1988).

Hosaka, M., Toda, K., Takasu, H., Torri, S., Murakami, K. & Nakayama, K. (1996).

Structure and intracellular localization of mouse ADP-ribosylation factors type 1 to type 6 (ARF1-ARF6). *J. Biochem.* **120**, 813-819.

Hsueh, Y.P., Kim, E. & Sheng, M. (1997).

Disulfide-linked head-to-head multimerization in the mechanism of ion channel clustering by PSD-95. *Neuron* **18**, 803-814.

Hsueh, Y.P., Yang, F.C., Kharazia, V., Naisbitt, S., Cohen, A.R., Weinberg, R.J. & Sheng, M. (1998).

Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses. *J. Cell. Biol.* **142**, 139-151.

Huang, C., Zang, Q., Takagi, J. & Springer, T.A. (2000).

Structural and functional studies with antibodies to the integrin beta 2 subunit. A model for the I-like domain. *J. Biol. Chem.* **275**, 21514-21524.

Hughes, P.E., O'Toole, T.E., Ylanne, J., Shattil, S.J. & Ginsberg, M.H. (1995).

The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity. *J. Biol. Chem.* **270**, 12411-12417.

Huth, J.R., Olejniczak, E.T., Mendoza, R., Liang, H., Harris, E.A., Lupher, M.L. Jr., Wilson, A.E., Fesik, S.W. & Staunton, D.E. (2000).

NMR and mutagenesis evidence for an I domain allosteric site that regulates Lymphocyte function-associated antigen 1 ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 5231-5236.

Hynes, R.O. (1992).

Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.

Hynes, R.O. (1999).

Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* **9**, M33-M37.

Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T.W. & Sudhof, T.C. (1997).

Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* **277**, 1511-1515.

Isacsson, U. & Watermark, G. (1974).

Anal. Chim. Acta. **68**, 339-362.

Ish Horowicz, D. & Burke, J.F. (1981).

Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2989-2998.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983).

Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.

Izant, J. & Weintraub, H. (1984).

Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* **36**, 1007-1015.

Jensen, F.C., Girardi, A.J., Gilden, R.V. & Koprowski, H. (1964).

Infection of human and simian tissue cultures with Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **52**, 53-59.

Johnson, E.S., Schwienhorst, I., Dohmen, R.J. & Blobel, G. (1997).

The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J.* **16**, 5509-5519.

Jones, S.L., Wang, J., Turck, C.W. & Brown, E.J. (1998).

A role for the Aktin-bundling protein L-plastin in the regulation of Leukozyte integrin function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9331-9336.

Karin, M. & Ben-Neriah, Y. (2000).

Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Ann. Rev. Immun.* **18**, 621-663.

Kashiwagi, H., Schwartz, M.A., Eigenthaler, M., Davis, K.A., Ginsberg, M.H. & Shattil, S.J. (1997).

Affinity modulation of platelet integrin alpha IIb beta3 by beta3-endonexin, a selective binding partner of the beta3 integrin cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* **137**, 1433-1443.

Kassner, P.D. & Hemler, M.E. (1993).

Interchangeable alpha chain cytoplasmic domains play a positive role in control of cell adhesion mediated by VLA-4, a beta 1 integrin. *J. Exp. Med.* **178**, 649-660.

Kassner, P.D., Kawaguchi, S. & Hemler, M.E. (1994).

Minimum alpha chain cytoplasmic tail sequence needed to support integrin-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* **269**, 19859-19867.

- Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y.N. & Sheng, M.** (1995).
Clustering of Shaker-type K<sup>+</sup> channels by interaction with family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* **378**, 85-88.
- Kim, Y.H., Choi, C.Y. & Kim, Y.** (1999).
Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12350-12355.
- Kim, K.I., Baek, S.H., Nishimori, S., Suzuki, T., Uchida, S., Shimbara, N., Saitoh, H., Tanaka, K. & Chung, C.H.** (2000).
A new SUMO-1 specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. *J. Biol. Chem.* **275**, 14102-14106.
- Kimble, J., Hodgkin, J., Smith, T. & Smith, J.** (1982).
Suppression of an amber mutation by microinjection of suppressor tRNA in *C. elegans*. *Nature* **299**, 456-458.
- Kimble, J. & Sharrock, W.J.** (1983).
Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **96**, 189-196.
- Kitano, J., Kimura, K., Yamazaki, Y., Soda, T., Shigemoto, R., Nakajima, Y. & Nakanishi, S.** (2002).
Tamalin, a PDZ Domain-Containing Protein, Links a Protein Complex Formation of Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors and the Guanine Nucleotide Exchange Factor Cytohesins. *J. of Neurosci.* **22**, 1280-1289.
- Klarlund, J.K., Guilherme, A., Holik, J.J., Virbasius, J.V., Chawla, A. & Czech, M.P.** (1997).
Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* **275**, 1927-1930.
- Klarlund, J.K., Rameh, L.E., Cantley, L.C., Buxton, J.M., Holik, J.J., Sakelis, C., Patki, V., Corvera, S. & Czech, M.P.** (1998).
Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 1859-1862.
- Kneller, D.G., Cohen, F.E. & Langridge, R.** (1990).
Improvements in Protein Secondary Structure Prediction by an Enhanced Neural Network. *J. Mol. Biol.*, **214**, 171-182.
- Knorr, T., Nagel, W. & Kolanus, W.** (2000).
Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system. *Eur. J. Biochem.* **267**, 378437-378491.

Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H. & Seed, B. (1996).

$\alpha_L\beta_2$ Integrin/LFA-1 Binding to ICAM-1 Induced by Cytohesin-1, a Cytoplasmic Regulatory Molecule. *Cell* **86**, 233-242.

Kolanus, W. & Seed, B. (1997).

Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 725-731.

Kozlov, G., Gehring, K. & Eckil, I. (2000).

Solution structure of the PDZ2 domain from human phosphatase hPTP1E and its interactions with C-terminal peptides from the Fas receptor. *Biochemistry* **39**, 2572-2580.

Kumar, C.C. (1998).

Signaling by integrin receptors. *Oncogene* **17**, 365-373.

Laemmli, U.K. (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Landis, R.C., Bennett, R.I. & Hogg, N. (1993).

A novel LFA-1 activation epitope maps to the I domain. *J. Cell Biol.* **120**, 1519-1527.

Langille, S.E., Patki, V., Klarlund, J.K., Buxton, J.M., Holik, J.J., Chawla, A., Corvera, S. & Czech, M.P. (1999).

ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. *J. Biol. Chem.* **274**, 27099-27104.

LaFlamme, S.E., Homan, S.M., Bodeau, A.L. & Mastrangelo, A.M. (1997).

Integrin cytoplasmic domains as connectors to the cell's signal transduction apparatus. *Matrix Biol.* **16**, 153-163.

Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A. & Liddington, R. (1995).

Crystal structure of the A domain from the β subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **80**, 631-638.

Lee, M., Cram E.J. & Schwarzbauer, J.E. (2001).

Roles for beta(pat-3) integrins in development and function of *Caenorhabditis elegans* muscles and gonads. *J. Biol. Chem.* **28**, 36404-36410.

Lee, S.Y. & Pohajdak, B. (2000).

N-terminal targeting of guanine nucleotide exchange factors (GEF) for ADP ribosylation factors (ARF) to the Golgi. *J. Cell Sci.* **113**, 1883-1889.

- Lee, S.Y., Mansour, M. & Pohajdak, B.** (2000).
B2-1, a Sec7- and pleckstrin homology domain-containing protein, localizes to the Golgi complex. *Exp. Cell Res.* **256**, 515-521.
- Leitinger, B. & Hogg, N.** (2000).
Effects of I domain deletion on the function of the beta2 integrin Lymphocyte function-associated antigen-1. *Mol. Biol. Cell* **11**, 677-690.
- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. & Schlessinger, J.** (1996).
PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* **85**, 621-624.
- Lemmon, M.A. & Ferguson, K.M.** (1998).
Pleckstrin homology domains. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **228**, 39-74
- Levine, T.P. & Munro, S.** (1998).
The pleckstrin homology domain of oxysterol-binding protein recognises a determinant specific to Golgi membranes. *Curr. Biol.* **8**, 729-739.
- Lewis, J.M. & Schwartz, M.A.** (1995).
Mapping in vivo associations of cytoplasmic proteins with integrin beta 1 cytoplasmic domain mutants. *Mol. Biol. Cell* **6**, 151-160.
- Ley, K.** (1996).
Molecular mechanisms of Leukozyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc. Res.* **32**, 733-742.
- Lodish, H., Berk, S.L., Zipursky, P., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J.E.** (2001).
Molekulare Zellbiologie. 4.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag
- Loftus, J.C., Smith, J.W. & Ginsberg, M.H.** (1994).
Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face. *J. Biol. Chem.* **269**, 25235-25238.
- Lopata, M.A., Cleveland, D.W., Sollner & Webb, B.** (1984).
High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res.* **12**, 5707-5717.
- Lowell, C.A, Fumagalli, L. & Berton, G.** (1996).
Deficiency of Scr family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J. Cell Biol.* **133**, 895-910.
- Lub, M., van Kooyk, Y. & Figdor, C.G.** (1995).
Ins and outs of LFA-1. *Immunol. Today* **16**, 479-83.

- Lupas, A., Van Dyke, M., & Stock, J.** (1991).
Predicting Coiled Coils from Protein Sequences. *Science* **252**, 1162-1164.
- Li, L.L. & Yeh, N.H.** (1992).
Cell cycle-dependent migration of the DNA-binding protein Ku80 into nucleoli. *Exp. Cell Res.* **199**, 262-268.
- Liu, L. & Pohajdak, B.** (1992).
Cloning and sequencing of a human cDNA from cytolytic NK/T cells with homology to yeast SEC7. *Biochim. Biophys. Acta.* **1132**, 75-78.
- Mackett, M., Smith, G.L. & Moss, B.** (1982).
Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 7415-7419.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. & Melchior, F.** (1997).
A Small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting Ran GAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**, 97-107.
- Malissen, B. & Malissen, M.** (1996).
Functions of TCR and pre-TCR subunits: Lessons from gene ablation. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 383-393.
- Marsour, M., Lee, S.Y. & Pohajdak, B.** (2002).
The N-terminal Coiled coil Domain of the Cytohesin/ARNO Family of Guanine Nucleotide Exchange Factors Interacts with the Scaffolding Protein CASP. *J. Biol. Chem.* **277**, 32302-32309.
- Marafatia, S.M., Morais-Cabral, J.H., Kim, A.C., Byron, O. & Chishti, A.H.** (1997).
The PDZ domain of human erythrocyte p55 mediates its binding to the cytoplasmic carboxyl terminus of glycophorin C. Analysis of the binding interface by in vitro mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **272**, 24191-24197.
- Matsuda, S., Mikawa, S. & Hirai, H.** (1999).
Phosphorylation of serine-880 in GluR2 by protein kinase C prevents its C terminus from binding with glutamate receptor-interacting protein. *J. Neurochem.* **73**, 1765-1768.
- Mayer, G., Blind, M., Nagel, W., Bohm, T., Knorr, T., Jackson, C.L., Kolanus, W. & Famulok, M.** (2001).
Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4961-4965.

McDonald K.A. & Williams B.D. (1998).

Effects of constitutively activated and ligand binding deficient integrin beta subunits on muscle development in *C. elegans*. *Early 1998 Midwest Worm Meeting abstract 54*.

McClelland, J.L., & Rumelhart, D.E. (1988).

Explorations in Parallel Distributed Processing. *MIT Press, Cambridge MA*. **3**, 318-362.

McGilvray, I.D., Lu, Z., Wei, A.C., Dackiw, A.P., Marshall, J.C., Kapus, A., Levy, G. & Rotstein, O.D. (1998).

Murine hepatitis virus strain 3 induces macrophage prothrombinase fgl-2 through p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J.Biol. Chem.* **273**, 32222-32229.

McKay, D.B. & Steitz, T.A. (1981).

Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* **290**, 744-749.

Meacci, E., Tsai, S.C., Adamik, R., Moss, J. & Vaughan, M. (1997).

Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1745-1748.

Mellmann, I. (1996).

Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 575-625.

Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. & Ambros, V. (1991).

Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* **10**, 3959-3970.

Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K. & Yamada, K.M. (1995).

Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J.Cell Biol.* **131**, 791-805.

Monier, S., Chardin, P., Robineau, S. & Goud, B. (1998).

Overexpression of the ARF1 exchange factor ARNO inhibits the early secretory pathway and causes the disassembly of the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **111**, 3427-3436.

Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. (1998).

Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82-86

Morinaga, N., Tsai, S.C., Moss, J. & Vaughan, M. (1996).

Isolation of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP ribosylation factor (ARF) 1 and ARF3 that contains a Sec7-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**, 12856-12860.

Moss, J. & Vaughan, M. (1998).

Molecules in the ARF orbit. *J. Biol. Chem.* **273**, 21431-21434.

Mossessova, E., Gulbis, J.M. & Goldberg, J. (1998).

Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human arno and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell* **92**, 415-523.

Mould, A.P. (1996).

Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes. *J. Cell Sci.* **109**, 2613-2618.

Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987).

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.

Nagel, W., Zeitlmann, L., Schilcher, P., Geiger, C., Kolanus, J. & Kolanus, W. (1998a).

Phosphoinositide 3-OH Kinase Activates the β_2 Integrin Adhesion Pathway and Induces Membrane Recruitment of Cytohesin-1. *J. Biol. Chem.* **273**, 14853-14861.

Nagel, W., Schilcher, P., Zeitlmann, L. & Kolanus, W. (1998b).

The PH Domain and the Polybasic c Domain of Cytohesin-1 Cooperate specifically in Plasma Membrane Association and Cellular Funktion. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1981-1994.

Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J.C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R.J., Worley, P.F. & Sheng, M. (1999).

Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortAktin. *Neuron* **23**, 569-582.

Nakatsu, F. & Ohno, H. (2003).

Adaptor Protein Complexes as Key Regulators of Protein Sorting in the Post-Golgi-Network. *Cell Struc. Func.* **28**, 419-429.

Nevrivy, D.J., Peterson, V.J., Avram, D., Ishmael, J.E., Hansen, S.G., Dowell, P., Hruby, D.E., Dawson, M.I. & Leid M. (2000).

Interaction of GRASP, a Protein encoded by a Novel Retinoic Acid-induced Gene, with Members of the Cytohesin Family of Guanine Nucleotide Exchange Factors. *J. Biol. Chem.* **275**, 16827-16836.

Nielsen, M., Svejgaard, A., Skov, S., Dobson, P., Bendtzen, K., Geisler, C. & Odum, N. (1996).

IL-2 induces beta2-integrin adhesion via a wortmannin/LY294002-sensitive, rapamycin-resistant pathway. Phosphorylation of a 125-kilodalton protein correlates with induction of adhesion, but not mitogenesis. *J. Immunol.* **157**, 5350-5358.

Niethammer, M., Valtschanoff, J.G., Kapoor, T.M., Allison, D.W., Weinberg, T.M., Craig, A.M. & Sheng, M. (1998).

CRIP1, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *Neuron* **20**, 693-707.

Nilges, M. & Brunger, A.T. (1991).

Automated modeling of coiled coils: application to the GCN4 dimerization region. *Protein Eng.* **4**, 649-659.

Nishizuka, Y. (1984).

Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* **225**, 3171-3178.

Nishizuka, Y. (1986).

Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**, 305-312.

Norman, J.C., Jones, D., Barry, S.T., Holt, M.R., Cockcroft, S. & Critchley D.R. (1998).

ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fiber formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* **143**, 1981-1995.

Ogasawara, M., Kim, S.C., Adamik, R., Togawa, A., Ferrans, V.J., Takeda, K., Kirby, M., Moss, J. & Vaughan, M. (2000).

Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *J. Biol. Chem.* **275**, 3221-3230.

Oguro, M., Suzuki-Hori, C., Nagano, H., Mano, Y. & Ikegami, S. (1979).

The mode of inhibitory action by aphidicolin on eukaryotic DNA polymerase alpha. *Eur. J. Biochem.* **97**, 603-607.

Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M.C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T. & Bonifacino, J.S. (1995).

Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**, 1872-1875.

Okkema, P., White-Harrison, S., Plunger, V., Aryana, A., & Fire, A. (1993).

Sequence requirements for myosin gene expression and regulation in *C.elegans*. *Genetics* **135**, 385-404.

O'Neill, G.M., Fashena, S.J. & Golemis, E.A. (2000).

Integrin signalling: a new Cas(t) of characters enters the stage. *Trends Cell Biol.* **10**, 111-119.

Ortlepp, S., Stephens, P.E., Hogg, N., Figdor, C.G. & Robinson, M.K. (1995).

Antibodies that activate beta 2 integrins can generate different ligand binding states. *Eur. J. Immunol.* **25**, 637-643.

- O'Shea, E.K., Rutkowski, R. & Kim PS.** (1989).
Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* **243**, 538-542.
- O'Toole, T.E., Mandelman, D., Forsyth, J., Shattil, S.J., Plow, E.F. & Ginsberg, M.H.** (1991).
Modulation of the affinity of integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of alpha IIb. *Science* **254**, 845-847.
- O'Toole, T.E., Katakiri, Y., Faull, R.J., Peter, K., Tamura, R., Quaranta, V., Loftus, J.C., Shattil, S.J. & Ginsberg, M.H.** (1994).
Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J. Cell. Biol.* **124**, 1047-1059.
- O'Toole, T.E.** (1997).
Integrin signaling: building connections beyond the focal contact? *Matrix Biol.* **16**, 165-171.
- Pacheco-Rodriguez, G., Meacci, E., Vitale, N., Moss, J. & Vaughan, M.** (1998).
Guanine nucleotide exchange on ADP-ribosylation factors catalyzed by cytohesin-1 and its Sec7 domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 26543-26548.
- Pacheco-Rodriguez, G., Patton, W.A., Adamik, R., Yoo, H.S., Lee, F.J., Zhang, G.F. Moss, J. & Vaughan, M.** (1999).
Structural elements of ADP-ribosylation factor 1 required for functional interaction with cytohesin-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 12438-12444.
- Palacios, F., Price, L., Schweitzer, J., Collard, J.G. & D'Souza-Schorey, C.** (2001).
An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *EMBO J.* **20**, 4973-4986.
- Panicali, D. & Paoletti, E.** (1982).
Construction of poxvirus as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 4927-4931.
- Pasqualini, R. & Hemler, M.E.** (1994).
Contrasting roles for integrin beta 1 and beta 5 cytoplasmic domains in subcellular localization, cell proliferation, and cell migration. *J. Cell Biol.* **125**, 447-460.
- Pavalko, F.M. & LaRoche, S.M.** (1993).
Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the Aktin binding protein alpha-Aktinin. *J. Immunol.* **151**, 3795-3807.
- Pawson, T.** (1995).
Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573-580.

Peters, P.J., Hsu, V.W., Ooi, C.E., Finazzi, D., Teal, S.B., Oorschot, V., Donaldson, J.G. & Klausner, R.D. (1995).

Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J. Cell Biol.* **128**, 1003-1017.

Peyroche, A., Paris, S. & Jackson, C.L. (1996).

Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* **384**, 4794-4781.

Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. & Jackson, C.L. (1999).

Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: Involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol. Cell* **3**, 275-285.

Pitcher, J.A., Touhara, K., Payne, E.S. & Lefkowitz, R.J. (1995).

Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J. Biol. Chem.* **270**, 11707-11710.

Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z. & Donaldson, J.G. (1999).

ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical Aktin rearrangements. *J. Cell Sci.* **112**, 855-866.

Rameh, L.E., Arvidsson, A.K., Carraway, K.L., Couvillon, A.D., Rathbun, G., Crompton, A., VanRenterghem, B., Czech, M.P., Ravichandran, K.S., Burakoff, S.J., Wang, D.S., Chen, C.S. & Cantley, L.C. (1997).

A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* **272**, 22059-22066.

Reitnauer, P.J., DeMars, R. & Sondel, P.M. (1985).

The proliferative immune response to autologous Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. I. Studies with HLA haplotype loss variants demonstrate a role for MHC-linked genes. *Hum. Immunol.* **13**, 177-191.

Romeo, C. & Seed, B. (1991).

Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* **64**, 1037-1046.

Rothlein, R. & Springer, T.A. (1986).

The requirement for Lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic Leukozyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J. Exp. Med.* **163**, 1132-1149.

Ruden, D.M., Ma, J., Li, Y., Wood, K., Ptashne, M. (1991).

Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* **350**, 250-252.

Sager, P.R., Rothfield, N.L., Oliver, J.M. & Berlin, R.D. (1986).

A novel mitotic spindle pole component that originates from the cytoplasm during prophase. *J. Cell Biol.* **103**, 1863-1872.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985).

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988).

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Saitoh, H. & Hinchey, J. (2000).

Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers, SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J. Biol. Chem.* **275**, 6252-6258.

Salim, K., Bottomley, M.J., Querfurth, E., Zvelebil, M.J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R.L., Gigg, R., Smith, C.I., Driscoll, P.C., Waterfield, M.D. & Panayotou, G. (1996).

Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* **15**, 6241-6250.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989).

Molecular Cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sampath, R., Gallagher, P.J. & Pavalok, F.M. (1998).

Cytoskeletal interactions with the Leukozyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-Aktinin. *J. Biol. Chem.* **273**, 33588-33594.

Santy, L.C. & Casanova, J.E. (2001).

Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J. Cell Biol.* **154**, 599-610.

Schafer, D.A., D'Souza-Schorey, C. & Cooper, J.A. (2000).

Aktin assembly at membranes controlled by ARF6. *Traffic* **1**, 892-903.

Schierenberg, E. & Cassada, R. (1986).

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* - ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus. *Biologie in unserer Zeit* **16**, 1-7.

Schiestl, R.H. & Gietz, R.D. (1989).

High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**, 339-346.

Seed, B. (1987).

An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature* **329**, 840-842.

Seufert, W., Futcher, B. & Jentsch, S. (1995).

Role of a ubiquitin-conjugation enzyme in degradation of S- and M-phase cyclines. *Nature* **373**, 78-81.

Sharma, C.P., Ezzell, R.M. & Arnaout, M.A. (1995).

Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. *J. Immunol.* **154**, 3461-3470.

Shaw, G. (1996).

The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *BioEssays* **18**, 35-46.

Sheng, M. & Sala, C. (2001).

PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1-29.

Shieh, B.H. & Zhu, M.Y. (1996).

Regulation of the TRP Ca^{2+} channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* **16**, 991-998.

Shimizu, Y., Mobley, J.L., Finkelstein, L.D., Chan, A.S. (1995).

A role for phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of beta 1 integrin activity by the CD2 antigen. *J. Cell Biol.* **131**, 1867-1880.

Shimizu, Y., Hunt, S.W. 3rd. (1996).

Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase? *Immunol. Today* **17**, 565-573.

Sigal, A., Bleijs, D.A., Grabovsky, V., van Vliet, S.J., Dwir, O., Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Alon, R. (2000).

The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment. *J. Immunol.* **165**, 442-452.

Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988).

Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40

Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M. & Cantley, L.C. (1997).

Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **275**, 73-77.

Springer, T.A. (1990).

Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425-434.

Springer, T.A. (1994).

Traffic signals for Lymphocyte recirculation and Leukozyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314.

Stewart, M., Thiel, M. & Hogg, N. (1995).

Leukozyte integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 690-696.

Stewart, M.P., McDowall, A. & Hogg, N. (1998).

LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by Ca<sup>2+</sup>-dependent protease, calpain. *J. Cell Biol.* **140**, 699-707.

Stricker, N.L., Christopherson, K.S., Yi, B.A. Schatz, P.J., Raab, R.W., Dawes, G., Bassett, D.E., Jr., Bredt, D.S. & Li, M. (1997).

PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nat. Biotechnol.* **15**, 336-342.

Studier, F.W. & Moffat, B.A. (1986).

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. (1990).

Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.

Sulston, J. & Hodkin, J. (1988).

Methods In "The Nematode *Caenorhabditis elegans*". (ed. W.B. Wood) *Cold Spring Harbor Lab. Press*, Plainview, NY, 587-606.

Sussman, D.J. & Milman, G. (1984).

Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA. *Mol. Cell Biol.* **4**, 1641-1643.

Szoka, Tc:c. & Papahadjopoulos, D. (1978).

Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **75**, 4194-4198.

Tabor, S. & Richardson, C.C. (1985).

A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1074-1078.

- Takada, Y., Kamata, T., Irie, A., Puzon-McLaughlin, W. & Zhang, X.P.** (1997).
Structural basis of integrin-mediated signal transduction. *Matrix Biol.* **16**, 143-151.
- Takeya, R., Takeshige, K. & Sumimoto, H.** (2000).
Interaction of the PDZ Domain of human PICK1 with Class I ADP-Ribosylation Factors. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **267**, 149-155.
- Tang, P. Cheng, T.P., Agnello, D., Wu, C., Hissong, B.D., Watford, W.T., Ahn, H., Galon, J., Moss, J., Vaughan, M., O'Shea, J.J. & Gadina, M.** (2002).
Cybr, a cytokine-inducible protein that binds cytohesin-1 and regulates its activity. *PNAS* **99**, 2625-2629.
- Tanigawa, G., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Helms, J.B. & Rothman, J.E.** (1993).
Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coat vesicles. *Cellular Biochem.* **123**, 1265-1371.
- Teal, S.B., Hsu, V.W., Peters, P.J., Klausner, R.D. & Donaldson J.G.** (1993).
An activating mutation in ARF1 stabilizes coatamer binding to Golgi membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 3135-3138.
- Thornhill, M.H., Wellicome, S.M., Mahiouz, D.L., Lanchbury, J.S., Kyan-Aung, U. & Haskard, D.O.** (1991).
Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J. Immunol.* **146**, 592-598.
- Tian, L., Kilgannon, P., Yoshihara, Y., Mori, K., Gallatin, W.M., Carpen, O. & Gahmberg, C.G.** (2000).
Binding of T Lymphocytes to hippocampal neurons through ICAM-5 (telencephalin) and characterization of its interaction with the Leukozyte integrin CD11a/CD18. *Eur. J. Immunol.* **30**, 810-818.
- Tochio, H., Mok, Y.K., Zhang, Q., Mandal, P., Li, M. & Zhang, M.** (2000).
Formation of nNOS/PSD-95 PDZ dimer requires a performed β -finger structure from the nNOS PDZ domain. *J. Mol. Biol.* **6**, 359-370.
- Tominaga, T., Kita, Y., Satoh, A., Asai, S., Kato, K., Ishikawa, K., Horiuchi, T. & Takashi, T.** (1998).
Affinity and kinetic analysis of the molecular interaction of ICAM-1 and Leukozyte function-associated antigen-1. *J. Immunol.* **161**, 4016-4022.

Torres, R., Firestein, B.L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E.N., Huganir, R.L., Bredt, D.S., Gale, N.W. & Yancopoulos, G.D. (1998).

PDZ proteins bind cluster and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* **21**, 1453-1463.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.

Toye, B., Zhong, G.M., Peeling, R. & Brunham, R.C. (1990).

Immunologic characterization of a cloned fragment containing the species-specific epitope from the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* **58**, 3909-3913.

Tsai, S.C., Noda, M., Adamik, R., Moss, J. & Vaughan, M. (1987).

Enhancement of choleraen ADP-ribosyltransferase activities by guanyl nucleotides and a 19-kDa membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5139-5142.

Tsai, S.C., Adamik, R., Haun, R.S., Moss, J. & Vaughan, M. (1992).

Differential interaction of ADP-ribosylation factors 1, 3, and 5 with rat brain Golgi membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 9272-9276.

Tsunoda, S. & Zuker, C.S. (1999).

The organisation of INAD-signaling complexes by a multivalent PDZ domain protein in *Drosophila* photoreceptor cells ensures sensitivity and speed of signaling. *Cell Calcium* **26**, 165-171.

Valmu, L., Fagerholm, S., Suila, H. & Gahmberg, C.G. (1999).

The cytoskeletal association of CD11/CD18 Leukozyte integrins in phorbol ester-activated cells correlates with CD18 phosphorylation. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2107-2118.

Valmu, L., Hilden, T.J., van Willigen, G. & Gahmberg, C.G. (1999).

Characterization of beta2 (CD18) integrin phosphorylation in phorbol ester-activated T Lymphocytes. *Biochem. J.* **339**, 119-125.

van Kooyk, Y., van de Wiel-van Kemenade, P., Weder, P., Kuijpers, T.W. & Figdor, C.G. (1989).

Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T Lymphocytes. *Nature* **342**, 811-813.

van Kooyk, Y., Weder, P., Hogervorst, F., Verhoeven, A.J., van Seventer, G., te Velde, A.A., Borst, J., Keizer, G.D. & Figdor, C.G. (1991).

Activation of LFA-1 through a Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent epitope stimulates Lymphocyte adhesion. *J. Cell Biol.* **112**, 345-354.

- van Kooyk, Y., Weder, P., Heije, K., & Figdor, C.G.** (1994).
Extracellular Ca^{2+} modulates Leukozyte function-associated antigen-1 cell surface distribution on T Lymphocytes and consequently affects cell adhesion. *J. Cell Biol.* **124**, 1061-1070.
- van Kooyk, Y., van Vliet, S.J., & Figdor, C.G.** (1999).
The Aktin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *J. Biol. Chem.* **274**, 26869-26877.
- van Kooyk, Y. & Figdor, C.G.** (2000).
Avidity regulation of integrins: the driving force in Leukozyte adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 542-547.
- Venkateswarlu, K., Gunn-Moore, F., Oatey, P.B., Tavar, J.M. & Cullen, P.J.** (1998a).
Nerve growth factor- and epidermal growth factor-stimulated translocation of the ADP-ribosylation factor-exchange factor GRP1 to the plasma membrane of PC12 cells requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the GRP1 pleckstrin homology domain. *Biochem. J.* **335**, 139-146.
- Venkateswarlu, K., Oatey, P.B., Tavar, J.M. & Cullen, P.J.** (1998b).
Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Curr. Biol.* **8**, 463-466.
- Venkateswarlu, K., Gunn, M.F., Tavar, J.M. & Cullen, P.J.** (1999).
EGF- and NGF-stimulated translocation of cytohesin-1 to the plasma membrane of PC12 cells requires PI 3-Kinase activation and a functional cytohesin-1 PH domain. *J. Cell Sci.* **112**, 1957-1965.
- Venkateswarlu, K.** (2003).
Interaction Protein for Cytohesin Exchange Factor 1 (IPCEF1) Binds Cytohesin 2 and Modifies Its Activity. *J. Biochem. Chem.* **278**, 43460-43469.
- Vial, J.P., Belloc, F., Dumain, P., Besnard, S., Lacombe, F., Boisseau, M.R., Reiffers, J. & Bernard, P.** (1998).
Study of the apoptosis induced in vitro by antitumoral drugs on leukaemic cells. *Leuk Res.* **22**, 561.
- Vitale, N., Moss, J. & Vaughan, M.** (1998).
Molecular characterization of the GTPase-activating domain of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1). *J Biol Chem.* **273**, 2553-2560.
- Vitale, N., Pacheco-Rodriguez, G., Ferrans, V.J., Riemenschneider, W., Moss, J. & Vaughan, M.** (2000).
Specific functional interaction of human cytohesin-1 and ADP-ribosylation factor domain protein (ARD1). *J. Biol. Chem.* **275**, 21331-21339.

Vitale, N., Moss, J. & Vaughan, M. (2001).

Purification and properties of ARD1, an ADP-ribosylation factor (ARF)-related protein with GTPase-activating domain. *Methods Enzymol.* **329**, 324-334.

Wallace, R.B. & Miyada, C.G. (1987).

Oligonucleotide probes for the screening of recombinant DNA libraries. *Methods Enzymol.* **152**, 432-42.

Wan, L., Molly, S.S., Thomas, L., Lui, G., Xiang, Y., Rybak, S.L. & Thomas, G. (1998).

PACS-1 Defines a Novel Gene Family of Cytosolic Sorting Proteins Required for *trans*-Golgi Network Localisation. *Cell* **94**, 205-216.

Ward, S.G., June, C.H. & Olive, D. (1996).

PI 3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation? *Immunol. Today* **17**, 187-196.

Wawra E. (1988).

Microinjected deoxynucleotides for the study of chemical inhibition of DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* **16**, 5249-5261.

Weber, K.S., Klickstein, L.B. & Weber, C. (1999).

Specific activation of Leukozyte beta2 integrins Lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the alpha subunit cytoplasmic domains. *Mol. Biol. Cell* **10**, 861-873.

Weber, K.S., Weber, C., Ostermann, G., Dierks, H., Nagel, W. & Kolanus W. (2001).

Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct LFA-1 functions in Leukozyte arrest and transmigration triggered by chemokines. *Curr. Biol.* **11**, 1969-1974.

Wehrli M., DiAntonio A., Fearnley I.M., Smith R.J., & Wilcox M. (1993).

Cloning and characterization of alpha PS1, a novel *Drosophila melanogaster* integrin. *Mech. Dev.* **43**, 21-36.

Weiss, A., Wiskocil, R.L. & Stobo, J.D. (1984).

The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J. Immunol.* **133**, 123-128.

Whitehead, T.P., Kricka, L.J., Carter, T.J. & Thorpe, G.H. (1979).

Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* **25**, 1531-1546.

Williams, M.J., Hughes, P.E., O'Toole, T.E. & Ginsberg, M.H. (1994).

The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol.* **4**, 109-112.

Wilson, C.M. (1993).

Staining of proteins on gels. Comparison of dyes and procedures. *Methods Enzymol.* **91**, 236-247.

Woods, D.F. & Bryant, P.J. (1993).

Zo-1, DlgA and PSD95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. *Mech. Dev.* **44**, 889.

Woodside, D.G., Lui, S. & Ginsberg, M.H. (2001).

Integrin activation. *Thromb. Haemost.* **86**, 316-323.

Yan, S.R. & Berton, G. (1996).

Regulation of Src family tyrosine kinase activities in adherent human neutrophils. Evidence that reactive oxygen intermediates produced by adherent neutrophils increase the activity of the p58c-fgr and p53/56lyn tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 23464-23471.

Yan, S.R., Hunag, M. & Berton, G. (1997).

Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 25846-25856.

Yan, S.R. & Novak, M.J. (1999).

Beta2 integrin-dependent phosphorylation of protein-tyrosine kinase Pyk2 stimulated by tumor necrosis factor alpha and fMLP in human neutrophils adherent to fibrinogen. *FEBS Lett.* **451**, 33-38.

Yao, R., Maeda, T., Takada, S. & Noda, T. (2001).

Identification of a PDZ Domain Containing Golgi Protein, GOPC, as an Interaction Partner of Frizzled. *Biochem. Biophys. Res. Communications* **286**, 771-778.

Zell, T., Hunt, S.W. 3rd, Mobley, J.L., Finkelstein, L.D. & Shimizu, Y. (1996).

CD28-mediated up-regulation of beta 1-integrin adhesion involves phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* **156**, 883-886.

Zervos, A.S., Gyuris, J. & Brent, R. (1993).

Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* **72**, 223-232.

Zhang, C.J., Rosenwald, A.G., Willingham, M.C., Skuntz, S., Clark, J. & Khan R.A. (1994).

Expression of a dominant allele of human ARF1 inhibits membrane traffic in vivo. *J. Cell Biol.* **124**, 289-300.

Zhang, W., Vazquez, L., Apperson, M. & Kennedy, M.B. (1999).

Citron binds to PSD-95 at glutamateric synapses on inhibitory neurons in hippocampus. *J. Neurosci.* **19**, 96-108.

Zheng, L., Sjolander, A., Eckerdal, J. & Andersson, T. (1996).

Antibody-induced engagement of beta 2 integrins on adherent human neutrophils triggers activation of p21ras through tyrosine phosphorylation of the protooncogene product Vav. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8431-8436.

Zheng, J., Cahill, S.M., Lemmon, M.A., Fushman, D.; Schlessinger, J. & Cowburn, D. (1996).

Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *J. Mol. Biol.* **255**, 14-21.

Zhu, Y., Traub, L.M. & Kornfeld, S. (1998).

ADP-ribosylation factor 1 transiently activates high-affinity adaptor protein complex AP-1 binding sites on Golgi membranes. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1323-1337.

9 Anhang

9.1 Abkürzungen

9.1.1 Allgemein

| | |
|------------------|---|
| AA | <u>A</u> cryl <u>a</u> mid |
| Abb. | <u>A</u> bbildung |
| abs. | <u>a</u> bsolut |
| amp | <u>A</u> mpicillin |
| AP | <u>a</u> lkalische <u>P</u> hosphatase |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle(n) (<u>a</u> ntigene <u>p</u> resenting <u>c</u> ell) |
| APS | <u>A</u> mmoniumperoxodisulfat |
| ARF | ADP-Ribosylierungsfaktor (<u>A</u> DP- <u>r</u> ibosylation <u>f</u> actor) |
| AS | <u>A</u> minosäure(n) |
| ATP | <u>A</u> denosin-5'- <u>T</u> riphosphat |
| BCIP | 5- <u>B</u> rom-4- <u>C</u> hlor-3- <u>I</u> ndolyl- <u>P</u> hosphat |
| bidest. | zweifach destilliert |
| BSA | Rinderserum-Albumin (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin) |
| bzw. | <u>b</u> eziehungsweise |
| ca. | <u>c</u> irca |
| CD | Zelloberflächenmarker (<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation) |
| cDNA | komplementäre DNA |
| <i>C.elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| clg | cytoplasmatisch exprimiertes <u>I</u> mmunglobulin |
| COS | <u>C</u> V1 <u>O</u> rigine <u>S</u> V40 (SV40-transformierte Affennierenzelllinie CV1) |
| Cyh-1 | <u>C</u> ytohesin-1 (bzw. -2, -3, -4) |
| cyt | cytoplasmatisch |
| CYTIP | <u>C</u> ytohesin <u>I</u> nter <u>A</u> ktion <u>P</u> rotein |
| DAG | <u>D</u> iacylglycerol |
| dATP | <u>D</u> esoxy <u>a</u> denosin-5'- <u>t</u> riphosphat |
| DC | dentritische Zelle (<u>d</u> endritic <u>c</u> ell) |
| dCTP | <u>D</u> esoxy <u>c</u> ytidin-5'- <u>t</u> riphosphat |
| DEAE | <u>D</u> iethylaminoethyl |
| dUTP | <u>D</u> esoxy <u>g</u> uanosin-5'- <u>t</u> riphosphat |
| d.h. | das heißt |
| DMEM | <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium |
| DMSO | <u>D</u> imethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid) |
| dNTP | <u>D</u> esoxy- <u>N</u> ukleosid-5'- <u>T</u> riphosphat |
| ds | <u>d</u> oppelsträngig |
| DTT | <u>D</u> ithiothreitol |

| | |
|-----------------|--|
| dTTP | <u>D</u> esoxy <u>t</u> hymidin-5'- <u>t</u> riphosphat |
| <i>E.coli</i> | <i>E</i> sch <u>e</u> richa <i>c</i> oli |
| ECL | <u>e</u> nhanced <u>c</u> hemiluminescence |
| EDTA | Di-Natriumsalz der Ethylendiaminotetraessigsäure |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor (<u>e</u> pithelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor) |
| ER | <u>e</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum |
| EtBr | <u>E</u> thidium <u>b</u> romid |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | Fluoreszenzaktivierte Zelltrennung (<u>f</u> luorescence- <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting) |
| Fc | <u>f</u> ragment <u>c</u> rytallizable |
| FCS | Fötale Kälberserum (<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum) |
| FITC | <u>F</u> luorescein- <u>I</u> sothiocyanat |
| GAP | <u>G</u> TPase- <u>a</u> ktiviertes <u>P</u> rotein |
| GDP | <u>G</u> uanosin <u>d</u> iphosphat |
| GEF | Guaninnukleotid-Austauschfaktor (<u>g</u> uanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor) |
| GEP | G-Protein austauschends Protein (<u>G</u> -protein <u>e</u> xchange protein) |
| GMP | <u>G</u> uanosin <u>m</u> onophosphat |
| GSH | Glutathion |
| GST | <u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase |
| GTP | <u>G</u> uanosin-5'- <u>t</u> riphosphat |
| GTPase | Guanosin-5'-triphosphat hydrolysierendes Enzym |
| HBSS | <u>H</u> ank's <u>b</u> uffered <u>s</u> alt <u>s</u> olution |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase (<u>h</u> orseradish <u>p</u> eroxidase) |
| ICAM | interzelluläres Adhäsionsmolekül (<u>i</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule) |
| IF | <u>I</u> mmunfluoreszenz |
| Ig | <u>I</u> mmunglobulin |
| IL | <u>I</u> nterleukin |
| inkl. | <u>I</u> nklusive |
| IP <sub>3</sub> | <u>I</u> nositol (1,4,5)- <u>T</u> risphosphat |
| IPTG | <u>I</u> sopropyl-β-D- <u>t</u> hiogalactosid |
| kan | <u>K</u> anamycin |
| Konz. | <u>K</u> onzentration |
| LAD | <u>L</u> eukozyten- <u>A</u> dhäsions <u>d</u> efizienz |
| LAT | <u>L</u> inker für die <u>A</u> ktivierung von <u>T</u> -Zellen |
| LB | <u>L</u> uria- <u>B</u> overi |
| LFA-1 | <u>L</u> ymphozyte <u>f</u> unction- <u>a</u> ssociated <u>a</u> ntigen- <u>1</u> |
| Lsg. | <u>L</u> ösung |
| mAb | <u>m</u> onoklonaler <u>A</u> ntikörper |
| max. | <u>m</u> aximal |
| MeOH | Methanol |
| mGluR | group 1 <u>m</u> etabotropic <u>g</u> lutamate <u>r</u> eceptor |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (<u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex) |
| mind. | <u>m</u> indestens |
| MOI | <u>m</u> ultiplicity of <u>i</u> nfection |
| mRNA | <u>m</u> essenger <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid |
| MPA | Mycophenolsäure (<u>m</u> ycophenolic <u>a</u> cid) |

| | |
|-------------------------|--|
| NBT | <u>N</u> itro <u>b</u> lau- <u>T</u> etrazoliumchlorid |
| NK-Zellen | <u>N</u> atürliche <u>K</u> illerzellen |
| NP40 | <u>N</u> ichtionisches Detergenz <u>P</u> 40 |
| ONPG | <u>o</u> - <u>N</u> itrophenyl- β - <u>D</u> -galaktosid |
| p.a. | pro <u>a</u> nalysis |
| PAA | <u>P</u> oly <u>a</u> crylamid |
| PAGE | <u>P</u> oly <u>a</u> cylamid- <u>G</u> e <u>l</u> elektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<u>p</u> hosphat <u>b</u> uffered <u>s</u> aline) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction) |
| PEG | <u>P</u> oly <u>e</u> thylenglykol |
| PH | <u>P</u> leckstrin <u>H</u> omologie |
| PHA | <u>P</u> hyto <u>h</u> ämaggglutinin |
| PI <sub>3</sub> -K | <u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol <u>3</u> - <u>K</u> inase |
| PI(3,4,5)P <sub>3</sub> | <u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol (<u>3</u> , <u>4</u> , <u>5</u>)- <u>T</u> ris <u>p</u> hosphat |
| PI(4,5)P <sub>2</sub> | <u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol (<u>4</u> , <u>5</u>)- <u>B</u> is <u>p</u> hosphat |
| PKA | <u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>A</u> |
| PKC | <u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>C</u> |
| PMA | 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat |
| PMSF | <u>P</u> henyl <u>m</u> ethylsulfonylfluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure (<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid) |
| Rnase A | <u>R</u> ibonuklease <u>A</u> |
| RT | <u>R</u> aum <u>t</u> emperatur |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate) |
| sog. | sogenannte(s) |
| ssDNA | einzelsträngige DNA (<u>s</u> ingle <u>s</u> tranded <u>D</u> NA) |
| Tab. | <u>T</u> abelle |
| TAE | <u>T</u> ris- <u>A</u> cetat- <u>E</u> DTA-Elektrophoresepuffer |
| TBE | <u>T</u> ris- <u>B</u> orsäure- <u>E</u> DTA-Elektrophoresepuffer |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung (<u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline) |
| TBST | Tris-gepufferte Salzlösung + Tween 20 (<u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline + <u>T</u> wen 20) |
| TCR | T-Zell-Rezeptor (<u>T</u> - <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor) |
| TE | <u>T</u> ris- <u>E</u> DTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylethylendiamin |
| Temp. | <u>T</u> emperatur |
| tet | <u>T</u> etrazyklin |
| Tris | <u>T</u> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TRITC | Tetramethyl-Rhodamin |
| TYM | <i>Trypton Yeast extract</i> Medium |
| Tween20 | Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat |
| u.a. | <u>u</u> nter <u>a</u> nderem |
| ÜN | <u>ü</u> ber <u>N</u> acht |
| Upm | <u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute |
| UV | <u>U</u> ltraviolett |
| v/v | Volumenanteil einer Flüssigkeit in einer Lösung (<u>v</u> olume per <u>v</u> olume) |
| VCAM | <u>v</u> ascular <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule |

| | |
|-------|---|
| vgl. | <u>v</u> ergleiche |
| VLA | <u>v</u> ery <u>l</u> ate <u>a</u> ntigen |
| Vol. | <u>V</u> olumen |
| w/v | Gewichtsanteil eines Stoffes in einer Lösung (<u>w</u> eight per <u>v</u> olume) |
| WB | <u>W</u> estern- <u>B</u> lot |
| wt | <u>W</u> ildtyp |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chloro-3-indoxyl- β -D-Galaktosid |
| z.B. | zum <u>B</u> eispiel |

9.1.2 Einheiten

| | |
|-----------------|---|
| A | <u>A</u> mpère |
| A <sub>x</sub> | Absoption bei einer Wellenlänge von <u>x</u> nm |
| bp | <u>B</u> asenpaare |
| °C | Temperaturangabe in Grad Celsius |
| Ci | <u>C</u> urie (3,7 x 10 <sup>10</sup> Zerfälle/Sekunde) |
| cpm | <u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute (radioaktive Zerfälle pro Minute) |
| Da | <u>D</u> alton (Einheit für Proteinmasse) |
| Fd | <u>F</u> arad |
| g | <u>G</u> ramm |
| h | Stunde(n) |
| kb | <u>K</u> ilobasen |
| l | <u>L</u> iter |
| M | <u>M</u> olar (mol/l) |
| MG | <u>M</u> olekulargewicht |
| min | <u>M</u> inute(n) |
| Mio | <u>M</u> illion(en) |
| mol | Mol (Stoffmenge) |
| OD <sub>x</sub> | <u>o</u> ptische <u>D</u> ichte bei einer Wellenlänge von <u>x</u> nm |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<u>r</u> otations <u>p</u> er <u>m</u> inute) |
| pfu | Plaue bildende Einheit (<u>p</u> laque <u>f</u> orming <u>u</u> nit) |
| sek | Sekunde |
| U | <u>U</u> nit(s) (Einheit von Enzymaktivitäten) |
| V | <u>V</u> olt |
| W | <u>W</u> att |
| xg | x-fache Erdbeschleunigung |

9.1.3 Präfixe

| | | |
|---|-------|-----------------------|
| k | kilo | (=10 <sup>3</sup>) |
| c | centi | (=10 <sup>2</sup>) |
| m | Milli | (=10 <sup>-3</sup>) |
| μ | Micro | (=10 <sup>-6</sup>) |
| n | Nano | (=10 <sup>-9</sup>) |
| p | Pico | (=10 <sup>-12</sup>) |

9.1.4 Abkürzungen der Nukleoside bzw. Nukleotide

| | |
|---|----------------------|
| A | Adenin bzw. Adeosin |
| C | Cytosin bzw. Cytidin |
| G | Guanin bzw. Guanosin |
| T | Thymin bzw. Thymidin |

9.1.5 Abkürzungen der Aminosäuren

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

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|----------------------|-------------|
| Name: | Thomas Böhm |
| Geburtsort: | München |
| Geburtsdatum: | 22.5.71 |
| Staatsangehörigkeit: | deutsch |
| Familienstand: | ledig |

Schulbildung

| | | |
|--------------|----------------------------------|-------------------|
| Grundschule: | Grundschule Haar | 09/1978 – 07/1979 |
| | Grundschule Kirchheim b. München | 09/1979 – 07/1982 |
| Gymnasium: | Gymnasium Kirchheim b. München | 09/1982 – 07/1991 |

Hochschulstudium

| | | |
|---------------|---|-------------------|
| Studium: | Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München | 10/1991 – 04/1997 |
| Vordiplom: | | 13/05/1994 |
| Hauptdiplom: | | 10/09/1996 |
| Diplomarbeit: | „Expression und Aufreinigung von Fusions-Proteinen“ | 09/1996 – 04/1997 |
| Dissertation: | „Regulation der Zelladhäsion in Lymphozyten durch Interaktion der cytoplasmatischen Proteine Cytohesin-1 und CYTIP“ | 05/1997 – 05/2002 |

Berufserfahrung

| | |
|---|-------------------|
| APALEXO Biotechnologie GmbH | 06/2002 – 03/2004 |
| Gruppenleiter der Abteilung „Production of Idiotypvaccines“ | |
| Klinische Pharmakologie – Klinikum Innenstadt München | 06/2004 – heute |
