



# **Interaktionsanalyse der Adapterproteine SLy1 und SLy2**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Simone Brandt**

aus Duisburg

Düsseldorf, April 2010

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und  
Krankenhaushygiene  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Klaus Pfeffer  
Koreferent: Prof. Dr. Peter Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2010

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Signaltransduktion .....	1
1.2 Adapterproteine und Interaktionsdomänen .....	2
1.3 Die SLy Proteinfamilie .....	5
1.4 14-3-3 Proteine .....	8
1.5 Transkriptionsregulation durch Acetylierung und Deacetylierung von Histonen .....	11
1.6 Die Histondeacetylase 1 (HDAC1) und ihre Komplexe .....	14
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit .....	15
2 Material und Methoden .....	17
2.1 Bezugsquellennachweis .....	17
2.1.1 Chemikalien .....	17
2.1.2 Enzyme .....	19
2.1.3 Kits und Verbrauchsmaterial .....	20
2.1.4 Geräte .....	21
2.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze .....	22
2.2 Medien und Puffer .....	23
2.2.1 Stammlösungen und Puffer .....	23
2.2.2 Medien für die Bakterienkultur .....	27
2.2.3 Medien für die Hefekultur .....	28
2.2.4 Medien für die Zellkultur .....	29
2.3 Bakterienstämme, Hefestämme und Zelllinien .....	29
2.3.1 Bakterienstämme .....	29
2.3.2 Hefestamm .....	30
2.3.3 Zellen und Zelllinien .....	30
2.4 Oligonukleotide .....	31
2.5 Plasmidvektoren .....	34
2.5.1 Ausgangsvektoren .....	34
2.5.2 Im Rahmen der Arbeit erstellte Vektoren .....	37
2.6 Antikörper .....	39
2.7 Molekularbiologische Arbeitsmethoden .....	40
2.7.1 Analytische Plasmidpräparation aus Bakterien .....	40

---

2.7.2 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterien .....	41
2.7.3 Enzymatische Behandlung von DNS .....	41
Restriktionsanalyse von DNS.....	41
Dephosphorylierung von DNS.....	42
Ligation von DNS-Molekülen.....	42
2.7.4 Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien .....	43
Transformation chemokompetenter Bakterien.....	43
Transformation elektrokompenter Bakterien.....	43
2.7.5 Kryokonservierung von Bakterien .....	43
2.7.6 Amplifikation von DNS-Molekülen mittels PCR .....	44
2.7.7 Fusion von PCR-Fragmenten .....	45
2.7.8 Sequenzanalyse .....	45
2.7.9 Agarosegelelektrophorese .....	46
Analytische Agarosegelelektrophorese .....	46
Präparative Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion .....	46
Bestimmung von DNS-Fragmentgrößen .....	46
2.8 Proteinanalytische Methoden.....	47
2.8.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	47
2.8.2 Dephosphorylierung von Gesamtzellextrakten .....	47
2.8.3 Fraktionierte Zellyse.....	47
2.8.4 Zellfraktionierung (ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit) .....	48
2.8.5 Zellfraktionierung (ProteoExtract® Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit).....	48
2.8.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Test .....	49
2.8.7 Ko-Immunpräzipitation von Proteinen .....	49
2.8.8 Affinitätspräzipitation.....	50
2.8.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	51
2.8.10 Western Blot (Immunoblot) .....	51
2.8.11 Coomassie-Blau-Färbung .....	52
2.8.12 Histondeacetylase-(HDAC-)Assay .....	52
2.8.13 Analyse von Lipid-Protein-Interaktionen.....	53
2.8.14 Expression rekombinanter Proteine .....	53
2.9 Zellbiologische Methoden .....	54
2.9.1 Allgemeine Zellkultur.....	54
2.9.2 Kultivierung von Zelllinien .....	54
Suspensionszellen .....	54
Adhärent wachsende Zellen.....	54
2.9.3 Bestimmung der Zellzahl.....	55

---

2.9.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	55
2.9.5 Transfektion adhärenter Zellen .....	55
Kalziumphosphat- (CaPO <sub>4</sub> )-vermittelte Transfektion .....	55
Transfektion mittels jetPEI™ .....	56
2.9.6 Lentivirale Transduktion von Zellen.....	56
Virusproduktion mittels 293FT Zellen.....	57
Lentivirale Transduktion von Jurkat Zellen .....	57
2.9.7 Immunfluoreszenz.....	58
2.10 Arbeit mit Hefezellen im Hefe Zwei-Hybrid-System.....	59
2.10.1 Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	59
2.10.2 Das Hefe Zwei-Hybrid-System .....	59
2.10.3 Transformation von Hefezellen .....	60
Herstellung transformationskompetenter Hefezellen .....	60
Transformation kompetenter Hefezellen mit Plasmid-DNS.....	61
2.10.4 Isolierung von Plasmid-DNS aus Hefezellen .....	61
2.10.5 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNS aus Hefezellen .....	61
2.10.6 Sequenzanalyse der positiven Klone des Hefe Zwei-Hybrid-Systems.....	62
3 Ergebnisse .....	63
3.1 Interaktionsanalyse des Adapterproteins SLy1 .....	63
3.1.1 Subzelluläre Lokalisation des SLy1-Proteins.....	65
3.1.2 Homodimerisierung des SLy1-Proteins .....	70
3.1.3 Interaktion von SLy1 mit Lipiden .....	72
3.1.4 Interaktion von SLy1 mit 14-3-3 Proteinen .....	76
3.1.5 Ansätze zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner von SLy1 .....	81
3.2 Interaktionsanalyse des Adapterproteins SLy2 .....	81
3.2.1 Subzelluläre Lokalisation des SLy2-Proteins.....	83
3.2.2 Homodimerisierung des SLy2-Proteins .....	87
3.2.3 Interaktion von SLy2 mit Lipiden .....	89
3.2.4 Interaktion von SLy2 mit 14-3-3 Proteinen .....	93
3.2.5 Identifizierung weiterer Interaktionspartner von SLy2.....	100
3.2.5.1 Interaktion von SLy2 mit SAP30.....	100
3.2.5.2 Interaktion von SLy2 mit HDAC1 .....	103
3.2.5.3 SLy2 bildet einen ternären Komplex mit SAP30 und HDAC1 .....	104
3.2.5.4 SLy2 erhöht die Aktivität von HDAC1 .....	105
4 Diskussion .....	109
4.1 Die SLy Proteinfamilie putativer Adaptermoleküle .....	109
4.2 Interaktionsanalyse der putativen Adaptermoleküle SLy1 und SLy2 .....	110

---

4.2.1 Subzelluläre Lokalisation des SLy1- und SLy2-Proteins .....	110
4.2.2 Homodimerisierung des SLy1- und SLy2-Proteins .....	114
4.2.3 Interaktion von SLy1 und SLy2 mit Lipiden .....	116
4.2.4 Interaktion von SLy1 und SLy2 mit 14-3-3 Proteinen .....	118
4.2.5 Identifizierung weiterer Interaktionspartner von SLy1 und SLy2 .....	120
4.3 Fazit und Ausblick .....	124
5 Zusammenfassung .....	126
6 Summary .....	127
7 Literaturverzeichnis .....	128
8 Danksagung .....	137
9 Anhang .....	138

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Generierung von Multiprotein-Komplexen mit Hilfe von Adaptermolekülen .....	3
Abbildung 2: Interaktionsdomänen in der Signaltransduktion.....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Proteine der SLy Familie.	8
Abbildung 4: Struktur eines 14-3-3 Dimers. ....	9
Abbildung 5: Strukturelle Effekte einer Bindung an 14-3-3 Proteine.....	10
Abbildung 6: Lysinmodifikationen. ....	12
Abbildung 7: Reportergenkonstrukte in <i>S. cerevisiae</i> AH109.....	60
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Domänenstruktur verschiedener SLy1-Konstrukte .....	64
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von SLy1 inklusive der zwei putativen PEST-Sequenzen .....	65
Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisation der verschiedenen SLy1-Konstrukte .....	67
Abbildung 11: Kontrollen zur Überprüfung der Reinheit der subzellulären Fraktionen .....	68
Abbildung 12: Zytosolische und mitochondriale Fraktionierung von SLy1 .....	70
Abbildung 13: Homodimerisierung des SLy1-Proteins .....	71
Abbildung 14: Interaktion von SLy1 mit Lipiden .....	73
Abbildung 15: Interaktion von SLy1 mit Lipiden .....	75
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Interaktion von phosphoryliertem SLy1 und 14-3-3 Proteinen.....	77
Abbildung 17: Interaktion des SLy1-Proteins mit 14-3-3 $\tau$ und 14-3-3 $\beta$ .....	78
Abbildung 18: Phosphorylierungsabhängige Interaktion von SLy1 mit 14-3-3 $\beta$ , - $\gamma$ , - $\eta$ , - $\sigma$ , - $\epsilon$ , - $\tau$ und - $\zeta$ .....	79
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Domänenstruktur verschiedener SLy2-Konstrukte .....	82
Abbildung 20: Subzelluläre Lokalisation der verschiedenen SLy2-Konstrukte .....	84
Abbildung 21: Kontrollen zur Überprüfung der Reinheit der subzellulären Fraktionen .....	86
Abbildung 22: Zytosolische und mitochondriale Fraktionierung von SLy2.....	87
Abbildung 23: Homodimerisierung des SLy2-Proteins .....	88
Abbildung 24: Interaktion von SLy2 mit Lipiden .....	90
Abbildung 25: Interaktion von SLy2 mit Lipiden .....	92
Abbildung 26: Schematische Darstellung der Interaktion von phosphoryliertem SLy2 und 14-3-3 Proteinen.....	94
Abbildung 27: Interaktion des SLy2-Proteins mit 14-3-3 $\beta$ .....	95
Abbildung 28: Interaktion von SLy2 und SLy2S23 $\rightarrow$ A mit 14-3-3 $\beta$ , - $\gamma$ , - $\eta$ , - $\epsilon$ , - $\sigma$ , - $\tau$ und - $\zeta$ ...	96

---

Abbildung 29: Phosphorylierungsabhängige Bindung von SLy2 an 14-3-3 $\beta$ und 14-3-3 $\sigma$ .....	97
Abbildung 30: Subzelluläre Lokalisation von SLy2 in An- und Abwesenheit von 14-3-3 $\beta$ .....	99
Abbildung 31: Interaktion des SLy2-Proteins mit SAP30 .....	102
Abbildung 32: Interaktion des SLy2-Proteins mit SAP30 .....	103
Abbildung 33: Interaktion des SLy2-Proteins mit HDAC1 .....	104
Abbildung 34: SLy2 bildet einen ternären Komplex mit SAP30 und HDAC1 .....	105
Abbildung 35: SLy2 erhöht die Aktivität von HDAC1.....	107
Abbildung 36: Modell für die Funktion von SAP30 bei der N-CoR-vermittelten Transkriptionsrepression .....	121

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterienkulturmedien .....	27
Tabelle 2: Verwendete Antibiotika .....	28
Tabelle 3: Hefekulturmedien.....	28
Tabelle 4: Medien und Zusätze .....	29
Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme .....	29
Tabelle 6: Verwendeter Hefestamm .....	30
Tabelle 7: Verwendete Zellen und Zelllinien .....	30
Tabelle 8: Primer zur Klonierung verschiedener Fusionskonstrukte.....	31
Tabelle 9: Verwendete Plasmidvektoren .....	34
Tabelle 10: Hergestellte Plasmide .....	37
Tabelle 11: Primäre Antikörper .....	39
Tabelle 12: Sekundäre Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert) .....	40
Tabelle 13: Sekundäre Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff-markiert) .....	40
Tabelle 14: Restriktionsverdau .....	42
Tabelle 15: Standard-PCR-Ansatz.....	44
Tabelle 16: Standard-PCR-Bedingungen.....	45
Tabelle 17: Sequenzierergebnis der Hefeklone aus dem Versuchsansatz mit der SLy2SAM-Domäne als Köderprotein.....	138

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	komplementäre DNS (DNS-Kopie der mRNS)
Δ	Deletionsmutante
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HACS1	„Hematopoietic Adapter Containing SH3 and SAM domains 1“
HDAC	Histondeacetylase
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes Wasser
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNS	Boten-RNS
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
n	Anzahl der getesteten Proben
NASH1	„NLS, SAM, SH3 containing protein 1“
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NES	nukleäres Exportsignal

---

nM	Nanomolar
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAM-Domäne	„Sterile alpha motive“-Domäne
SAP30	„Sin3-associated polypeptide 30“
SASH1	„SAM and SH3 containing 1“
SH3-Domäne	„Src homology 3“-Domäne
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SLy	„SH3 Protein expressed in Lymphocytes“
Tab.	Tabelle
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Signaltransduktion

Mehrzellige Organismen benötigen komplexe Zellkommunikationsmechanismen. Fast alle zellulären Funktionen wie beispielsweise Proliferation, Metabolismus, Genexpression, Organisation des Zytoskeletts oder auch das Überleben einer Zelle werden durch externe Signalmoleküle gesteuert. Die Signaltransduktion, welche zum ersten Mal 1972 in einer Fachpublikation als solche bezeichnet wurde (Rensing, L., 1972), kann als die koordinierte Übertragung von extrazellulären Signalen zu intrazellulären Effektormolekülen definiert werden. Ein derartiges Kommunikationssystem gewährleistet, dass die Funktionen der einzelnen Zellen in den verschiedenen Organen und Geweben aufeinander abgestimmt sind. Extrazelluläre Signalmoleküle werden von bestimmten Signalzellen gebildet. Sie können in Form löslicher Moleküle, wie zum Beispiel Hormonen, oder als gebundene Proteine auf der Zelloberfläche oder der extrazellulären Matrix (ECM) bestimmter Zellen auftreten. Es existieren sowohl Rezeptoren an der Zelloberfläche (Transmembranrezeptoren) als auch intrazelluläre Rezeptoren, welche die unterschiedlichen Signalmoleküle erkennen und binden können. Beispiele für Transmembranrezeptoren sind sogenannte G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), Integrine oder Toll-like Rezeptoren. Intrazelluläre Rezeptoren stellen lösliche Proteine dar und umfassen einerseits zytoplasmatische, andererseits jedoch auch nukleäre Rezeptoren. Typische Liganden für nukleäre Rezeptoren sind lipophile Hormone (z.B. Steroide), wohingegen zytoplasmatische Rezeptoren – wie beispielsweise die sogenannten NOD-like Rezeptoren – mikrobielle Moleküle erkennen können. Die Weiterleitung von Signalen in das Zellinnere erfolgt über kleine und große Signalmoleküle. In eukaryotischen Zellen besitzen die meisten intrazellulären Proteine, die durch eine Ligand/Rezeptor-Interaktion aktiviert werden, eine enzymatische Funktion. Diese Enzyme umfassen beispielsweise Phosphatasen, Proteinkinasen (Tyrosinkinase, Serin/Threoninkinase), Hydrolasen oder GTPasen. Einige der aktivierten Enzyme generieren sogenannte „second messengers“ – zum Beispiel zyklische Nucleotide (cAMP, cGMP) oder Phosphatidylinositol-Derivate (u. a. PIP<sub>3</sub>). Hierbei ist es von ganz entscheidender Bedeutung, dass die an der Signaltransduktion beteiligten Enzyme zur richtigen Zeit und am richtigen Ort auf ihre Substrate treffen. Dies erfordert eine Balance zwischen zwei scheinbar gegensätzlichen Prozessen, nämlich zum einen der Diffusion von Information durch das Zytoplasma und den Nucleus sowie zum anderen der Bearbeitung der Information durch immobilisierte Multiprotein-Komplexe (Scott, J.D. und Pawson, T., 2009). Eukaryotische Zellen haben eine ganze Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um diesen Anforderungen gerecht zu werden: 1) Pro-

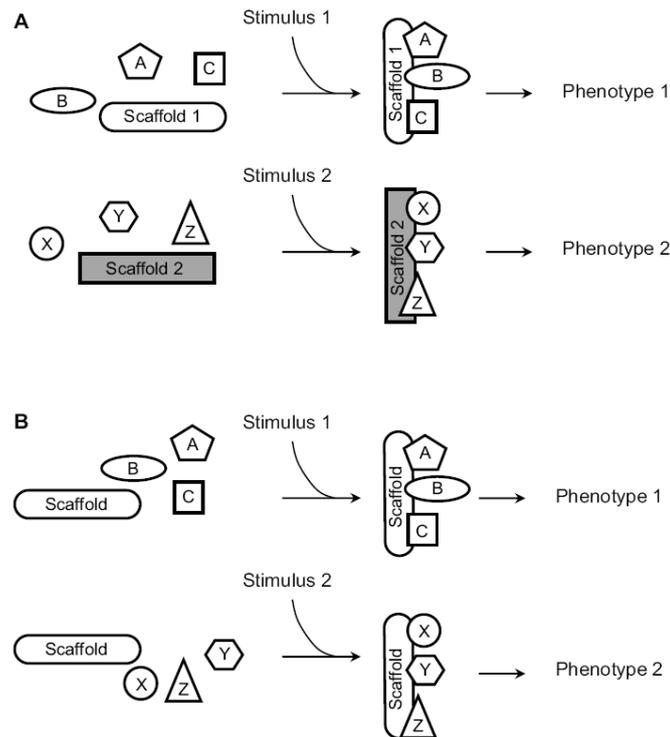
teinkomplexe werden signalabhängig generiert, II) Signale werden durch zuvor entstandenen Multiprotein-Komplexe prozessiert, III) die Aktivität von Enzymen wird durch eine spezifische subzelluläre Lokalisation reguliert und IV) die Signalwege der Zellen unterliegen einer zeitlichen Kontrolle (Scott, J.D. und Pawson, T., 2009).

Die dynamische Generierung von Proteinkomplexen zur intrazellulären Signalweiterleitung kann zum Beispiel durch posttranslationale Modifikationen oder durch eine Oligomerisierung von Proteinen mit nachfolgender Konzentrierung der enzymatischen Aktivität in speziellen „Taschen“ initiiert werden (Scott, J.D. und Pawson, T., 2009).

Signalproteine besitzen typischerweise einen modulartigen Aufbau und bestehen dabei aus Domänen, die entweder eine katalytische Funktion oder aber eine Bindefunktion aufweisen. Proteine, die Bindedomänen enthalten, werden in der Literatur als Adaptermoleküle bezeichnet. Bis heute wurden ungefähr 100 spezialisierte Protein-Interaktions-Domänen identifiziert, welche eine Vielzahl von chemischen Signalen erkennen können (Scott, J.D. und Pawson, T., 2009).

## 1.2 Adapterproteine und Interaktionsdomänen

Adapterproteine sind Moleküle, denen eine enzymatische Aktivität fehlt. Sie sind jedoch für die Signaltransduktion von entscheidender Bedeutung, da sie konstitutive oder induzierbare Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Interaktionen mit Hilfe spezieller Interaktionsdomänen ermöglichen. Generell werden zytosolische Adaptorproteine und Transmembranadaptermoleküle unterschieden. Abbildung 1 zeigt die Bildung von Multiprotein-Komplexen mit Hilfe von Adapter- oder Gerüstproteinen in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli.



**Abbildung 1: Generierung von Multiprotein-Komplexen mit Hilfe von Adaptermolekülen**

Adapterproteine stellen eine Möglichkeit dar, wie Multiprotein-Komplexe aus unterschiedlichen Komponenten zusammengesetzt werden können. Diese Komplexe erfüllen in den Zellen spezifische Aufgaben und führen somit zu ganz speziellen Phänotypen. **(A)** Stimulus 1 ist assoziiert mit der Generierung eines Multiprotein-Komplexes in Abhängigkeit von Adapterprotein 1 (Scaffold 1), wohingegen Stimulus 2 zur Bildung eines anderen Komplexes mit Adapterprotein 2 (Scaffold 2) führt. **(B)** Ein und dasselbe Adapterprotein ist je nach Stimulus an der Bildung verschiedener Proteinkomplexe beteiligt (nach Vondriska, T.M. et al., 2004).

Der Archetyp eines Protein-Interaktions-Moduls stellt die sogenannte Src homology 2 (SH2)-Domäne dar. Sie wurde zuerst im Onkoprotein P130<sup>gag-fps</sup> beschrieben, besteht aus ungefähr 100 Aminosäuren und bindet spezifisch an Peptid-Motive, welche phosphorylierte Tyrosinreste (pY) enthalten (Sadowski, I. et al., 1986; Mayer, B.J. et al., 1988). Das menschliche Genom codiert für ungefähr 120 SH2-Domänen, welche Bestandteile einer Vielzahl von Proteinen sind (Scott, J.D. und Pawson, T., 2009). Die meisten Adaptermoleküle mit SH2-Domänen werden zu Bereichen in der Zelle rekrutiert, in denen Tyrosinphosphorylierungen stattfinden, um dort bei der Generierung molekularer Signalkomplexe zu helfen (Songyang, Z. et al., 1994). SH2-Domänen können auch einen direkten Einfluss auf die enzymatische Aktivität bestimmter Moleküle ausüben. Ein Beispiel hierfür ist die humane zytoplasmatische Tyrosinkinase FES. In der aktiven Konformation bilden die SH2- und die Kinase-Domäne des Enzyms zusammen eine funktionelle Einheit, welche das Substrat binden kann (Filippakopoulos, P. et al., 2008). Im Falle der Kinasen Abl, Src, Lyn und Fyn jedoch vermag eine SH2-Domäne die Aktivität der Enzyme zu inhibieren, indem das Andocken der SH2-

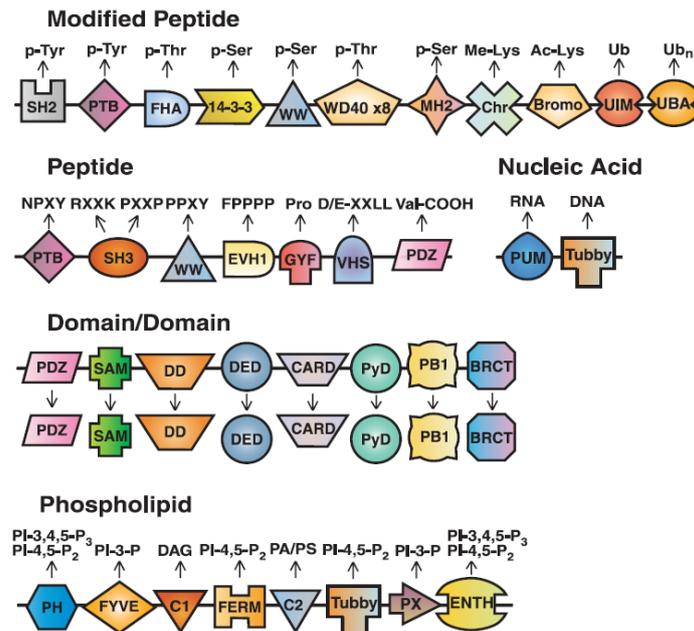
Domäne an die Rückseite der katalytischen Einheit der Enzyme eine interne Bindestelle für eine ebenfalls vorhandene SH3-Domäne schafft. Diese SH2-SH3-Einheit wiederum stabilisiert die inaktive Konformation der Enzyme (Moarefi, I. et al., 1997; Young, M.A. et al., 2001). Die Src homology 3 (SH3)-Domäne bindet im Gegensatz zu SH2-Domänen sowohl an prolinreiche (Ladbury, J.E. und Arold, S., 2000) als auch an arginin- und lysinreiche (Kang, H. et al., 2000; Berry, D.M. et al., 2002) Sequenzen in Proteinen. Bezogen auf die Bindung von SH3-Domänen an prolinreiche Sequenzen wurde zunächst das kanonische Bindemotiv PxxP identifiziert, allerdings existieren auch abweichende Bindesequenzen. Die SH3-Domäne des Moleküls Eps8 bindet zum Beispiel an die Sequenz PxxDY (Mongiovi, A.M. et al., 1999). SH3-Domänen sind genauso wie SH2-Domänen an vielen intrazellulären Signalwegen beteiligt, indem sie einen Beitrag zum Aufbau makromolekularer Proteinkomplexe leisten. Neben der Verknüpfung unterschiedlicher Proteine über SH3-Domänen konnte mittlerweile jedoch auch die Möglichkeit einer Homodimerisierung von Proteinen mit Hilfe von SH3-Domänen gezeigt werden. Beispiele hierfür sind das Protein IB1 (Kristensen, O. et al., 2006), die humane Kinase Lck (Romir, J. et al., 2007) und die Tyrosin-Kinase Csk (Levinson, N.M. et al., 2009). Ferner konnte festgestellt werden, dass bestimmte SH3-Domänen in der Lage sind, Ubiquitin zu binden (Stamenova, S.D. et al., 2007), andere wiederum, die sogenannten „helically extended“ (hSH3)-Domänen, vermögen mit Lipiden zu interagieren (Heuer, K. et al., 2005).

Eine weitere wichtige Domäne von Adaptermolekülen in Signalwegen stellt die SAM-Domäne dar. Die Abkürzung SAM steht hierbei für steriles  $\alpha$ -Motiv. Dieser Name leitet sich von der  $\alpha$ -helikalen Struktur und dem Vorkommen von SAM-Domänen in Hefeproteinen, welche für die sexuelle Differenzierung der Hefen essentiell sind, ab (Kim, C.A. und Bowie, J.U., 2003). SAM-Domänen umfassen einen Bereich von ungefähr 75 Aminosäuren und stellen ein weit verbreitetes Proteinmodul für die Homo- oder Heterodimerisierung von Signalproteinen dar. Für die SAM-Domäne des Proteins Smaug konnte eine Bindung an RNS gezeigt werden (Kim, C.A. und Bowie, J.U., 2003). Barrera *et al.* und Li *et al.* waren zudem in der Lage, für die SAM-Domäne der  $\alpha$ -Splicevariante des Tumorsuppressors p73 (p73 $\alpha$ ), beziehungsweise für den Tumorsuppressor DLC2 eine Bindung an Lipide darzustellen (Barrera, F.N. et al., 2003; Li, H. et al., 2007).

Di Pietro *et al.* haben zuletzt eine neue Funktion von SAM-Domänen identifizieren können. Für das Hefeprotein Sla1p konnten sie zeigen, dass die in dem Protein vorhandene SAM-Domäne am Prozess der Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt ist, indem sie diesen negativ beeinflusst (Di Pietro, S.M. et al., 2010). Für diesen Prozess ist zuvor noch keine Beteiligung von Proteinen mit SAM-Domänen nachgewiesen worden, obwohl SAM-Domänen an vielen verschiedenen intrazellulären Signalwegen beteiligt sind.

Neben den bereits genannten Domänen gibt es zusätzlich noch eine ganze Reihe anderer Module in Adapterproteinen, die für die Bildung makromolekularer Komplexe verantwortlich sind. Die sogenannte Pleckstrin homology (PH)-Domäne ist beispielsweise in der Lage, an geladene Kopfgruppen von spezifischen Inositol-Phospholipiden zu binden, welche als Antwort auf ein extrazelluläres Signal in der Plasmamembran gebildet werden.

In Abb. 2 sind Beispiele für Module in Adapterproteinen und ihre Bindeeigenschaften dargestellt.



**Abbildung 2: Interaktionsdomänen in der Signaltransduktion**

Interaktionsmodule von Adapterproteinen binden an Proteine, Phospholipide und Nucleinsäuren. Gezeigt werden Beispiele für solche Domänen und ihre generelle Binfunktion (nach Pawson, T. und Nash, P., 2003).

### 1.3 Die SLy Proteinfamilie

Die Proteine der SLy (SH3 Protein expressed in Lymphocytes) Familie stellen putative Adapterproteine mit SH3- und SAM-Domänen sowie einem nukleären Lokalisationssignal (NLS) dar. SLy1 wurde als erstes Mitglied dieser hoch homologen und aus drei Mitgliedern bestehenden Proteinfamilie im Zuge eines Adhäsionscreens entdeckt. Hierbei wurden Gene aus einer T Zell-Lymphom cDNS-Bibliothek in 293T Zellen transfiziert. Allerdings konnte eine Funktion von SLy1 bei der Vermittlung von Adhäsion später nicht nachgewiesen werden. Aufgrund des Vorhandenseins einer SH3-Domäne und der gewebespezifischen Expression des Proteins in lymphoiden Organen wurde das Molekül SLy1 genannt (Beer, S. et al., 2001). Das *SLy1*-Gen ist beim Menschen und bei der Maus auf dem X-Chromosom lokalisiert und weist acht Exons auf. Die Länge der mRNA beträgt ungefähr 2600 bp, und es exis-

tiert ein offener Leserahmen von 1143 bp (Beer, S. et al., 2001). Das Protein besteht aus 381 Aminosäuren und hat eine Masse von 55 kDa.

Ein andere Arbeitsgruppe entdeckte SLy1 unabhängig davon bei der Suche nach neuen Substraten von Serin-Kinasen (Astoul, E. et al., 2003). Das dabei verwendete Antiserum PAP-1 (phospho antibody for proteomics-1) sollte spezifisch Serin-Phosphorylierungsmotive der Serin-Kinase Akt identifizieren. Astoul *et al.* konnten im Verlauf ihrer Analyse zeigen, dass SLy1 nach Antigen-Rezeptor-Stimulation oder einer Stimulation mit Phorbol-Ester am Serin27 phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung an diesem Serinrest konnte dabei sowohl durch Einsatz des PI3K-Inhibitors Ly-294002 als auch durch den PKC-Inhibitor RO-318425 verhindert werden. Eine direkte Beteiligung der Kinase Akt an der Phosphorylierung von SLy1 konnte allerdings nicht verifiziert werden. Zudem stellte sich heraus, dass das verwendete Antiserum zwar spezifisch phosphorylierte Serinreste erkennt, es allerdings nicht spezifisch für die die Phosphorylierungsstellen umgebenden Aminosäuren ist. Somit ist das Antiserum nicht in der Lage, spezifisch Substrate der Kinase Akt zu identifizieren. Die Resultate von Astoul *et al.* wiesen jedoch auf eine Funktion von SLy1 in der Signaltransduktion von T und B Zellen nach Antigen-Rezeptor-Stimulation hin. Dieser Befund wurde durch die Herstellung einer Mausmutante (SLy1<sup>ΔΔ</sup>) erhärtet, die eine trunkierte Form des SLy1-Proteins (SLy1Δ) mit gestörter subzellulärer Lokalisation exprimiert. Diese Mäuse zeigen neben einer deutlich reduzierten Antigen-Rezeptor-vermittelten Proliferation *in vitro* auch eine Verminderung der B Zellen in der Marginalzone der Milz, eine reduzierte Immunglobulinsekretion sowie eine verminderte semi-allogene Transplantatabstoßung *in vivo* (Beer, S. et al., 2005; Scheikl, T. et al., 2008). Interessanterweise weisen SLy1-„knockout“-Mäuse (SLy1<sup>-/-</sup>), denen das SLy1-Protein komplett fehlt, denselben Phänotyp auf wie die SLy1<sup>ΔΔ</sup>-Mäuse. Neben den beschriebenen Defekten in der Funktion peripherer Lymphozyten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Entwicklung des Thymus sowohl in SLy1<sup>ΔΔ</sup>-Mäusen als auch in SLy1<sup>-/-</sup>-Mäusen gestört ist (Reis, B. et al., 2009). Beide Mauslinien weisen eine erhöhte Apoptoserate in Thymozyten auf. Der molekulare Mechanismus dieses Effektes ist allerdings noch nicht komplett geklärt. Da das trunkierte SLy1-Protein denselben Phänotyp generiert wie das komplette Fehlen des SLy1-Moleküls, ist anzunehmen, dass der in dem trunkierten SLy1<sup>ΔΔ</sup>-Protein deletierte N-terminale Teil entscheidend für die Funktion von SLy1 ist.

Das zweite Mitglied der SLy Proteinfamilie ist das Molekül SLy2, welches zeitgleich von mehreren Arbeitsgruppen kloniert und beschrieben wurde. Claudio *et al.* benannten das Molekül HACS1 (Hematopoietic Aadapter Containing SH3 and SAM domains), wohingegen Uchida *et al.* dem Protein den Namen Nash1 (NLS, SAM, SH3) gaben (Claudio, J.O. et al., 2001; Uchida, T. et al., 2001). Im Folgenden wird das Protein als SLy2 bezeichnet.

Das SLy2-Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 21, bei der Maus auf Chromosom 16 und besitzt 11 Exons. Das SLy2-Protein besteht aus 372 Aminosäuren und hat eine

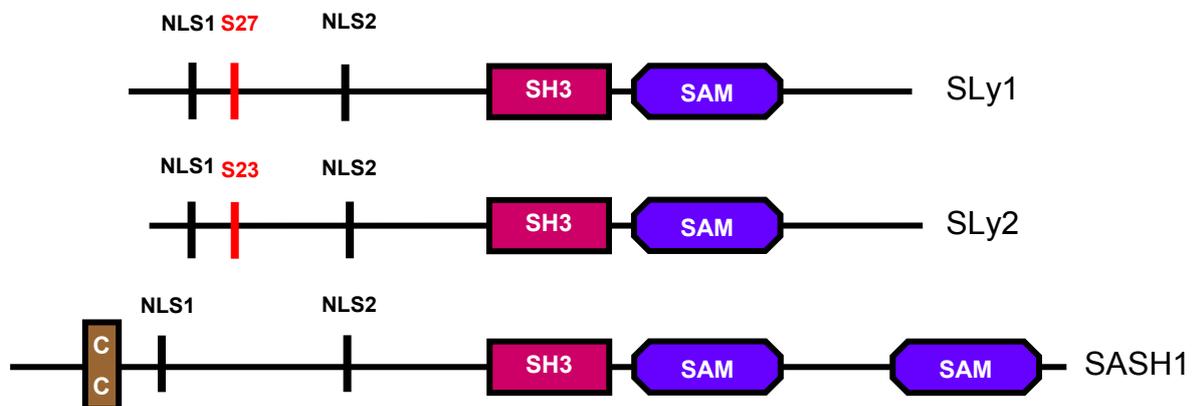
Masse von 48 kDa. Es wird in hämatopoetischen Geweben, Endothelzellen, Muskel- und Herzgewebe, Gehirn, Lunge und auch Myelomen exprimiert. Somit weist dieses Protein ein breiteres Expressionsmuster als SLy1 auf. Die genomische Region um den humanen SLy2-Lokus (21q11.2) ist bei malignen hämatopoetischen Erkrankungen häufig das Ziel von Translokationsereignissen (Mitelman, F. et al., 1997). Claudio *et al.* konnten zeigen, dass SLy2 in vielen Myelomen überexprimiert wird (Claudio, J.O. et al., 2001). Eine weitere Publikation beschreibt eine mögliche Funktion von SLy2 als ein Tumorsuppressor bei Lungenkarzinomen (Yamada, H. et al., 2008). Diese Studien deuten darauf hin, dass SLy2 ein neues Signalmolekül bei der karzinogenen Transformation von Zellen sein könnte. Zudem wird der SLy2-Lokus aufgrund seiner Lokalisation auf Chromosom 21 im Zuge von Analysen zur Entwicklung und Erkrankung des Gehirns, wie zum Beispiel der Alzheimer-Erkrankung, untersucht. Eine Studie deutet beispielsweise auf eine Funktion von SLy2 bei der Bildung der Blutgefäße während der Entwicklung des Gehirns hin (Gitton, Y. et al., 2002). Zusätzlich wurde SLy2 in Zusammenhang mit der Differenzierung von B Zellen gebracht (Zhu, Y.X. et al., 2004). Zhu *et al.* konnten zeigen, dass die Überexpression von SLy2 in B Zellen einen Plasmazell-ähnlichen Phänotyp hervorruft. Außerdem wird in dieser Publikation eine Interaktion von SLy2 mit dem B Zell inhibitorischen Rezeptor PirB *in vitro* dargestellt. In ihrer jüngsten Publikation beschreiben Wang *et al.* den Phänotyp einer von ihnen generierten HACS1-defizienten Mauslinie (HACS1<sup>-/-</sup>). Diese Mäuse weisen unter anderem eine erhöhte Anzahl peritonealer B1a Zellen, eine gesteigerte Proliferation von B Zellen nach Stimulation über den B Zellrezeptor sowie eine erhöhte basale Tyrosin-Phosphorylierung auf, so dass HACS1 (SLy2) als ein potenzielles immuninhibitorisches Adapterprotein bezeichnet wird (Wang, D. et al., 2010).

SLy1 und SLy2 besitzen eine Gesamthomologie von ungefähr 43%. Hierbei sind die homologen Bereiche nicht über die gesamte Aminosäuresequenz verteilt, sondern es existieren Cluster. Die zwei Bereiche mit der höchsten Homologie umfassen die Aminosäuren 170-231 (72%) beziehungsweise die Aminosäuren 251-315 (63%). Eine weitere homologe Region ist am N-Terminus beider Proteine zu finden (62%). SLy2 besitzt eine zu SLy1 homologe potenzielle Phosphorylierungsstelle am Serin23.

Das dritte Mitglied der SLy Familie ist das Molekül SASH1 (SAM and SH3 containing 1) und wurde zuerst von Zeller *et al.* im Zuge einer Suche nach Genen, welche in Brustkarzinomen herunterreguliert sind, beschrieben (Zeller, C. et al., 2003). Eine weitere Publikation konnte zeigen, dass SASH1 auch in anderen malignen Geweben, wie zum Beispiel bei Leber- und Kolonkarzinomen, herunterreguliert ist (Rimkus, C. et al., 2006). Die Autoren konnten zudem darstellen, dass eine verminderte Expression von SASH1 mit der Bildung von Metastasen korreliert. Eine statistische Analyse ergab, dass eine geringe SASH1-Proteinmenge als ein unabhängiger negativer Marker für das Überleben der Krebspatienten dienen kann (Rimkus,

C. et al., 2006). Diese Befunde deuten auf eine Funktion von SASH1 als ein Tumorsuppressor hin. Das humane *SASH1*-Gen befindet sich auf Chromosom 6 und besitzt 20 Exons (Zeller, C. et al., 2003). Das Protein besteht aus 1247 Aminosäuren und hat eine Masse von ungefähr 110 kDa.

SASH1 ist deutlich größer als SLy1 und SLy2 und besitzt zusätzliche Domänen im Vergleich zu den beiden anderen Proteinen der SLy Familie. Am N-Terminus von SASH1 ist eine sogenannte „coiled-coil“-Domäne lokalisiert, und am C-Terminus befindet sich eine zweite SAM-Domäne (Abb. 3). Der mittlere Teil von SASH1 zeigt die höchste Homologie zu SLy1 und SLy2. Insbesondere in der SH3-Domäne sind die Proteine hoch homolog, was auf eine neue Familie von Adapterproteinen hinweist, da die Sequenz der SH3-Domäne von SLy1, SLy2 und SASH1 im Vergleich zu SH3-Domänen anderer Proteine eine deutlich geringere Homologie als untereinander zeigt (Beer, S. et al., 2005).



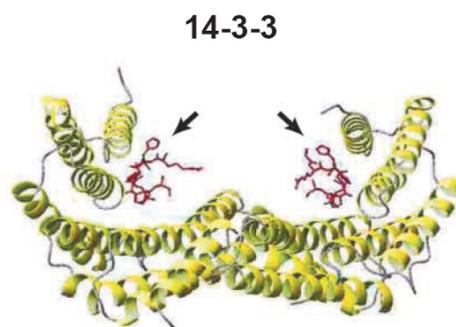
**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Proteine der SLy Familie**

mit zweigeteilter NLS, SH3- und SAM-Domäne. Die Aminosäure Serin27, an der SLy1 phosphoryliert wird, ist gekennzeichnet, ebenso wie das Serin23 von SLy2, das die potenzielle homologe Phosphorylierungsstelle darstellt. SASH1 besitzt im Vergleich zu SLy1 und SLy2 eine zweite SAM- und eine „coiled-coil“-Domäne (C-C).

## 1.4 14-3-3 Proteine

Die Mitglieder der 14-3-3 Proteinfamilie bilden eine Gruppe von hoch konservierten, sauren Proteinen mit einer Masse von ungefähr 30 kDa, die in vielen Organismen und Geweben exprimiert werden. Der Name 14-3-3 leitet sich vom Eluierungsmuster dieser Moleküle während einer zweidimensionalen DEAE-Zellulose-Chromatographie und einer Stärkegelelektrophorese ab. 14-3-3 Proteine aus einem Rindergehirnhomogenat eluieren in der 14. Fraktion von der DEAE-Zellulose-Säule und in den Fraktionen 3.3 im letzten Schritt. In Säugetieren sind sieben Isoformen bekannt, wobei die fünf Hauptisoformen der 14-3-3 Proteine im Gehirn mit den Buchstaben  $\alpha$ - $\eta$  versehen wurden, und zwar nach der Position

ihrer Eluierung während einer Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (Ichimura, T. et al., 1988; Toker, A. et al., 1992). 14-3-3 $\alpha$  und 14-3-3 $\delta$  stellen dabei die Phosphoformen von 14-3-3 $\beta$  beziehungsweise 14-3-3 $\zeta$  dar (Aitken, A. et al., 1995). Zwei weitere Isoformen – 14-3-3 $\tau$  (auch bekannt als  $\theta$ ) und 14-3-3 $\sigma$  - werden in T Zellen beziehungsweise in Epithelzellen exprimiert, wobei 14-3-3 $\tau$  ebenfalls in anderen Geweben inklusive dem Gehirn vorkommt. Homologe zu den 14-3-3 Proteinen wurden in vielen eukaryotischen Organismen gefunden. In fast allen bekannten Organismen wurden mindestens zwei Isoformen von 14-3-3 Proteinen entdeckt (Aitken, A., 2002), wobei wenigstens 12 - wahrscheinlich eher 15 - Isoformen allein in *Arabidopsis* identifiziert wurden (Rosenquist, M. et al., 2000). 14-3-3 Proteine sind in der Lage, sowohl Homo- als auch Heterodimere zu generieren (Dougherty, M.K. und Morrison, D.K., 2004; Bridges, D. und Moorhead, G.B., 2005), und sie können die Interaktionen zwischen Proteinen modulieren. Die ersten 14-3-3 Kristallstrukturen der Isoformen  $\tau$  und  $\zeta$  zeigten, dass 14-3-3 Proteine helikale, dimere Moleküle sind (Liu, D. et al., 1995; Xiao, B. et al., 1995). Jedes Monomer besteht aus neun antiparallelen  $\alpha$ -Helices, welche in einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne organisiert sind. Das Dimer wiederum bildet einen großen, negativ geladenen Kanal. Die Regionen, die in allen Isoformen hoch konserviert sind, sind in der Regel in diesem Kanal lokalisiert, variable Reste hingegen eher auf der Oberfläche der Proteine. In Abb. 4 ist die Struktur eines 14-3-3 Dimers dargestellt.



**Abbildung 4: Struktur eines 14-3-3 Dimers.**

Das dargestellte Molekül ist von der Struktur eines 14-3-3 $\zeta$  Dimers abgeleitet. Die beiden Pfeile weisen auf gebundene Phosphoserin-Peptide hin (nach Rittinger, K. et al., 1999).

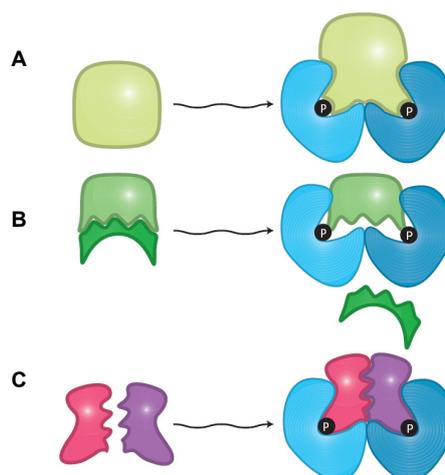
14-3-3 Proteine sind an Prozessen wie der intrazellulären Signaltransduktion, der Regulation des Zellzyklus, dem intrazellulären Transport von Molekülen, der Strukturierung des Zytoskeletts und der Transkription beteiligt. In den meisten Fällen ist die Bindung von 14-3-3 Proteinen an ihre Interaktionspartner abhängig von der Phosphorylierung letzterer (Scholz, R.P. et al., 2009). Es gibt allerdings auch Beispiele in der Literatur für eine phosphorylie-

rungsunabhängige Bindung von 14-3-3 Proteinen an ihre Partner, wie im Falle des Exoenzyms S (ExoS) (Ottmann, C. et al., 2007).

Für die phosphorylierungsabhängige Bindung von 14-3-3 Proteinen an ihre Zielmoleküle wurden konservierte Bindungsmotive entdeckt. Motiv 1 besitzt die Konsensussequenz RSXpSXP und Motiv 2 die Sequenz RXXXpSXP (Yaffe, M.B. et al., 1997; Rittinger, K. et al., 1999), wobei pS für einen phosphorylierten Serinrest steht. In beiden Fällen kann das Phosphoserin gegen ein Phosphothreonin ausgetauscht werden. Zudem existiert noch ein drittes, C-terminales Motiv mit der Sequenz pS/pTX<sub>1,2</sub>, wobei das X nicht für ein Prolin stehen kann (Aitken, A., 2006).

14-3-3 Proteine können ebenfalls phosphoryliert werden. Dies kann eine wichtige regulatorische Rolle für die Funktion der Moleküle spielen, da durch die Phosphorylierung eines 14-3-3 Proteins zum Beispiel die Interaktion mit einem Zielmolekül verhindert werden kann. Zudem ist es möglich, dass eine Phosphorylierung auch einen Einfluss auf die Dimerisierungseigenschaften der 14-3-3 Proteine ausübt.

Die Interaktion von 14-3-3 Proteinen mit ihren Zielmolekülen dient oftmals der Regulation der subzellulären Lokalisation dieser Zielmoleküle (Muslin, A.J. und Xing, H., 2000). Zusätzlich kann die Bindung an 14-3-3 Proteine eine „Gerüstfunktion“ darstellen, so dass makromolekulare Komplexe entstehen können, oder die Bindung an 14-3-3 Proteine bewirkt beim Interaktionspartner eine Konformationsänderung, die wiederum für die Eigenschaften dieses Moleküls entscheidend ist (Dougherty, M.K. und Morrison, D.K., 2004; Bridges, D. und Moorhead, G.B., 2005). In Abb. 5 sind mögliche strukturelle Effekte einer Bindung an 14-3-3 Proteine dargestellt.



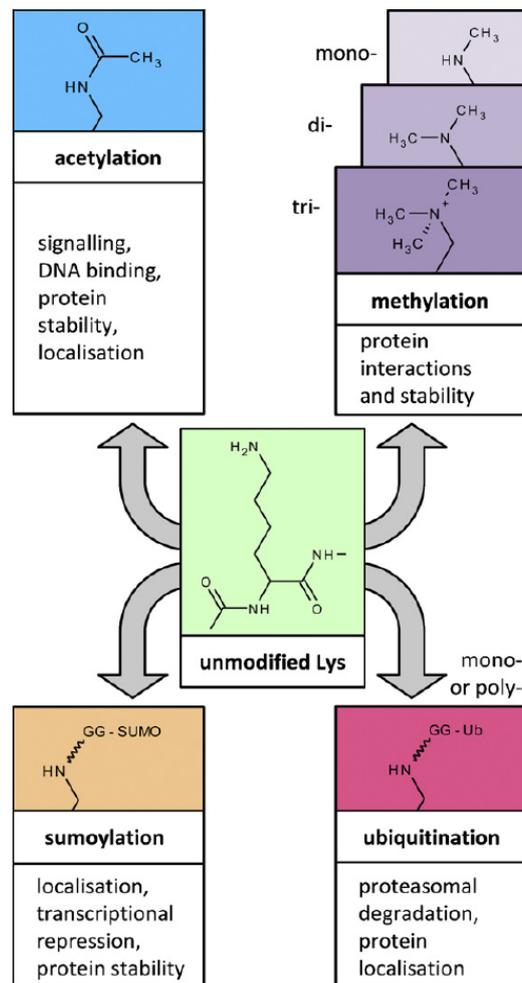
**Abbildung 5: Strukturelle Effekte einer Bindung an 14-3-3 Proteine.**

Die Interaktion mit einem 14-3-3 Dimer (dargestellt in blau) kann drei Effekte beim Interaktionspartner hervorrufen: (A) Konformationsänderung; (B) Verdeckung einer speziellen Region (Interaktionsstelle mit einem Liganden oder anderen Molekül, enzymatisch aktive Region); oder (C) Kolokalisation von zwei Molekülen über die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen (nach Bridges, D. und Moorhead, G.B., 2005).

Die im Zuge dieser Arbeit untersuchten putativen Adapterproteine SLy1 und SLy2 besitzen in ihrer Aminosäuresequenz mindestens eine potenzielle 14-3-3 Proteinbindestelle, die dem Konsensusmotiv 1 entspricht. Diese Interaktionsstelle schließt bei SLy1 das phosphorylierte Serin27 ein, bei SLy2 analog dazu die potenzielle homologe Phosphorylierungsstelle am Serin23.

## **1.5 Transkriptionsregulation durch Acetylierung und Deacetylierung von Histonen**

Die Regulation der Transkription erfolgt in eukaryotischen Organismen auf mehreren Ebenen. Während der zellulären Differenzierung und als Reaktion auf Hormone und Signale von Nachbarzellen wird sowohl die Konzentration als auch die Aktivität von Aktivatoren und Repressoren, welche die Transkription vieler proteincodierender Gene beeinflussen, gesteuert. Diese aktivierenden oder reprimierenden Moleküle bewirken Veränderungen der Chromatinstruktur sowie Histonacetylierung und -deacetylierung. Die DNS liegt in eukaryotischen Organismen nicht frei vor, sondern sie ist mit Proteinen assoziiert und bildet so das Chromatin. Die grundlegende Struktureinheit des Chromatins ist das Nukleosom, das aus 147 Basenpaaren der DNS besteht, die sich fest um einen zylinderförmigen Kern von Histonproteinen winden. Der Histonkern ist ein Oktamer, welches aus vier verschiedenen Histonmolekülen besteht: H2A, H2B, H3 und H4. Im kondensierten Chromatin assoziieren die Nukleosomen zu einer Faser mit einem Durchmesser von ungefähr 30 nm. Die Aminosäurereste am Aminoacylende jedes Histonmoleküls ragen aus der Nukleosomoberfläche heraus. Unter diesen Aminosäureresten befinden sich sehr viele Lysine, die durch Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Sumoylierung oder auch das Anhängen von Ubiquitinmolekülen reversibel modifiziert werden können. In Abb. 6 sind mögliche Modifikationen an Lysinresten dargestellt.



**Abbildung 6: Lysinmodifikationen.**

Lysinreste können reversibel posttranslational modifiziert werden, wodurch unterschiedliche funktionelle Konsequenzen entstehen. Mit Hilfe eines Modifikationswechsels können die Eigenschaften von lysinreichen Proteinen – wie zum Beispiel den Histonen – verändert werden. Mögliche Lysinmodifikationen sind neben einer Acetylierung auch die Methylierung, die Sumoylierung oder eine Ubiquitinierung. Diese Modifikationen können nachfolgend einen Einfluss auf die Proteinstabilität, die Lokalisation, Interaktionen mit anderen Molekülen, die Signalweiterleitung, proteosomalen Abbau und DNS-Bindeeigenschaften ausüben (nach Spange, S. et al., 2009).

Die Acetylierung von Histonen erfolgt mit Hilfe spezieller Enzyme, den sogenannten Histonacetyltransferasen (HATs). Die Deacetylierung hingegen wird von den Histondeacetylasen (HDACs) durchgeführt (Hebbes, T.R. et al., 1988; Braunstein, M. et al., 1993).

Die Aktivierung der Transkription geht in der Regel mit der Acetylierung von Histonen einher, wohingegen eine Histondeacetylierung eine Repression der Genexpression bewirkt (Yang, X.J. und Seto, E., 2003; Gallinari, P. et al., 2007). Der Grund hierfür besteht darin, dass im Fall nichtacetylierter Histone die Lysinreste positiv geladen sind und somit starke Wechsel-

wirkungen mit den Phosphatgruppen der DNS möglich sind, so dass die Affinität der DNS zur Oberfläche des Nukleosoms besonders groß ist. Diese starke Wechselwirkung verhindert, dass sich allgemeine Transkriptionsfaktoren an die TATA-Box und den Initiationsbereich binden können. Im Falle hyperacetylierter Histon-Aminoacylenden sind die positiv geladenen Lysinreste neutralisiert und können keine elektrostatischen Wechselwirkungen mit der DNS eingehen. Somit wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promoterbereich viel weniger behindert, so dass die Genexpression stattfinden kann.

Die Histonacetyltransferasen sind evolutionär konserviert und bilden unterschiedliche Komplexe. Sie katalysieren den Transfer einer Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinresten. In Säugetieren existieren über 30 HATs, die mit unterschiedlicher Substratspezifität sowohl Histone, aber auch Nicht-Histon Proteine acetylieren können. Hierbei scheinen sie ein potenzielles Erkennungsmotiv zu benötigen: GKXXP (Rojas, J.R. et al., 1999; Bannister, A.J. et al., 2000). Histonacetyltransferasen werden in zwei Klassen eingeteilt: A- und B-Typ HATs. A-Typ HATs sind im Zellkern lokalisiert und acetylieren Lysinreste im Zusammenhang mit der Regulation von Transkription. B-Typ HATs hingegen lokalisieren im Zytoplasma und acetylieren „de novo-synthetisierte“ freie Histone. Die beiden Enzyme CBP und p300 stellen die am meisten analysierten HATs dar.

Die Histondeacetylasen werden aufgrund ihres phylogenetischen Konservierungsmusters in vier Klassen eingeteilt (Grozinger, C.M. und Schreiber, S.L., 2002; Gregoretti, I.V. et al., 2004). Die Klasse I besteht aus den Molekülen HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8, die Homologe des Hefeproteins Rpd3 sind. Die HDACs der Klasse I werden ubiquitär exprimiert und lokalisieren, mit Ausnahme von HDAC3, im Zellkern.

Die Klasse II umfasst HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 und HDAC10 und ist homolog zum Hefeprotein Hda1. Die Expression der Klasse II HDACs ist auf bestimmte Gewebe restringiert, und die Enzyme wandern zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und her.

Klasse III wiederum besteht aus den Sirtuinen SIRT1 bis SIRT7, welche Homologe des Hefeproteins Sir2 darstellen. Bei SIRT1, -6 und -7 handelt es sich um nukleäre Proteine, SIRT2 lokalisiert im Zytoplasma und SIRT3, -4 und -5 stellen mitochondriale Proteine dar.

Die HDAC-Klasse IV wiederum enthält HDAC11-verwandte Enzyme.

HATs und HDACs sind allerdings auch in der Lage, Lysinreste in Nicht-Histon-Proteinen zu acetylieren beziehungsweise zu deacetylieren. Mittlerweile ist bekannt, dass in eukaryotischen Zellen die Acetylierung eine der meist verbreiteten kovalenten Modifikationen darstellt, deren Bedeutung einer Phosphorylierung ungefähr gleichzusetzen ist. Beispiele für Moleküle, die acetyliert werden, sind der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Untereinheit p65) und der Tumorsuppressor p53 (Spange, S. et al., 2009).

## 1.6 Die Histondeacetylase 1 (HDAC1) und ihre Komplexe

HDAC1 gehört zur Klasse I der Histondeacetylase, wird ubiquitär exprimiert und ist im Zellkern lokalisiert. Allerdings konnten Kim *et al.* in einer Studie zeigen, dass HDAC1 im Gehirn von Patienten mit Multipler Sklerose in verletzten Axonen aus dem Nukleus heraus ins Zytoplasma transportiert wird (Kim, J.Y. *et al.*, 2010). HDAC1 scheint hierbei in der Lage zu sein, den axonalen Transport negativ zu beeinflussen, indem es die Motorprotein-Mikrotubuli-Interaktion unterbricht. Zudem existieren Studien zu Neuroblastom-Zellen, in denen HDAC1 ebenfalls aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert wird (Zhang, Y. und Jones, C., 2001; Gu, H. *et al.*, 2005).

Die Expression des *HDAC1*-Gens wird in murinen Zellen durch Wachstumsfaktoren angeregt und durch das eigene Genprodukt über eine negative Rückkopplungsschleife kontrolliert (Hauser, C. *et al.*, 2002; Schuettengruber, B. *et al.*, 2003). HDAC1 bildet häufig Heterodimere mit dem sehr nah verwandten Enzym HDAC2, allerdings kann HDAC1 auch homodimerisieren (Gregoretti, I.V. *et al.*, 2004). HDAC1 ist an vielen zellulären Prozessen, wie zum Beispiel Proliferation, Differenzierung, Zellzyklus oder auch der embryonalen Entwicklung beteiligt (Lagger, G. *et al.*, 2002). Die essentielle Bedeutung von HDAC1 wird durch Analysen untermauert, welche zeigen, dass ein HDAC1-„knockout“ bei Mäusen zu embryonaler Letalität führt (Lagger, G. *et al.*, 2002). HDAC1 und HDAC2 sind Komponenten von drei Multiprotein-Komplexen: dem Sin3-Komplex, dem NuRD-Komplex und dem CoREST-Komplex (Ahringer, J., 2000). Der NuRD-Komplex (Nucleosome Remodeling and Deacetylating-Komplex, auch bekannt als Mi-2) hat eine ungefähre Größe von 2 MDa und umfasst in Säugerzellen mindestens sieben Polypeptide. Neben seiner Histondeacetylaseaktivität besitzt dieser Komplex zusätzlich auch eine ATP-abhängige Nucleosom-Umstrukturierungsaktivität, da er Proteine aus der Mi-2/CHD-Familie enthält, die neben einer Chromodomäne (Chromatin Organization Modifier-Domäne) auch eine DNS-Helikase/ATPase-Domäne und sogenannte Plant Homeodomain (PHD)-Finger (Interaktion mit DNS) besitzen.

Der CoREST-Komplex wurde zuerst von You *et al.* beschrieben und unterscheidet sich in seinen Komponenten deutlich von den anderen zwei HDAC-Komplexen (You, A. *et al.*, 2001). Neben HDAC1, HDAC2 und anderen Molekülen enthält er den Ko-Repressor CoREST.

Der Sin3-Komplex umfasst den Ko-Repressor mSin3, die Histondeacetylase HDAC1 und HDAC2, die histonbindenden Moleküle mit dem Namen Retinoblastoma (rb)-associated proteins 46 und 48, das Protein SAP30 (Sin3-associated polypeptide 30) sowie weitere Moleküle (Zhang, Y. *et al.*, 1997; Zhang, Y. *et al.*, 1998). Neuere Studien zeigen, dass dieser Komplex aus mindestens zehn Polypeptiden zusammengesetzt ist, deren Funktion in vielen Fällen noch nicht vollständig geklärt ist. Eine essenzielle Funktion dieser Komponenten könnte

die Stabilisierung des Komplexes sein oder die Bereitstellung von Interaktionsmodulen zur Rekrutierung weiterer Moleküle (Hassig, C.A. et al., 1997; Laherty, C.D. et al., 1997; Laherty, C.D. et al., 1998; Lai, A. et al., 2001; Alland, L. et al., 2002; Fleischer, T.C. et al., 2003; Shiio, Y. et al., 2006).

Das Sin3-Protein ist nicht in der Lage, DNS zu binden und besitzt auch keinerlei enzymatische Aktivität. Aus diesem Grund scheint es als ein Gerüstmolekül für den Zusammenbau des Sin3-Komplexes zu dienen. Zudem vermag es, Komponenten des Sin3-Komplexes mit DNS-bindenden Repressoren zu verknüpfen (Ayer, D.E. et al., 1995; Knoepfler, P.S. und Eisenman, R.N., 1999).

Das ebenfalls im Sin3-Komplex enthaltene Protein SAP30 interagiert zusätzlich auch mit einigen anderen Molekülen, zum Beispiel mit dem Protein CIR (CBF1-interacting corepressor), dem Transkriptionsfaktor Yin Yang 1 (YY1), dem Molekül RBP1 (retinoblastoma-binding protein 1) oder dem Tumorsuppressor ING1b (inhibitor of growth 1b) (Hsieh, J.J. et al., 1999; Lai, A. et al., 2001; Skowrya, D. et al., 2001; Kuzmichev, A. et al., 2002; Huang, N.E. et al., 2003).

Weitere Studien belegen, dass eine Repression der Transkription über das Molekül SAP30 auch für die Übertragung und Vermehrung bestimmter Viren wichtig ist (Krithivas, A. et al., 2000; Le May, N. et al., 2008).

Insgesamt hat SAP30 im Sin3-Komplex ganz entscheidende Funktionen. In Abhängigkeit von lokalen Faktoren, wie zum Beispiel dem Status des Chromatins oder der Anwesenheit spezieller Interaktionspartner, greift SAP30 mit Hilfe des Sin3-Komplexes in die Regulation der Transkription etlicher Gene ein (Ahringer, J., 2000; Kuzmichev, A. et al., 2002; Zupkovitz, G. et al., 2006).

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Adapterproteine spielen während der Weiterleitung von intrazellulären Signalen eine wesentliche Rolle. Sie sind an der Generierung von Multiprotein-Komplexen beteiligt und sorgen für eine räumlich und zeitlich begrenzte Interaktion von Molekülen, die in den verschiedenen Signaltransduktionskaskaden involviert sind. Die SLy Proteinfamilie besteht aus drei Mitgliedern, welche aufgrund ihrer Domänenstruktur mit SH3- und SAM-Modulen putative Adapterproteine darstellen. Das zuerst beschriebene Mitglied dieser Familie, SLy1, wird spezifisch in T und B Zellen nach Antigen-Rezeptor-Stimulation phosphoryliert. Dieser Befund spricht für eine Rolle des SLy1-Proteins in den nachfolgenden Signalkaskaden dieser Zellen (Beer, S. et al., 2001; Astoul, E. et al., 2003).

Aufgrund der typischen Adapterproteinstruktur von SLy1 und SLy2 sollten Interaktionspartner für beide Moleküle gesucht werden, um weitere Hinweise auf die Funktion von SLy1 und

SLy2 zu erhalten. In diesem Zusammenhang sollte ein Vergleich des Interaktionsverhaltens beider Proteine erfolgen, da SLy1 und SLy2 zwar hoch homolog sind, ihr Expressionsmuster allerdings stark voneinander abweicht.

Die Suche nach Interaktionspartnern von SLy1 und SLy2 sollte mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems durchgeführt werden. Dazu sollte diese Technik zunächst etabliert werden. Nachfolgend sollte die Interaktion von SLy1 und SLy2 mit den über das Hefe Zwei-Hybrid-System identifizierten Proteinen mittels weiterer, biochemischer Techniken verifiziert und eine bestehende Interaktion von SLy1 und SLy2 mit ihren Interaktionspartnern funktionell weiter charakterisiert werden.

Da die grundlegenden Eigenschaften beider Moleküle noch nicht vollständig analysiert sind, sollte zudem auch die subzelluläre Lokalisation der wildtypischen Proteine im Vergleich zu SLy1- und SLy2-Deletionsmutanten untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bezugsquellennachweis

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Adenin-Hemisulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Adenosintriphosphat (ATP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Agar	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ampicillin, Na-Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Flag <sup>®</sup> M2-Agarose Affinity Gel	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid (X- $\alpha$ -Gal)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin), frei von Fettsäuren	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DAPI	Molecular Probes, USA
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs, je 10 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
DNS Größenstandard (MassRuler <sup>™</sup> DNA Ladder Mix, 103 ng/ $\mu$ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

---

Drop-out Supplement	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FluoromountG	Southernbiotech, Birmingham, USA
Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare, München
Glyzerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
HEPES Puffer, 1M	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lachssperma-DNS, Na-Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Histidin	Merck, Darmstadt
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Leucin	Merck, Darmstadt
L-Tryptophan	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Oxoid, Hampshire, England
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure (BES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet P 40 (Igepal CA-630)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Octylphenoldecaethylenglycolether (Triton X-100)	Merck, Darmstadt

Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphate-Buffered Saline Dulbecco (PBS Dulbecco)	Invitrogen, Karlsruhe
Polybren	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyethylenglykol (PEG, MW 3350)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Merck, Darmstadt
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein Größenstandard (Rainbow coloured protein high molecular weight marker, ca. 1 mg/ml von jedem Protein)	GE Healthcare, München
Protein G-Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, München
Re-Blot Plus Strong Solution	Millipore, Schwalbach
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren	BD Diagnostic Systems, Sparks, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ultrapure H <sub>2</sub> O	Invitrogen, Karlsruhe
Ziegenserum	DaKoCytomation, Hamburg

### 2.1.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase)	USB Corporation, Cleveland, USA
DNS Polymerase Pyrobest™	Takara, Japan
DNS T4 Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Polynukleotidkinase	New England BioLabs, Frankfurt a.M.

### 2.1.3 Kits und Verbrauchsmaterial

Reagenz/Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
BCA Protein Assay Kit	Pierce-Thermo Scientific, Rockford, USA
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Filme Hyperfilm™-ECL	GE Healthcare, München
Filterpapier Whatman 3MM	VWR, Darmstadt
Glaskügelchen (425-600 µm)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HDAC Assay Kit (Fluorometric Detection)	Millipore-Upstate, Schwalbach
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
jetPEI™ DNS-Transfektionsreagenz	Polyplus, Illkirch, Frankreich
Kanülen	BD Pharma, Heidelberg
Membrane Lipid Strips™	Echelon, Salt Lake City, USA
Nitrozellulosemembran (Protran BA 85)	Schleicher & Schuell, Dassel
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
PCR-Softstrips (0,2 ml)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
PIP Array™	Echelon, Salt Lake City, USA
PIP Strips™	Echelon, Salt Lake City, USA
Plasmid Isolierungskits	QIAGEN, Hilden
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden BD Falcon, Heidelberg Corning, Amsterdam, Niederlande Iwaki, Japan Sarstedt, Nümbrecht
ProteoExtract®	Calbiochem-Merck, Darmstadt
Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit	
ProteoExtract®	Calbiochem-Merck, Darmstadt
Subcellular Proteome Extraction Kit	
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld
Yeastmaker™ Yeast Plasmid Isolation Kit	Takara Bio Europe/Clontech, Saint- Germain-en-Laye, Frankreich
Zellsieb (70 µm, Nylon)	BD Falcon, Heidelberg

### 2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage (Chyo JL-180)	Welabo, Düsseldorf
Brutschrank (BBD 6220)	Heraeus, Hanau
Drehrad (Model L 28)	Labinco BV, Breda, Niederlande
Elektrophoresekammer für DNS	Hoefer, Amstetten
Elektrophoresekammer für NuPAGE Gele (XCELL SureLock Mini-Cell)	Invitrogen, Karlsruhe
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Bio-Rad, München
ELISA Reader Sunrise	Tecan, Crailsheim
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln
Geldokumentationsanlage	Biometra, Göttingen
Konfokales Lasermikroskop (LSM 510 Meta)	Zeiss, Jena
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifugen	Heraeus, Hanau
Sorvall® RC 26 PLUS	
Megafuge 1.0,	
Omnifuge 2.0 RS	
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Multimode Microplate Reader (Mithras LB 940)	Berthold Technologies, Bad Wildbad
PCR-Geräte	Biometra, Göttingen
T1 Thermocycler,	
T3 Thermocycler,	
T-Gradient	
pH-Meter (MP225)	Mettler Toledo, Giessen
Photometer (GeneQuantII)	Pharmacia, Braunschweig
Pipettierhilfe (Pipet-Boy, accu-jet)	Brand, Wertheim
Pipetten	Thermo Scientific, Rockford, USA
Proteintransfer-Apparatur (Transblot SD)	Bio-Rad, München
Schüttler für Bakterienkulturen (3015)	GFL, Burgwedel
Sterilbank (Hera Safe)	Heraeus, Hanau
Thermoblöcke	
Thermomixer Compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
DRI Block	Techne, Jahnsdorf

## Tischzentrifugen

Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415 C, miniSpin	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Ultraschall-Anlage (Branson-Sonifier 450)	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Ultrazentrifuge L60	Beckman Coulter, Krefeld
Ultrazentrifugenrotor SW55Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Waage (Precisa 600)	Oehmen, Essen
Wasserbad	
WNB22	Memmert, Schwabach
1092	GFL, Burgwedel
E100	Lauda, Lauda-Königshofen

**2.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze****Medien/Zusätze****Bezugsquelle**


---

β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 4,5 g/l Glukose + L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS), inaktiviert bei 56°C für 30 min	PAN Biotech, Aidenbach
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium - L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.2 Medien und Puffer

### 2.2.1 Stammlösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ampicillin Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin in ddH <sub>2</sub> O
Auftragspuffer für DNS (6x)	15% Ficoll Typ 400 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol
2x BBS	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6,92
Blockierlösung	2% Ziegenserum in 0,1 x Permeabilisierungslösung
Coomassie-Blau-Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 10% (v/v) Eisessig 40% (v/v) Ethanol
Coomassie-Blau-Entfärbelösung	7% (v/v) Essigsäure 5% (v/v) Ethanol
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH <sub>4</sub> CL 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM EDTA
Fixierlösung	4% PFA in PBS
2x HBS-Lösung	280 mM NaCl 100 mM HEPES 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 7,11 ≤ pH ≤ 7,13

---

Kanamycin Stammlösung	50 mg/ml Kanamycin in ddH <sub>2</sub> O
MOPS-SDS-Laufpuffer (Western Blot)	50 mM MOPS 50 mM Tris 0,1% (w/v) SDS 1 mM EDTA pH 7,7
PEG/Lithiumacetatlösung (Hefetransformation)	40% PEG 1x TE 0,1 M Lithiumacetat
Permeabilisierungslösung	0,05% Saponin in PBS
Protease-Inhibitor-Mischung für das Aufschließen von Hefen	0,1 mg/ml Pepstatin A 0,03 mM Leupeptin 145 mM Benzamidin 0,37 mg/ml Aprotinin
5x Protein-Auftragspuffer	10% SDS 25% β-Mercaptoethanol 30 mM Tris-HCl pH 6,8 0,15% Bromphenolblau 45% Glyzerin
Puffer A (fraktionierte Zellyse)	10 mM HEPES pH 7,9 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 0,5 mM DTT 0,2 mM PMSF 0,4 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette pro 10 mL auflösen

---

Puffer B (fraktionierte Zelllyse)	20 mM HEPES pH 7,9 420 mM NaCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2 mM EDTA 0,5 mM DTT 0,2 mM PMSF 0,4 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette pro 10 mL auflösen
Puffer für das Aufschließen von Hefen	8 M Harnstoff 5% (w/v) SDS 40 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1 mM EDTA 0,4 mg/ml Bromphenolblau 1% (v/v) β-Mercaptoethanol 5% (v/v) PMSF (100X) 7% (v/v) Protease-Inhibitor-Mischung
TAE (Elektrophoresepuffer, DNS)	40 mM Tris pH 8,0 2mM EDTA 20 mM Eisessig
10x TE-Puffer	0,1 M Tris-HCl 10 mM EDTA pH-Wert auf 7,5 einstellen
Transferpuffer (Western Blot)	1,25 mM Bicin 1,25 mM Bis-Tris 0,05 mM EDTA 20% (v/v) Methanol pH 7,2
TBS-T	10 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 0,1% Tween 20

---

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 7,5
Waschpuffer B (IP)	0,2% NP-40 150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 7,6 1 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette pro 10 ml auflösen
Waschpuffer C (IP)	0,2% NP-40 500 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 7,6 1 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette pro 10 ml auflösen
Zelllyse-Puffer	1% NP-40 10 mM NaF 1 mM $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 1 mM PMSF 140 mM NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7,6 5 mM $\text{MgCl}_2$ 1 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette pro 10 mL auflösen
Zelllyse-Puffer, hypotonisch (Lipid-Membranen)	50 mM Tris-HCl pH 7,4 5 mM NaF 1 mM PMSF 1 mM $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 1 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette pro 10 mL auflösen

### 2.2.2 Medien für die Bakterienkultur

Die Medien (s. Tab. 1) wurden durch Autoklavieren (121°C/2 bar/20 min) sterilisiert. Um Festmedium zu erhalten, wurden dem Medium 15 g Agar pro Liter vor dem Autoklavieren zugesetzt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte aerob bei 37°C. Bakterien auf Agarplatten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 4°C maximal 4 Wochen aufbewahrt. Zur Langzeitkonservierung wurden über Nacht gewachsene Flüssigkulturen mit 50% sterilem Glycerin vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

**Tabelle 1: Bakterienkulturmedien**

Medium	Zusammensetzung	Menge
LB	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 l
	pH = 7,2	
2 x YT	Trypton	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 l
	pH = 7,0	
S.O.C.	Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	Glukose	20 mM
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 l
	pH = 7	

Zur positiven Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Kulturmedium je nach verwendetem Plasmid Ampicillin oder Kanamycin beigefügt (s. Tab. 2).

**Tabelle 2: Verwendete Antibiotika**

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , sterilfiltriert	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , sterilfiltriert	100 µg/ml

### 2.2.3 Medien für die Hefekultur

**Tabelle 3: Hefekulturmedien**

Medium	Zusammensetzung	Menge
YPDA	Pepton	20 g
	Hefeextrakt	10 g
	Glukose	20 g
	Adenin-Hemisulfat	0,1 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 l
	pH = 5,8	
„Drop-out“- Medium	Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren	6,7 g
	Glukose	20 g
	Adenin-Hemisulfat (optional)	0,04 g
	Dropout Supplement (- Leu, - Trp, - His, - Ade)	0,6 g
	L-Histidin (optional)	0,2 g
	L-Leucin (optional)	1 g
	L-Tryptophan (optional)	0,2 g
	X-α-Gal (optional)	0,04 g
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 l
	pH = 5,8	

Das Medium wurde durch Autoklavieren (121°C/2 bar/20 min) sterilisiert. Um Festmedium zu erhalten, wurden dem Medium 20 g Agar pro Liter vor dem Autoklavieren zugesetzt.

Je nach Bedarf wurden dem „Dropout“-Medium vor dem Autoklavieren Adenin-Hemisulfat bzw. nach dem Autoklavieren die angegebenen Aminosäuren beigelegt. Für die Blau-Weiß-Selektion wurde dem „Dropout“-Medium zusätzlich X-α-Gal zugegeben und Agarplatten gegossen.

Die Anzucht der Hefekulturen erfolgte aerob bei 30°C. Platten mit Hefekolonien wurden mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert. Zur Langzeitkonservierung wurde eine einzelne

Hefekolonie steril in 500 µl Medium überführt, Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 25% zugegeben, gemischt und bei -80°C gelagert.

## 2.2.4 Medien für die Zellkultur

**Tabelle 4: Medien und Zusätze**

	<b>Jurkat</b>	<b>293 T/ 293 FT</b>	<b>HeLa</b>
Grundmedium	RPMI	DMEM	DMEM
Zusätze			
FKS	10%	10%	10%
Penicillin (U/ml)	100	100	100
Streptomycin (µg/ml)	100	100	100
L-Glutamin	2 mM		
β-ME (mM)	0,05		
Natriumpyruvat	1 mM		

## 2.3 Bakterienstämme, Hefestämme und Zelllinien

### 2.3.1 Bakterienstämme

In Tab. 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme unter Angabe des Genotyps und der Referenz aufgelistet. Die Bakterienstämme *E. coli* DH5α und ElectroMAX™ DH5α-E™ wurden für die Amplifikation von Plasmid-DNS verwendet, der Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3) gold hingegen diente der Expression von Fusionsproteinen.

**Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme**

<b>Bakterienstamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, D., 1983)
ElectroMAX™ DH5α-E™	F <sup>-</sup> 80d/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) gal phoA supE44 λ<sup>-</sup> thi1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>f</sup> galλ (DE3) endA Hte</i>	Stratagene, Waldbronn

### 2.3.2 Hefestamm

In Tab. 6 ist der in dieser Arbeit verwendete Hefestamm unter Angabe des Genotyps und der Referenz aufgelistet.

**Tabelle 6: Verwendeter Hefestamm**

Hefestamm	Genotyp	Referenz
AH109	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2</i> , <i>GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3</i> , <i>GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2</i> , <i>URA3</i> , <i>MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	(James, P. et al., 1996)

### 2.3.3 Zellen und Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7: Verwendete Zellen und Zelllinien**

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
Jurkat	Humane T-Lymphom-Zelllinie	Tumorbank, DKFZ
Jurkat SLy1-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy1-HA transduzierte Jurkat Zellen	Bernhard Reis, Düsseldorf
Jurkat SLy1S27A-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy1S27A-HA transduzierte Jurkat Zellen	Bernhard Reis, Düsseldorf
Jurkat SLy1Δ-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy1Δ-HA transduzierte Jurkat Zellen	Bernhard Reis, Düsseldorf
Jurkat SLy1ΔNLS-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy1ΔNLS-HA transduzierte Jurkat Zellen	Bernhard Reis, Düsseldorf
Jurkat SLy1ΔSH3-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy1ΔSH3-HA transduzierte Jurkat Zellen	in dieser Arbeit generiert
Jurkat SLy1ΔSAM-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy1ΔSAM-HA transduzierte Jurkat Zellen	in dieser Arbeit generiert
Jurkat SLy1ΔPESTL-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy1ΔPESTL-HA transduzierte Jurkat Zellen	in dieser Arbeit generiert
Jurkat SLy1ΔPESTH-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy1ΔPESTH-HA transduzierte Jurkat Zellen	in dieser Arbeit generiert
Jurkat SLy2-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy2-HA transduzierte Jurkat Zellen	Max von Holleben, Düsseldorf

Jurkat SLy2S23A-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy2S23A-HA transduzierte Jurkat Zellen	Max von Holleben, Düsseldorf
Jurkat SLy2 $\Delta$ NLS-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy2 $\Delta$ NLS-HA transduzierte Jurkat Zellen	Max von Holleben, Düsseldorf
Jurkat SLy2 $\Delta$ SH3-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy2 $\Delta$ SH3-HA transduzierte Jurkat Zellen	Max von Holleben, Düsseldorf
Jurkat SLy2 $\Delta$ SAM-HA	Lentiviral mit pWPI-SLy2 $\Delta$ SAM-HA transduzierte Jurkat Zellen	Max von Holleben, Düsseldorf
HEK 293T	Humane, embryonale Nierenzelllinie	ATCC, Rockville, USA
293FT	Aus 293T Zellen abgeleitete Zelllinie zur Maximierung der Virusproduktion	(Naldini, L. et al., 1996)

## 2.4 Oligonukleotide

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert, gereinigt und lyophilisiert. In Tab. 8 sind die Primer aufgelistet, die für die Klonierung der verschiedenen in dieser Arbeit generierten Expressionskonstrukte verwendet wurden.

**Tabelle 8: Primer zur Klonierung verschiedener Fusionskonstrukte**

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
SLy2-myc_for	ATA GTC GAC ATG CTA AAG AGG AAG CCA TCC	SLy2-myc-Konstrukt
SLy2-myc_rev	ATT GCG GCC GCG AGG TCA CTG GAT TCT GTG	SLy2-myc-Konstrukt
Flag-SLy1_for	TAT GCG GCC GCA ATT TTG CGT CGC AAA CCC TCC	Flag-SLy1-Konstrukt
Flag-SLy1_rev	TAT GTC GAC TCA AGG TGC CCC AGA CAG G	Flag-SLy1-Konstrukt
Flag-SLy1 $\Delta$ NLS_for	TAT GCG GCC GCA ATT TTG CGT CGC AAA CCC TCC	Flag-SLy1 $\Delta$ NLS-Konstrukt
Flag-SLy1 $\Delta$ NLS_rev	TAT GTC GAC TCA AGG TGC CCC AGA CAG G	Flag-SLy1 $\Delta$ NLS-Konstrukt
SLy1_Frag1_ $\Delta$ SH3_rev	ACA GAA AGG CCC CGT GTA CTG GGG	Flag-SLy1 $\Delta$ SH3-Konstrukt

SLy1_Frag2_ΔSH3_for	GAG GAG GCT GTG GGA CCT GTA CGC CCC AGT CGC	Flag-SLy1ΔSH3- Konstrukt
SLy1_Frag1_ΔSAM_rev	TTT GCT CTG TCG GCG ACT GGG GCG	Flag-SLy1ΔSAM- Konstrukt
SLy1_Frag2_ΔSAM_for	GAC ACT GGC AGT GAA GAG GCT GAA GAG	Flag-SLy1ΔSAM- Konstrukt
SLy1_Frag1_ΔPESTH_rev	CAC CAT CAT CTT GCC CAT CTT	Flag-SLy1ΔPESTH- Konstrukt
SLy1_Frag2_ΔPESTH_for	AAG ATG GCC CTG GCC TTT AC	Flag-SLy1ΔPESTH- Konstrukt
SLy1_Frag1_ΔPESTL_rev	CTC GCT CAC CAC GGG GGA	Flag-SLy1ΔPESTL- Konstrukt
SLy1_Frag2_ΔPESTL_for	AAG AGT GGC AAA AAG TTG GG	Flag-SLy1ΔPESTL- Konstrukt
SLy1ΔSH3-HA_for	AAA ATT TAA ATG CCA CCA TGT TGC GTC GCA AAC CCT CC	SLy1ΔSH3-HA-Konstrukt
SLy1ΔSH3-HA_rev	AGC TTA ATT AAT CAC GCG TAA TCT GGA ACA TCG TAT GGG TAA GGT GCC CCA	SLy1ΔSH3-HA-Konstrukt
SLy1ΔSAM-HA_for	AAA ATT TAA ATG CCA CCA TGT TGC GTC GCA AAC CCT CC	SLy1ΔSAM-HA- Konstrukt
SLy1ΔSAM-HA_rev	AGC TTA ATT AAT CAC GCG TAA TCT GGA ACA TCG TAT GGG TAA GGT GCC CCA	SLy1ΔSAM-HA- Konstrukt
SLy1ΔPESTH-HA_for	AAA ATT TAA ATG CCA CCA TGT TGC GTC GCA AAC CCT CC	SLy1ΔPESTH-HA- Konstrukt
SLy1ΔPESTH-HA_rev	AGC TTA ATT AAT CAC GCG TAA TCT GGA ACA TCG TAT GGG TAA GGT GCC CCA	SLy1ΔPESTH-HA- Konstrukt
SLy1ΔPESTL-HA_for	AAA ATT TAA ATG CCA CCA TGT TGC GTC GCA AAC CCT CC	SLy1ΔPESTL-HA- Konstrukt

SLy1ΔPESTL-HA_rev	AGC TTA ATT AAT CAC GCG TAA TCT GGA ACA TCG TAT GGG TAA GGT GCC CCA	SLy1ΔPESTL-HA- Konstrukt
pGBKT7-SLy1_for	TAT GAA TTC ATT TTG CGT CGC AAA CCC	Klonierung der SLy1- cDNS in den Vektor pGBKT7
pGBKT7-SLy1_rev	TAT GTC GAC TCA AGG TGC CCC AGA CAG G	Klonierung der SLy1- cDNS in den Vektor pGBKT7
pGBKT7-SLy1_SH3_for	TAT GAA TTC GGG CGT GCC CGA GTC CAC ACT G	Klonierung der SLy1SH3-cDNS in den Vektor pGBKT7
pGBKT7-SLy1_SH3_rev	TAT GTC GAC GGG TAG CAC ATC CAC GTA GAT G	Klonierung der SLy1SH3-cDNS in den Vektor pGBKT7
pGBKT7-SLy1_SAM_for	TAT GAA TTC GGC AAG AGG CCC AAG CCC AAG	Klonierung der SLy1SAM-cDNS in den Vektor pGBKT7
pGBKT7-SLy1_SAM_rev	TAT GTC GAC ATA GTC CAG TAG CAG CTC TGC	Klonierung der SLy1SAM-cDNS in den Vektor pGBKT7
pGBKT7-SLy2_for	ATT GAA TTC ATT CTA AAG AGG AAG CCA TCC	Klonierung der SLy2- cDNS in den Vektor pGBKT7
pGBKT7-SLy2_rev	ATT GTC GAC TCA GTC ACT GGA TTC TGT G	Klonierung der SLy2- cDNS in den Vektor pGBKT7
pGBKT7-SLy2_SH3_for	TAT GAA TTC GGC CGG GCC AAA GTG CAC	Klonierung der SLy2SH3-cDNS in den Vektor pGBKT7
pGBKT7-SLy2_SH3_rev	TAT GTC GAC TAA GAT AAC ATC CAC ATA AAT	Klonierung der SLy2SH3-cDNS in den Vektor pGBKT7
pGBKT7-SLy2_SAM_for	TAT GAA TTC AGA AGA GAG AAC CAC CAG AC	Klonierung der SLy2SAM-cDNS in den Vektor pGBKT7

pGBKT7-SLy2_SAM_rev	TAT GTC GAC TTC ATC CAG GAG ACT CTC GG	Klonierung der SLy2SAM-cDNS in den Vektor pGBKT7
Flag-SAP30_for	ATT GAA TTC TAT TAA CGG CTT CAC TCC GGA GG	Flag-SAP30-Konstrukt
Flag-SAP30_rev	ATT GTC GAC CTA GTG AAC ACC ACT GTC G	Flag-SAP30-Konstrukt
GST-SAP30_for	TAT GAA TTC ATG AAC GGC TTC ACT CCG GAG G	GST-SAP30-Konstrukt
GST-SAP30_rev	TAT CTC GAG CTA GTG AAC ACC ACT GTC GGC C	GST-SAP30-Konstrukt

## 2.5 Plasmidvektoren

### 2.5.1 Ausgangsvektoren

Für die Klonierung und Expression von DNS-Sequenzen wurden verschiedene, teilweise kommerziell erhältliche Ausgangsvektoren verwendet.

In Tab. 9 sind zudem Plasmidvektoren aufgelistet, die im Verlauf der Arbeit zwar verwendet aber nicht eigenständig kloniert wurden.

**Tabelle 9: Verwendete Plasmidvektoren**

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
psPAX2	Lentiviraler Verpackungsvektor, CAG-Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Zufferey, R. et al., 1998) und <a href="http://tronolab.epfl.ch">http://tronolab.epfl.ch</a>
pEF/myc/cyto	Eukaryontischer Expressionsvektor für C-terminale myc-Fusionsproteine, humaner EF-1 $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
pFlag-CMV <sup>TM</sup> -2	Expressionsvektor für N-terminale Flag-Fusionsproteine, CMV-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
pGBKT7	Vektor für die Expression (in Hefe) von Proteinen, die mit den AS 1-147 der GAL4 DNS-Bindedomäne fusioniert werden sollen, ADH1-Promotor, c-myc-Epitop, TRP1-Gen, Kan <sup>R</sup>	Takara Bio Europe/Clontech

pGEX-4-T1	Prokaryontischer Expressionsvektor für N-terminale GST-Fusionsproteine, tac-Promotor, Amp <sup>R</sup>	GE Healthcare, München
pMD2G	Lentivirales Hüllplasmid, CMV-Promotor, Amp <sup>R</sup>	<a href="http://tronolab.epfl.ch">http://tronolab.epfl.ch</a>
pWPI	Lentiviraler bicistronischer Expressionsvektor mit einer GFP-Kassette unter Kontrolle einer IRES-Sequenz, EF-1 $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Zufferey, R. et al., 1998) und <a href="http://tronolab.epfl.ch">http://tronolab.epfl.ch</a>
SLy1-HA (pWPI)	Lentiviraler Expressionsvektor für ein SLy1-HA-Konstrukt, EF-1 $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	Bernhard Reis, Düsseldorf
SLy1S27A-HA (pWPI)	Lentiviraler Expressionsvektor für ein SLy1-HA-Konstrukt, in dem Serin27 zu Alanin mutiert wurde, EF-1 $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	Bernhard Reis, Düsseldorf
SLy1 $\Delta$ -HA (pWPI)	Lentiviraler Expressionsvektor für ein SLy1 $\Delta$ -HA-Konstrukt, dessen Sequenz dem SLy1 entspricht, das in den SLy1 <sup><math>\Delta\Delta</math></sup> -Mäusen vorkommt, EF-1 $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	Bernhard Reis, Düsseldorf
SLy1 $\Delta$ NLS-HA (pWPI)	Lentiviraler Expressionsvektor für ein SLy1-HA-Konstrukt, in dem der zweite Teil der NLS fehlt, EF-1 $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	Bernhard Reis, Düsseldorf
SLy2-HA (pWPI)	Lentiviraler Expressionsvektor für ein SLy2-HA-Konstrukt, EF-1 $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	Max von Holleben, Düsseldorf
SLy2S23A-HA (pWPI)	Lentiviraler Expressionsvektor für ein SLy2-HA-Konstrukt, in dem Serin23 zu Alanin mutiert wurde, EF-1 $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	Max von Holleben, Düsseldorf
SLy2 $\Delta$ NLS-HA (pWPI)	Lentiviraler Expressionsvektor für ein SLy2-HA-Konstrukt, in dem der zweite Teil der NLS fehlt, EF-1 $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	Max von Holleben, Düsseldorf
SLy2 $\Delta$ SH3-HA (pWPI)	Lentiviraler Expressionsvektor für ein SLy2-HA-Konstrukt, in dem die SH3-Domäne fehlt, EF-1 $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	Max von Holleben, Düsseldorf
SLy2 $\Delta$ SAM-HA (pWPI)	Lentiviraler Expressionsvektor für ein SLy2-HA-Konstrukt, in dem die SAM-Domäne fehlt, EF-1 $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	Max von Holleben, Düsseldorf

SLy1-myc (pSecTagB)	Eukaryontischer Expressionsvektor für ein C-terminales SLy1-myc-Konstrukt, CMV-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Sandra Beer-Hammer, Tübingen
GST-14-3-3 $\beta$ (pGEX-4-T1)	Prokaryontischer Expressionsvektor für ein N-terminales GST-14-3-3 $\beta$ -Konstrukt, tac-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Angelika Hausser, Stuttgart
GST-14-3-3 $\gamma$ (pGEX-4-T1)	Prokaryontischer Expressionsvektor für ein N-terminales GST-14-3-3 $\gamma$ -Konstrukt, tac-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Angelika Hausser, Stuttgart
GST-14-3-3 $\epsilon$ (pGEX-4-T1)	Prokaryontischer Expressionsvektor für ein N-terminales GST-14-3-3 $\epsilon$ -Konstrukt, tac-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Angelika Hausser, Stuttgart
GST-14-3-3 $\eta$ (pGEX-4-T1)	Prokaryontischer Expressionsvektor für ein N-terminales GST-14-3-3 $\eta$ -Konstrukt, tac-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Angelika Hausser, Stuttgart
GST-14-3-3 $\sigma$ (pGEX-4-T1)	Prokaryontischer Expressionsvektor für ein N-terminales GST-14-3-3 $\sigma$ -Konstrukt, tac-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Angelika Hausser, Stuttgart
GST-14-3-3 $\tau$ (pGEX-4-T1)	Prokaryontischer Expressionsvektor für ein N-terminales GST-14-3-3 $\tau$ -Konstrukt, tac-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Angelika Hausser, Stuttgart
GST-14-3-3 $\xi$ (pGEX-4-T1)	Prokaryontischer Expressionsvektor für ein N-terminales GST-14-3-3 $\xi$ -Konstrukt, tac-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Angelika Hausser, Stuttgart
HDAC1-Flag (pcDNA3.1-Flag)	Prokaryontischer Expressionsvektor für ein C-terminales HDAC1-Flag-Konstrukt, CMV-Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Emiliani, S. et al., 1998)

## 2.5.2 Im Rahmen der Arbeit erstellte Vektoren

In Tab. 10 sind alle in dieser Arbeit generierten Plasmidvektoren aufgelistet.

**Tabelle 10: Hergestellte Plasmide**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Vektor</b>	<b>Insert</b>	<b>Eigenschaften</b>
Flag-SLy1	pFlag-CMV <sup>TM</sup> -2	SLy1-cDNS 5' fusioniert mit einer Flag-Epitop-Markierung	Eukaryontischer SLy1-Expressionsvektor
Flag-SLy1ΔNLS	pFlag-CMV <sup>TM</sup> -2	SLy1ΔNLS-cDNS 5' fusioniert mit einer Flag-Epitop-Markierung	Eukaryontischer SLy1ΔNLS-Expressionsvektor
Flag-SLy1ΔSH3	pFlag-CMV <sup>TM</sup> -2	SLy1ΔSH3-cDNS 5' fusioniert mit einer Flag-Epitop-Markierung	Eukaryontischer SLy1ΔSH3-Expressionsvektor
Flag-SLy1ΔSAM	pFlag-CMV <sup>TM</sup> -2	SLy1ΔSAM-cDNS 5' fusioniert mit einer Flag-Epitop-Markierung	Eukaryontischer SLy1ΔSAM-Expressionsvektor
Flag-SLy1ΔPESTH	pFlag-CMV <sup>TM</sup> -2	SLy1ΔPESTH-cDNS 5' fusioniert mit einer Flag-Epitop-Markierung	Eukaryontischer SLy1ΔPESTH-Expressionsvektor
Flag-SLy1ΔPESTL	pFlag-CMV <sup>TM</sup> -2	SLy1ΔPESTL-cDNS 5' fusioniert mit einer Flag-Epitop-Markierung	Eukaryontischer SLy1ΔPESTL-Expressionsvektor
SLy1ΔSH3-HA	pWPI	SLy1ΔSH3-cDNS 5' fusioniert mit einer HA-Epitop-Markierung	Lentiviraler SLy1ΔSH3-Expressionsvektor
SLy1ΔSAM-HA	pWPI	SLy1ΔSAM-cDNS 5' fusioniert mit einer HA-Epitop-Markierung	Lentiviraler SLy1ΔSAM-Expressionsvektor

SLy1ΔPESTH-HA	pWPI	SLy1ΔPESTH-cDNS 5' fusioniert mit einer HA-Epitop-Markierung	Lentiviraler SLy1ΔPESTH- Expressionsvektor
SLy1ΔPESTL-HA	pWPI	SLy1ΔPESTL-cDNS 5' fusioniert mit einer HA- Epitop-Markierung	Lentiviraler SLy1ΔPESTL- Expressionsvektor
pGBKT7-SLy1	pGBKT7	SLy1-cDNS 5' fusio- niert mit der GAL4 DNS-Bindedomäne und einer myc-Epitop- Markierung	Eukaryontischer (Hefe) SLy1-Expressionsvektor, Köderplasmid für ein Hefe- Zwei-Hybrid-System
pGBKT7- SLy1SH3	pGBKT7	SLy1SH3-cDNS 5' fu- sioniert mit der GAL4 DNS-Bindedomäne und einer myc-Epitop- Markierung	Eukaryontischer (Hefe) SLy1SH3- Expressionsvektor, Köderplasmid für ein Hefe- Zwei-Hybrid-System
pGBKT7- SLy1SAM	pGBKT7	SLy1SAM-cDNS 5' fusioniert mit der GAL4 DNS-Bindedomäne und einer myc-Epitop- Markierung	Eukaryontischer (Hefe) SLy1SAM- Expressionsvektor, Köderplasmid für ein Hefe- Zwei-Hybrid-System
SLy2-myc	pEF/myc/cyto	SLy2-cDNS 5' fusio- niert mit einer myc- Epitop-Markierung	Eukaryontischer SLy2- Expressionsvektor
pGBKT7-SLy2	pGBKT7	SLy2-cDNS 5' fusio- niert mit der GAL4 DNS-Bindedomäne und einer myc-Epitop- Markierung	Eukaryontischer (Hefe) SLy2-Expressionsvektor, Köderplasmid für ein Hefe- Zwei-Hybrid-System
pGBKT7- SLy2SH3	pGBKT7	SLy2SH3-cDNS 5' fu- sioniert mit der GAL4 DNS-Bindedomäne und einer myc-Epitop- Markierung	Eukaryontischer (Hefe) SLy2SH3- Expressionsvektor, Köderplasmid für ein Hefe- Zwei-Hybrid-System

pGBKT7-SLy2SAM	pGBKT7	SLy2SAM-cDNS 5' fusioniert mit der GAL4 DNS-Bindedomäne und einer myc-Epitop-Markierung	Eukaryontischer (Hefe) SLy2SAM-Expressionsvektor, Köderplasmid für ein Hefe-Zwei-Hybrid-System
Flag-SAP30	pFlag-CMV™-2	SAP30-cDNS 5' fusioniert mit einer Flag-Epitop-Markierung	Eukaryontischer SAP30-Expressionsvektor
GST-SAP30	pGEX-4-T1	SAP30-cDNS 5' fusioniert mit einer GST-Epitop-Markierung	Prokaryontischer SAP30-Expressionsvektor

## 2.6 Antikörper

In Tab. 11 sind die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper und in den Tab. 12 und 13 die sekundären Antikörper aufgelistet.

**Tabelle 11: Primäre Antikörper**

Antigen	Reaktivität	Spezies/ Markierung	Klon	Verwendung	Bezugs-quelle
β-Aktin	Maus, Mensch	Maus	AC-74	WB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Caspase-3	Mensch, Maus, Ratte	Kaninchen	8G10	WB	Cell Signaling, USA
c-myc		Maus	9E10	WB, IP	AbD Serotec, UK
c-myc		Maus	9E10	IF	Santa Cruz, USA
FLAG		Maus, HRP	M2	WB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GST		Ziege		WB	GE Healthcare, München
HA		Kaninchen		WB, IP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

HA		Maus	HA-7	WB, IP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PARP	Mensch, Maus, Hamster, Rind	Maus	C2-10	WB	BD Biosciences, Heidelberg
Tom20	Maus, Rat- te, Mensch	Kaninchen		WB	Santa Cruz, USA
Vimentin	Maus, Rat- te, Mensch	Kaninchen		WB	Santa Cruz, USA

**Tabelle 12: Sekundäre Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert)**

Antigen	Reaktivität	Spezies	Verwendung	Bezugsquelle
IgG + IgM	Maus	Ziege	WB	Dianova, Hamburg
IgG	Maus	Maus	WB	Natutec/eBiosciences, Frankfurt a. M.
IgG	Kaninchen	Ziege	WB	BD Biosciences, Heidelberg
IgG	Ziege	Maus	WB	Dianova, Hamburg

**Tabelle 13: Sekundäre Antikörper (Fluoreszenzfarbstoff-markiert)**

Antigen	Reaktivität	Spezies	Farbstoff	Verwen- dung	Bezugsquelle
IgG 1	Maus	Ziege	AlexaFluor® 488	IF	Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe
IgG	Kaninchen	Ziege	AlexaFluor® 633	IF	Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe

## 2.7 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

### 2.7.1 Analytische Plasmidpräparation aus Bakterien

Für die analytische Plasmidpräparation wurde eine einzelne *E.coli*-Kolonie in 2 ml antibiotikahaltigem Medium über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterienkultur wurde in der exponentiellen Wachstumsphase durch eine Zentrifugation bei 6.000 rpm für fünf Minuten geerntet und nachfolgend mittels alkalischer Lyse (Birnboim, H.C. und Doly, J., 1979) aufgeschlossen und die Plasmid-DNS präpariert. Im Zuge der alkalischen Lyse werden die Bakterien unter für RNS, DNS und Proteine denaturierenden Bedingungen mittels

SDS in Gegenwart von NaOH in der Kälte lysiert. Bei der anschließenden Neutralisation erfolgt eine Ko-Präzipitation von SDS, chromosomaler DNS und Proteinen. Die Plasmid-DNS hingegen renaturiert und verbleibt in Lösung, aus der sie nachfolgend mittels Ethanol-Fällung gewonnen werden kann. Die in dieser Arbeit bei der alkalischen Lyse verwendeten Lösungen P1, P2 und P3 wurden von der Firma Qiagen hergestellt.

Bei der Durchführung der alkalischen Lyse wurde das durch Zentrifugation gewonnene Zellpellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 und eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Mit Hilfe des sauren Bindungspuffers P3 wurde das Lysat anschließend neutralisiert, wobei es für zehn Minuten auf Eis inkubiert wurde. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4°C für 15 Minuten konnte der plasmidhaltige Überstand in eine neues Reaktionsgefäß überführt und die DNS durch Zugabe des 0,8fachen Volumens Isopropanol für zehn Minuten bei Raumtemperatur gefällt werden. Die Plasmid-DNS wurde anschließend durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und Raumtemperatur für 15 Minuten gefällt und das Pellet in 70% Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNS getrocknet und in 20-50 µl sterilem Wasser gelöst. Positive Klone mit der gewünschten Plasmid-DNS wurden mittels Restriktionsanalyse und Auftrennung der Restriktionsfragmente auf einem analytischen Agarosegel identifiziert.

### **2.7.2 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterien**

Bei der präparativen Plasmidisolierung wurden ungefähr 500 µl Bakteriensuspension aus der analytischen Plasmidpräparation in 250 ml antibiotikahaltigem Medium über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Plasmidpräparation aus der Übernachtskultur erfolgte gemäß Herstellerangaben (Qiagen Maxi Kit Protokoll). Die DNS-Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Die Reinheit der DNS-Lösung konnte über den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt und anschließend die Plasmid-DNS über Restriktionsanalyse verifiziert werden.

### **2.7.3 Enzymatische Behandlung von DNS**

#### **Restriktionsanalyse von DNS**

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifische, palindromische Erkennungssequenzen von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNS. Sie katalysieren die Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen beider Stränge, infolgedessen DNS-Moleküle mit definierten Enden entstehen, welche sich für Klonierungszwecke eignen.

Für eine vollständige enzymatische Reaktion wurden 2-5 Einheiten Restriktionsenzym pro µg Plasmid-DNS eingesetzt. In Tab. 14 ist der allgemeine Ansatz eines Restriktionsverdaus aufgelistet.

**Tabelle 14: Restriktionsverdau**

<b>Zusammensetzung</b>	
DNS	x $\mu$ l (2 $\mu$ g entsprechend)
Puffer (10x)	2 $\mu$ l
Enzym	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	ad 20 $\mu$ l

Die Menge des eingesetzten Enzyms sollte 10 % des Reaktionsvolumens nicht überschreiten, da die Reaktion durch einen zu hohen Anteil des Enzymkonservierungsmittels Glycerin beeinträchtigt werden kann.

Die Restriktionsansätze wurden 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert und mittels Gelelektrophorese analysiert.

### **Dephosphorylierung von DNS**

Mit Hilfe der alkalischen Phosphatase werden die 5'-Enden eines Vektors dephosphoryliert, so dass eine Selbstligation eines Vektors mit kompatiblen Enden vermieden und zudem die gewünschte Ligation zwischen Vektor und DNS-Fragment begünstigt wird.

Im Zuge der Dephosphorylierung wurde dem Reaktionsansatz nach dem Restriktionsverdau bzw. der Linearisierung des Vektors eine Einheit alkalische Phosphatase zugegeben und dieser dann eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für zehn Minuten, um eine bei der nachfolgenden Ligation störende Enzymaktivität zu vermeiden.

### **Ligation von DNS-Molekülen**

Die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende linearer DNS-Moleküle. Das Enzym verbindet sowohl überstehende als auch glatte Enden miteinander. Eine effiziente Ligation doppelsträngiger DNS-Moleküle erfordert ein passendes molares Verhältnis der zu ligierenden DNS-Fragmente. Dieses sollte in etwa 1:3 von Vektor zu DNS-Fragment betragen.

Bei der Durchführung der Ligation wurden dem DNS-Ansatz 2  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer und 1-2 Einheiten T4 DNS-Ligase zugegeben und der Ansatz mit H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st auf 20  $\mu$ l aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Ligation bei Raumtemperatur innerhalb von 60 Minuten.

## 2.7.4 Transformation von *E. coli* Bakterien

### Transformation chemokompetenter Bakterien

CaCl<sub>2</sub>-behandelte Bakterien können durch einen kurzen Hitzeschock mit Plasmid-DNS transformiert werden (Cohen, S.N. et al., 1972).

Für die Transformation wurden chemokompetente Bakterien der *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$  (Hanahan, D., 1983) und BL21 (DE3) gold verwendet. Nach vorsichtigem Auftauen der Bakteriensuspension auf Eis wurden 500 ng bis 1  $\mu$ g der zu transformierenden Plasmid-DNS zugegeben und die Bakterien für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 40 Sekunden bei 42°C inkubiert und danach sofort für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l antibiotikafreiem LB-Medium wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C geschüttelt, um die Expression der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz zu erreichen. 150  $\mu$ l des Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Positive Klone wurden anschließend über Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse verifiziert.

### Transformation elektrokompenter Bakterien

Die elektrische Transformation ist im Vergleich zur Transformation mittels Hitzeschock wesentlich effizienter. Das Einschleusen der Fremd-DNS in die Bakterien erfolgt in diesem Fall durch Elektroporation. Die bakterielle Suspension wird hierbei unter hoher Spannung einem kurzen elektrischen Puls ausgesetzt. Dies führt zur Ausbildung winziger Poren in der bakteriellen Zellmembran, durch welche die Fremd-DNS direkt in das Zytoplasma aufgenommen wird und anschließend in den Zellkern gelangen kann.

Für die Transformation von Plasmid-DNS aus Hefen wurden elektrokompente Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  (ElectroMAX™ DH5 $\alpha$ -E™, Invitrogen) verwendet. Nach dem Auftauen der Bakteriensuspension auf Eis und Zugabe der Plasmid-DNS erfolgte der Puls bei 2,0 kV und 25  $\mu$ F (Elektroporationsgerät Gene Pulser II, Bio-Rad). Die Bakterien wurden im Anschluss in 1 ml S.O.C.-Medium eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Zur positiven Selektion der Bakterien mit den gewünschten Plasmiden wurde die Bakteriensuspension anschließend auf Petrischalen mit antibiotikahaltigem LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus Einzelkolonien wurde danach die Plasmid-DNS isoliert, sequenziert und die Identität der DNS mittels BLASTN ermittelt.

## 2.7.5 Kryokonservierung von Bakterien

Für eine dauerhafte Lagerung verschiedener Bakterienstämme wurden Glycerinstammkulturen angelegt. Hierzu wurden 500  $\mu$ l einer sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterienkultur mit 500  $\mu$ l sterilem Glycerin vermischt und die Lösung vorsichtig homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Lagerung der Bakterien bei -80°C.

### 2.7.6 Amplifikation von DNS-Molekülen mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur selektiven Vervielfältigung definierter Nukleinsäureabschnitte eingesetzt. Sie beruht auf der Eigenschaft der DNS-Polymerasen, einzel-strängige DNS als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges benutzen zu können, so dass auf diesem Wege extrem viele Kopien einer spezifischen DNS-Sequenz produziert werden können (Mullis, K. et al., 1992). Die Grundlage einer PCR stellen zyklische Temperaturveränderungen dar. Nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNS durch Hitze, hybridisieren spezifische Oligonukleotidprimer an die 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden DNS-Fragments. An diese anknüpfend kann dann mit Hilfe einer DNS-Polymerase ein DNS-Doppelstrang aus der einzelsträngigen Vorlage synthetisiert werden. Nach der Synthese des Komplementärstranges führt eine sich wiederholende Abfolge von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und Verlängerung des DNS-Stranges über 30-35 Zyklen zu einer exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNS-Fragmentes.

die Zusammensetzung von Standard-PCR-Ansätzen, wie sie im Zuge dieser Arbeit In dieser Arbeit wurde für die Durchführung der PCRs die DNS-Polymerase Pyrobest™ (Takara) aus *Pyrococcus sp.* gewählt, welche eine sehr gute Produktivität und auf Grund ihrer Korrekturaktivität (3'→5' Exonukleaseaktivität) eine sehr geringe Fehlerrate aufweist. Tabelle 15 zeigt verwendet wurden.

**Tabelle 15: Standard-PCR-Ansatz**

Reagenz	Volumen
DNS	ca. 100 ng
10x PCR-Puffer	5 µl
dNTP-Mixtur (enthält 2,5 mM jedes dNTPs)	4 µl
5'-Oligonukleotid (20 pmol)	1 µl
3'-Oligonukleotid (20 pmol)	1 µl
DNS-Polymerase (5 Einheiten/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl

Die Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.4 angegeben.

Die Durchführung sämtlicher PCRs erfolgte, indem die Reaktion auf Eis angesetzt, kurz mit einem Vortex-Gerät gemischt und abzentrifugiert wurde. In Tab. 16 sind die Bedingungen aufgeführt, unter welchen die PCRs durchgeführt wurden. Die Temperatur für die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer ist sequenzabhängig und die Extensionsdauer jeder PCR hängt von der Größe des zu amplifizierenden PCR-Produktes ab. In der Regel wird jedoch ca. eine Minute pro 1000 Basenpaare benötigt.

**Tabelle 16: Standard-PCR-Bedingungen**

Funktion	Dauer	Temperatur	Zykluswiederholung	Anzahl Zyklen
DNS-Denaturierung	10 s	98°C		x 30
Primerhybridisierung	30 s	55°-68°C		
Extension	variabel	72°C		
Pause	4°C			

### 2.7.7 Fusion von PCR-Fragmenten

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene SLy1-Deletionsmutanten erstellt, indem definierte Bereiche der cDNS-Sequenz von SLy1 entfernt wurden. Dazu wurden PCR-Fragmente hergestellt, die den zu deletierenden Bereich der cDNS aussparten und anschließend miteinander fusioniert werden konnten. Diese Technik wird als PCR-Ligation-PCR Mutagenese bezeichnet (Ali, S.A. und Steinkasserer, A., 1995).

Bei der Durchführung wurden zunächst die gewünschten PCR-Fragmente mit Hilfe definierter Oligonukleotide hergestellt, diese dann wie in Abschnitt 2.7.9 beschrieben auf ein Agarosegel aufgetragen, anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Danach wurden die einzelnen PCR-Fragmente mittels T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert. Hierzu wurden ungefähr ähnliche molare Mengen der zu fusionierenden Fragmente mit 10 mM ATP, 1x T4 Polynukleotidkinase-Reaktionspuffer und H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (Endvolumen: 50 µl) gemischt und für fünf Minuten bei 70°C inkubiert. Nachfolgend wurden 50 Einheiten der T4 Polynukleotidkinase zugegeben und der Ansatz für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Aus den Einzelansätzen (phosphorylierte PCR-Fragmente) wurden je 5 µl entnommen und in einem frischen Reaktionsgefäß mit dem zu fusionierenden Fragment gemischt. Anschließend erfolgte die Ligation beider Fragmente durch die Zugabe von 400 Einheiten T4 DNS Ligase für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurde mit 2 µl Ligationsansatz eine Fusions-PCR durchgeführt, indem die beiden äußeren Oligonukleotide der Fragmente für die PCR verwendet wurden. Die endgültigen PCR-Produkte konnten dann wieder auf ein Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und aufgereinigt werden (s. 2.7.9). Sie standen nun zur weiteren Klonierung in einen Expressionsvektor zur Verfügung.

### 2.7.8 Sequenzanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche DNS-Sequenzanalysen von der Firma GATC Biotech, Konstanz durchgeführt.

## 2.7.9 Agarosegelelektrophorese

### Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode für die Auftrennung von DNS-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Nukleinsäuren sind innerhalb eines sehr großen pH-Bereichs negativ geladen und wandern daher im elektrischen Feld in Richtung Anode. Über einen weiten Größenbereich der DNS besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus ( $\log_{10}$ ) der Länge des Fragments (in bp) und der relativen Wanderungsdistanz (in cm, bezogen auf die gesamte Wanderungstrecke) im Agarosegel. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid in der Gelmischung, welches in die Doppelhelix der DNS interkaliert, fluoreszieren die Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht (254-366 nm), da der eingebaute Farbstoff durch UV-Licht angeregt wird. Er emittiert infolgedessen Licht im orange-roten Bereich (590 nm), so dass das Bandenmuster auch photographisch festgehalten und analysiert werden kann.

Agarosegelelektrophoresen wurden durchgeführt, indem 0,8-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgekocht wurden, bis eine klare homogene Lösung entstand. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Handwärme wurde Ethidiumbromid (4  $\mu\text{g/ml}$ ) zugegeben, die Lösung in eine Gelkammer mit den gewünschten Kämmen gegossen und gewartet, bis sich die Lösung zu einer Gelmatrix verfestigt hatte. Anschließend wurde die Gelkammer mit dem erstarrten Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingesetzt, mit TAE-Puffer überschichtet und die DNS-Proben in die Geltaschen pipettiert. Je nach Gelgröße erfolgte die Elektrophorese bei 80-100 V.

### Präparative Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNS über Agarosegele wurde neben der DNS-Analyse auch für die selektive Elution von PCR-Produkten und Plasmiden, beispielsweise auch nach restriktionsenzymatischer Spaltung, genutzt. Nach der Agarosegelelektrophorese (s. o.) konnten gewünschte DNS-Fragmente über die größenspezifische Auftrennung im Gel identifiziert und nachfolgend unter langweiliger UV-Beleuchtung (325 nm) daraus ausgeschnitten werden. Aus dem isolierten Gelstück wurde die DNS mit Hilfe des „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche) gewonnen. Die Vorgehensweise entsprach der dem Kit beiliegenden Anleitung des Herstellers.

### Bestimmung von DNS-Fragmentgrößen

Durch einen internen Standard im Gel kann die Größe der DNS-Moleküle und gegebenenfalls auch deren Konzentration abgeschätzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der „MassRuler™ DNA Ladder Mix“ der Firma MBI Fermentas als Größenstandard verwendet.

## 2.8 Proteinanalytische Methoden

### 2.8.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml Zellyse-Puffer aufgenommen und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Mit Hilfe des im Puffer enthaltenen nicht-ionischen Detergenzes NP-40 können sowohl viele lösliche Kernproteine als auch zytoplasmatische Proteine aus eukaryontischen Zellen herausgelöst werden. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 20 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt; der restliche Zelldebris wurde verworfen. Falls erforderlich erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Test (s. 2.8.6). Die Lysate wurden zur Denaturierung in 5x Ladepuffer aufgenommen und für fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht. Anschließend konnten die so erstellten Proteinlysate über SDS-Polyacrylamidgele (s. 2.8.9) aufgetrennt und analysiert werden.

### 2.8.2 Dephosphorylierung von Gesamtzellextrakten

Für die Dephosphorylierung von Gesamtzellextrakten aus Jurkat T-Zellen wurden pro Ansatz  $4 \times 10^7$  Zellen 1 ml Zellyse-Puffer - jedoch ohne Phosphatase-Inhibitoren - lysiert (s. 2.8.1) und die Proteinkonzentration in den Lysaten mittels BCA-Test ermittelt (s. 2.8.6). Anschließend wurden pro Ansatz 0,5 mg Gesamtprotein in 1x Reaktionspuffer (FastAP™ Buffer, MBI Fermentas) mittels 33 Einheiten Phosphatase (FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, MBI Fermentas) für eine Stunde bei 37°C dephosphoryliert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) in einer Endkonzentration von 10 mM pro Ansatz zugegeben wurde. Anschließend konnten die dephosphorylierten Lysate für weitere Analysen (z. B. Affinitätspräzipitation, s. 2.8.8) eingesetzt werden.

### 2.8.3 Fraktionierte Zellyse

Mit Hilfe einer fraktionierten Zellyse ist es möglich, die löslichen Bestandteile des Zytoplasmas von den löslichen Bestandteilen des Zellkerns zu separieren, ohne dabei den Zellkern zu zerstören.

Puffer A stellt einen hypotonischen Puffer dar, mit Hilfe dessen Wasser in die Zellen strömt, so dass diese platzen. Bei diesem Vorgang bleibt der Nukleus aufgrund seiner stabileren Doppelmembran intakt, lediglich gut lösliche Bestandteile der Kernmembran und assoziierte Proteine können in die zytosolische Fraktion gelangen.

Im zweiten Schritt werden die Zellkerne in einem hypertonen Puffer (Puffer B) resuspendiert, so dass Wasser aus den Nuklei herausströmt. Dabei werden lösliche Bestandteile aus den

Zellkernen extrahiert. Zusätzlich werden durch die hohe Ionenstärke auch Zellbestandteile solubilisiert, die unter hypotonen Bedingungen unlöslich sind.

Bei der Durchführung der fraktionierten Zelllyse wurden die zu lysierenden Zellpellets abhängig von der Menge der Zellen in Puffer A resuspendiert, zehn Minuten auf Eis lysiert und zwei Minuten bei 2750 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (zytoplasmatische Fraktion) wurde anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das verbleibende Zellpellet in einem zu Puffer A äquivalenten Volumen an Puffer B resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis und einer Zentrifugation für zwei Minuten bei 13.000 rpm und 4°C konnte die Kern-Fraktion als Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden. Nachfolgend konnten beide Fraktionen für weitere Versuche verwendet oder mittels SDS-PAGE (s. 2.8.9) und Western Blot (s. 2.8.10) analysiert werden.

#### **2.8.4 Zellfraktionierung (ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit)**

Mit Hilfe des ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kits (Calbiochem-Merck) ist es aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit verschiedener subzellulärer Kompartimente in speziellen Reagenzien möglich, diese subzellulären Fraktionen voneinander zu trennen. Die strukturelle Integrität der verschiedenen Kompartimente bleibt hierbei vor und während der Extraktion erhalten. Im Verlauf der Zellfraktionierung mit Hilfe dieses Kits erhält man vier Fraktionen mit abnehmender Komplexität des Proteoms. Der Extraktions-Puffer I löst zytosolische Proteine (Fraktion 1), während Membranen und membranöse Organellen mit Hilfe des Extraktions-Puffers II gelöst werden (Fraktion 2), ohne dass die Integrität von Zellkern und Zytoskelett zerstört wird. Anschließend erhält man durch die Behandlung mit Extraktions-Puffer III die nukleäre Fraktion (Fraktion 3), wohingegen Komponenten des Zytoskeletts erst ganz zum Schluss mit Hilfe von Extraktions-Puffer IV gelöst werden (Fraktion 4).

Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Zellfraktionierung mit Hilfe des ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kits an verschiedenen Jurkat T Zelllinien durchgeführt. Hierbei wurden pro Ansatz jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt und die Fraktionierung anhand der Angaben des Herstellers für Suspensionszellen durchgeführt. Nach der Zellfraktionierung wurden die vier verschiedenen Fraktionen mittels SDS-PAGE (s. 2.8.9) und Western Blot (s. 2.8.10) analysiert. Hierbei erfolgte auch eine Kontrolle der Reinheit der Fraktionen durch die Detektion bestimmter Marker-Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper.

#### **2.8.5 Zellfraktionierung (ProteoExtract® Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit)**

Mit Hilfe des ProteoExtract® Cytosol/Mitochondria Fractionation Kits (Calbiochem-Merck) können Säugetierzellen so fraktioniert werden, dass am Ende zwei Fraktionen erhalten werden, nämlich zum einen das Zytosol und zum anderen die Mitochondrien.

Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Zellfraktionierung mit diesem Kit an verschiedenen Jurkat T Zelllinien durchgeführt. Hierbei wurden pro Ansatz jeweils  $5 \times 10^7$  Zellen eingesetzt, und die Vorgehensweise entsprach den im Kit beiliegenden Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die zwei verschiedenen Fraktionen mittels SDS-PAGE (s. 2.8.9) und Western Blot (s. 2.8.10) analysiert. Hierbei erfolgte auch eine Reinheitskontrolle für die beiden Fraktionen durch die Detektion charakteristischer Marker-Proteine.

### **2.8.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Test**

Über einen BCA-(Bicinchoninsäure-)Test (Smith, P.K. et al., 1985) können unbekannte Proteinkonzentrationen kolorimetrisch quantifiziert werden. Die BCA-Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und eine geringe Störanfälligkeit gegenüber Detergenzien aus. Allerdings können komplexierende und reduzierende Verbindungen die Reaktion stören. Der Nachweis von Proteinen über einen BCA-Test beruht auf der Tatsache, dass die in der Probe enthaltenen Proteine, genauer die Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan, in einem alkalischen, wässrigen und kupferhaltigen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduzieren können (Biuret-Reaktion). Das einwertige Kupferion bildet nun nachfolgend mit zwei Molekülen BCA einen Farbstoffkomplex. Durch eine photometrische Messung bei 562 nm (Absorptionsmaximum des Komplexes) kann mit Hilfe einer durch einen Standard ermittelten Eichkurve die Proteinkonzentration in den zu testenden Proben ermittelt werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde der BCA-Test mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

### **2.8.7 Ko-Immünpräzipitation von Proteinen**

Die Ko-Immünpräzipitation wurde zur gezielten Anreicherung von Proteinen aus Zelllysaten und zum Nachweis physiologischer Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt. Im Zuge dieser Arbeit wurden Proteine, die mit einer Flag-Markierung versehen waren mit Hilfe des Anti-Flag<sup>®</sup> M2-Agarose Affinity Gels (Sigma-Aldrich) angereichert. Alle anderen Proteine wurden mittels Protein G-Sepharose (Protein G-Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare) präzipitiert. Protein G ist ein bakterielles Protein von Streptokokken der Gruppe G und verfügt über eine hohe Affinität und Spezifität für den Fc-Teil von IgGs aus unterschiedlichen Spezies. Somit können mittels Protein G-Sepharose Antikörper über nicht-kovalente Bindungen gebunden werden, mit deren Hilfe anschließend eine Aufreinigung spezifischer Proteine und deren Interaktionspartner in Proteingemischen ermöglicht wird.

Zur Vorbereitung der Ko-Immünpräzipitation wurde das jeweilige Zelllysate zusammen mit dem gewünschten Antikörper über Nacht bei 4°C auf einem Überkopf-Probenrotator inkubiert, so dass eine Bindung des Antikörpers an das entsprechende Protein stattfinden konnte. Die dabei verwendete Antikörpermenge variierte je nach Antikörper und richtete sich

nach den Herstellerangaben. Dieser Schritt entfiel bei Proben, die Flag-markierte Proteine enthielten, da diese mit dem Anti-Flag<sup>®</sup> M2-Agarose Affinity Gel inkubiert wurden. Anschließend wurde dem Zelllysate-Antikörper-Gemisch entweder in Lysepuffer gewaschene Protein G-Sepharose oder gewaschenes Anti-Flag<sup>®</sup> M2-Agarose Affinity Gel zugesetzt, wobei die Menge der Protein G-Sepharose bzw. der Agarose der Menge des Zelllysats angepasst wurde. Zelllysaten aus  $1 \times 10^7$  Zellen (Lyse in 1 ml Lysepuffer) wurden beispielsweise 30-40  $\mu$ l Protein G-Sepharose/Agarose zugegeben. Das Gemisch wurde danach für vier Stunden bei 4°C auf einem Überkopf-Probenrotator inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal in Waschpuffer B, zweimal in Waschpuffer C und einmal in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gewaschen. Waschpuffer C ist ein Hochsalz-Puffer, der 500 mM NaCl enthält. Mit Hilfe dieser hohen Salzkonzentration ist es möglich, unspezifische Protein-Protein-Interaktionen zu einem großen Teil zu unterbinden. Allerdings können durch die Behandlung der Proben mit einem solchen Puffer auch eher schwache Proteinbindungen gelöst werden.

Nachdem die Proben gründlich mit Hilfe einer Kanüle trocken gesaugt worden waren, wurden die Pellets anschließend für fünf Minuten in 1x Protein-Auftragspuffer bei 95°C aufgekocht. Nach der Auftrennung der Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel (s. 2.8.9) wurden die Proben mittels Western Blot (s. 2.8.10) weiter analysiert.

### 2.8.8 Affinitätspräzipitation

Im Verlauf dieser Arbeit wurden für einige Analysen zur Protein-Protein-Interaktion Affinitätspräzipitationen mit rekombinanten (s. 2.8.14), Glutathion-S-Transferase-(GST)-markierten Proteinen durchgeführt. Hierfür wurden  $4 \times 10^7$  Zellen in jeweils 1 ml Zelllyse-Puffer lysiert und anschließend mit 10  $\mu$ g an Glutathion-Sepharose (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare) gekoppeltem GST-Fusionsprotein (s. 2.8.14) versetzt. Als Kontrolle dienten dabei 10  $\mu$ g GST-Protein. Das Prinzip dieser Technik ist, dass die Glutathion-S-Transferase an ihr Substrat Glutathion bindet, so dass das Fusionsprotein an die Sepharose gekoppelt werden kann.

Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose erfolgte anhand der Anleitung aus dem „GST Gene Fusion Handbook“ (GE Healthcare). Die Menge des an die Sepharose gekoppelten Fusionsproteins wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau-Färbung (s. 2.8.11) abgeschätzt. Dabei wurden verschiedene Volumina des an die Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteins neben einem Standard (definierte Konzentrationen an Rinderserumalbumin, BSA) auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und dieses dann anschließend mit Coomassie-Blau-Färbelösung angefärbt.

Die Bindung von Proteinen aus dem Zelllysate an die gekoppelten GST-Fusionsproteine erfolgte für mindestens drei Stunden oder über Nacht bei 4°C auf einem Überkopf-Probenrotator. Anschließend wurde die Sepharose viermal mit Zelllyse-Puffer gewaschen

und dann in 15 µl Protein-Auftragspuffer für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die weitere Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

### **2.8.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das stark an hydrophobe Bereiche von Proteinen gebunden wird (1 g Protein bindet 1,4 g SDS) und diese denaturiert. Dabei wird eine stark negative Ladung eingefügt, die alle vorhandenen Ladungen der Proteine überdeckt. Aus diesem Grund wandern die linearen Protein-SDS-Komplexe während der Elektrophorese ausschließlich zur Anode und verhalten sich im elektrischen Feld unabhängig von der Aminosäurezusammensetzung der Proteine und dem isoelektrischen Punkt. Aufgrund der Molekularsiebeeigenschaften eines Polyacrylamidgels ist die Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion der Logarithmen ihrer Molmassen. Somit kann die relative Molmasse ( $M_r$ ) eines Proteins anhand eines Protein-Standards ermittelt werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Proteine über 4-12% Bis-Tris-Gradientengele der Firma Invitrogen aufgetrennt. Dabei wurden die denaturierten Proben in die Taschen des Gels geladen und bei 180 Volt aufgetrennt. Für die spätere Bestimmung der relativen Molmasse der Proteine wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker (Rainbow coloured protein high molecular weight marker, GE Healthcare) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte so lange, bis das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

### **2.8.10 Western Blot (Immunoblot)**

Die Technik des Western Blottings besteht seit 1979 (Towbin, H. et al., 1979; Renart, J. und Sandoval, I.V., 1984) und dient dazu, die in einem Gel aufgetrennten Proteine über einen Transfer (z. B. Elektrotransfer) auf einen Träger (z. B. Nitrozellulose oder Polyvinylidenfluorid) zu übertragen und für die nachfolgende Immundetektion mittels spezifischer Antikörper zu immobilisieren.

Im Anschluss an eine SDS-PAGE (s. 2.8.9) wurde im Verlauf dieser Arbeit zunächst mit Hilfe einer sogenannten „Semidry“-Proteintransfer-Apparatur (Transblot SD, Bio-Rad) ein Elektrotransfer der auf dem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran durchgeführt. Dabei wurde das Gel auf die in Transferpuffer getränkte Membran gelegt. Unter- und oberhalb des Gel-Membran-Aufbaus befand sich zusätzlich noch jeweils ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier (Whatman 3 MM). Der Transfer erfolgte für zwei Stunden bei 0,04 Ampere pro Gel. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpulver-TBS-T blockiert. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären, spezifischen Antikörper in 3% Magermilchpulver-TBS-T über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln. Nachdem die Membran dreimal für je-

weils fünf Minuten in TBS-T gewaschen worden war, erfolgte anschließend die Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten und ebenfalls in 3% Magermilchpulver-TBS-T gelösten sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils zehn Minuten in TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen. Die Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers und somit des interessierenden Proteins erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (GE Healthcare). Die Membran wurde für drei Minuten in der Detektionslösung (bestehend aus gleichen Teilen der Lösungen A und B) im Dunkeln inkubiert und anschließend in eine Plastikfolie gelegt. Die spezifischen Signale wurden mit Hilfe von speziellen Filmen (ECL Hyperfilm, GE Healthcare) detektiert.

### **2.8.11 Coomassie-Blau-Färbung**

Mit Hilfe einer Coomassie-Blau-Färbung können Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel angefärbt und fixiert werden. Der blaue Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau bindet dabei recht unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine.

Die Färbung der aufgetrennten Proteine wurde durch eine ca. 30-minütige Inkubation des Gels bei Raumtemperatur in der Coomassie-Blau-Färbelösung erzielt. Da zunächst das komplette Gel blau angefärbt wird, erfolgte anschließend eine Entfärbung des Gels bei Raumtemperatur in Coomassie-Blau-Entfärbelösung. Das Gel wurde so lange auf einem Schüttler in der Lösung inkubiert, bis der Hintergrund farblos erschien. Danach wurde das Gel mehrfach mit Wasser gewaschen und auch bis zur Ablichtung und elektronischen Speicherung des Bandenmusters in Wasser aufbewahrt. Anschließend konnte das Gel entweder getrocknet oder entsorgt werden.

### **2.8.12 Histondeacetylase-(HDAC-)Assay**

Im Zuge dieser Arbeit wurden HDAC-Assays zur Bestimmung der Aktivität von HDAC1 in Zelllysaten von transient transfizierten 293T Zellen durchgeführt. Dabei wurden Gesamtzelllysate (s. 2.8.1), nukleäre Lysate (nach fraktionierter Zelllyse, s. 2.8.3) und Immunpräzipitate (s. 2.8.7) aus Gesamtzelllysaten verwendet. Nach der Konzentrationsbestimmung der im jeweiligen Lysat enthaltenen Proteine mittels BCA-Test (s. 2.8.6), wurde die Aktivität von HDAC1 mit Hilfe des HDAC Assay Kits (Millipore-Upstate) ermittelt. Hierbei erfolgt die Detektion der HDAC-Aktivität fluorometrisch, indem die Proben zunächst mit einem fluoreszierenden HDAC-Substrat inkubiert werden, so dass bei Vorhandensein von HDAC-Aktivität das Substrat deacetyliert wird. Mit Hilfe einer nachfolgend zugegebenen Aktivator-Lösung kann dann das Fluorophor vom deacetylierten Substrat abgelöst werden und über ein Mikroplatten-Lesegerät (Multimode Microplate Reader (Mithras LB 940), Berthold Technologies) detektiert werden. Die HDAC-Assays wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

### 2.8.13 Analyse von Lipid-Protein-Interaktionen

Im Verlauf dieser Arbeit wurde getestet, ob sowohl SLy1 als auch SLy2 mit Lipiden interagieren kann. Dazu wurden sogenannte „Membrane Lipid Strips™“, „PIP Strips™“ und „PIP Arrays™“ (Echelon) mit Lysaten aus verschiedenen Jurkat Zelllinien inkubiert.

Das Prinzip dieser Analyse ist, dass es sich bei den „Membrane Lipid Strips™“, den „PIP Strips™“ und den „PIP Arrays™“ um hydrophobe Membranen handelt, auf die biologisch aktive Lipide (z. B. Phosphoinositide, PIPs) punktförmig aufgetragen sind. Im Falle der „Membrane Lipid Strips™“ und der „PIP Strips™“ sind pro Lipidpunkt 100 pmol Lipid aufgebracht. Bei den „PIP Arrays™“ hingegen sind die Phosphoinositide in jeweils sieben verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, so dass es möglich wird, die relative Stärke der Protein-Phosphoinositid-Bindung zu ermitteln.

Für die Durchführung der Lipid-Protein-Interaktionsanalysen wurden pro Ansatz jeweils  $1 \times 10^8$  Jurkat Zellen in 12 ml hypotonischen Lysepuffers resuspendiert und mit Hilfe einer Spritze und Kanüle mechanisch aufgeschlossen, indem die Zellsuspension mehrfach durch die Kanüle gepresst wurde. Anschließend wurde das Lysat für eine Stunde bei 4°C und  $100.000 \times g$  ultrazentrifugiert, um die zytosolische Fraktion zu erhalten. Währenddessen wurden die Lipid-Membranen für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in 3% BSA-TBS-T blockiert, wobei darauf zu achten war, dass das BSA in diesem Fall keine Fettsäuren enthält. Über Nacht konnten nun die Lipid-Membranen mit den Lysaten (1 + 1-Verdünnung mit Blockierlösung) bei 4°C schüttelnd inkubiert werden. Nachfolgend wurden die Membranen dreimal für jeweils zehn Minuten in TBS-T gewaschen, für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem gewünschten Primärantikörper inkubiert und nochmals wie zuvor gewaschen, woraufhin sie schließlich ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert wurden. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Membranen für drei Minuten in ECL-Detektionslösung inkubiert und die Signale wie in Abschnitt 2.8.10 beschrieben detektiert.

### 2.8.14 Expression rekombinanter Proteine

Für die Expression rekombinanter, GST-markierter Fusionsproteine wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) gold verwendet. Nach erfolgreicher Transformation der Bakterien mit dem gewünschten Plasmid wurde jeweils eine Bakterienkolonie in 3 ml antibiotikahaltigem 2x YT-Medium über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend in 150-200 ml frisches, antibiotikahaltiges 2x YT-Medium überführt und für zwei bis drei Stunden bei 37°C auf einen Bakterieneschüttler gestellt, bis die Absorption der Bakterienkultur bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) ca. 0,5 betrug. Nachfolgend wurde die Expression der Fusionsproteine in den Bakterien mit Hilfe von 1 mM IPTG induziert. IPTG ist ein künstlicher Induktor des Laktose-Operons bei *E. coli*. Das im Verlauf dieser Arbeit verwendete Plasmid für die Expressi-

on von GST-Fusionsproteinen (pGEX-4-T1) trägt das *lacI<sup>q</sup>*-Gen, mit dessen Hilfe die Expression der gewünschten Proteine nach Zugabe von IPTG gestartet wird.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von ungefähr zwei Stunden bei 37°C wurden die Bakterien schließlich durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 3500 rpm geerntet. Die Bakterienpellets wurden nun in 7,5-10 ml kaltem PBS resuspendiert und zum Aufschließen für viermal jeweils eine Minute auf Eis mit Ultraschall behandelt. Zwischen den Beschallungsvorgängen wurde die Suspension für jeweils eine Minute auf Eis stehen gelassen. Das Aufschließen der Bakterien zeigt sich im Verlauf der Beschallung durch eine Klärung der zuvor relativ trüben Suspension.

Nach der Beschallung wurde der Suspension das Detergenz Triton X-100 (Endkonzentration 1%) zugefügt, um eine bessere Löslichkeit des Fusionsproteins zu erzielen. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Suspension auf einem Überkopf-Probenrotator bei 4°C wurden die Proben bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert und anschließend der das gewünschte Fusionsprotein enthaltende Überstand abgenommen. Nachfolgend konnte der Überstand zu gewaschener Glutathion-Sepharose gegeben werden, um das GST-markierte Fusionsprotein an die Sepharose zu koppeln, so dass damit im Weiteren Affinitätspräzipitationen durchgeführt werden konnten (s. 2.8.8).

## 2.9 Zellbiologische Methoden

### 2.9.1 Allgemeine Zellkultur

Die Arbeiten mit Zellkulturen fanden an Sterilbänken unter Verwendung steriler Materialien und Lösungen statt. Zudem wurde grundsätzlich mit Laborhandschuhen gearbeitet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 5-10% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

### 2.9.2 Kultivierung von Zelllinien

#### Suspensionszellen

Suspensionszellen (Jurkat T Zellen) wurden in RPMI-Medium (s. 2.2.4) in einer Dichte bis ca. 5x10<sup>6</sup> Zellen/ml kultiviert. Die Zellen wurden jeden zweiten Tag passagiert.

#### Adhärenz wachsende Zellen

Adhärenz Zellen (293T Zellen, HeLa Zellen) wurden regelmäßig mit frischem DMEM-Medium (s. 2.2.4) versorgt und spätestens bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Das Ablösen adhärenz wachsender Zellen erfolgte mit einer Trypsin/EDTA-Lösung für ca. fünf Minu-

ten bei 37°C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen neu ausgesät.

### 2.9.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Anfärben der toten Zellen eines Aliquots der Zellsuspension mit 0,16% Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer. Trypanblau ist ein saurer Azofarbstoff, welcher an Zellproteine bindet. Es dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen in Gegensatz zu lebenden Zellen tiefblau. Trypanblau wirkt zytotoxisch.

### 2.9.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfriermedium setzte sich aus 90% FKS und 10% DMSO zusammen. Es wurden jeweils  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, für 30 Minuten bei -20°C und für weitere 24 Stunden bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch bei 37°C. Die Zellen wurden einmal in vorgewärmtem Zellkulturmedium gewaschen und danach in Medium ausgesät.

### 2.9.5 Transfektion adhärenter Zellen

#### Kalziumphosphat- ( $\text{CaPO}_4$ )-vermittelte Transfektion

Die transiente Transfektion von 293T Zellen erfolgte nach der  $\text{CaPO}_4$ -Methode (Chen, C.A. und Okayama, H., 1988). Am Tag vor der Transfektion wurden subkonfluent wachsende 293T Zellen mit Trypsin/EDTA (s. 2.9.2) von der Zellkulturschale abgelöst und gezählt (s. 2.9.3). Auf eine 10 cm-Kulturschale wurden anschließend  $1 \times 10^6$  Zellen in 8 ml Kulturmedium (s. 2.9.2) ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 8%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Am folgenden Tag wurden insgesamt 10 µg Plasmid-DNS mit 80 µl 1M  $\text{CaCl}_2$  vermischt und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 400 µl aufgefüllt. Nachfolgend wurden 400 µl 2x BBS-Lösung zu der DNS- $\text{CaCl}_2$ -Mischung gegeben und gründlich gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur, in der sich ein feinkörniger Niederschlag aus Kalziumphosphat und der DNS bildet, wurde die Lösung tropfenweise unter ständigem Schwenken der Kulturschale auf die Zellen pipettiert, die das DNS-Präzipitat über Endozytose aufnehmen. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank bei 8%  $\text{CO}_2$  kultiviert und konnten anschließend für weitere Experimente (z. B. Herstellung von Zellextrakten) verwendet werden. Die Transfektionseffizienz lag immer bei über 90%.

### **Transfektion mittels jetPEI™**

Die transiente Transfektion von HeLa Zellen erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenzes jetPEI™ (Polyplus).

JetPEI™ ist ein wasserlösliches Polymer, das stabile Aggregate mit DNS bildet und die DNS während der Komplexbildung schützen soll. Die jetPEI™-DNS-Aggregate werden von den Zellen über Endozytose aufgenommen. In den Endosomen soll das jetPEI™-Reagenz als ein Protonenfänger fungieren, so dass der pH-Wert in diesen Organellen abgepuffert wird. Dies wiederum führt dazu, dass die Endosomen anschwellen und platzen, so dass die jetPEI™-DNS-Komplexe in das Zytosol der Zellen entlassen werden. Zusätzlich soll das jetPEI™-Reagenz das Einschleusen der DNS in den Zellkern begünstigen.

Am Tag vor der Transfektion wurden subkonfluent wachsende HeLa Zellen mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst (s. 2.9.2) und die Zellzahl bestimmt (s. 2.9.3). Anschließend wurden die Zellen anhand der Herstellerinformationen mit definierter Zellzahl ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 8% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium gewechselt und die Transfektion laut Herstellerangaben durchgeführt. Nach einer 24-stündigen Kultivierung der Zellen im Brutschrank bei 8% CO<sub>2</sub> konnten weitere Analysen mit den transfizierten HeLa-Zellen erfolgen (z. B. Immunfluoreszenz).

### **2.9.6 Lentivirale Transduktion von Zellen**

Der virale Gentransfer ist eine effektive Methode, um genetisches Material stabil in eine Vielzahl von Zielzellen zu schleusen.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten lentiviralen Vektoren sind nicht replikationsfähig, und sie durchlaufen den lentiviralen Replikationszyklus nur bis zur Integration in die Zielzelle. Für die Herstellung lentiviraler Überstände wurden drei verschiedene Plasmide transient in 293FT Zellen transfiziert. Eines dieser drei Plasmide trug das Gen, das in der Zielzelle exprimiert werden soll. Als Ausgangsvektor wurde das pWPI-Plasmid verwendet, welches das zu exprimierende Gen unter der Transkriptionskontrolle eines EF1 $\alpha$ -Promotors enthielt. Zusätzlich besitzt der pWPI-Vektor unter der Kontrolle einer IRES-Sequenz einen offenen Leserahmen für das Grün-fluoreszierende Protein (eGFP). Somit handelt es sich bei pWPI um einen bicistronischen Vektor. Beide Gene werden von langen terminalen Sequenzen (LTR) flankiert, die für die Verpackung und die Integration essenziell sind. Mit Hilfe der grünen Fluoreszenz transduzierter Zellen kann die Transduktionseffizienz relativ einfach mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie ermittelt werden. Der pWPI-Vektor enthält zudem auch noch alle weiteren für Transkription, Verpackung, reverse Transkription und Integration notwendigen cis-aktiven lentiviralen Sequenzen. Das Vektorkonstrukt weist Deletionen im Bereich der U3-Region der 3'-LTRs auf, welche bei der reversen Transkription als Matrize für die U3-Region der 5'-LTRs dienen. Folglich besitzt die ins Genom der Zielzel-

le integrierte provirale DNS Deletionen im lentiviralen Promotor und kann mit Hilfe dieses Promotors nicht transkribiert werden. Aus diesem Grund wird der Vektor auch als ein sich selbst inaktivierender Vektor bezeichnet.

Das zweite für die Virusproduktion verwendete Plasmid trägt die Gene *gag*, *pol* und *rev*, welche für die Verpackung der Viren nötig sind. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektor psPAX2 der zweiten Generation sind zusätzliche Gene des Virus wie zum Beispiel *vpr*, *vif*, *vpu* oder *nef* deletiert (Zufferey, R. et al., 1998).

Das dritte Plasmid enthält die genetische Information für das G Protein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G), das als Hüllprotein zur Pseudotypisierung der Viren fungiert.

### **Virusproduktion mittels 293FT Zellen**

Am Tag vor der Transfektion wurden  $5 \times 10^6$  293FT Zellen auf einer 10cm-Zellkulturschale in DMEM-Medium (s. 2.2.4) ausgesät. Am nächsten Morgen erfolgte die Transfektion dieser Zellen mit Hilfe der CaPO<sub>4</sub>-Methode. Dazu wurden 20 µg des pWPI-Vektors, 15 µg des Verpackungsvektors und 5 µg des Hüllproteinvektors gemischt und auf 250 µl mit 2,5 mM HEPES aufgefüllt. Nach der Zugabe von 250 µl 0,5M CaCl<sub>2</sub> wurde die Lösung unter Benutzung eines Vortex-Geräts zu 500 µl 2x HBS-Lösung pipettiert und 35 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich ein feiner Niederschlag aus Kalziumphosphat und DNS bilden konnte. Während dieser Zeit wurde ein Mediumwechsel bei den 293FT Zellen vorgenommen, indem das Kulturmedium der Zellen gegen 10 ml FKS-freies Medium ausgetauscht wurde. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen pipettiert, die danach für sechs Stunden im Brutschrank bei 37°C kultiviert wurden. Nachfolgend wurde das Medium mitsamt DNS-Präzipitat entfernt und 6 ml FKS-haltiges Kulturmedium zu den 293FT Zellen gegeben. 48 Stunden später wurde der virenhaltige Überstand geerntet. Dazu wurde das Medium von den Platten abgenommen und für fünf Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurde der virenhaltige Überstand durch ein 0,45 µm-Zellsieb filtriert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

### **Lentivirale Transduktion von Jurkat Zellen**

Der Virusüberstand wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit 6 µg/ml Polybren versetzt. Jeweils 1 ml des Virusüberstandes wurde in eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte pipettiert, pro Ansatz wurden  $3 \times 10^4$  Jurkat Zellen zugegeben und die Mischung dreimal vorsichtig resuspendiert. Nach einer 20-minütigen Äquilibrationszeit im Brutschrank bei 37°C wurde die Platte mit Parafilm umwickelt und für zwei Stunden bei 1200 rpm und 32°C zentrifugiert. Anschließend wurde die Parafilmabklebung entfernt und die Zellen für weitere 1-3 Stunden im Brutschrank mit dem Virusüberstand inkubiert. Nach einem Mediumwechsel

wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert und am nächsten Tag die Transduktion noch einmal mit frischem Virusüberstand wiederholt, um die Transduktionseffizienz zu steigern. Nach 7-14 Tagen wurde die Transduktionseffizienz dann mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Bestimmung der GFP-Expression ermittelt. Zudem konnten GFP-positive Zellen über einen durchflusszytometrischen Sortiervorgang angereichert werden. Jurkat Zellen, die auf diese Weise behandelt wurden, blieben über den Zeitraum der Analyse hinweg zu mindestens 95% dauerhaft GFP-positiv.

### **2.9.7 Immunfluoreszenz**

Um die Lokalisation von intrazellulären Proteinen zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Technik der Immunfluoreszenzfärbung angewendet. Dazu wurden am Tag vor der Transfektion in einer 12-Loch-Platte  $5 \times 10^4$  adhärente HeLa-Zellen pro Loch auf sterilen 16 mm-Deckgläschen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert (s. 2.9.5, jetPEI™-Protokoll). 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst für fünf Minuten in PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach einem weiteren 5-minütigen Waschschrift in PBS wurden die Zellen mit Hilfe einer 0,05%igen Saponin-Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nachfolgend wurden die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur leicht schwenkend in Blockierlösung inkubiert, woraufhin der primäre Antikörper verdünnt in 0,1x Blockierlösung für eine Stunde zugegeben werden konnte. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal für jeweils fünf Minuten in 0,1x Permeabilisierungslösung gewaschen. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff-markierte sekundäre Antikörper in 0,1x Blockierlösung verdünnt; die Zellen wurden für 45 Minuten im Dunkeln in der Antikörperlösung inkubiert. Nach zwei Waschschriften von jeweils fünf Minuten in PBS erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mittels DAPI (1:2500 verdünnt in PBS) für drei Minuten. Anschließend wurden die Zellen noch ein- bis zweimal in PBS für jeweils fünf Minuten gewaschen, woraufhin die Deckgläschen mit Hilfe von FluoromountG auf Objektträger geklebt werden konnten.

Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Zeiss LSM 510).

Für die Darstellung des nukleären Anteils zu untersuchender Proteine wurde mittels der Auswertungssoftware für das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop die Fluoreszenz des zu analysierenden Moleküls in einem definierten Bereich innerhalb des Zellkerns mehrerer Zellen detektiert und graphisch dargestellt. Hierbei wurde immer der niedrigste im Zellkern zu detektierende Wert für die Fluoreszenz eines bestimmten Proteins gewählt.

Durch einen Vergleich verschiedener Transfektionsansätze konnte somit eine mögliche Veränderung des Kernanteils eines Proteins in An- oder Abwesenheit von anderen Molekülen untersucht werden. Die Bestimmung der statistischen Signifikanz einer solchen Veränderung wurde mit Hilfe des Student's t-Test durchgeführt.

## 2.10 Arbeit mit Hefezellen im Hefe Zwei-Hybrid-System

### 2.10.1 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* wurde anhand etablierter Protokolle kultiviert („Yeast Protocols Handbook“, Clontech, 2001). Das Standardmedium für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefestamm AH109 ist das YPDA-Medium (s. 2.2.3). Für die Selektion auf Auxotrophiemarker hingegen wird ein sogenanntes „Drop-out“-Medium (s. 2.2.3) verwendet, das den gewünschten Selektionsbedingungen entsprechend mit Hilfe eines „Drop-out“-Supplements und gegebenenfalls weiterer Aminosäuren hergestellt wird. Zur Kultivierung auf festen Medien wurde den Kulturmedien 20 g/l Agar zugesetzt. Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte unter Schütteln in Erlenmeyerkolben. Die Kultivierung von Hefezellen erfolgt generell bei 30°C. Eine Lagerung von Hefen auf Agar-Platten ist bei 4°C für eine Dauer von bis zu zwei Monaten möglich. Für eine langfristige Lagerung werden die Hefen in YPDA-Medium mit einem Anteil von 25% Glycerin (v/v) bei -80°C eingefroren.

### 2.10.2 Das Hefe Zwei-Hybrid-System

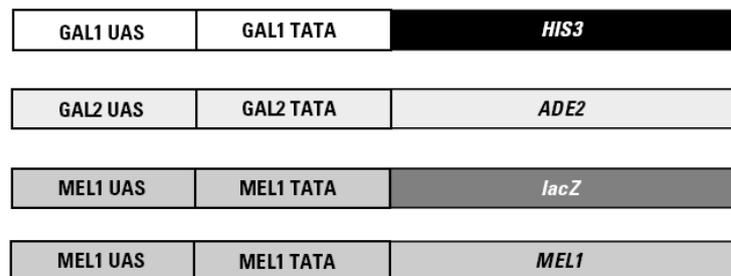
Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Hefe Zwei-Hybrid-System-Analyse wurde das sogenannte „MATCHMAKER GAL4 Zwei-Hybrid-System“ von Clontech verwendet (MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid Vectors Handbook, Clontech).

Die Grundlage eines Hefe Zwei-Hybrid-Systems ist die Tatsache, dass Transkriptionsfaktoren wie das Molekül GAL4 eine Domänenstruktur besitzen. Die DNS-Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors kann beispielsweise mit den Transkriptionsaktivator-domänen verschiedener anderer Transkriptionsaktivatoren in Fusionsproteinen kombiniert werden, ohne dass ihre Funktion dabei beeinträchtigt wird. Somit eignet sich diese Methode für die Suche nach Interaktionspartnern von Proteinen. Das Köderprotein wird hierbei mit der DNS-Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors fusioniert, wohingegen das Beuteprotein zusammen mit der Aktivator-domäne des Transkriptionsfaktors exprimiert wird.

Als Köderplasmid wurde in der vorliegenden Arbeit der Vektor pGBKT7 (Clontech) verwendet, welcher das Gen *TRP1* für die Synthese von Tryptophan trägt. In diesen Vektor wurde die cDNS sowohl von SLy1 als auch von SLy2 kloniert. Als Beuteplasmid hingegen diente eine murine T Zell-Lymphom-cDNS-Bibliothek auf der Basis des Vektors pACT (Clontech).

Dieser Vektor trägt das Gen *LEU2* für die Synthese von Leucin. Der im Verlauf der Arbeit verwendete Hefestamm AH109 ist unter anderem auxotroph bezüglich der Aminosäuren Tryptophan, Leucin und Histidin. In Abb. 7 sind die Reporterogene des Hefestamms AH109 dargestellt.

AH109 Constructs



**Abbildung 7: Reportergenkonstrukte in *S. cerevisiae* AH109**

(nach MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual, Clontech, 1999)

Nach der Transformation der Hefen mit dem Köderplasmid und der cDNS-Bibliothek konnte auf Expression und Interaktion der Fusionsproteine folgendermaßen selektioniert werden:

1. Selektion auf Expression des Köderproteins: Trp-freies Medium.
2. Selektion auf Expression von Beuteproteinen: Leu-freies Medium.
3. Selektion auf Interaktion von Köderprotein und Beuteproteinen aus der cDNS-Bibliothek: Trp-, Leu-, Ade- und His-freies Medium.
4. Detektion auf Interaktion von Köderprotein und Beuteproteinen aus der cDNS-Bibliothek: Hydrolyse von X- $\alpha$ -Gal zu einem blauen Farbstoff (*MEL1*-Genprodukt:  $\alpha$ -Galaktosidase).

### 2.10.3 Transformation von Hefezellen

#### Herstellung transformationskompetenter Hefezellen

Für die Aufnahme von Fremd-DNS durch die Hefezellen wurde die Lithiumacetat-vermittelte Methode ausgewählt (Gietz, D. et al., 1992). Dazu mussten zunächst transformationskompetente Hefezellen hergestellt werden. Hierbei wurde eine Hefezellkolonie des Stammes AH109 von einer YPDA-Agarplatte in 50 ml YPDA-Medium überführt und über Nacht bei 30°C schüttelnd (200 UpM) angezogen. Die OD<sub>600</sub> sollte am nächsten Morgen etwa 0,6 betragen. Die Zellen wurden dann durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 4000 rpm und Raumtemperatur sedimentiert, mit 20 ml sterilem Wasser gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 1 ml 1x TE/0,1M Lithiumacetat aufgenommen. Nach diesem Schritt sind die Hefezellen für die Transformation vorbereitet und können kurze Zeit auf Eis gelagert werden. Im Gegensatz zu Bakterien wie *E. coli* ist es nicht möglich, kompetente Hefezellen über einen län-

geren Zeitraum bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zu lagern. Sie müssen daher vor jeder Transformation frisch hergestellt werden.

### **Transformation kompetenter Hefezellen mit Plasmid-DNS**

Für die Transformation von Hefen mit Plasmid-DNS ist eine sogenannte Träger-DNS nötig. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu Lachssperma-DNS (Sigma-Aldrich) benutzt. Der Transformationsansatz setzte sich aus  $50\ \mu\text{g}$  Köderplasmid,  $25\ \mu\text{g}$  cDNS-Bibliothek und  $2\ \text{mg}$  Lachssperma-DNS zusammen. Zu diesem Ansatz wurden  $1\ \text{ml}$  kompetente Hefezellen gegeben und mit Hilfe eines Vortex-Gerätes gut gemischt. Anschließend wurden  $6\ \text{ml}$  einer frisch hergestellten PEG/Lithiumacetat-Lösung zugegeben, gut gemischt und der Ansatz für  $30\ \text{Minuten}$  bei  $30^{\circ}\text{C}$  und  $200\ \text{UpM}$  inkubiert. Nach der Zugabe von  $700\ \mu\text{l}$  DMSO und vorsichtigem Invertieren des Transformationsansatzes erfolgte der Hitzschock für  $15\ \text{Minuten}$  bei  $42^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad. Anschließend wurden die Hefezellen für  $1-2\ \text{Minuten}$  auf Eis inkubiert, woraufhin sie dann für fünf Minuten bei  $4000\ \text{rpm}$  zentrifugiert wurden. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die pelletierten Hefezellen in  $1\ \text{ml}$   $1 \times \text{TE}$ -Puffer aufgenommen, auf den entsprechenden Selektionsagarplatten ausgestrichen und für  $3-7\ \text{Tage}$  bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

#### **2.10.4 Isolierung von Plasmid-DNS aus Hefezellen**

Die Isolierung von Plasmid-DNS aus transformierten Hefezellen ist nur in sehr geringen Ausbeuten und mit Verunreinigungen durch genomische DNS möglich. Hefezellen besitzen ungefähr dreimal mehr genomische DNS als *E. coli*. Eine weitere Schwierigkeit stellt das Aufbrechen der stabilen Zellwand der Hefen dar. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Isolierung von Plasmid-DNS aus Hefen das YEASTMAKER Yeast Plasmid Isolation Kit (Clontech) verwendet. Dazu wurden frische Einzelkolonien transformierter Hefen von der entsprechenden Selektionsplatte, die auf Interaktionen zwischen dem Köderprotein und Beuteproteinen aus der cDNS-Bibliothek hindeutete, gepickt und diese über Nacht in  $500\ \mu\text{l}$  flüssigem Selektionsmedium bei  $30^{\circ}\text{C}$  kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Hefezellen bei  $14.000\ \text{rpm}$  für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend die Plasmid-DNS mit Hilfe des YEASTMAKER Yeast Plasmid Isolation Kits den Herstellerangaben entsprechend isoliert.

Bei dieser Präparation liegen sowohl das Köder- als auch das Beuteplasmid vor. Aus diesem Grund muss die isolierte Plasmid-DNS für eine Trennung von Köder und Beute in einem weiteren Schritt in *E. coli* amplifiziert werden.

#### **2.10.5 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNS aus Hefezellen**

Mit der aus den Hefen isolierten Plasmid-DNS wurden elektrokompetente Bakterien (ElectroMAX™ DH5 $\alpha$ -E™, Invitrogen) wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben transformiert. Anschließend wurden auf LB-Platten mit Ampicillin die Bakterien selektioniert, welche die Beute-

---

cDNS aus der Bibliothek trugen, da der Basisvektor der Bibliothek (pACT) das Ampicillin-Resistenzgen enthält. Nachfolgend wurden die auf den Selektionsplatten wachsenden Bakterienklone gepickt und über Nacht in 3 ml flüssigem LB-Ampicillin-Medium schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dann die Plasmid-DNS im Zuge einer Minipräparation aus den transformierten *E. coli* isoliert (s. 2.7.1).

### **2.10.6 Sequenzanalyse der positiven Klone des Hefe Zwei-Hybrid-Systems**

Die aus den Bakterien isolierte Plasmid-DNS (s. 2.10.5) wurde einer Sequenzanalyse (s. 2.7.8) unterzogen, um die Identität der Beute-cDNS aus der eingesetzten cDNS-Bibliothek zu ermitteln. Anschließend wurde auf Nukleinsäureebene der sequenzierte DNS-Abschnitt mittels Datenbankvergleich untersucht. Hierzu wurde das Programm BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) gewählt, welches die Datenbanken GenBank, EMBL und DDBJ durchsucht (Altschul, S.F. et al., 1990). BLASTN erkennt hierbei sehr ähnliche Sequenzen mit hoher Homologie.

## 3 Ergebnisse

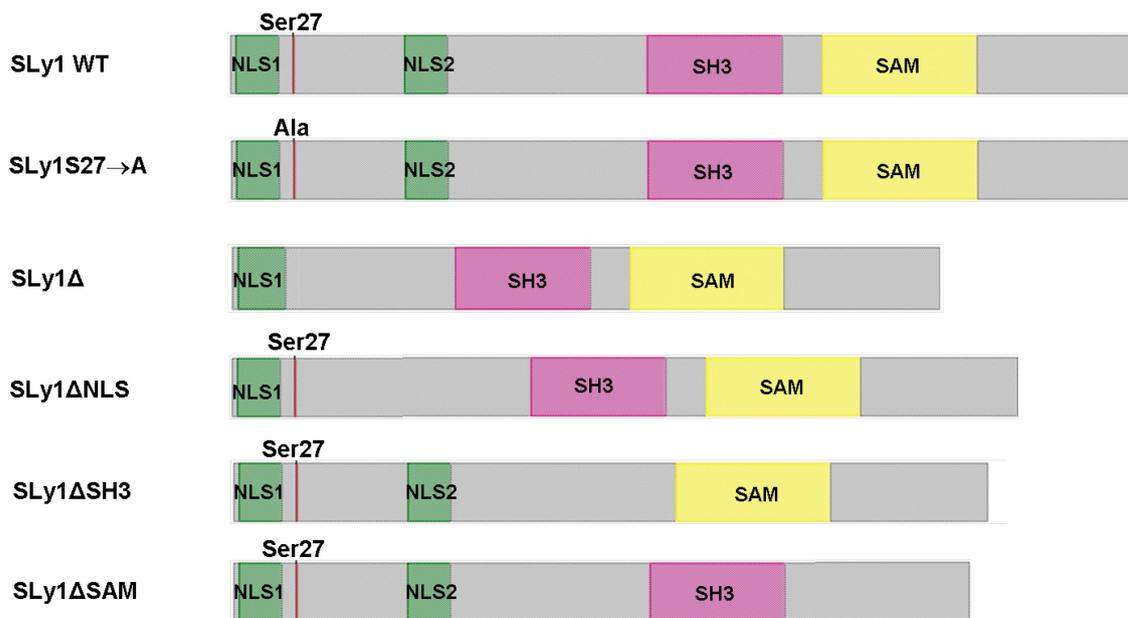
### 3.1 Interaktionsanalyse des Adapterproteins SLy1

Die SLy Proteinfamilie besteht aus drei Mitgliedern. Das „SH3 protein expressed in Lymphocytes1“ (SLy1) war das erste Protein aus dieser Familie, das kloniert wurde. Es wurde im Zuge eines Adhäsionsscreens aus einer T Zell-Lymphom-cDNS-Bibliothek isoliert und nachfolgend als ein putatives Adapterprotein mit einer nukleären Lokalisationssequenz (NLS) neben einer SH3- und einer SAM-Domäne charakterisiert, welches spezifisch in Lymphozyten exprimiert wird (Beer, S. et al., 2001). Zusätzlich befindet sich um den Leucinrest an Position 266 in der Aminosäuresequenz von SLy1 ein putatives leucinreiches nukleäres Exportsignal (NES), das mit Hilfe des Programms „NES predictor (NetNES)“ vorhergesagt wurde (<http://www.cbs.dtu.dk/>).

Eine weitere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass SLy1 in T und B Zellen nach einer Stimulation des Antigenrezeptors spezifisch an einem Serinrest (Serin27) phosphoryliert wird (Astoul, E. et al., 2003). Die charakteristische Domänenstruktur von SLy1 und dieser Phosphorylierungsbefund legten die Vermutung nahe, dass es sich bei SLy1 um ein Adapterprotein im Signalweg von Lymphozyten handeln könnte. Die Analyse einer Mauslinie, die eine trunkierte Version des SLy1-Proteins exprimiert (SLy1<sup>ΔΔ</sup>) und die Analyse einer SLy1-defizienten Mauslinie (SLy1<sup>-/-</sup>) ergaben, dass die Proliferation und Effektorfunktion von T und B Lymphozyten nach Stimulation des Antigenrezeptors *in vitro* deutlich vermindert waren (Beer, S. et al., 2005; Reis, B. et al., 2009). Zudem war in diesen Mauslinien die Entwicklung der Lymphozyten beeinträchtigt, was sich durch eine Reduktion der Zellularität in den peripheren lymphatischen Organen darstellte (Beer, S. et al., 2005; Scheikl, T. et al., 2008; Reis, B. et al., 2009). *In vivo*-Experimente zeigten eine verminderte Abstoßung semi-identischer Herz-Allotransplantate (Beer, S. et al., 2005). Weitere Analysen ergaben, dass SLy1 ein anti-apoptotisches Protein ist, das für die Entwicklung von Thymozyten eine entscheidende Rolle spielt, da in Abwesenheit eines funktionsfähigen SLy1-Proteins die Apoptoserate im Verlauf der Thymozyten-Entwicklung erhöht ist (Reis, B. et al., 2009). Bei sämtlichen Analysen fiel auf, dass die Expression der trunkierten Version des SLy1-Proteins die gleichen Ergebnisse lieferte wie eine komplette Abwesenheit des SLy1-Moleküls. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass die in der trunkierten SLy1-Version fehlenden Abschnitte eine ganz entscheidende Rolle bei der Funktion des Proteins spielen. Dem verkürzten Protein SLy1<sup>Δ</sup> fehlen im N-terminalen Bereich die Aminosäuren 20 bis 100 von insgesamt 380 Aminosäuren. Dadurch sind im SLy1<sup>Δ</sup>-Molekül 50% der zweigeteilten NLS und die Phosphorylierungsstelle am Serin27 deletiert.

Neben dem Wildtyp-SLy1-Protein und dem SLy1 $\Delta$ -Molekül wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit noch weitere Deletionsmutanten von SLy1 analysiert, denen charakteristische Bereiche dieses Moleküls fehlen. Die verwendeten Konstrukte sind in Abb. 8 zusammengefasst.

### SLy1-Konstrukte



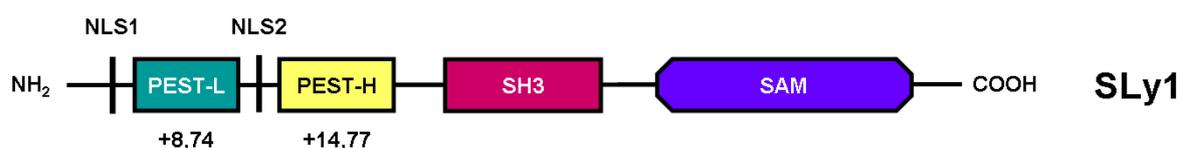
**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Domänenstruktur verschiedener SLy1-Konstrukte**

Oben gezeigt ist das SLy1-Protein, wie es in Wildtyp-Mäusen (WT) exprimiert wird. Die Phosphorylierungsstelle am Serin27 ist markiert. Darunter dargestellt ist eine Version des SLy1-Moleküls, bei der diese Serin-Phosphorylierungsstelle zu einem Alanin mutiert wurde, an dem keine Phosphorylierung mehr stattfinden kann. Durch die Deletion der Aminosäuren 20-100 im SLy1 $\Delta$ -Protein kommt es ebenfalls zu einem Verlust der Phosphorylierungsstelle, zudem ist auch noch ein Teil der zweigeteilten NLS deletiert. In der SLy1-Mutante SLy1 $\Delta$ NLS hingegen ist die Phosphorylierungsstelle am Serin27 noch vorhanden, allerdings fehlt der zweite Teil der NLS. In der SLy1 $\Delta$ SH3-Mutante ist die SH3-Domäne deletiert, und in der SLy1 $\Delta$ SAM-Mutante fehlt die SAM-Domäne.

Zusätzlich zu den in Abb. 8 dargestellten SLy1-Konstrukten wurden für Experimente zu einer möglichen Homodimerisierung von SLy1 noch zwei weitere Mutanten verwendet. Dabei handelt es sich um SLy1-Moleküle, bei denen putative PEST-Sequenzen deletiert wurden. PEST-Sequenzen sind Bereiche in der Aminosäureabfolge von Proteinen, welche reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E) und Serin (S)/Threonin (T) (selten auch Aspartat) sind, wodurch sich auch der Name dieser Motive ergibt. PEST-Sequenzen stellen eines der häufigsten Signale zum Proteinabbau mittels Ubiquitinierung (proteosomaler Abbau), durch Caspasen oder durch die Protease Calpain dar. Zudem sind PEST-Motive aber auch an vielen anderen zellulären Prozessen, wie beispielsweise der Phosphorylierung von Proteinen,

der Zelladhäsion oder auch Protein-Protein-Interaktionen, beteiligt. Anhand der mit Hilfe des „PESTfind“-Programms (<http://www.at.embnnet.org/toolbox/pestfind/>) vorhergesagten Stärke der jeweiligen PEST-Sequenz wurden die Konstrukte als SLy1 $\Delta$ -PEST-H (H = High Score) und SLy1 $\Delta$ PEST-L (L = Low Score) bezeichnet. Nach Angaben des „PESTfind“-Programms besitzen PEST-Motive ab einer Stärke von +5 eine funktionelle Relevanz.

Die Lokalisation der putativen PEST-Sequenzen im SLy1-Protein und die für sie vorhergesagte Stärke sind in Abb. 9 gezeigt.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von SLy1 inklusive der zwei putativen PEST-Sequenzen**

Dargestellt ist das Wildtyp-SLy1-Protein mit seiner zweigeteilten NLS, der SH3- und der SAM-Domäne sowie zwei mit Hilfe des „PESTfind“-Programms vorhergesagten potenziellen PEST-Motiven. Der Wert unterhalb dieser Sequenzen steht für die putative Stärke dieser Motive. PEST-L bezeichnet die „Low Score“-PEST Sequenz, wohingegen PEST-H für „High Score“-PEST steht.

### 3.1.1 Subzelluläre Lokalisation des SLy1-Proteins

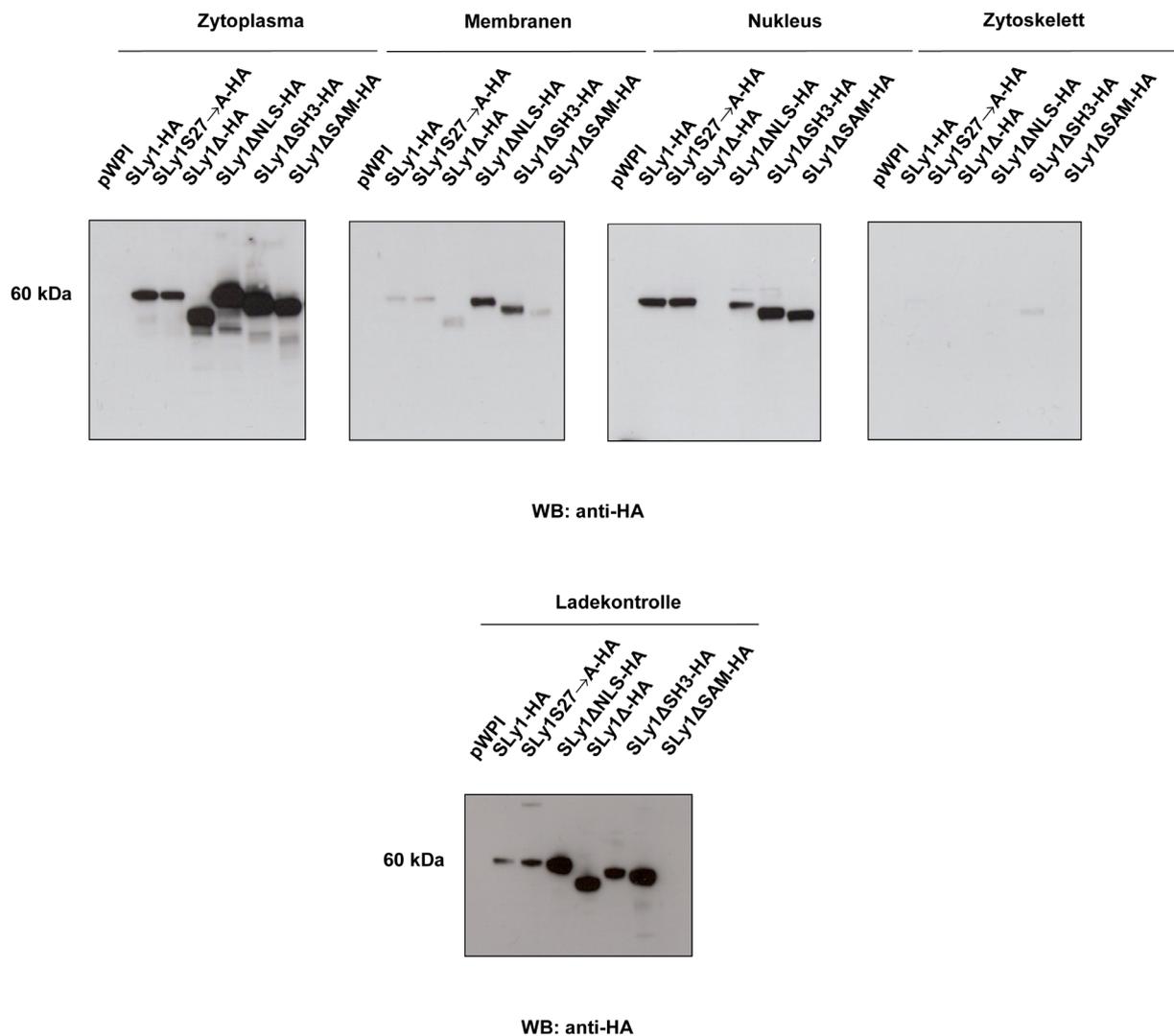
Das wildtypische SLy1-Protein ist sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert (Beer, S. et al., 2005), wobei sich der mehrheitliche Teil des Moleküls im Zellkern befindet. Interessanterweise zeigt sich in primären T Zellen, welche mit anti-CD3 und anti-CD28 kostimuliert wurden, eine Translokation des SLy1-Proteins aus dem Nukleus in das Zytoplasma, die nach 60-minütiger Stimulation vollständig ist und mindestens zwei Stunden anhält (Reis, B., Dissertation).

Zudem war aus vorherigen Analysen bereits bekannt, dass das SLy1 $\Delta$ -Protein eine zum Wildtyp-Molekül abweichende subzelluläre Lokalisation aufweist, da die SLy1 $\Delta$ -Mutante nicht mehr im Nukleus, sondern nur noch im Zytoplasma zu finden ist (Beer, S. et al., 2005; Scheikl, T. et al., 2008). Eine Stimulation von primären T Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 verändert hierbei die Lokalisation des mutierten SLy1-Moleküls nicht (Reis, B., Dissertation). Aus diesem Grund wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit zunächst die subzelluläre Lokalisation sämtlicher SLy1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein analysiert, um Aufschlüsse darüber zu erhalten, ob auch die Deletion weiterer charakteristischer Abschnitte oder Domänen des SLy1-Proteins Veränderungen in der Lokalisation dieses Moleküls hervorruft.

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation der verschiedenen SLy1-Proteine wurden Jurkat T Zellen über ein lentivirales System mit den in Abb. 8 aufgeführten SLy1-Konstrukten

---

und einem Kontrollvektor (pWPI) stabil transduziert. Hierbei waren diese Konstrukte jeweils mit einer HA-Markierung versehen, so dass eine Detektion der Proteine über eine Western Blot-Analyse mit Hilfe eines Antikörpers gegen die HA-Markierung möglich war. Anschließend wurde eine subzelluläre Fraktionierung der verschiedenen Jurkat Zelllinien mit Hilfe des „ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kits“ (Calbiochem-Merck) durchgeführt. Dabei werden neben der zytosolischen Fraktion die Kern-, eine Membran- und die Zytoskelettfraktion erhalten. Hierbei ist zu bemerken, dass die Membranfraktion neben der Plasmamembran auch membranöse Organellen beinhaltet. Die präparierten Fraktionen wurden nachfolgend einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und einer Western Blot-Analyse unterzogen.



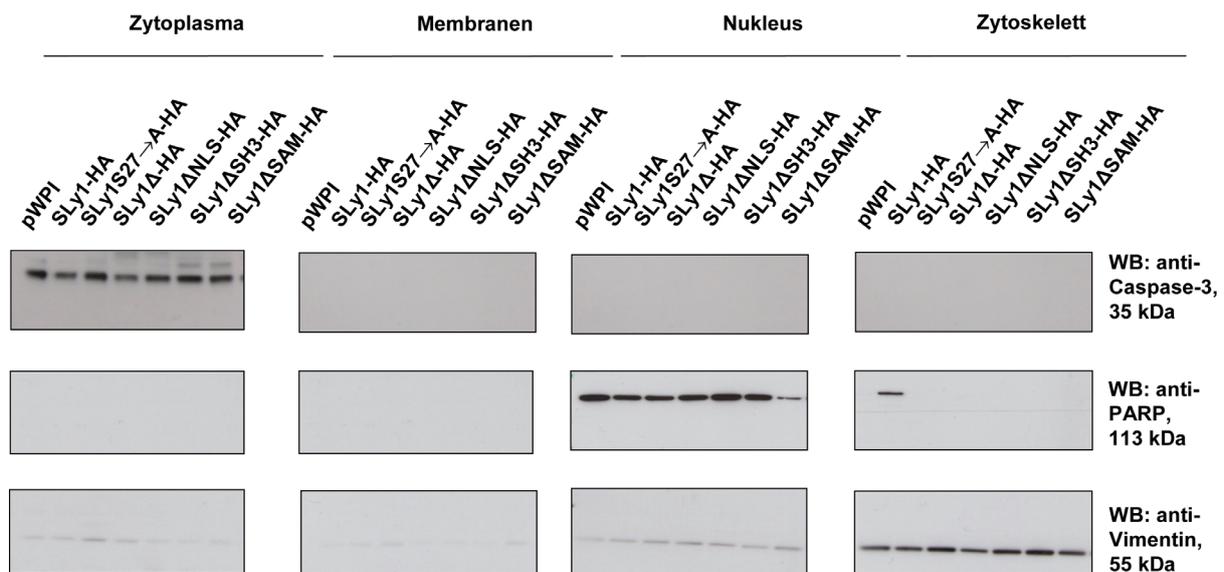
**Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisation der verschiedenen SLy1-Konstrukte**

Stabil transduzierte Jurkat T Zellen, welche den Kontrollvektor pWPI oder die verschiedenen HA-markierten SLy1-Konstrukte exprimieren, wurden mit Hilfe des „ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kits“ fraktioniert. Die dabei erhaltene zytosolische Fraktion wurde neben einer Membran-, der Nukleus- und der Zytoskelettfraktion auf die Detektierbarkeit der verschiedenen SLy1-Proteine hin analysiert. Die ebenfalls aufgeführte Ladekontrolle zeigt die Expression der unterschiedlichen SLy1-Konstrukte in den Jurkat Zellen.

Wie Abb. 10 verdeutlicht, sind alle analysierten SLy1-Konstrukte sowohl in der zytosolischen als auch in der Membranfraktion zu finden. Allerdings sind die Konstrukte in der membranösen Fraktion nur relativ schwach zu detektieren. Die Analyse der Kernfraktion zeigt, dass alle SLy1-Moleküle bis auf die SLy1Δ-Mutante im Nukleus der Jurkat Zellen detektierbar sind. Dieser Befund deckt sich mit den zuvor veröffentlichten Daten bezüglich der veränderten Lokalisation des SLy1Δ-Proteins im Vergleich zum wildtypischen SLy1 (Beer, S. et al., 2005; Scheikl, T. et al., 2008). Interessanterweise reicht die Deletion des

zweiten Teils der NLS von SLy1 in der SLy1 $\Delta$ NLS-Mutante nicht aus, um eine Lokalisation dieses Moleküls im Nukleus zu verhindern. In der Zytoskelettfraktion hingegen sind die verschiedenen SLy1-Proteine nicht mehr nachzuweisen. Lediglich bei der SLy1 $\Delta$ SH3-Mutante ist eine schwache Bande sichtbar. Die Ladekontrolle zeigt die Expression der verschiedenen SLy1-Konstrukte in den stabil transduzierten Jurkat T Zellen. Hierbei wird deutlich, dass die Proteine in den Zelllinien deutliche Expressionsunterschiede aufweisen, so dass eine Quantifizierung der Mengen des SLy1-Proteins in den verschiedenen Fraktionen nicht möglich ist. Die erzielten Resultate lassen lediglich eine Qualifizierung der SLy1-Lokalisation zu.

In Abb. 11 werden die der subzellulären Fraktionierung entsprechenden Kontrollen gezeigt. Um die Reinheit der erhaltenen Fraktionen zu testen, wurden sämtliche Proben über eine Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen Caspase-3 (zytosolischer Marker), Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP, Kernmarker) und Vimentin (Zytoskelettmarker) inkubiert. Ein Marker für die Überprüfung der Membranfraktion von Jurkat Zellen konnte im Zuge dieser Arbeit trotz Testung verschiedener Antikörper nicht etabliert werden.



**Abbildung 11: Kontrollen zur Überprüfung der Reinheit der subzellulären Fraktionen**

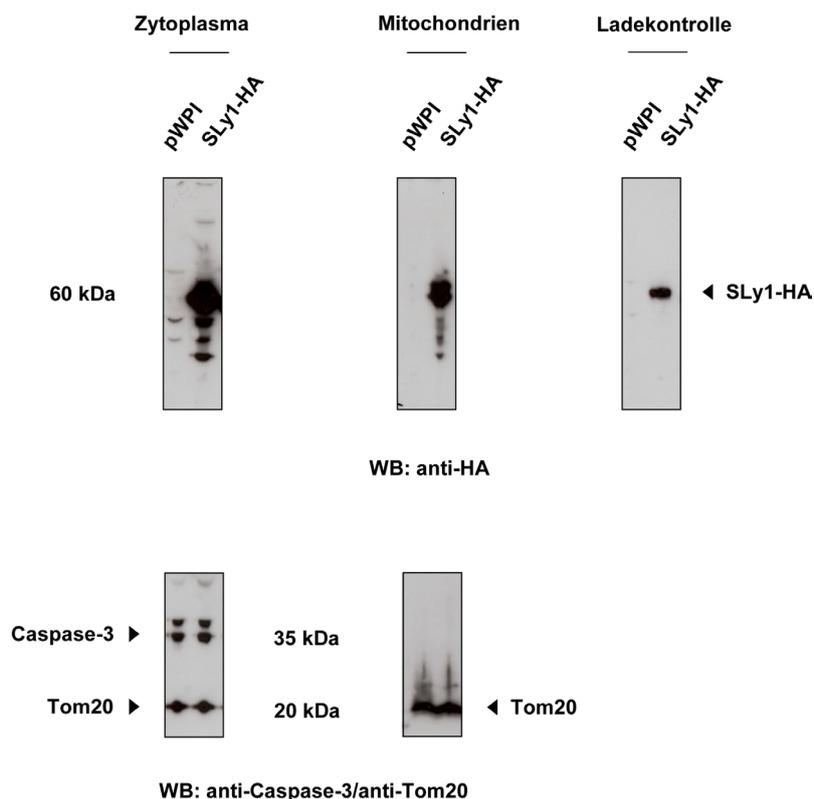
Für die Überprüfung der Reinheit der im Zuge der SLy1-Fraktionierung erhaltenen Fraktionen wurden sämtliche Proben mit Hilfe einer Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen spezifische Markerproteine inkubiert. Caspase-3 stellt ein zytosolisches, Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ein nukleäres und Vimentin ein Markermolekül für das Zytoskelett dar.

Wie Abb. 11 zeigt, ist Caspase-3 erwartungsgemäß nur in der zytosolischen und PARP nur in der nukleären Fraktion detektierbar. Lediglich in der Zytoskelettfraktion des wildtypischen SLy1-Proteins ist zusätzlich eine PARP-Bande sichtbar. Vimentin stellt ein Intermediärfilament des Zytoskeletts dar und liefert in der Western Blot-Analyse in sämtlichen Fraktionen

einen leichten Hintergrund. Allerdings ist eine deutliche Anreicherung dieses Moleküls in der Zytoskelettfraktion detektierbar.

Aufgrund der bereits publizierten Funktion von SLy1 als ein neues anti-apoptotisches Molekül bei der Entwicklung von Thymozyten (Reis, B. et al., 2009) bestand zusätzlich zu der in Abb. 10 dargestellten subzellulären Fraktionierung von SLy1 ein Interesse daran, ob SLy1 an Mitochondrien zu finden ist, die für den programmierten Zelltod eine entscheidende Rolle spielen können. Aus diesem Grund wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des „ProteoExtract® Cytosol/Mitochondria Fractionation Kits“ (Calbiochem-Merck) eine Fraktionierung von stabil transduzierten Jurkat Zellen durchgeführt. Hierbei wurden Zellen, die einen Kontrollvektor (pWPI) exprimieren, mit Zellen verglichen, welche das wildtypische SLy1-Protein mit einer HA-Markierung generieren.

Wie Abb. 12 zeigt, ergab diese Fraktionierung, dass das wildtypische SLy1-Molekül erwartungsgemäß im Zytoplasma, aber auch in der mitochondrialen Fraktion nachweisbar ist. Eine Ladekontrolle zeigt die Expression des SLy1-Proteins in den Jurkat-Zellen. Zur Überprüfung der Reinheit der beiden Fraktionen wurden als Markermoleküle Caspase-3 (zytosolischer Marker) und Tom20 (mitochondrialer Marker) verwendet. Hierbei fällt auf, dass Tom20 nicht nur in der mitochondrialen, sondern auch in der zytosolischen Fraktion detektierbar ist, was auf eine Verunreinigung der zytoplasmatischen Fraktion mit Mitochondrien hindeutet. Entscheidend ist allerdings, dass bei der Mitochondrienfraktion keine Verunreinigung mit zytosolischen Bestandteilen nachweisbar ist, denn in dieser Fraktion ist nur eine Tom20-Bande und keine zusätzliche Caspase-3-Bande detektierbar.



**Abbildung 12: Zytoplasmische und mitochondriale Fraktionierung von SLy1**

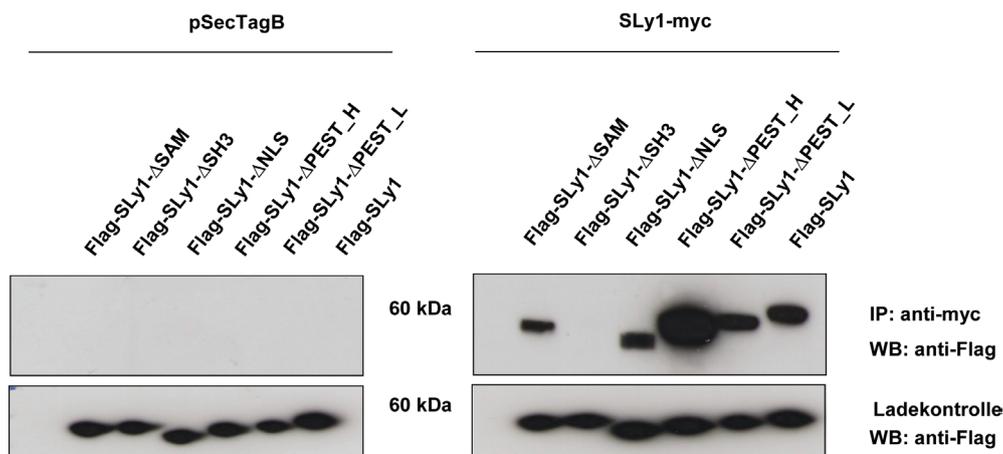
Dargestellt ist die zytoplasmische und mitochondriale Fraktionierung („ProteoExtract® Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit“) von stabil transduzierten Jurkat Zellen, die entweder einen Kontrollvektor (pWPI) oder das wildtypische SLy1-Protein mit HA-Markierung exprimieren. Eine Ladekontrolle zeigt die Expression des SLy1-Moleküls. Zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen Fraktionen wurden in der Western Blot-Analyse die Antikörper gegen Caspase-3 (zytosoisches Protein) und Tom20 (mitochondriales Protein) verwendet.

### 3.1.2 Homodimerisierung des SLy1-Proteins

Die Aufklärung des Interaktionsverhaltens von SLy1 kann einen wichtigen Beitrag zur funktionellen Charakterisierung dieses Moleküls leisten. Proteine mit typischen Protein-Protein-Interaktionsmodulen, wie zum Beispiel SH3- und SAM-Domänen, interagieren mit Hilfe dieser Domänen oftmals nicht nur mit anderen Molekülen, sondern sind auch in der Lage, Homodimere zu generieren. Eine Homodimerisierung von Adaptermolekülen kann unterschiedliche Auswirkungen auf die Funktion dieser Proteine haben. Zum einen kann sie die Interaktion der Adaptermoleküle mit ihren Zielproteinen erst ermöglichen, zum anderen vermag eine Homodimerisierung jedoch auch die Bindung eines Adapterproteins an ein Zielmolekül zu verhindern, indem durch sie die Bindestelle für das Zielmolekül blockiert wird.

Wie Abb. 8 zeigt, besitzt das SLy1-Protein sowohl eine SH3- als auch eine SAM-Domäne, so dass dieses Molekül ein putatives Adapterprotein darstellt, welches sowohl mit anderen Proteinen als auch mit sich selbst interagieren könnte. Aus diesem Grund sollten im Zuge der vorliegenden Arbeit zunächst eine mögliche Homodimerisierung des wildtypischen SLy1-

Proteins und eine Identifizierung der zu einer Homodimerisierung beitragenden Domäne erfolgen. Dazu wurde entweder ein Kontrollvektor (pSecTagB) oder ein myc-markiertes wildtypisches SLy1-Konstrukt (SLy1-myc) zusammen mit verschiedenen Flag-markierten SLy1-Konstrukten transient in HEK 293T Zellen ko-transfiziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Lysate als Ausgangsmaterial für eine Ko-Immünpräzipitation eingesetzt. Die Ko-Immünpräzipitation wurde mit anti-myc-gekoppelter Sepharose durchgeführt und die Proben anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot analysiert (s. Abb. 13).



**Abbildung 13: Homodimerisierung des SLy1-Proteins**

HEK 293 T Zellen wurden entweder mit einem Kontrollvektor (pSecTagB, links) oder einem wildtypischen SLy1-myc-Konstrukt (rechts) und verschiedenen Flag-markierten SLy1-Molekülen transient ko-transfiziert und eine mögliche Homodimerisierung der jeweiligen Proteine mittels Ko-Immünpräzipitation (anti-myc-gekoppelte Sepharose) sowie anschließender SDS-PAGE und Western Blot-Analyse detektiert. Eine Ladekontrolle zeigt die Expression der verschiedenen Flag-markierten SLy1-Konstrukte.

Bei der Ko-Transfektion der Flag-markierten SLy1-Konstrukte mit dem Kontrollvektor sind erwartungsgemäß keine Proteinbanden im Western Blot detektierbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Flag-markierten SLy1-Proteine nicht unspezifisch an das myc-Epitop und/oder die Sepharose binden. Bei der Ko-Transfektion der Flag-markierten SLy1-Moleküle mit dem SLy1-myc-Konstrukt hingegen zeigen sich im Western Blot eindeutige Proteinbanden, welche auf eine Homodimerisierung des SLy1-Proteins hindeuten. Sowohl die beiden wildtypischen SLy1-Moleküle vermögen miteinander zu interagieren als auch das wildtypische SLy1-Protein mit dem SLy1 $\Delta$ SAM-, dem SLy1 $\Delta$ NLS-, dem SLy1 $\Delta$ PEST-H- und dem SLy1 $\Delta$ PEST-L-Konstrukt. Besonders auffällig ist hierbei die besonders dicke Interaktionsbande bei der Ko-Transfektion von SLy1 und SLy1 $\Delta$ PEST-H. Im Falle der Ko-Transfektion des wildtypischen SLy1-Proteins mit der SLy1 $\Delta$ SH3-Mutante jedoch findet eindeutig keine Homodimerisierung mehr statt. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis darauf, dass die SH3-Domäne von

SLy1 für die Homodimerisierung dieses Proteins verantwortlich ist. Neben der Ko-Immunitäzipitation ist auch eine Ladekontrolle aufgeführt, welche die Expression der verschiedenen Flag-markierten SLy1-Konstrukte in den transfizierten HEK 293T Zellen zeigt.

### 3.1.3 Interaktion von SLy1 mit Lipiden

Eine Interaktion von Proteinen mit Lipiden kann über typische Protein-Lipid-Interaktionsdomänen wie zum Beispiel sogenannte „Pleckstrin homology“- (PH-) Domänen erfolgen, welche an die Kopfgruppe von Phosphoinositiden binden kann. Mit Hilfe einer derartigen Interaktion können Proteine an die Plasmamembran andocken, um dort eine spezifische Funktion zu erfüllen. Neben ihrem Vorkommen in der Plasmamembran sind Phosphoinositide auch im Zellkern zu finden. Hier sind sie an entscheidenden Prozessen der Signalweiterleitung beteiligt.

Zusätzlich zu den typischen Protein-Lipid-Interaktionsdomänen existieren jedoch auch polybasische Regionen (PBRs) in der Aminosäuresequenz von Proteinen, mit deren Hilfe diese Moleküle ebenfalls an Lipide binden können. Solche polybasischen Regionen sind reich an positiv geladenen Aminosäuren wie beispielsweise Lysin, welche an die negativ geladenen Kopfgruppen von phosphorylierten Lipiden zu binden vermögen.

SLy1 besitzt zwar keine typischen Protein-Lipid-Interaktionsdomänen, allerdings weist die zweigeteilte NLS des Moleküls einen hohen Anteil an positiv geladenen Lysin- und Argininresten auf.

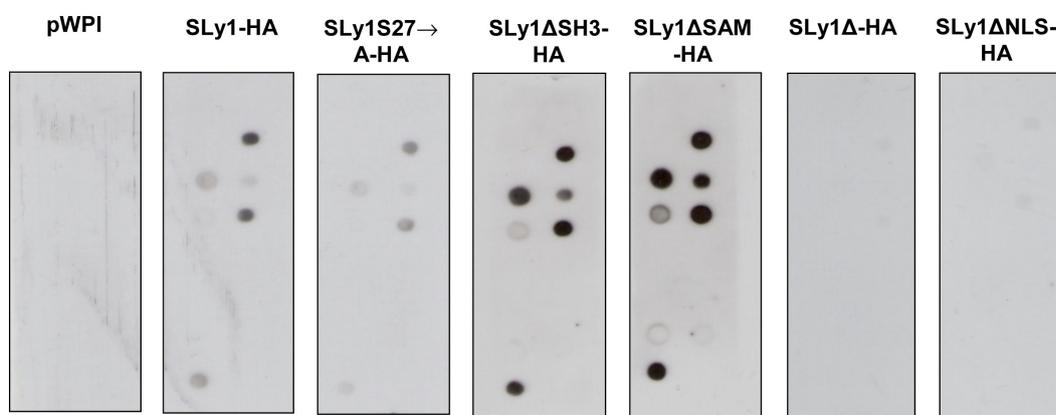
Aus diesem Grund sollte im Zuge dieser Arbeit eine mögliche Interaktion von SLy1 mit Lipiden analysiert werden. Dazu wurden Lipidbindeexperimente mit sogenannten „Membrane Lipid Strips™“, „PIP Strips™“ und „PIP Arrays™“ und Lysaten von stabil transduzierten Jurkat T Zellen durchgeführt. Hierbei wurden Jurkat Zellen verwendet, die neben dem wildtypischen, HA-markierten SLy1-Protein entweder einen Kontrollvektor (pWPI) oder verschiedene HA-markierte Deletionsmutanten von SLy1 exprimieren. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines hypotonischen Lysepuffers, welcher keine Detergenzien enthält, die eine Bindung an Lipide stören könnten. Zudem wurden die Zellen mechanisch durch mehrmaliges Aufziehen in eine Spritze aufgeschlossen.

Bei den „Membrane Lipid Strips™“, „PIP Strips™“ und „PIP Arrays™“ handelt es sich um hydrophobe Membranen, auf die punktförmig biologisch aktive Lipide aufgebracht wurden (siehe Abb. 14 A). Nach der Inkubation der Membranen mit den jeweiligen Lysaten kann die Bindung eines Proteins an die aufgetragenen Lipide mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert werden.

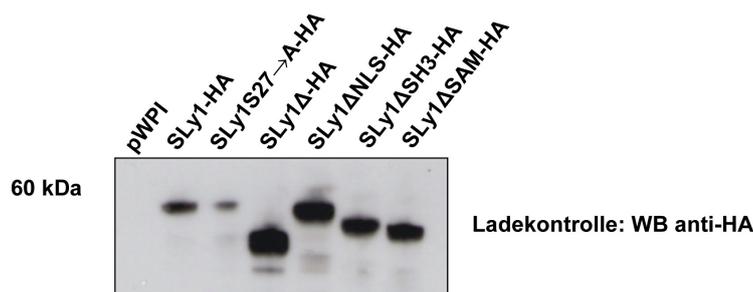
A

Triglyceride	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Phosphatidylinositol (PI)
Diacylglycerin (DAG)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	PI(4)P
Phosphatidat (PA)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	PI(4,5)P <sub>2</sub>
Phosphatidylserin (PS)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	PI(3,4,5)P <sub>3</sub>
Phosphatidylethanolamin (PE)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Cholesterol
Phosphatidylcholin (PC)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Sphingomyelin
Phosphatidylglycerin (PG)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Sulfatid
Cardiolipin	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Leerkontrolle

B



Detektion: anti-HA



Ladekontrolle: WB anti-HA

#### Abbildung 14: Interaktion von SLy1 mit Lipiden

**A:** Schematische Darstellung des Auftragsmusters der „Membrane Lipid Strips™“.

**B:** „Membrane Lipid Strips™“ wurden mit Lysaten von Jurkat T Zellen inkubiert, welche unterschiedliche, HA-markierte SLy1-Konstrukte oder einen Kontrollvektor (pWPI) stabil exprimieren. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines hypotonischen Puffers ohne Detergenzien und durch mechanisches Aufschließen der Zellen. Eine Bindung der SLy1-Moleküle an die auf die Strips aufgebrachtene Lipide wurde über eine Detektion mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop sichtbar gemacht. Eine Ladekontrolle zeigt die Expressionsstärke der verschiedenen SLy1-Konstrukte.

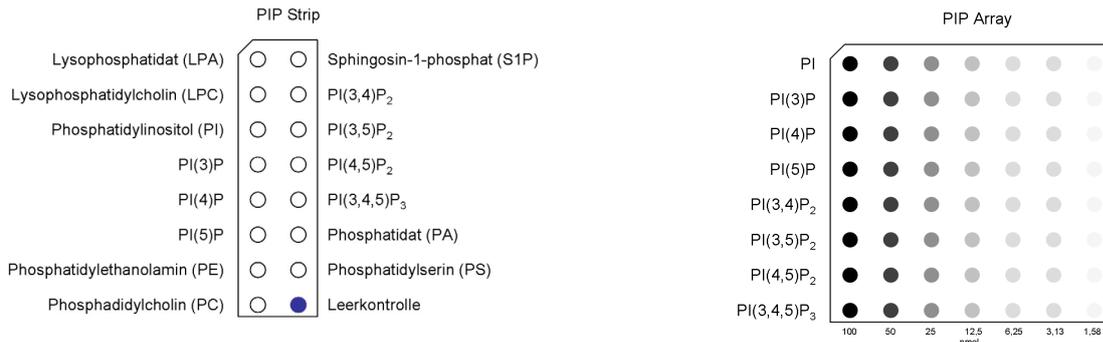
Die Lipidbindeexperimente für die verschiedenen SLy1-Moleküle mit den „Membrane Lipid Strips™“ sind in Abb. 14B dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass nach der Detektion mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop im Falle der Leervektorkontrolle (pWPI) keine Bindung an die vorhandenen Lipide zu detektieren ist. Das wildtypische SLy1-Molekül, sowie die SLy1S27→A-, die SLy1ΔSH3- und die SLy1ΔSAM-Mutante hingegen zeigen eine Bindung an Phosphatidylinositol-4-phosphat PI(4)P, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat PI(4,5)P<sub>2</sub>, Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>), Phosphatidat (Diacylglycerin-3-phosphat), Phosphatidylserin und Cardiolipin (Diphosphatidylglycerin). Diese Lipide tragen alle eine negative Ladung. Cardiolipin stellt ein typisches Lipid der Mitochondrienmembran dar, wohingegen die anderen Moleküle in der Plasmamembran zu finden sind. PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> sind zudem auch im Zellkern lokalisiert (Gozani, O. et al., 2005). Die Assoziation von SLy1 mit Cardiolipin könnte die Anwesenheit von SLy1 in der mitochondrialen Fraktion (s. Abb. 12) erklären. Die Interaktion von SLy1 mit sämtlichen anderen Lipiden hingegen kann die Lokalisation von SLy1 in der Membranfraktion (s. Abb. 10) bewirken. Da jedoch einige der Phosphoinositide, mit denen SLy1 interagiert, auch im Nukleus detektierbar sind, besteht auch die Möglichkeit, dass SLy1 mit diesen Lipiden im Zellkern assoziiert. Interessanterweise vermag sowohl das SLy1Δ-Molekül als auch die SLy1ΔNLS-Mutante nicht mehr mit den zuvor genannten Lipiden zu interagieren. In beiden Molekülen fehlt der zweite Teil der zweigeteilten NLS. Zudem sind in der SLy1Δ-Mutante auch noch weitere Abschnitte der N-terminalen SLy1-Sequenz inklusive der Phosphorylierungsstelle am Serin27 deletiert (s. Abb. 8). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass SLy1 über die polybasische Region in der NLS, welche eine relativ große Anzahl positiv geladener Lysine und Arginine enthält, mit negativ geladenen Lipiden interagiert. Zudem zeigt dieses Resultat, dass bereits die Deletion des zweiten Teils der NLS von SLy1 ausreicht, die Bindung an die verschiedenen Lipide zu unterbinden.

Eine Ladekontrolle zeigt in Abb. 14 B die Expression der verschiedenen SLy1-Konstrukte. Hierbei ist deutlich eine unterschiedliche Expressionsstärke der Proteine in den jeweiligen Zelllinien zu erkennen.

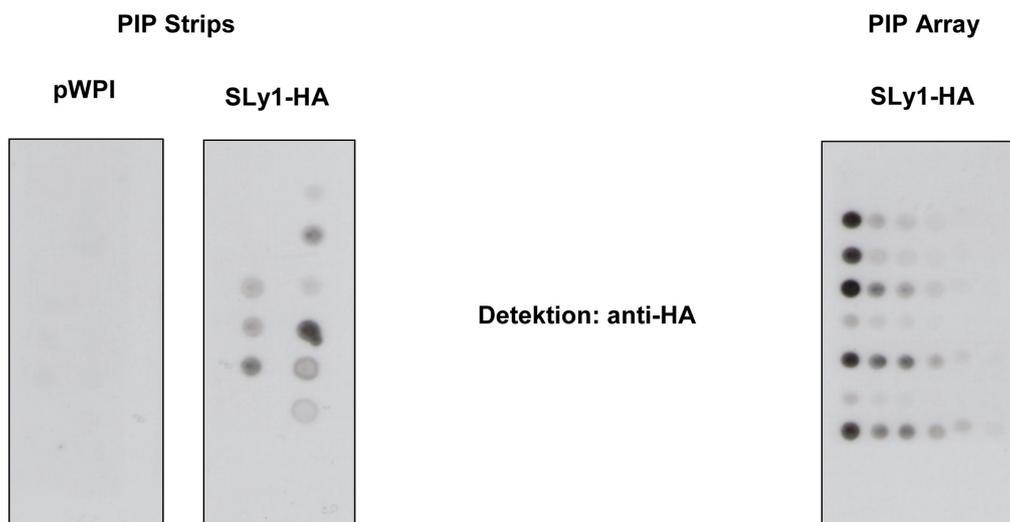
Da für das SLy1-Protein mit Hilfe der „Membrane Lipid Strips™“ bereits eine Bindung an Phosphoinositide detektierbar war (s. Abb. 14 B), wurden weitere Lipidbindeexperimente mit sogenannten „PIP Strips™“ und „PIP Arrays™“ durchgeführt, um eventuell weitere Phosphoinositid-Spezies, an welche SLy1 ebenfalls bindet, zu identifizieren und die relative Stärke einer solchen Bindung zu bestimmen. Im Vergleich zu den „Membrane Lipid Strips™“ sind bei den „PIP Strips™“ mehr Phosphoinositid-Spezies auf der Membran vorhanden, so dass eine genauere Analyse des Phosphoinositid-Bindevorgangs eines Proteins erfolgen kann (s. Abb. 15 A). Mit Hilfe der „PIP Arrays™“ kann die relative Stärke der Protein-

Phosphoinositid-Bindung analysiert werden, da hier verschiedene Phosphoinositide in jeweils sieben unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen sind (s. Abb. 15 A rechts). Die Vorgehensweise entsprach hierbei der, welche zuvor für die „Membrane Lipid Strips™“ angewendet wurde. Allerdings wurden bei diesen Experimenten lediglich das wildtypische SLy1-Protein und eine Leervektorkontrolle (pWPI) analysiert.

## A



## B



## Abbildung 15: Interaktion von SLy1 mit Lipiden

**A:** Schematische Darstellung des Auftragsmusters der „PIP Strips™“ (links) und des „PIP Arrays™“ (rechts).

**B:** „PIP Strips™“ (links) und ein „PIP Array™“ (rechts) wurden mit Lysaten von Jurkat T Zellen inkubiert, welche entweder ein HA-markiertes, wildtypisches SLy1-Konstrukt oder einen Kontrollvektor (pWPI) stabil exprimieren. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines hypotonischen Puffers ohne Detergenzien und durch mechanisches Aufschließen der Zellen. Mit Hilfe des „PIP Arrays™“ kann die relative Stärke der Interaktion von SLy1 mit den verschiedenen Phosphoinositiden abgeschätzt werden. Eine Bindung der SLy1-Moleküle an die auf die Strips aufgebrachtene Lipide wurde über eine Detektion mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop sichtbar gemacht.

Abbildung 15 B zeigt das Resultat des Lipidbindeexperiments mit den „PIP Strips™“ und dem „PIP Array™“. Die Leervektorkontrolle (pWPI) zeigt hierbei erwartungsgemäß keine Bindung an die vorhandenen Lipide. Das wildtypische SLy1-Konstrukt hingegen bindet sowohl an die Monophosphoinositide PI(3)P, PI(4)P und PI(5)P, als auch an die Diphosphoinositide PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub> und PI(4,5)P<sub>2</sub>, sowie an das Triphosphoinositid PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Die Bindung von SLy1 an PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> wurde zuvor auch schon mit Hilfe der „Membrane Lipid Strips™“ gezeigt (s. Abb. 14 B), so dass diese Ergebnisse die Bindung verifizieren. Ebenso konnte die Bindung von SLy1 an Phosphatidat und Phosphatidylserin sowohl mit Hilfe des „Membrane Lipid Strips™“ und des „PIP Strips™“ gezeigt werden.

Interessanterweise scheint SLy1 die verschiedenen Phosphoinositide unterschiedlich stark zu binden. Das Resultat des „PIP Arrays™“ verdeutlicht, dass SLy1 die drei Monophosphoinositide ähnlich stark binden kann; bei den drei Diphosphoinositiden jedoch zeigen sich klare Unterschiede. Am stärksten vermag SLy1 an PI(3,5)P<sub>2</sub> zu binden. Die Interaktion mit PI(3,4)P<sub>2</sub> und PI(4,5)P<sub>2</sub> hingegen ist deutlich schwächer, aber miteinander vergleichbar. Die Bindung von SLy1 an PI(3,4,5)P<sub>3</sub> ist deutlich detektierbar. Das Ergebnis des „PIP Arrays™“ zeigt zudem, dass die Bindung von SLy1 an die verschiedenen Phosphoinositide bei abnehmender Lipidmenge ebenfalls weniger stark detektierbar ist. Dies verdeutlicht, dass die Stärke der Interaktion von SLy1 mit diesen Molekülen von der vorhandenen Menge der Lipide abhängig ist.

### 3.1.4 Interaktion von SLy1 mit 14-3-3 Proteinen

Im Zuge einer weiteren Interaktionspartnersuche von SLy1 wurde die Aminosäuresequenz dieses Proteins näher analysiert. Insbesondere das bereits in Abschnitt 3.1.1 beschriebene, stimulations- bzw. phosphorylierungsabhängige Translokationsverhalten des wildtypischen SLy1-Moleküls erforderte eine genauere Analyse der flankierenden Sequenz um die Phosphorylierungsstelle von SLy1 (Serin27) (Bernhard Reis). Diese Betrachtung ergab, dass durch die Phosphorylierung von SLy1 am Serin27 ein Sequenzmuster entsteht, welches bis auf eine Position einer Konsensusbindestelle für 14-3-3 Proteine entspricht (Dougherty, M.K. und Morrison, D.K., 2004). Die in der Literatur (Dougherty, M.K. und Morrison, D.K., 2004) angegebene Sequenz einer möglichen 14-3-3 Konsensusbindestelle lautet RSXpS/T XP (Mode 1). Die Buchstaben entsprechen hierbei dem Einbuchstabencode der Aminosäuren. „X“ steht in der genannten Konsensussequenz für eine beliebige Aminosäure, und „p“ weist auf eine Phosphorylierung der nachfolgenden Aminosäure hin.

Die SLy1-Sequenz um die Phosphorylierungsstelle am Serin27 lautet RSSpS FK (Aminosäuren 24-29). Somit ergibt sich eine bis auf die letzte Aminosäure identische Aminosäureabfolge im Vergleich zu der zuvor genannten 14-3-3 Konsensusbindesequenz.

Eine mehrfach in der Literatur beschriebene Funktion von 14-3-3 Proteinen besteht darin, mit phosphorylierten Zielproteinen zu interagieren und dadurch eine im Zielprotein vorhandene NLS zu maskieren. Dies bewirkt nachfolgend ein Zurückhalten des Zielmoleküls im Zytosol (Tzivion, G. und Avruch, J., 2002; Mackintosh, C., 2004; Yoshida, K. et al., 2005).

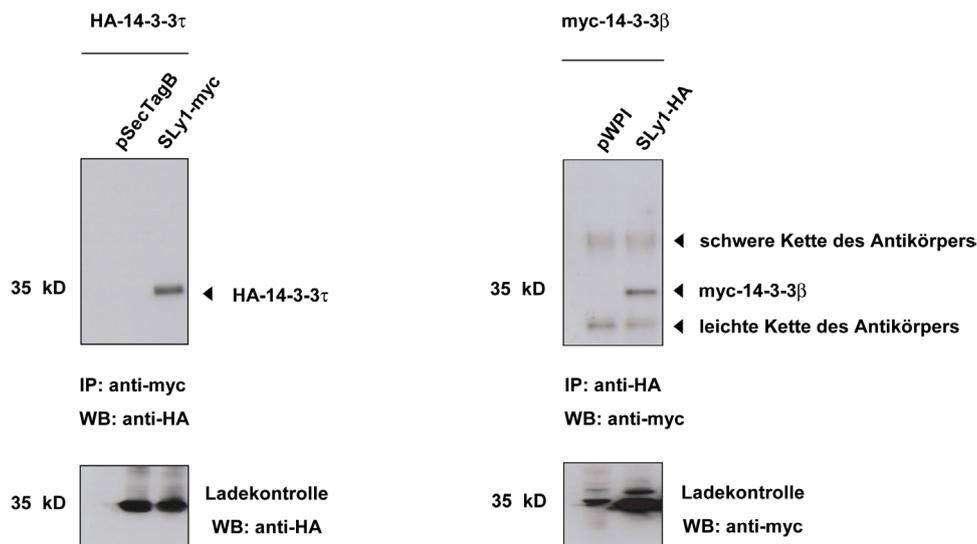
Die NLS von SLy1 befindet sich in der Nähe der putativen 14-3-3 Bindestelle. In Abb. 16 ist eine schematische Darstellung einer möglichen Interaktion von SLy1 und 14-3-3 Proteinen gezeigt. Hierbei wird ersichtlich, dass durch die Interaktion von SLy1 mit 14-3-3 Molekülen die NLS von SLy1 verdeckt wird. Mit diesem Befund könnte die ausschließliche Lokalisation des phosphorylierten SLy1-Proteins (s. Abschnitt 3.1.1) im Zytoplasma erklärt werden.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der Interaktion von phosphoryliertem SLy1 und 14-3-3 Proteinen**  
Durch die Phosphorylierung des SLy1-Proteins am Serin27 wird eine putative Bindestelle für 14-3-3 Moleküle generiert, welche sich in der Nähe des N-terminalen zweigeteilten nukleären Lokalisationssignals von SLy1 befindet (nach Reis, B., Dissertation).

Folglich sollte durch die Mutation der Phosphorylierungsstelle von einem Serin zu einem Alanin, welches nicht phosphoryliert werden kann, die Bindung von SLy1 an 14-3-3 Moleküle nicht mehr stattfinden können.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt, um eine mögliche Interaktion des wildtypischen SLy1-Proteins mit 14-3-3 Molekülen zu zeigen. Dazu wurden HEK 293T Zellen transient entweder mit einem Kontrollvektor (pSecTagB) oder einem wildtypischen SLy1-myc-Molekül und einem HA-markierten 14-3-3 $\tau$ -Konstrukt ko-transfiziert. Nach der Zelllyse wurde die Ko-Immunpräzipitation mit anti-myc-gekoppelter Sepharose durchgeführt und die Proben nachfolgend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. In einem weiteren Ansatz wurden HEK 293 T Zellen entweder mit einem Kontrollvektor (pWPI) oder einem wildtypischen SLy1-HA-Konstrukt und einem myc-markierten 14-3-3 $\beta$ -Konstrukt ko-transfiziert. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Ko-Immunpräzipitation mittels anti-HA-gekoppelter Sepharose (s. Abb. 17).



**Abbildung 17: Interaktion des SLy1-Proteins mit 14-3-3 $\tau$  und 14-3-3 $\beta$**

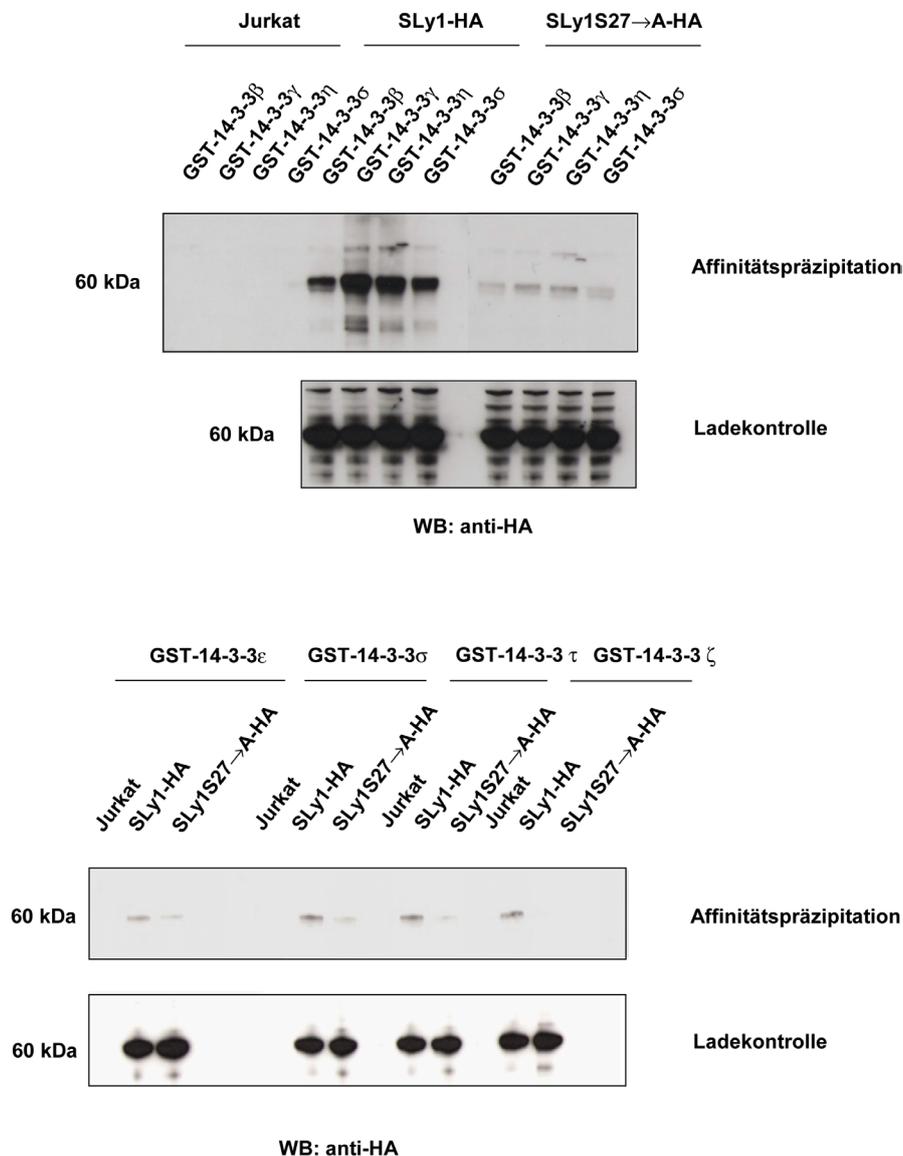
HEK 293 T Zellen wurden transient entweder mit einem Leervektor (pSecTagB) beziehungsweise mit einem wildtypischen SLy1-myc-Konstrukt und einem HA-markierten 14-3-3 $\tau$ -Konstrukt (links), oder mit einem Leervektor (pWPI) beziehungsweise mit einem wildtypischen SLy1-HA-Konstrukt und einem myc-14-3-3 $\beta$ -Konstrukt (rechts) ko-transfiziert. Eine mögliche Interaktion des SLy1-Moleküls mit 14-3-3 $\tau$  (links) oder 14-3-3 $\beta$  (rechts) wurde anschließend mittels Ko-Immünpräzipitation (links: anti-myc-gekoppelte Sepharose; rechts: anti-HA-gekoppelte Sepharose) sowie anschließender SDS-PAGE und Western Blot-Analyse detektiert. Ladekontrollen zeigen die Expression des 14-3-3 $\tau$ -Konstrukts (links) und des 14-3-3 $\beta$ -Moleküls (rechts).

Hierbei zeigt sich, dass sowohl 14-3-3 $\tau$  (links) als auch 14-3-3 $\beta$  (rechts) mit dem wildtypischen SLy1-Protein interagieren kann. In den jeweiligen Leervektorkontrollen sind erwartungsgemäß keine Interaktionsbanden detektierbar. Die beiden zusätzlichen Banden in der anti-HA-Ko-Immünpräzipitation (rechts) bei ungefähr 60 kDa und 25 kDa stammen von der schweren beziehungsweise der leichten Kette des bei der Ko-Immünpräzipitation eingesetzten Antikörpers gegen das HA-Epitop, welche durch den im Western Blot verwendeten sekundären Antikörper (anti-Maus, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert) ebenfalls detektiert werden. Die Ladekontrollen in Abb. 17 zeigen die Expression des HA-14-3-3 $\tau$  (links) und des myc-14-3-3 $\beta$ -Konstrukts (rechts).

Zudem wurden im Zuge dieser Arbeit Affinitätspräzipitationen mit GST-markierten 14-3-3 Proteinen durchgeführt, um einerseits die Ergebnisse der Ko-Immünpräzipitation zu untermauern, andererseits jedoch auch, um eine mögliche Phosphorylierungsabhängigkeit der Assoziation von SLy1 mit 14-3-3 Proteinen zu demonstrieren.

Die heterolog in Bakterien überexprimierten GST-14-3-3-Fusionskonstrukte wurden hierbei an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit Lysaten von Jurkat T Zellen inkubiert, welche entweder untransduziert waren oder ein HA-markiertes, wildtypisches SLy1-Konstrukt oder

die HA-markierte SLy1S27→A-Mutante exprimierten. Durch eine anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und eine Western Blot-Analyse der Affinitätspräzipitationsproben mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop konnte die Interaktion von SLy1 mit den getesteten 14-3-3 Proteinen sichtbar gemacht werden (s. Abb. 18).



**Abbildung 18: Phosphorylierungsabhängige Interaktion von SLy1 mit 14-3-3 $\beta$ , - $\gamma$ , - $\eta$ , - $\sigma$ , - $\epsilon$ , - $\tau$  und - $\zeta$**

Heterolog in Bakterien exprimierte GST-14-3-3-Fusionskonstrukte wurden für die Affinitätspräzipitation an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit Lysaten von Jurkat T Zellen inkubiert, die entweder untransduziert waren (Leerkontrolle), ein HA-markiertes, wildtypisches SLy1-Konstrukt oder die HA-markierte SLy1S27→A-Mutante exprimieren. Im oberen Teil der Abbildung ist die Interaktion von SLy1 mit 14-3-3 $\beta$ , - $\gamma$ , - $\eta$  und - $\sigma$  gezeigt, welche ohne eine Phosphorylierung am Serin27 (SLy1S27→A-Mutante) kaum noch detektierbar ist. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Assoziation von SLy1 mit 14-3-3 $\epsilon$ , - $\sigma$ , - $\tau$  und - $\zeta$ . Anzumerken ist, dass das Auftragsmuster hierbei etwas von dem im oberen Teil der Abbildung abweicht. Obwohl die Interaktionsbanden schwächer als bei den Proben aus dem oberen Abbildungsteil sind, lässt sich trotzdem deutlich die verminderte Bindung der SLy1S27→A-Mutante an die getesteten 14-3-3 Moleküle erkennen. In beiden Teilen der Abbildung zeigt die Ladekontrolle die Expression der SLy1-Konstrukte.

Mit Hilfe der Affinitätspräzipitation wurde die Bindung von SLy1 an alle sieben in Säugetieren vorkommenden 14-3-3 Isoformen ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\epsilon$ ,  $\tau$  und  $\zeta$ ) analysiert. Im oberen Teil der Abbildung ist die Interaktion von wildtypischem SLy1 mit GST-14-3-3 $\beta$ , - $\gamma$ , - $\eta$  und - $\sigma$  im Vergleich zur SLy1S27 $\rightarrow$ A-Mutante und einer Leerkontrolle (untransduzierte Jurkat Zellen) dargestellt. Hierbei zeigen sich bei der Leerkontrolle nach einer Detektion mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop erwartungsgemäß keine Interaktionsbanden. Das wildtypische SLy1-Protein hingegen interagiert mit den zuvor genannten 14-3-3 Isoformen. Dabei scheint SLy1 die Moleküle mit unterschiedlicher Affinität zu binden, da die Stärke der Interaktionsbanden unterschiedlich ist, die Expression des SLy1-Proteins in den verschiedenen Ansätzen jedoch identisch war (Ladekontrolle), und auch die Menge der jeweils eingesetzten GST-14-3-3 Moleküle vergleichbar war (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise vermag die SLy1S27 $\rightarrow$ A-Mutante kaum noch mit den getesteten 14-3-3 Isoformen zu interagieren. Die Ladekontrolle zeigt, dass die Expressionsstärke des wildtypischen SLy1-Proteins und der SLy1S27 $\rightarrow$ A-Mutante fast identisch waren, so dass die stark verminderte Bindung der SLy1S27 $\rightarrow$ A-Mutante an die 14-3-3 Proteine nicht mit einer geringeren Expression dieses Moleküls zu erklären ist.

Im unteren Teil der Abbildung ist die Assoziation von wildtypischem SLy1 mit GST-14-3-3 $\epsilon$ , - $\sigma$ , - $\tau$  und - $\zeta$  im Vergleich zu einer Leerkontrolle (untransduzierte Jurkat Zellen) und der SLy1S27 $\rightarrow$ A-Mutante dargestellt. Hierbei fällt auf, dass die Interaktion von SLy1 bei diesen Proben insgesamt deutlich schwächer als bei den zuvor getesteten Proben ist. Es zeigt sich allerdings ein ähnliches Ergebnis, denn das wildtypische SLy1-Protein bindet an die analysierten 14-3-3 Isoformen, wohingegen die SLy1S27 $\rightarrow$ A-Mutante eine deutlich schwächere bis kaum noch detektierbare Assoziation mit den 14-3-3 Molekülen zeigt. Im Falle der Leerkontrolle sind erwartungsgemäß keine Interaktionsbanden sichtbar. Die Ladekontrolle verdeutlicht eine ähnlich starke Expression des wildtypischen SLy1-Proteins und der SLy1S27 $\rightarrow$ A-Mutante.

Dieses Resultat bestätigt die Annahme, dass wildtypisches SLy1 14-3-3 Proteine binden kann. Hierbei wird eine Phosphorylierung von SLy1 vorausgesetzt. Die für dieses Experiment eingesetzten Jurkat Zellen waren zwar unstimuliert, allerdings konnte in vorherigen Analysen mehrfach gezeigt werden, dass SLy1 in der Zellkultur eine erhöhte basale Phosphorylierung am Serin27 aufweist (Bernhard Reis).

Die verminderte beziehungsweise kaum noch detektierbare Bindung der SLy1S27 $\rightarrow$ A-Mutante an 14-3-3 Proteine zeigt deutlich, dass die Assoziation von SLy1 mit 14-3-3 Molekülen phosphorylierungsabhängig stattfindet.

### 3.1.5 Ansätze zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner von SLy1

Die Suche nach weiteren Molekülen, welche mit SLy1 interagieren, ist für die Charakterisierung der zellulären Funktion dieses Proteins von entscheidender Bedeutung.

Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit das Hefe Zwei-Hybrid-System angewendet. Als Köderprotein wurde entweder das komplette wildtypische SLy1-Molekül, die isolierte SH3-Domäne von SLy1 oder die isolierte SAM-Domäne eingesetzt. Hefezellen wurden mit diesen Köderkonstrukten und einer murinen T Zell-cDNS-Bibliothek ko-transformiert und auf Selektionsplatten ausplattiert.

Trotz mehrmaligen Wiederholens dieser Experimente konnte kein Ergebnis mit Hilfe dieser Technik erzielt werden, denn auf den Selektionsplatten waren auch nach mehrtägiger Kultivierung bei 30°C keinerlei Hefeklone detektierbar.

Die Expression der verschiedenen Köderkonstrukte in den Hefezellen wurde überprüft und war eindeutig mittels Western Blot-Analyse zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Die cDNS-Bibliothek wurde zusätzlich für andere Analysen eingesetzt und lieferte dabei Resultate.

Aus diesem Grund kann an dieser Stelle für das Scheitern des Hefe Zwei-Hybrid-Systems bei der Suche nach SLy1-Interaktionspartnern keine plausible Erklärung gefunden werden.

### 3.2 Interaktionsanalyse des Adapterproteins SLy2

Das zweite Mitglied der SLy Proteinfamilie ist das Molekül SLy2 (HACS1, Nash1). SLy2 stellt ebenfalls ein putatives Adapterprotein mit einer zweigeteilten nukleären Lokalisationssequenz (NLS) und einer SH3- sowie einer SAM-Domäne dar. Interessanterweise zeigen SLy1 und SLy2 die höchsten Homologien innerhalb dieser Domänen. Ähnlich wie das Molekül SLy1 besitzt SLy2 ebenfalls ein potenzielles nukleäres Exportsignal (NES). Bei SLy2 befindet sich diese leucinreiche Sequenz um den Aspartatrest 272. Diese putative NES wurde mit Hilfe des Programms „NES predictor (NetNES)“ vorhergesagt (<http://www.cbs.dtu.dk/>).

Wie in Abschnitt 3.1 erwähnt, wird SLy1 in T und B Zellen am Serin27 nach Stimulation phosphoryliert. SLy2 besitzt in seiner Aminosäureabfolge einen zum Serin27 (SLy1) korrespondierenden Serinrest an Position 23 (Serin23). Inwiefern SLy2 ein ähnliches Phosphorylierungsmuster wie SLy1 aufweist, konnte bisher allerdings noch nicht abschließend geklärt werden. In primären Thymozyten konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation der Zellen mittels PDBU/Ionomycin die Gesamtphosphorylierung von SLy2 zunächst induziert wird und nachfolgend zunimmt, wohingegen in malignen Zelllinien SLy2 eine konstitutive Phosphorylierung zeigt, welche sich nach Stimulation dieser Zellen nicht verändert (v. Holleben, M., Dissertation).

Zu Beginn dieser Dissertation war kaum etwas über das SLy2-Protein bekannt. Aufgrund der Homologie zu SLy1 jedoch bestand großes Interesse, die Funktion von SLy2 zu beschreiben

und diese Ergebnisse mit den bereits bekannten Resultaten bezüglich der Funktion von SLy1 zu vergleichen.

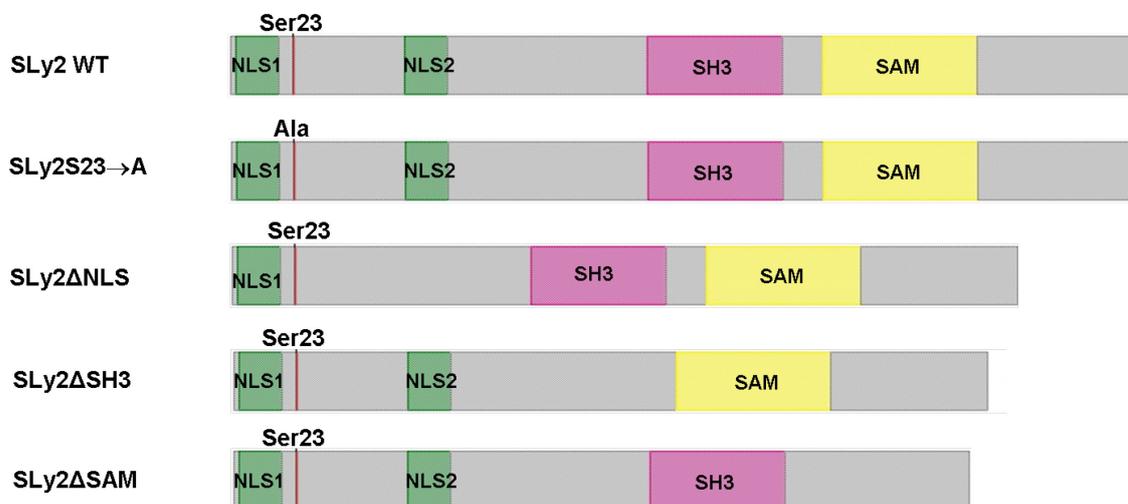
Interessanterweise konnten Claudio *et al.* zeigen, dass SLy2 in vielen Myelomen überexprimiert wird (Claudio, J.O. *et al.*, 2001). Zhu *et al.* hingegen beschreiben SLy2 im Zusammenhang mit der Differenzierung von B Zellen (Zhu, Y.X. *et al.*, 2004) und konnten in einer neueren Publikation die Funktion dieses Proteins als ein immuninhibitorisches Molekül darstellen (Wang, D. *et al.*, 2010).

Yamada *et al.* wiederum diskutieren in ihrer Publikation eine mögliche Funktion von SLy2 als ein Tumorsuppressor bei Lungenkarzinomen (Yamada, H. *et al.*, 2008).

Somit deuten einige der bisher publizierten Funktionen von SLy2 auf eine eventuelle Rolle dieses Proteins bei der Entstehung von Tumoren hin.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte analog zu der Vorgehensweise für SLy1 die funktionelle Charakterisierung von SLy2 über eine Analyse des Interaktionsverhaltens dieses Moleküls erfolgen. Dazu wurden verschiedene SLy2-Konstrukte verwendet, welche in Abb. 19 zusammengefasst sind. Neben dem wildtypischen SLy2-Konstrukt wurden einige Mutanten von SLy2 eingesetzt, bei denen charakteristische Sequenzabschnitte deletiert sind.

### SLy2-Konstrukte



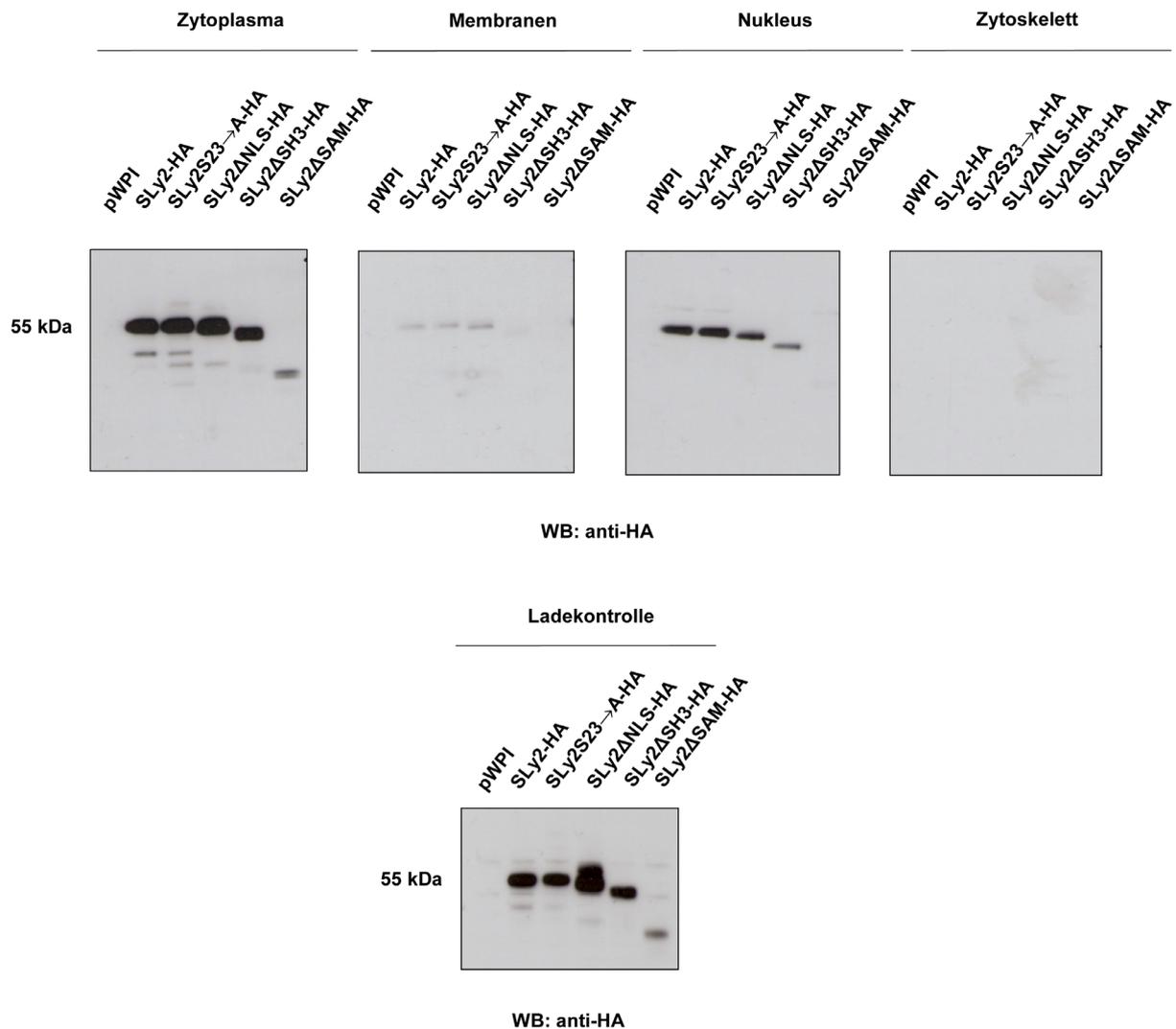
**Abbildung 19: Schematische Darstellung der Domänenstruktur verschiedener SLy2-Konstrukte**

Zuoberst ist das SLy2-Protein dargestellt, wie es in Wildtyp-Mäusen (WT) exprimiert wird. Die potenzielle Phosphorylierungsstelle am Serin 23 ist markiert. Darunter wird eine Version des SLy2-Moleküls gezeigt, bei der diese potenzielle Serin-Phosphorylierungsstelle zu einem Alanin mutiert wurde, an dem keine Phosphorylierung mehr stattfinden kann. In der SLy2-Mutante SLy2ΔNLS hingegen ist die putative Phosphorylierungsstelle am Serin23 noch vorhanden, allerdings fehlt der zweite Teil der NLS. In der SLy2ΔSH3-Mutante ist die SH3-Domäne deletiert, und in der SLy2ΔSAM-Mutante fehlt die SAM-Domäne.

### 3.2.1 Subzelluläre Lokalisation des SLy2-Proteins

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde zunächst analog zu SLy1 die subzelluläre Lokalisation sämtlicher SLy2-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein analysiert, um Aufschlüsse darüber zu erhalten, ob die Deletion charakteristischer Abschnitte oder Domänen des SLy2-Moleküls Veränderungen in der Lokalisation hervorruft. Aus vorhergehenden Experimenten war bereits bekannt, dass das wildtypische SLy2-Protein vergleichbar mit SLy1 sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert ist und die SLy2 $\Delta$ NLS-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp-SLy2-Molekül deutlich verringerte nukleäre Lokalisation zeigt (v. Holleben, M., Dissertation).

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation der verschiedenen SLy2-Proteine wurden Jurkat T Zellen über ein lentivirales System mit den in Abb. 19 aufgeführten SLy2-Konstrukten und einem Kontrollvektor (pWPI) stabil transduziert. Hierbei waren diese Konstrukte jeweils mit einer HA-Markierung versehen, so dass eine Detektion der Proteine über eine Western Blot-Analyse mit Hilfe eines Antikörpers gegen das HA-Epitop möglich war. Anschließend wurde eine subzelluläre Fraktionierung der verschiedenen Jurkat Zelllinien mit Hilfe des „ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kits“ (Calbiochem-Merck) analog zu SLy1 (s. 3.1.1). durchgeführt.



### Abbildung 20: Subzelluläre Lokalisation der verschiedenen SLy2-Konstrukte

Stabil transduzierte Jurkat T Zellen, welche neben einem Kontrollvektor (pWPI) die verschiedenen HA-markierten SLy2-Konstrukte exprimieren, wurden mit Hilfe des „ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kits“ fraktioniert. Die dabei erhaltene zytosolische Fraktion wurde neben einer Membran-, der Nukleus- und der Zytoskelettfraktion auf die Detektierbarkeit der verschiedenen SLy2-Proteine hin analysiert. Die ebenfalls aufgeführte Ladekontrolle zeigt die Expression der unterschiedlichen SLy2-Konstrukte in den Jurkat Zellen.

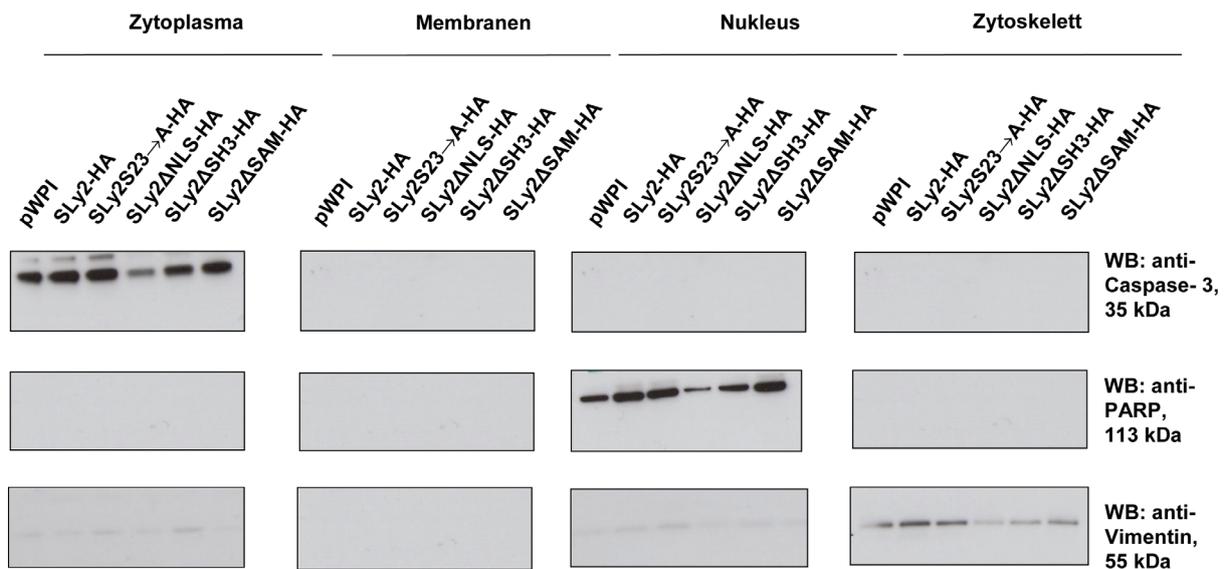
Wie Abb. 20 verdeutlicht, sind alle analysierten SLy2-Konstrukte in der zytosolischen Fraktion zu finden. In der Membranfraktion hingegen sind relativ schwach das wildtypische SLy2-Molekül, die SLy2S23→A-Mutante und das SLy2ΔNLS-Konstrukt zu identifizieren. Die SLy2ΔSH3- sowie die SLy2ΔSAM-Mutante sind in dieser Fraktion nicht sichtbar. In diesem Zusammenhang muss allerdings erwähnt werden, dass die Expression der SLy2ΔSAM-Mutante generell sehr schwach und die Masse des exprimierten Deletionskonstrukts trotz korrekter Sequenz viel geringer als erwartet war. Dies zeigt sich auch in der Ladekontrolle in Abb. 20.

Die Analyse der Kernfraktion ergibt, dass alle SLy2-Moleküle in dieser Fraktion zu detektieren sind, wobei die SLy2 $\Delta$ NLS-Mutante erwartungsgemäß deutlich schwächer als im Zytoplasma in dieser Fraktion vorkommt. Das SLy2 $\Delta$ SH3-Konstrukt lokalisiert ebenfalls ziemlich schwach, aber sichtbar, in der Kernfraktion, wohingegen die SLy2 $\Delta$ SAM-Mutante in dieser Fraktion nicht detektierbar ist. In der Zytoskelettfraktion ist keines der analysierten SLy2-Moleküle nachweisbar.

Die Ladekontrolle zeigt die Expression der verschiedenen SLy2-Proteine in den jeweiligen Zelllinien. Hierbei wird deutlich, dass die Expression der Konstrukte - mit Ausnahme der SLy2 $\Delta$ SAM-Mutante - untereinander relativ gut vergleichbar ist. Somit kann diese subzelluläre Fraktionierung nicht nur qualitativ, sondern auch annähernd quantitativ ausgewertet werden.

In Abb. 21 werden die der subzellulären Fraktionierung entsprechenden Kontrollen gezeigt. Analog zu SLy1 wurde die Reinheit der verschiedenen Fraktionen mit Antikörpern gegen Caspase-3 (zytosolischer Marker), Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP, Kernmarker) und Vimentin (Zytoskelettmarker) inkubiert.

Wie Abb. 21 verdeutlicht, ist Caspase-3 erwartungsgemäß nur in der zytosolischen und PARP nur in der nukleären Fraktion detektierbar. Vimentin stellt ein Intermediärfilament des Zytoskeletts dar und liefert in der Western Blot-Analyse in der zytosolischen sowie der nukleären Fraktion einen leichten Hintergrund. Allerdings ist eine deutliche Anreicherung dieses Moleküls in der Zytoskelettfraktion detektierbar.



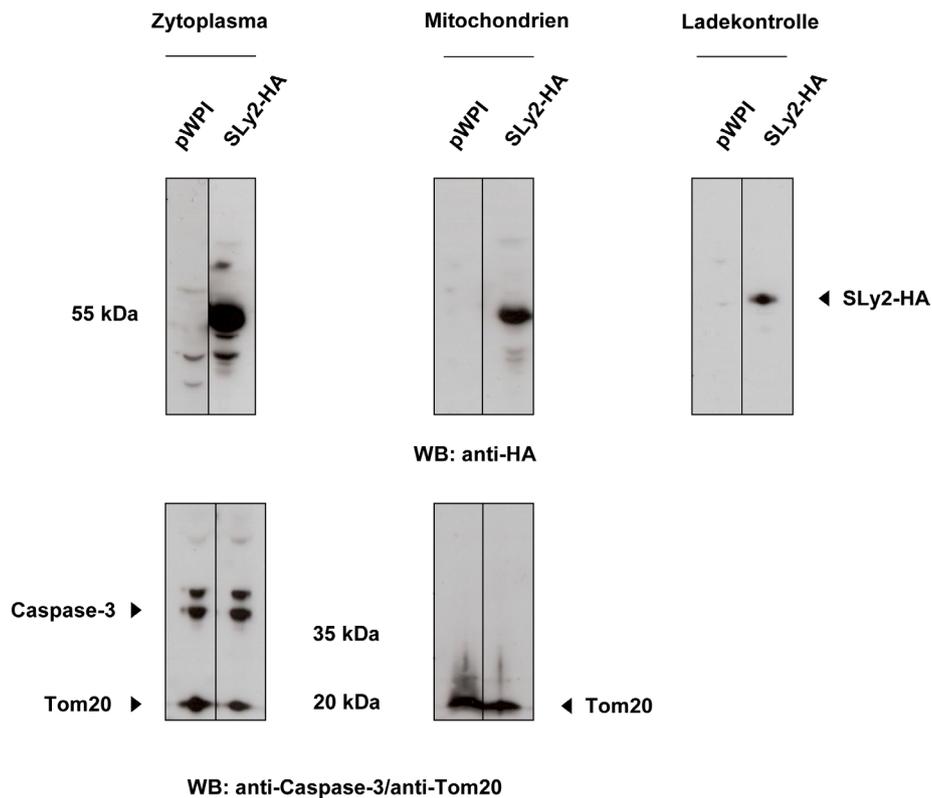
### Abbildung 21: Kontrollen zur Überprüfung der Reinheit der subzellulären Fraktionen

Für die Überprüfung der Reinheit der im Zuge der SLy2-Fraktionierung erhaltenen Fraktionen wurden sämtliche Proben mit Hilfe einer Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen spezifische Markerproteine inkubiert. Caspase-3 stellt ein zytosolisches, Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ein nukleäres und Vimentin ein Markermolekül für das Zytoskelett dar.

Analog zu der Lokalisationsanalyse für SLy1 wurde für SLy2 ebenfalls eine zusätzliche Fraktionierung in eine zytosolische und eine mitochondriale Fraktion mit Hilfe des „ProteoExtract® Cytosol/Mitochondria Fractionation Kits“ (Calbiochem-Merck) vorgenommen, um das Lokalisationsverhalten beider Moleküle vergleichen zu können.

Dazu wurden Jurkat Zellen, die einen Kontrollvektor (pWPI) exprimieren, mit Zellen verglichen, welche das wildtypische SLy2-Protein mit einer HA-Markierung generieren.

Wie Abb. 22 zeigt, ergab diese Fraktionierung, dass das wildtypische SLy2-Molekül erwartungsgemäß im Zytoplasma, aber auch in der mitochondrialen Fraktion nachweisbar ist. Eine Ladekontrolle zeigt die Expression des SLy2-Proteins in den Jurkat Zellen. Zur Überprüfung der Reinheit der beiden Fraktionen wurden als Markermoleküle Caspase-3 (zytosolischer Marker) und Tom20 (mitochondrialer Marker) verwendet. Hierbei fällt auf, dass Tom20 nicht nur in der mitochondrialen, sondern auch in der zytosolischen Fraktion detektierbar ist, was auf eine Verunreinigung der zytoplasmatischen Fraktion mit Mitochondrien hindeutet. Entscheidend ist allerdings, dass bei der Mitochondrienfraktion keine Verunreinigung mit zytosolischen Bestandteilen nachweisbar ist, denn in dieser Fraktion ist nur eine Tom20-Bande und keine zusätzliche Caspase-3-Bande detektierbar.



**Abbildung 22: Zytosolische und mitochondriale Fraktionierung von SLy2**

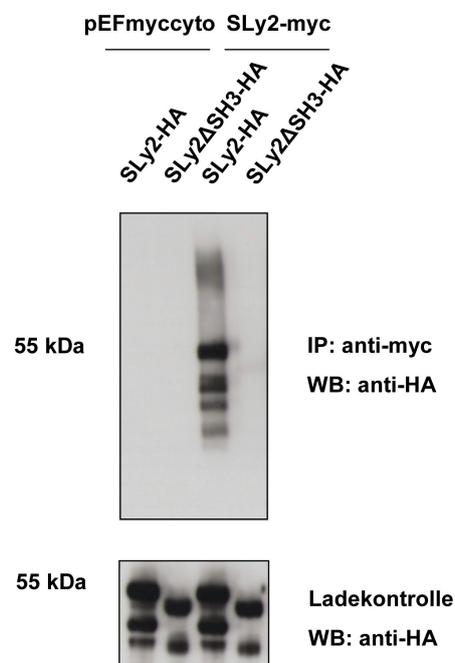
Dargestellt ist die zytosolische und mitochondriale Fraktionierung („ProteoExtract® Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit“) von stabil transduzierten Jurkat Zellen, die entweder einen Kontrollvektor (pWPI) oder das wildtypische SLy2-Protein mit HA-Markierung exprimieren. Eine Ladekontrolle zeigt die Expression des SLy2-Moleküls. Zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen Fraktionen wurden in der Western Blot-Analyse die Antikörper gegen Caspase-3 (zytosolisches Protein) und Tom20 (mitochondriales Protein) verwendet. Die Linien in der Mitte der Western Blots zeigen an, dass die dargestellten Ergebnisse zwar auf ein und demselben SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen wurden, allerdings der Kontrollvektor und das wildtypische SLy2-Konstrukt nicht direkt nebeneinander platziert worden sind. Aus diesem Grund mussten die Blots auseinander geschnitten und wieder zusammengefügt werden.

### 3.2.2 Homodimerisierung des SLy2-Proteins

Für die funktionelle Charakterisierung von SLy2 sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit das Interaktionsverhalten dieses putativen Adapterproteins analysiert werden.

Wie Abb. 19 zu entnehmen ist, besitzt das SLy2-Protein neben einer SH3- auch eine SAM-Domäne, so dass dieses Molekül sowohl mit anderen Proteinen als auch mit sich selbst interagieren könnte. Aus diesem Grund sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit analog zu SLy1 eine mögliche Homodimerisierung des wildtypischen SLy2-Proteins und die eventuelle Identifizierung der zu einer Homodimerisierung führenden SH3-Domäne von SLy2 erfolgen, da aus den Experimenten zu SLy1 bereits bekannt war, dass dieses Molekül über seine SH3-Domäne homodimerisiert (s. Abb. 13).

Dazu wurden entweder ein Kontrollvektor (pEFmyccyto) oder ein myc-markiertes wildtypisches SLy2-Konstrukt (SLy2-myc) zusammen mit einem HA-markierten wildtypischen SLy2-Konstrukt (SLy2-HA) oder mit der HA-markierten SLy2 $\Delta$ SH3-Mutante transient in HEK 293T Zellen ko-transfiziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Lysate als Ausgangsmaterial für eine Ko-Immunpräzipitation eingesetzt. Die Ko-Immunpräzipitation wurde mit anti-myc-gekoppelter Sepharose durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot (Abb. 23). Neben der Ko-Immunpräzipitation ist auch eine Ladekontrolle aufgeführt, welche die Expression der HA-markierten SLy2-Konstrukte in den transfizierten HEK 293T Zellen zeigt. Das wildtypische SLy2-Molekül liefert dabei die größere Bande, die SLy2 $\Delta$ SH3-Mutante hingegen ist aufgrund der Deletion der SH3-Domäne etwas kleiner.



### Abbildung 23: Homodimerisierung des SLy2-Proteins

HEK 293 T Zellen wurden entweder mit einem Kontrollvektor (pEFmyccyto, links) oder einem wildtypischen SLy2-myc-Konstrukt (rechts) und einem HA-markierten wildtypischen SLy2-Konstrukt beziehungsweise einer HA-markierten SLy2 $\Delta$ SH3-Mutante transient ko-transfiziert. Eine mögliche Homodimerisierung der jeweiligen Proteine wurde mittels Ko-Immunpräzipitation (anti-myc-gekoppelte Sepharose) sowie anschließender SDS-PAGE und Western Blot-Analyse detektiert. Eine Ladekontrolle zeigt die Expression der beiden HA-markierten SLy2-Konstrukte, wobei das wildtypische SLy2-Protein die größere Proteinbande liefert. Die Banden unterhalb der eigentlichen SLy2-Banden stellen Abbauprodukte der SLy2-Moleküle dar.

Bei der Ko-Transfektion der beiden HA-markierten SLy2-Konstrukte mit dem Kontrollvektor sind erwartungsgemäß keine Proteinbanden im Western Blot detektierbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass die HA-markierten SLy2-Proteine nicht unspezifisch an das myc-Epitop und/oder

die Sepharose binden. Bei der Ko-Transfektion der HA-markierten SLy2-Moleküle mit dem SLy2-myc-Konstrukt hingegen zeigt sich im Western Blot lediglich im Falle der Ko-Transfektion mit dem wildtypischen SLy2-HA-Konstrukt eine eindeutige Proteinbande, welche auf eine Homodimerisierung des SLy2-Proteins hindeutet. Im Falle der Ko-Transfektion des wildtypischen SLy2-Proteins mit der SLy2 $\Delta$ SH3-Mutante jedoch findet, ebenso wie bei SLy1, keine Homodimerisierung mehr statt. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis darauf, dass auch die SH3-Domäne von SLy2 für die Homodimerisierung dieses Proteins verantwortlich ist.

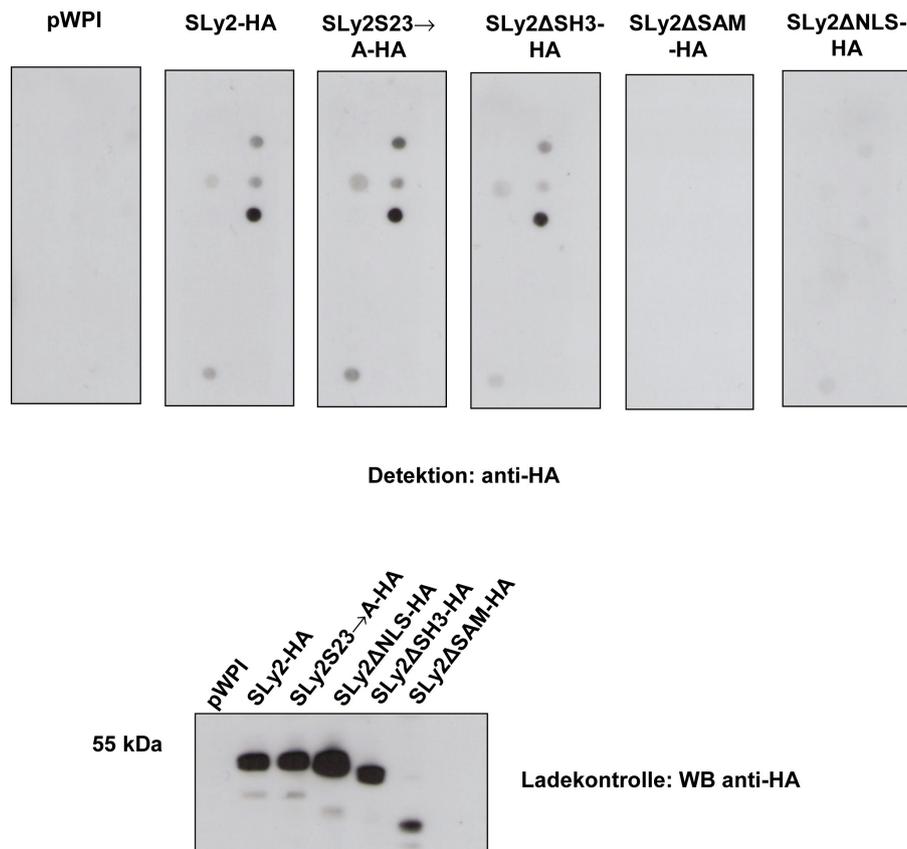
Die zusätzlich detektierbaren Banden in Abb. 23 stellen Abbauprodukte der SLy2-Konstrukte dar.

### 3.2.3 Interaktion von SLy2 mit Lipiden

Ebenso wie SLy1 besitzt SLy2 zwar keine typischen Protein-Lipid-Interaktionsdomänen, allerdings weist auch die zweigeteilte NLS von SLy2 einen hohen Anteil an positiv geladenen Lysin- und Argininresten auf.

Aus diesem Grund sollte im Zuge dieser Arbeit analog zu SLy1 eine mögliche Interaktion von SLy2 mit Lipiden analysiert werden. Dazu wurden – wie bereits in Abschnitt 3.1.3 beschrieben - Lipidbindeexperimente mit sogenannten „Membrane Lipid Strips™“, „PIP Strips™“ und „PIP Arrays™“ und Lysaten von stabil transduzierten Jurkat T Zellen durchgeführt. Hierbei wurden Jurkat Zellen verwendet, die neben dem wildtypischen, HA-markierten SLy2-Protein entweder einen Kontrollvektor (pWPI) oder verschiedene HA-markierte Deletionsmutanten von SLy2 exprimieren.

In Abb. 24 ist das Resultat des Lipidbindexperiments für die verschiedenen SLy2-Moleküle mit den „Membrane Lipid Strips™“ dargestellt, auf denen typische Membranlipide zu finden sind.



**Abbildung 24: Interaktion von SLy2 mit Lipiden**

„Membrane Lipid Strips™“ wurden mit Lysaten von Jurkat T Zellen inkubiert, welche unterschiedliche, HA-markierte SLy2-Konstrukte oder einen Kontrollvektor (pWPI) stabil exprimieren. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines hypotonischen Puffers ohne Detergenzien und durch mechanisches Aufschließen der Zellen. Eine Bindung der SLy2-Moleküle an die auf die Strips aufgetragenen Lipide wurde über eine Detektion mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop sichtbar gemacht. Eine Ladekontrolle zeigt die Expressionsstärke der verschiedenen SLy2-Konstrukte.

Hierbei zeigt sich nach der Detektion mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop ein ähnliches Ergebnis wie bei SLy1. Im Falle der Leervektorkontrolle (pWPI) ist erwartungsgemäß keine Bindung an die vorhandenen Lipide zu detektieren, allerdings ist auch bei der SLy2ΔSAM-Mutante keine Lipidassoziation sichtbar. Dieser Befund lässt sich allerdings mit der nur sehr geringen Expression dieser Mutante erklären (siehe Ladekontrolle). Zudem ist unklar, ob diese Mutante überhaupt funktionsfähig ist, da – wie bereits in Abschnitt 3.2.1 beschrieben – die Masse dieses Moleküls deutlich von der zu erwartenden abweicht.

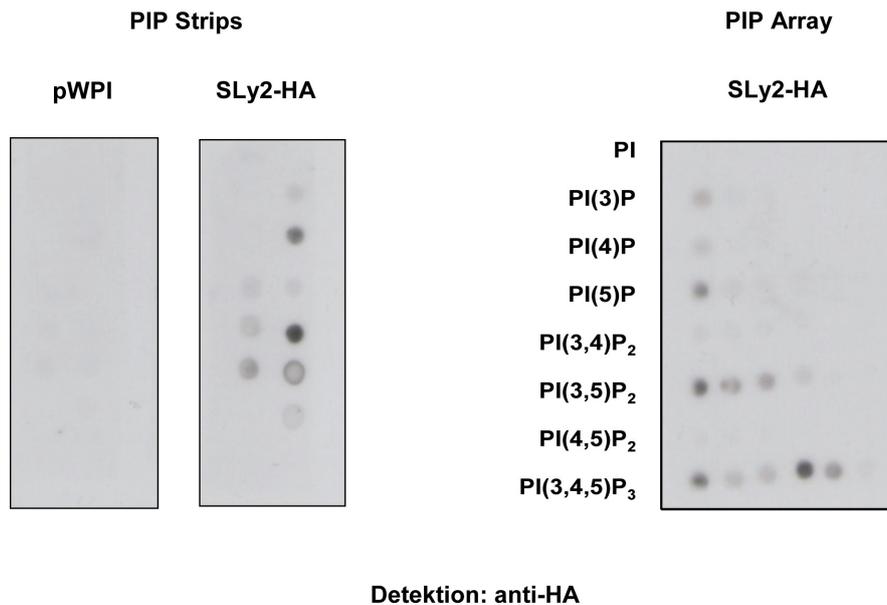
Das wildtypische SLy2-Molekül sowie die SLy2S23→A- und die SLy2ΔSH3-Mutante hingegen zeigen eine Bindung an die negativ geladenen Lipide Phosphatidylinositol-4-phosphat PI(4)P, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat PI(4,5)P<sub>2</sub>, Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>), Phosphatidat (Diacylglycerin-3-phosphat) und Cardiolipin (Diphosphatidylglycerin). Cardiolipin stellt ein typisches Lipid der Mitochondrienmembran dar, wohingegen die

anderen Moleküle in der Plasmamembran zu finden sind. PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> sind zudem auch im Zellkern lokalisiert (Gozani, O. et al., 2005). Die Assoziation von SLy2 mit Cardiolipin könnte – ebenso wie bei SLy1 - die Anwesenheit von SLy2 in der mitochondrialen Fraktion (s. Abb. 22) erklären. Durch die Interaktion von SLy2 mit sämtlichen anderen Lipiden hingegen könnte die Lokalisation von SLy2 in der Membranfraktion (s. Abb. 20) erklärt werden. Da jedoch einige der Phosphoinositide, mit denen SLy2 interagiert, auch im Nukleus detektierbar sind, besteht auch die Möglichkeit, dass SLy2 mit diesen Lipiden im Zellkern assoziiert. Interessanterweise vermag die SLy2ΔNLS-Mutante – genauso wie die SLy1ΔNLS-Mutante - nicht mehr mit den zuvor genannten Lipiden zu interagieren. In beiden Molekülen fehlt der zweite Teil der zweigeteilten NLS. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch SLy2 über die polybasische Region in der NLS, welche eine relativ große Anzahl positiv geladener Lysine und Arginine enthält, mit negativ geladenen Lipiden interagiert. Zudem zeigt dieses Resultat, dass bereits die Deletion des zweiten Teils der NLS von SLy2 ausreicht, die Bindung an die verschiedenen Lipide zu unterbinden.

Eine Ladekontrolle zeigt in Abb. 24 die Expression der verschiedenen SLy2-Konstrukte. Hierbei zeigt sich, dass die Expressionsstärken der verschiedenen SLy2-Proteine in den jeweiligen Zelllinien einigermaßen vergleichbar sind. Lediglich die SLy2ΔSAM-Mutante weist das bereits zuvor beschriebene, nicht erklärbare Expressionsverhalten auf.

Analog zu den SLy1-Experimenten wurden nachfolgend ebenfalls Lipidbindeexperimente für SLy2 mit den sogenannten „PIP Strips™“ und „PIP Arrays™“ durchgeführt.

Bei diesen Experimenten wurden – wie bei SLy1 - lediglich das wildtypische SLy2-Protein und eine Leervektorkontrolle (pWPI) analysiert (s. Abb. 25).



**Abbildung 25: Interaktion von SLy2 mit Lipiden**

„PIP Strips™“ (links) und ein „PIP Array™“ (rechts) wurden mit Lysaten von Jurkat T Zellen inkubiert, welche entweder ein HA-markiertes, wildtypisches SLy2-Konstrukt oder einen Kontrollvektor (pWPI) stabil exprimieren. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines hypotonischen Puffers ohne Detergenzien und durch mechanisches Aufschließen der Zellen. Mit Hilfe des „PIP Arrays™“ kann die relative Stärke der Interaktion von SLy2 mit den verschiedenen Phosphoinositiden abgeschätzt werden. Eine Bindung der SLy2-Moleküle an die auf die Strips aufgetragenen Lipide wurde über eine Detektion mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop sichtbar gemacht.

Die Leervektorkontrolle (pWPI) ergibt keine Bindung an die vorhandenen Lipide. Das wildtypische SLy2-Konstrukt assoziiert sowohl mit den Monophosphoinositiden PI(3)P, PI(4)P und PI(5)P und den Diphosphoinositiden PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub> und PI(4,5)P<sub>2</sub>, sowie mit dem Triphosphoinositid PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Die Bindung von SLy2 an PI(3,4)P<sub>2</sub> und PI(4,5)P<sub>2</sub> ist allerdings nur sehr schwach detektierbar. Die Interaktion von SLy2 mit PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> konnte zuvor auch schon mit Hilfe der „Membrane Lipid Strips™“ identifiziert werden (s. Abb. 24). Ebenso wurde die Bindung von SLy2 an Phosphatidat sowohl mit Hilfe des „Membrane Lipid Strips™“ als auch mit Hilfe des „PIP Strips™“ detektiert (s. Abb. 24 und 25).

Wie bereits erwähnt, scheint SLy2 mit den verschiedenen Phosphoinositiden unterschiedlich stark zu assoziieren. Das Ergebnis des „PIP Arrays™“ zeigt, dass SLy2 die drei Monophosphoinositide ähnlich stark binden kann (s. Abb. 25). Es ergibt sich allerdings eine leichte Präferenz für PI(5)P.

Bei den drei Diphosphoinositiden jedoch sind klare Unterschiede erkennbar. Am stärksten vermag SLy2 – vergleichbar mit SLy1 - an PI(3,5)P<sub>2</sub> zu binden. Die Interaktion mit PI(3,4)P<sub>2</sub> und PI(4,5)P<sub>2</sub> hingegen ist nur sehr schwach zu erkennen. Die Bindung von SLy2 an PI(3,4,5)P<sub>3</sub> ist deutlich detektierbar.

Das Resultat des „PIP Arrays™“ verdeutlicht zudem, dass die Assoziation von SLy2 mit den verschiedenen Phosphoinositiden bei abnehmender Lipidmenge ebenfalls weniger stark detektierbar ist (s. Abb. 25). Somit ist die Stärke der Interaktion von SLy2 mit diesen Molekülen von der vorhandenen Menge der Lipide abhängig. Lediglich in der Titrationsreihe von PI(3,4,5)P<sub>3</sub> ist die abnehmende Bindung von SLy2 an dieses Lipid mit sinkender Lipidmenge nicht ganz so deutlich zu erkennen.

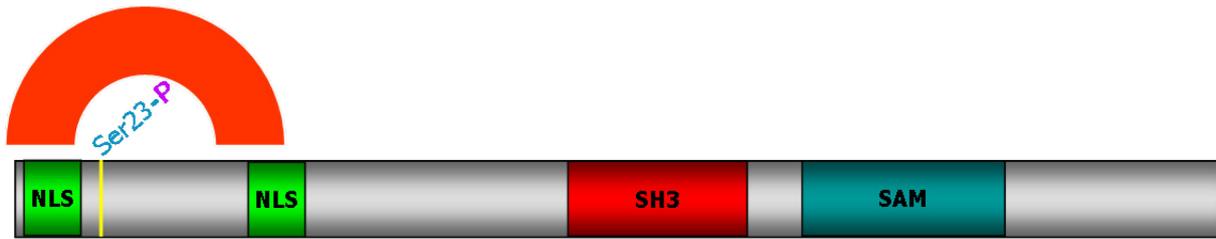
### 3.2.4 Interaktion von SLy2 mit 14-3-3 Proteinen

Aufgrund des Vorhandenseins einer putativen 14-3-3 Konsensusbindesequenz um das Serin27 in der Aminosäureabfolge von SLy1, wurde auch bei SLy2 um das Serin23 herum nach einer solchen Bindesequenz gesucht. Wie bereits zuvor beschrieben handelt es sich bei dem Serin23 von SLy2 um eine zum Serin27 (SLy1) homologe potenzielle Phosphorylierungsstelle. Zudem konnte für SLy1 die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen bestätigt und ihre Abhängigkeit von einer Phosphorylierung am Serin27 gezeigt werden.

Die in der Literatur (Dougherty, M.K. und Morrison, D.K., 2004) angegebene Sequenz einer möglichen 14-3-3 Konsensusbindestelle lautet RSXpS/T XP (Mode 1). Die SLy2-Sequenz um die putative Phosphorylierungsstelle am Serin23 besitzt die Sequenz RSSpS FG (Aminosäuren 20-25). Somit ergibt sich – genauso wie bei SLy1 - eine bis auf die letzte Aminosäure identische Aminosäureabfolge im Vergleich zu der zuvor genannten 14-3-3 Konsensusbindesequenz.

Wie bereits in Abschnitt 3.1.4 erwähnt interagieren 14-3-3 Proteine mit phosphorylierten Zielproteinen und können dadurch eine im Zielprotein vorhandene NLS maskieren. Dies bewirkt nachfolgend ein Zurückhalten des Zielmoleküls im Zytosol (Tzivion, G. und Avruch, J., 2002; Mackintosh, C., 2004; Yoshida, K. et al., 2005).

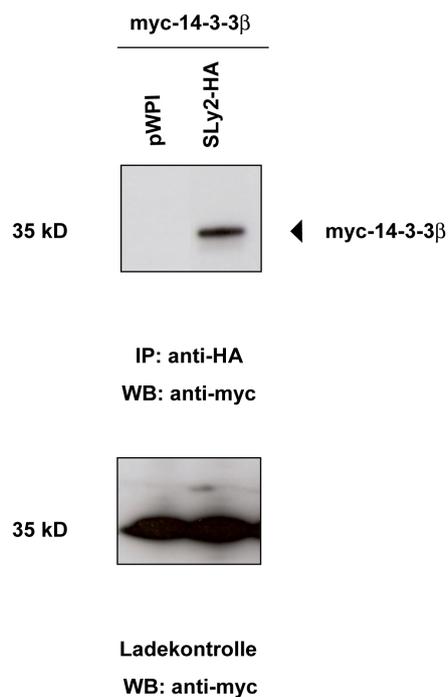
Ebenso wie bei SLy1 befindet sich die NLS von SLy2 in der Nähe der putativen 14-3-3 Bindestelle. In Abb. 26 ist eine schematische Darstellung einer möglichen Interaktion von SLy2 und 14-3-3 Proteinen dargestellt. Hierbei wird ersichtlich, dass eine Interaktion von SLy2 mit 14-3-3 Molekülen die NLS von SLy2 verdecken würde.



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der Interaktion von phosphoryliertem SLy2 und 14-3-3 Proteinen**

Durch eine potenzielle Phosphorylierung des SLy2-Proteins am Serin23 wird eine putative Bindestelle für 14-3-3 Moleküle generiert, welche sich in der Nähe des N-terminalen zweigeteilten nukleären Lokalisationssignals von SLy2 befindet.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt, um eine mögliche Interaktion des wildtypischen SLy2-Proteins an 14-3-3 Moleküle zu zeigen. Dazu wurden HEK 293T Zellen transient entweder mit einem Kontrollvektor (pWPI) oder einem wildtypischen SLy2-HA-Molekül und einem myc-markierten 14-3-3 $\beta$ -Konstrukt kotransfiziert. Das myc-14-3-3 $\beta$ -Konstrukt wurde dabei exemplarisch als eine der sieben Isoformen der 14-3-3 Proteine eingesetzt. Nach der Zellyse wurde die Ko-Immunpräzipitation mit anti-HA-gekoppelter Sepharose durchgeführt und die Proben nachfolgend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. In Abb. 27 ist das Ergebnis des Experiments dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass 14-3-3 $\beta$  mit dem wildtypischen SLy2-Protein interagieren kann. In der Leervektorkontrolle ist erwartungsgemäß keine Interaktionsbande detektierbar. Die Ladekontrolle in Abb. 27 zeigt die Expression des myc-14-3-3 $\beta$ -Konstrukts.



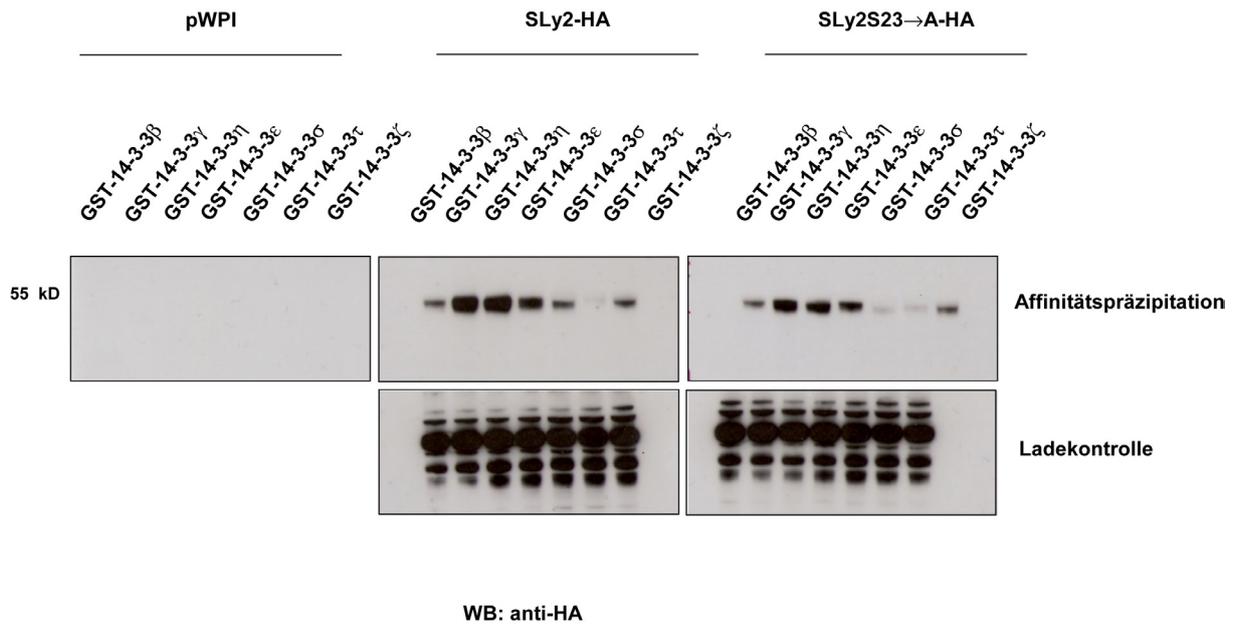
#### Abbildung 27: Interaktion des SLy2-Proteins mit 14-3-3 $\beta$

HEK 293 T Zellen wurden transient entweder mit einem Leervektor (pWPI) oder mit einem wildtypischen SLy2-HA-Konstrukt und einem myc-14-3-3 $\beta$ -Konstrukt ko-transfiziert. Eine mögliche Interaktion des SLy2-Moleküls mit 14-3-3 $\beta$  wurde anschließend mittels Ko-Immünpräzipitation (anti-HA-gekoppelte Sepharose) sowie anschließender SDS-PAGE und Western Blot-Analyse detektiert. Die Ladekontrolle zeigt die Expression des 14-3-3 $\beta$ -Moleküls.

Zudem wurden im Zuge dieser Arbeit analog zu SLy1 Affinitätspräzipitationen mit GST-markierten 14-3-3 Proteinen durchgeführt, um einerseits das Resultat der Ko-Immünpräzipitation zu untermauern, andererseits jedoch auch, um eine mögliche Interaktion von SLy2 mit weiteren Isoformen der 14-3-3 Proteine zu analysieren. Zusätzlich sollte eine mögliche Phosphorylierungsabhängigkeit der Assoziation von SLy2 mit 14-3-3 Proteinen untersucht werden. Dies konnte für SLy1 zuvor gezeigt werden (s. Abschnitt 3.1.4).

Die heterolog in Bakterien exprimierten GST-14-3-3-Fusionskonstrukte wurden hierbei an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit Lysaten von Jurkat T Zellen inkubiert, welche entweder mit einem Leervektor (pWPI) transduziert worden waren oder ein HA-markiertes, wildtypisches SLy2-Konstrukt oder die HA-markierte SLy2S23 $\rightarrow$ A-Mutante exprimieren. Durch eine anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und eine Western Blot-Analyse der Affinitätspräzipitationsproben mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop konnte die Interaktion von SLy2 mit den getesteten 14-3-3 Proteinen sichtbar gemacht werden.

In Abb. 28 ist das Ergebnis der Affinitätspräzipitation dargestellt. Es wurde in diesem Experiment die Bindung von SLy2 an alle sieben in Säugetieren vorkommenden 14-3-3 Isoformen ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\epsilon$ ,  $\tau$  und  $\zeta$ ) analysiert.



**Abbildung 28: Interaktion von SLy2 und SLy2S23→A mit 14-3-3 $\beta$ , - $\gamma$ , - $\eta$ , - $\epsilon$ , - $\sigma$ , - $\tau$  und - $\zeta$**

Heterolog in Bakterien exprimierte GST-14-3-3-Fusionskonstrukte wurden für die Affinitätspräzipitation an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit Lysaten von Jurkat T Zellen inkubiert, die entweder mit einem Leervektor (pWPI) transduziert worden waren, oder ein HA-markiertes, wildtypisches SLy2-Konstrukt beziehungsweise die HA-markierte SLy2S23→A-Mutante exprimieren. Gezeigt wird die Interaktion von SLy2 mit 14-3-3 $\beta$ , - $\gamma$ , - $\eta$ , - $\epsilon$ , - $\sigma$ , - $\tau$  und - $\zeta$ , welche auch ohne eine Phosphorylierung am Serin23 (SLy2S23→A-Mutante) noch detektierbar ist. Die Ladekontrolle demonstriert die vergleichbare Expression der beiden SLy2-Konstrukte.

Bei der Leerkontrolle zeigen sich erwartungsgemäß nach einer Detektion mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop keine Interaktionsbanden. Das wildtypische SLy2-Protein hingegen interagiert mit den zuvor genannten 14-3-3 Isoformen. Dabei scheint SLy2 – ebenso wie SLy1 – die Moleküle mit unterschiedlicher Affinität zu binden, da die Stärke der Interaktionsbanden unterschiedlich ist, die Expression des SLy2-Proteins in den verschiedenen Ansätzen jedoch identisch war (Ladekontrolle), und auch die Menge der jeweils eingesetzten GST-14-3-3 Moleküle vergleichbar war (Daten nicht gezeigt). Insbesondere die Isoformen 14-3-3 $\sigma$  und 14-3-3 $\tau$  scheinen sehr schlecht bis gar nicht an SLy2 binden zu können, da in beiden Fällen nur eine sehr schwache Interaktionsbande zu detektieren ist.

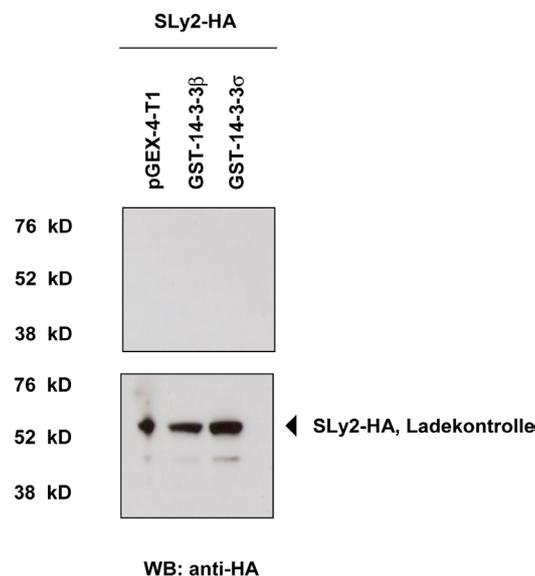
Im Gegensatz zu der SLy1S27→A-Mutante vermag das SLy2S23→A-Konstrukt ebenfalls mit den getesteten 14-3-3 Isoformen zu interagieren. Die Ladekontrolle zeigt, dass die Expressionsstärke des wildtypischen SLy2-Proteins und der SLy2S23→A-Mutante fast identisch waren, so dass die deutliche Bindung der SLy2S23→A-Mutante an die 14-3-3 Proteine nicht mit einer erhöhten Expression dieses Moleküls zu erklären ist. Im Vergleich zum wildtypischen SLy2-Protein ist die Assoziation der SLy2S23→A-Mutante mit den 14-3-3 Isoformen jedoch

geringfügig vermindert. Insbesondere bei 14-3-3 $\sigma$  zeigt sich eine deutlich geringere Interaktion der SLy2S23 $\rightarrow$ A-Mutante mit diesem Molekül.

Dieses Resultat bestätigt die Annahme, dass wildtypisches SLy2 14-3-3 Proteine binden kann. Die Phosphorylierung am Serin23 scheint bei dieser Bindung eine Rolle zu spielen, ist für sie eventuell jedoch nicht unbedingt entscheidend. Hierbei zeigt sich ein Unterschied zu der Assoziation von SLy1 mit 14-3-3 Proteinen.

Vergleichbar zwischen SLy1 und SLy2 ist jedoch, dass beide Moleküle am stärksten mit 14-3-3 $\gamma$  und 14-3-3 $\eta$  interagieren.

Da mit Hilfe der SLy2S23 $\rightarrow$ A-Mutante eine Phosphorylierungsabhängigkeit der Bindung von SLy2 an 14-3-3 Proteine nicht nachweisbar ist, wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit ein weiteres Experiment durchgeführt, um diesen Aspekt näher zu beleuchten. Dazu wurden Affinitätspräzipitationen exemplarisch mit zwei 14-3-3 Isoformen – 14-3-3 $\beta$  und 14-3-3 $\sigma$  - und einer GST-Kontrolle (pGEX-4-T1, GST-Leervektor) analog zu den vorherigen Versuchen durchgeführt. Die Zellysate, mit denen die 14-3-3 Moleküle inkubiert wurden, wurden allerdings vorher mit Hilfe einer Phosphatase unspezifisch dephosphoryliert. Hierbei kamen Lysate von Jurkat T Zellen zur Anwendung, welche stabil entweder einen Kontrollvektor (pWPI) oder das wildtypische SLy2-Protein exprimieren (s. Abb. 29).



**Abbildung 29: Phosphorylierungsabhängige Bindung von SLy2 an 14-3-3 $\beta$  und 14-3-3 $\sigma$**

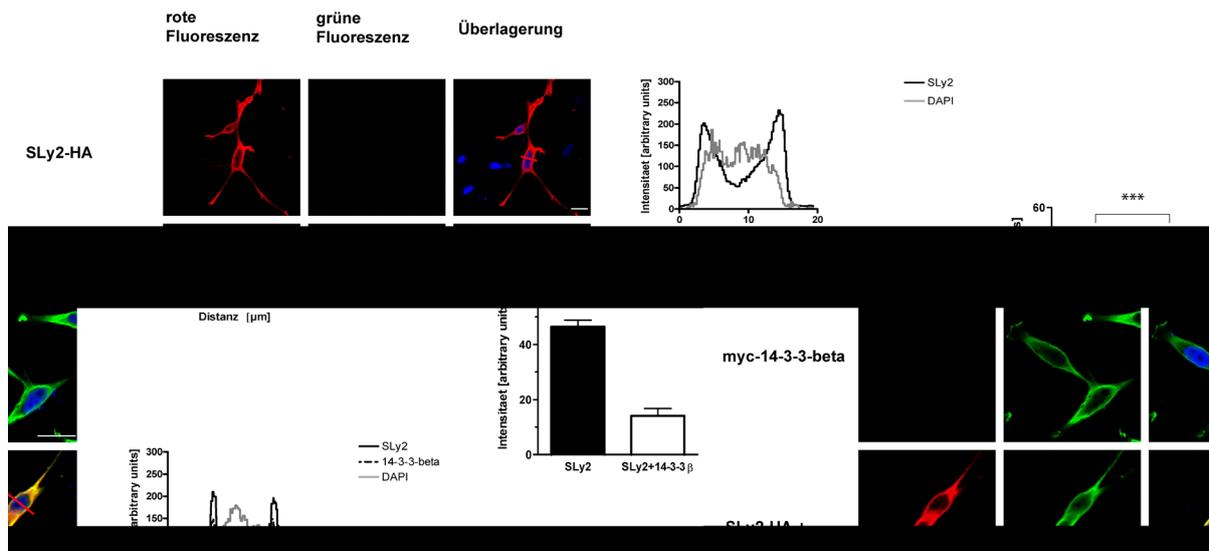
Für die Affinitätspräzipitation wurden exemplarisch GST-markiertes 14-3-3 $\beta$  und 14-3-3 $\sigma$  neben einer GST-Kontrolle (pGEX-4-T1) heterolog in *E. coli* exprimiert, an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit dephosphorylierten Lysaten von Jurkat T Zellen inkubiert, die ein HA-markiertes, wildtypisches SLy2-Konstrukt exprimieren. Eine Interaktion von SLy2 mit den zwei getesteten 14-3-3 Isoformen ist nach einer unspezifischen Dephosphorylierung der eingesetzten Zellysate nicht mehr detektierbar. Die Ladekontrolle zeigt die Expression des wildtypischen SLy2-Proteins

Es zeigt sich, dass nach einer Dephosphorylierung der in die Affinitätspräzipitation eingesetzten Lysate eine Bindung an 14-3-3 $\beta$  und 14-3-3 $\sigma$  nicht mehr stattfindet. Eine Ladekontrolle zeigt die vergleichbare Expression des wildtypischen SLy2-Moleküls in den verschiedenen Ansätzen. Die Ladekontrolle ist bei diesem Experiment von entscheidender Bedeutung, da die zur Dephosphorylierung eingesetzte Phosphatase unter Umständen auch eine Protease-Aktivität entwickeln kann, durch die nachfolgend Proteine im Lysat abgebaut werden.

Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Assoziation von SLy2 mit 14-3-3 Proteinen phosphorylierungsabhängig stattfindet. An welcher Aminosäure die Phosphorylierung erfolgen muss, lässt sich mit Hilfe dieses Experiments allerdings nicht klären.

Eine interessante Fragestellung im Zusammenhang mit der dargestellten Interaktion von SLy2 mit 14-3-3 Proteinen ist die, ob die Assoziation von SLy2 mit diesen Molekülen einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des SLy2-Proteins ausübt. Wie bereits zuvor beschrieben, besteht eine häufige Funktion von 14-3-3 Proteinen darin, durch die Interaktion mit einem Zielmolekül eine in der Aminosäureabfolge des Zielmoleküls vorhandene nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) zu maskieren. Dadurch wird das Zielprotein im Zytoplasma zurückgehalten.

Um diesen Aspekt der Interaktion von SLy2 mit 14-3-3 Proteinen näher zu beleuchten, wurden im Zuge dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Dr. Cornelia Beuter-Gunia HeLa Zellen transient entweder mit einem HA-markierten wildtypischen SLy2-Molekül oder einem myc-14-3-3 $\beta$ -Konstrukt transfiziert. In einem weiteren Ansatz wurden beide Plasmide zusätzlich ko-transfiziert. Anschließend erfolgte eine intrazelluläre Anfärbung der Proteine mit Antikörpern gegen das HA- und das myc-Epitop. Der Zellkern wurde zusätzlich mit DAPI sichtbar gemacht.



**Abbildung 30: Subzelluläre Lokalisation von SLy2 in An- und Abwesenheit von 14-3-3 $\beta$**

Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen von HeLa Zellen, welche transient entweder einzeln mit einem HA-markierten wildtypischen SLy2-Konstrukt (rote Fluoreszenz) oder einem myc-14-3-3 $\beta$ -Konstrukt (grüne Fluoreszenz) transfiziert, beziehungsweise mit beiden Expressionsvektoren gleichzeitig ko-transfiziert wurden. Eine Ko-Lokalisation beider Proteine im Ko-Transfektionsansatz wird durch die Gelbfärbung in der Überlagerung angezeigt. Der nukleäre Anteil von SLy2 wurde sowohl im Einzeltransfektionsansatz (SLy2-HA) als auch im Ko-Transfektionsansatz (SLy2-HA + myc-14-3-3 $\beta$ ) durch die Bestimmung der Intensität der SLy2-Färbung in einem definierten Bereich durch den Zellkern ermittelt (rote Linien durch die entsprechenden Zellen). Das Ergebnis dieser Analyse wurde graphisch dargestellt (Graphen neben den Mikroskopbildern), indem die nukleäre Intensität von SLy2 (schwarze Linie), DAPI (graue Linie) und – im Falle des Ko-Transfektionsansatzes – von myc-14-3-3 $\beta$  (schwarze gestrichelte Linie) analysiert wurden. Die statistische Signifikanz des reduzierten nukleären Anteils von SLy2 in Anwesenheit von 14-3-3 $\beta$  ist dem Balkendiagramm neben den beiden Graphen zu entnehmen ( $n = 7$ , Student's t-Test,  $p < 0,0001$ ). Die weiße Linie in den Mikroskopbildern entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Nach der intrazellulären Färbung wurde die Lokalisation des wildtypischen SLy2-Proteins beziehungsweise die Lokalisation von 14-3-3 $\beta$  in den nur mit einem Plasmid transfizierten HeLa Zellen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. In den ko-transfizierten HeLa-Zellen hingegen konnte die subzelluläre Lokalisation von SLy2 unter dem Einfluss von 14-3-3 $\beta$  dargestellt und mit der in den einzeln transfizierten HeLa Zellen verglichen werden. Zudem wurde eine quantitative Analyse des nukleären Anteils von SLy2 in An- oder Abwesenheit von 14-3-3 $\beta$  durchgeführt und graphisch dargestellt (s. Abb. 30). SLy2 (rote Fluoreszenz) befindet sich in den einzeln transfizierten Zellen erwartungsgemäß sowohl im Zytosol als auch zu einem geringeren Anteil im Zellkern. Im Mikroskopbild ist der Kernanteil von SLy2 allerdings nur sehr schlecht zu erkennen. Aus diesem Grund wurde eine Analyse des nukleären Anteils von SLy2 über einen definierten Bereich quer durch den Nukleus vorgenommen und graphisch dargestellt. Dieser definierte Bereich ist als rote Linie durch die jeweilige Zelle dargestellt und entspricht der Intensität der SLy2-Färbung in diesem Areal. In

der Grafik ist die Länge des analysierten Bereichs als „Distanz [ $\mu\text{m}$ ]“ angegeben. Zum Vergleich wurde zusätzlich die Intensität der DAPI-Kernfärbung in demselben Bereich ermittelt und ebenfalls graphisch erfasst. Das Ergebnis ist in der Graphik rechts neben den Mikroskopbildern gezeigt. Für die graphische Darstellung wurde der jeweils niedrigste nukleäre Intensitätswert verwendet. Hierbei wird deutlich, dass SLy2 in der Einzeltransfektion einen deutlichen Anteil im Nukleus besitzt. Die beiden „Spitzen“ der SLy2-Kurve links und rechts neben der nukleären Fraktion von SLy2 stellen den zytoplasmatischen Anteil von SLy2 dar.

Das myc-14-3-3 $\beta$ -Konstrukt wurde in grün angefärbt. In der Einzeltransfektion ist deutlich zu erkennen, dass dieses Molekül erwartungsgemäß im Zytoplasma und zu einem geringeren Anteil im Nukleus lokalisiert.

Eine Ko-Lokalisation beider Proteine in der Ko-Transfektion zeigt sich durch eine Gelbfärbung in der Überlagerung. Abbildung 30 zeigt deutlich, dass SLy2 und 14-3-3 $\beta$  im Zytoplasma von ko-transfizierten HeLa Zellen ko-lokalisieren.

Zudem beweist die graphische Darstellung des nukleären Anteils von SLy2, DAPI und 14-3-3 $\beta$ , dass SLy2 und 14-3-3 $\beta$  in der Ko-Transfektion zu einem vergleichbaren Anteil im Nukleus vorkommen, da sich ihre beiden Kurven in der Graphik überlagern.

Interessanterweise nimmt der Kernanteil von SLy2 in Anwesenheit von 14-3-3 $\beta$  um ca. 50% ab (s. Balkendiagramm). Diese Analyse demonstriert die statistische Signifikanz der Reduktion des Kernanteils von SLy2 in Anwesenheit von 14-3-3 $\beta$ .

### **3.2.5 Identifizierung weiterer Interaktionspartner von SLy2**

#### **3.2.5.1 Interaktion von SLy2 mit SAP30**

Für die funktionelle Charakterisierung des putativen Adapterproteins SLy2 ist die Suche nach weiteren Interaktionspartnern von essenzieller Bedeutung.

Aus diesem Grund wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit analog zu SLy1 eine Interaktionspartnersuche mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems durchgeführt. Als Köderprotein diente dabei das komplette wildtypische SLy2-Molekül, die isolierte SH3-Domäne von SLy2 oder die isolierte SAM-Domäne. Hefezellen wurden mit diesen Köderkonstrukten und einer murinen T Zell-cDNS-Bibliothek ko-transformiert und auf Selektionsplatten ausplattiert.

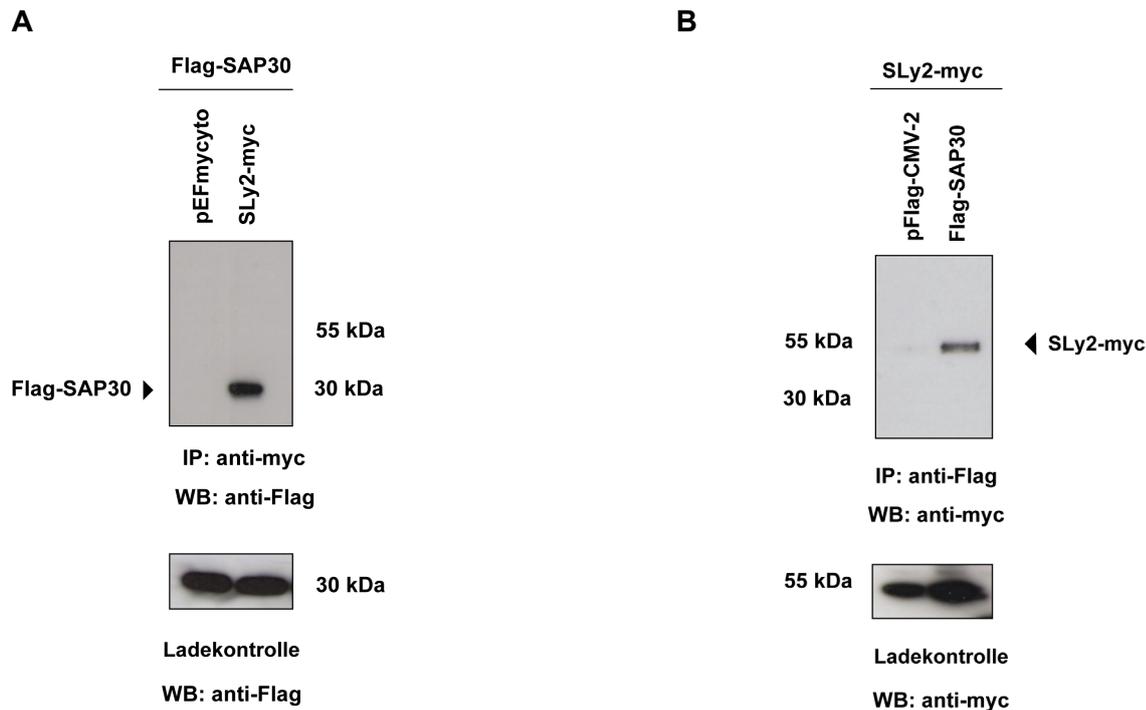
Für SLy2 lieferte der Versuchsansatz mit dem kompletten wildtypischen Protein acht Hefeklonen auf den Trp<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, X- $\alpha$ -Gal<sup>+</sup>-Selektionsplatten. Bei dem Ansatz mit der SAM-Domäne von SLy2 als Ködermolekül wurden 31 Hefeklonen auf den Selektionsplatten erhalten. Nach der Plasmidisolierung aus den Hefeklonen wurden elektrokompetente *E. coli* mit der gewonnenen DNS transformiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Anschließend wurde die Plasmid-DNS aus den Bakterien isoliert. Eine Sequenzanalyse lieferte für einen Hefeklon aus dem Versuchsansatz mit dem wildtypischen SLy2-Protein die Sequenz des

Moleküls „ribosomal protein L12“ (rpL12, GenBank accession number: L04280), für einen weiteren Klon die Sequenz des Proteins „Sin3-associated polypeptide 30“ (SAP30, GenBank accession number: AF075136). Die Sequenzen der restlichen Klone aus diesem Ansatz konnten nicht ausgewertet werden. Das Ergebnis der Sequenzanalyse der sequenzierbaren Hefeklone aus dem Versuchsansatz mit der SAM-Domäne von SLy2 ist in Tab. 17 im Anhang aufgeführt.

SAP30 ist ein nukleäres Protein mit einer Masse von 30 kDa und eine Komponente des Sin3-HDAC1-Ko-Repressor-Komplexes, welcher die Transkription vieler unterschiedlicher Gene beeinflusst. Der Komplex spielt bei der Regulation essenzieller zellulärer Prozesse – wie beispielsweise der Proliferation, der Zelldifferenzierung, dem Zellzyklus oder der embryonalen Entwicklung – ganz entscheidende Rollen.

Für die Verifizierung des Resultats aus dem Hefe Zwei-Hybrid-System wurde im Zuge dieser Arbeit die Interaktion von SLy2 und SAP30 mittels Ko-Immunpräzipitation analysiert. Dazu wurden HEK 293T Zellen transient entweder mit einem Kontrollvektor (pEFmyccyto) oder einem myc-markierten wildtypischen SLy2-Konstrukt und einem Flag-markierten SAP30-Konstrukt ko-transfiziert. Nach der Zellyse erfolgte die Ko-Immunpräzipitation mittels anti-myc-gekoppelter Sepharose, und die Proben wurden über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und nachfolgender Western Blot-Analyse untersucht (s. Abb. 31 A). Hierbei zeigt sich, dass SAP30 mit dem wildtypischen SLy2-Protein interagieren kann. In der Leervektorkontrolle ist erwartungsgemäß keine Interaktionsbande detektierbar. Die Ladekontrolle zeigt die Expression des Flag-SAP30-Konstrukts.

In Abb. 31 B hingegen ist eine Ko-Immunpräzipitation mit anti-Flag-gekoppelter Sepharose dargestellt. Für dieses Experiment wurden HEK 293T Zellen transient entweder mit einem Leervektor (pFlag-CMV-2) oder einem Flag-markierten SAP30-Konstrukt und einem myc-markierten wildtypischen SLy2-Konstrukt ko-transfiziert. Das Resultat dieser Ko-Immunpräzipitation bestätigt das Ergebnis der anti-myc-Ko-Immunpräzipitation (s. Abb. 31 A), denn auch hier findet eine Bindung von SLy2 und SAP30 statt. In der Leervektorkontrolle ist ebenfalls erwartungsgemäß keine Interaktionsbande detektierbar. Die Ladekontrolle zeigt die Expression des SLy2-myc-Konstrukts.

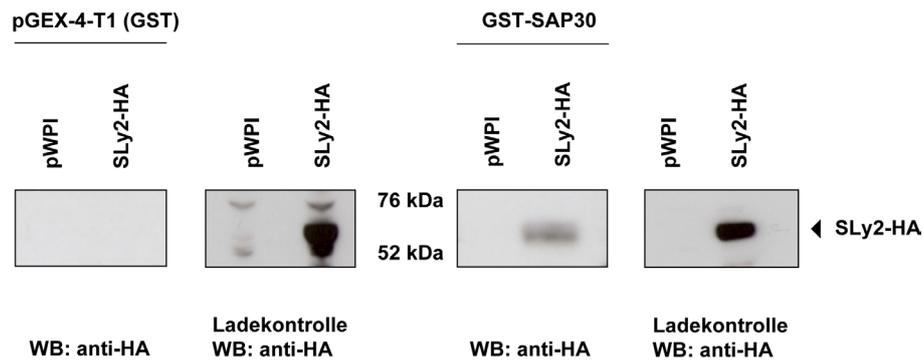


**Abbildung 31: Interaktion des SLy2-Proteins mit SAP30**

**A:** HEK 293 T Zellen wurden transient entweder mit einem Leervektor (pEFmyccyto) beziehungsweise mit einem wildtypischen SLy2-myc-Konstrukt und einem Flag-SAP30-Konstrukt ko-transfiziert. Eine Interaktion des SAP30-Moleküls mit SLy2 wurde anschließend mittels Ko-Immünpräzipitation (anti-myc-gekoppelte Sepharose) sowie anschließender SDS-PAGE und Western Blot-Analyse detektiert. Die Ladekontrolle zeigt die Expression des SAP30-Moleküls.

**B:** HEK 293 T Zellen wurden transient entweder mit einem Leervektor (pFlag-CMV-2) beziehungsweise mit einem Flag-markierten SAP30-Konstrukt und einem SLy2-myc-Konstrukt ko-transfiziert. Die Interaktion des SLy2-Moleküls mit SAP30 wurde anschließend mittels Ko-Immünpräzipitation (anti-Flag-gekoppelte Sepharose) sowie anschließender SDS-PAGE und Western Blot-Analyse detektiert. Die Ladekontrolle demonstriert die Expression des SLy2-Moleküls.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Assoziation von SLy2 und SAP30 mit Hilfe einer Affinitätspräzipitation untersucht. Hierfür wurde entweder ein GST-markiertes SAP30-Konstrukt oder als Kontrolle der GST-Leervektor (pGEX-4-T1) heterolog in *E. coli* exprimiert, an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit Lysaten von Jurkat T Zellen inkubiert, welche entweder mit einem Leervektor (pWPI) transduziert worden waren oder ein HA-markiertes wildtypisches SLy2-Konstrukt exprimierten. Durch eine anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und eine Western Blot-Analyse der Affinitätspräzipitationsproben mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop konnte die Interaktion von SLy2 mit SAP30 sichtbar gemacht werden. In der GST-Leervektorkontrolle zeigt sich erwartungsgemäß keine Interaktionsbande (s. Abb. 32).



**Abbildung 32: Interaktion des SLy2-Proteins mit SAP30**

Das heterolog in Bakterien überexprimierte GST-SAP30-Fusionskonstrukt wurde für die Affinitätspräzipitation an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit Lysaten von Jurkat T Zellen inkubiert, die entweder mit einem Leervektor (pWPI) oder einem HA-markierten wildtypischen SLy2-Konstrukt transduziert worden waren. Als Kontrolle diente die heterologe Überexpression des GST-Leervektors (pGEX-4-T1). Die Ladekontrolle zeigt die Expression des SLy2-Moleküls.

### 3.2.5.2 Interaktion von SLy2 mit HDAC1

Wie bereits in Abschnitt 3.2.5.1 erwähnt, handelt es sich bei SAP30 – einem mit SLy2 interagierenden Protein - um eine Komponente des sogenannten Sin3-HDAC1-Ko-Repressor-Komplexes.

Aus diesem Grund bestand ein Interesse daran, ob SLy2 zusätzlich auch an andere Moleküle dieses Ko-Repressor-Komplexes binden kann.

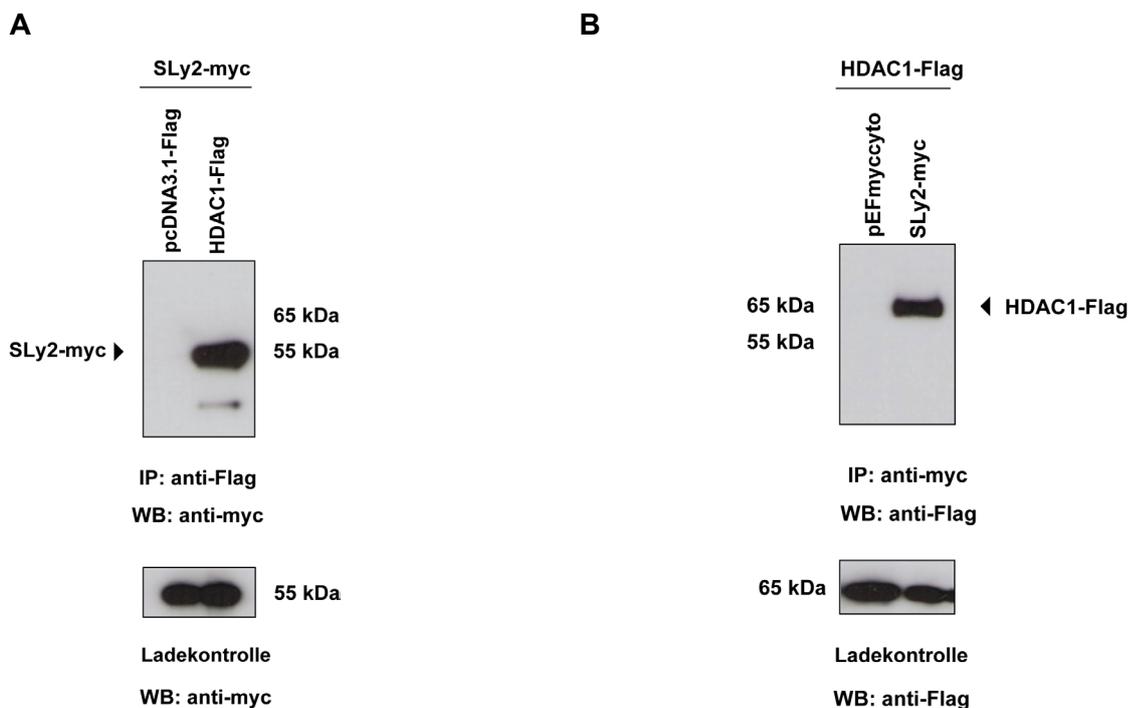
Die Histondeacetylase 1 (HDAC1) ist ein entscheidendes Protein in diesem Komplex, da es über die Deacetylierung von Histonen einen direkten Einfluss auf die Struktur des Chromatins und damit auf die Regulation der Transkription bestimmter Gene nimmt. Zudem ist bekannt, dass HDAC1 mit SAP30 interagiert (Zhang, Y. et al., 1998).

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde eine potenzielle Interaktion von SLy2 mit HDAC1 mittels Ko-Immunpräzipitation untersucht. Hierfür wurden HEK 293T Zellen transient entweder mit einem Kontrollvektor (pcDNA3.1-Flag) oder einem Flag-markierten HDAC1-Konstrukt und einem myc-markierten SLy2-Konstrukt ko-transfiziert. Nach der Zellyse erfolgte die Ko-Immunpräzipitation mittels anti-Flag-gekoppelter Sepharose, und die Proben wurden über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und nachfolgenden Western Blot-Analyse untersucht (s. Abb. 33 A).

Hierbei wird deutlich, dass SLy2 HDAC1 bindet. In der Leervektorkontrolle ist erwartungsgemäß keine Interaktionsbande detektierbar. Die Ladekontrolle zeigt die Expression des SLy2-myc-Konstrukts.

In Abb. 33 B wiederum ist eine Ko-Immunpräzipitation mit anti-myc-gekoppelter Sepharose dargestellt. Für dieses Experiment wurden HEK 293T Zellen transient entweder mit einem Leervektor (pEFmyccyto) oder einem SLy2-myc-Plasmid und einem Flag-markierten

HDAC1-Konstrukt ko-transfiziert. Das Resultat dieser Ko-Immünpräzipitation bestätigt das Ergebnis der anti-Flag-Ko-Immünpräzipitation (s. Abb. 33 A), denn auch hier findet eine Interaktion von HDAC1 und SLy2 statt. In der Leervektorkontrolle ist ebenfalls erwartungsgemäß keine Interaktionsbande detektierbar. Die Ladekontrolle zeigt die Expression des HDAC1-Flag-Konstrukts.



**Abbildung 33: Interaktion des SLy2-Proteins mit HDAC1**

**A:** HEK 293 T Zellen wurden transient entweder mit einem Leervektor (pcDNA3.1-Flag) beziehungsweise mit einem HDAC1-Flag-Konstrukt und einem SLy2-myc-Plasmid ko-transfiziert. Eine Bindung des SLy2-Moleküls an HDAC1 wurde nachfolgend mittels Ko-Immünpräzipitation (anti-Flag-gekoppelte Sepharose) sowie anschließender SDS-PAGE und Western Blot-Analyse detektiert. Die Ladekontrolle demonstriert die Expression des SLy2-Proteins.

**B:** HEK 293 T Zellen wurden transient entweder mit einem Leervektor (pEFmyccyto) beziehungsweise mit einem myc-markierten SLy2-Konstrukt und einem HDAC1-Flag-Plasmid ko-transfiziert. Die Interaktion des HDAC1-Moleküls mit SLy2 wurde anschließend mittels Ko-Immünpräzipitation (anti-myc-gekoppelte Sepharose) sowie anschließender SDS-PAGE und Western Blot-Analyse detektiert. Die Ladekontrolle zeigt die Expression des HDAC1-Moleküls.

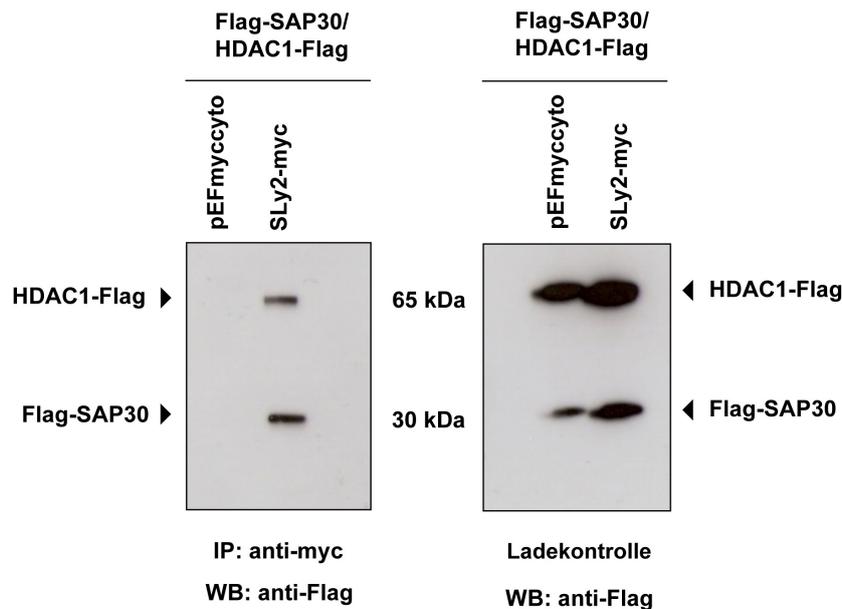
### 3.2.5.3 SLy2 bildet einen ternären Komplex mit SAP30 und HDAC1

Aufgrund der Tatsache, dass SLy2 sowohl mit SAP30 als auch mit HDAC1 interagiert und HDAC1 wiederum an SAP30 bindet, bestand ein Interesse daran, ob SLy2 einen Komplex mit beiden Molekülen bildet.

Für dieses Experiment wurden HEK 293T Zellen transient mit Flag-SAP30, HDAC1-Flag und entweder einem Kontrollvektor (pEFmyccyto) oder einem myc-markierten SLy2-Konstrukt ko-

transfiziert. Nach der Zellyse wurde eine Ko-Immünpräzipitation mit anti-myc-gekoppelter Sepharose durchgeführt. Die Proben wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Western Blot analysiert (s. Abb. 34).

Nach der Präzipitation des SLy2-Proteins ist sowohl SAP30 als auch HDAC1 in dem Präzipitat zu detektieren. Dies deutet auf eine Komplexbildung der drei Moleküle hin. In der Leervektorkontrolle sind erwartungsgemäß keine Interaktionsbanden sichtbar.



**Abbildung 34: SLy2 bildet einen ternären Komplex mit SAP30 und HDAC1**

HEK 293 T Zellen wurden transient mit Flag-SAP30, HDAC1-Flag und entweder einem Leervektor (pEFmyccyto) oder mit einem myc-markierten SLy2-Konstrukt ko-transfiziert. Die gleichzeitige Interaktion von HDAC1 und SAP30 mit SLy2 wurde anschließend mittels Ko-Immünpräzipitation (anti-myc-gekoppelte Sepharose) sowie anschließender SDS-PAGE und Western Blot-Analyse detektiert. Die Ladekontrolle zeigt die Expression von HDAC1 und SAP30.

#### 3.2.5.4 SLy2 erhöht die Aktivität von HDAC1

SLy2 interagiert gleichzeitig mit zwei Komponenten des Sin3-HDAC1-Ko-Repressor-Komplexes, nämlich mit SAP30 und mit HDAC1. Die Histondeacetylase 1 in diesem Komplex reguliert die Transkription unterschiedlicher Gene.

Aufgrund der molekularen Interaktion von SLy2 und HDAC1 wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit die Aktivität von HDAC1 in An- und Abwesenheit von SLy2 bestimmt, um festzustellen, ob die Assoziation beider Moleküle einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat. Dazu wurden HEK 293T Zellen transient entweder mit einem Kontrollvektor (pcDNA3.1-Flag), einem SLy2-HA-Plasmid oder einem HDAC1-Flag-Konstrukt transfiziert. In einem weiteren Ansatz wurden zudem SLy2-HA und HDAC1-Flag ko-transfiziert. In einem Versuchsansatz wurde aus den transfizierten Zellen das Gesamtzelllysate gewonnen, in einem anderen An-

satz hingegen wurde eine fraktionierte Zellyse durchgeführt, bei der eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion erhalten werden. In beiden Fällen erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines BCA-Tests.

In einem dritten Experiment wurde das Gesamtzelllysate für eine Ko-Immunitpräzipitation mit anti-Flag-gekoppelter Sepharose verwendet, um das HDAC1-Flag-Protein zu präzipitieren.

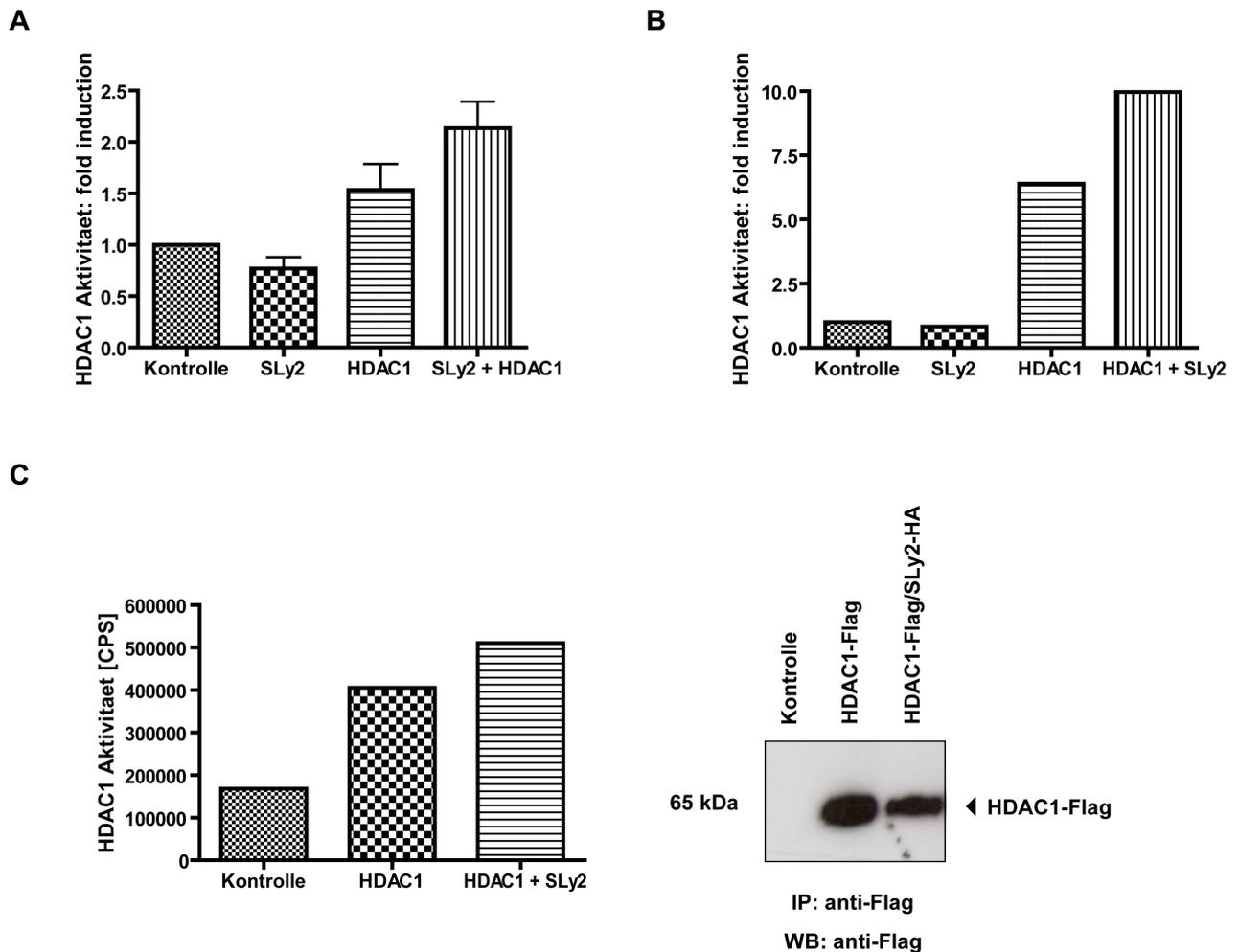
Die Bestimmung der Aktivität von HDAC1 erfolgte mit Hilfe des „HDAC Assay Kits“ (Upstate). Die Detektion findet hierbei über einen fluorimetrischen Nachweis statt. Bei der Durchführung der HDAC Assays wurde entweder das Gesamtzelllysate, der Kernextrakt oder die Ko-Immunitpräzipitation eingesetzt. Bei der Auswertung der Tests wurde die in jeder Probe erzielte HDAC-Aktivität auf die darin enthaltene Proteinmenge normalisiert. Die dabei erhaltene relative HDAC-Aktivität wurde anschließend zu der Aktivität in der Leervektorkontrolle in Beziehung gesetzt, welche zuvor als „1“ definiert worden war. Dieser Wert wurde anschließend als „fold induction“ bezeichnet.

In Abb. 35 A ist das Ergebnis für den HDAC1-Aktivitätstest mit dem Gesamtzelllysate dargestellt. Hierbei zeigt sich eine deutliche Steigerung der HDAC1-Aktivität in Anwesenheit von SLy2. Die Kontrolle und SLy2 allein weisen eine deutlich geringere HDAC-Aktivität als HDAC1 allein und HDAC1 in Anwesenheit von SLy2 auf.

Abbildung 35 B hingegen zeigt die Steigerung der Aktivität von HDAC1 in Anwesenheit von SLy2 im Kernextrakt der transfizierten Zellen. Der Unterschied zwischen HDAC1 allein und HDAC1 in Kombination mit SLy2 ist hierbei noch deutlicher zu erkennen als im Gesamtzelllysate. Dieser Befund entspricht den Erwartungen, da HDAC1 seine enzymatische Aktivität im Zellkern ausübt.

In Abb. 35 C ist die Aktivität von HDAC1 nach einer Ko-Immunitpräzipitation dargestellt. Dieses Experiment wurde durchgeführt, um ganz spezifisch die Enzymaktivität von HDAC1 zu demonstrieren, da dieses Molekül im Zuge der Präzipitation angereichert wurde. Auch hierbei wird die Steigerung der HDAC1-Aktivität in Anwesenheit von SLy2 sichtbar. Der Western Blot rechts neben dem Diagramm für die Enzymaktivität zeigt das präzipitierte HDAC1-Protein. Hierbei wird deutlich, dass in dem Präzipitat „HDAC1 + SLy2“ weniger HDAC1 enthalten war als in der Probe „HDAC1“. Da jedoch die Steigerung der HDAC1-Aktivität in der Probe „HDAC1 + SLy2“ auch so schon erreicht werden kann, ist anzunehmen, dass der Unterschied zwischen beiden Proben bei einer vergleichbar präzipitierten HDAC1-Menge noch deutlicher ausgefallen wäre.

Die Anwesenheit von SLy2 im HDAC1-Präzipitat wurde durch eine Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop überprüft und konnte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund bestätigt die Interaktion beider Moleküle.



### Abbildung 35: SLy2 erhöht die Aktivität von HDAC1

**A:** HEK 293T Zellen wurden transient entweder mit einem Kontrollvektor (pcDNA.3.1-Flag), einem SLy2-HA-Konstrukt oder einem HDAC1-Flag-Plasmid transfiziert. In einem weiteren Ansatz wurden das HDAC1-Flag-Konstrukt und das SLy2-HA-Plasmid ko-transfiziert. Der HDAC1-Aktivitätstest erfolgte mit dem Gesamtzelllysate. Die ermittelte Enzymaktivität wurde auf die jeweilige Proteinmenge normalisiert, die mit Hilfe eines BCA-Tests bestimmt worden war. Anschließend wurde die normalisierte HDAC1-Aktivität in der Leervektorkontrolle als „1“ festgelegt und die Enzymaktivitäten der restlichen Proben zu dieser Kontrolle in Beziehung gesetzt (fold induction). Hierbei zeigt sich im Gesamtzelllysate eine deutliche Steigerung der HDAC1-Aktivität in Anwesenheit von SLy2 (n = 6).

**B:** Die Transfektion der HEK 293T Zellen erfolgte wie im Abbildungsteil A beschrieben. Es wurde eine fraktionierte Zellyse durchgeführt, bei der eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion erhalten wurde. Nach der Proteinbestimmung mittels BCA-Test fand der HDAC1-Aktivitätstest mit dem Kernextrakt der transfizierten Zellen wie in Abbildungsteil A beschrieben statt. Die Steigerung der Aktivität von HDAC1 in Anwesenheit von SLy2 ist in der nukleären Fraktion der transfizierten Zellen noch deutlicher zu erkennen als im Gesamtzelllysate. Die Abbildung zeigt eines von drei unabhängigen Experimenten.

---

**C:** HEK 293T Zellen wurden wie zuvor beschrieben transfiziert. Anschließend wurde das Gesamtzelllysate für eine Ko-Immunpräzipitation mit anti-Flag-gekoppelter Sepharose verwendet, um HDAC1 zu präzipitieren. Der HDAC1-Aktivitätstest wurde nachfolgend mit den verschiedenen Präzipitaten durchgeführt. Hierbei ist eine deutliche Steigerung der Aktivität von HDAC1 in Anwesenheit von SLy2 zu erkennen. Zusätzlich zeigt ein Western Blot die in den verschiedenen Ansätzen präzipitierte HDAC1-Menge. Die Abbildung stellt eines von drei unabhängigen Experimenten dar.

Die in den Abbildungen 31-35 dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass im Zuge dieser Arbeit das putative Adapterprotein SLy2 als eine neue Komponente des SAP30-HDAC1-Komplexes identifiziert werden konnte, welche die Aktivität von HDAC1 reguliert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die SLy Proteinfamilie putativer Adaptermoleküle

Adapterproteine stellen Moleküle dar, die konstitutive oder induzierbare Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Interaktionen mit Hilfe spezieller Interaktionsdomänen vermitteln. Gleichzeitig fehlt Adapterproteinen eine eigene enzymatische Aktivität. Durch die Assoziation von Adaptern mit ihren unterschiedlichen Bindepartnern können große Proteinkomplexe generiert werden, welche an entscheidenden intrazellulären Signalwegen beteiligt sind.

Im Zusammenhang mit der Identifizierung des ersten Mitglieds der SLy Proteinfamilie – SLy1 – zeigte eine Analyse der Aminosäuresequenz dieses Moleküls, dass SLy1 neben einer SH3- auch eine SAM-Domäne besitzt. Bei diesen Modulen handelt sich um typische Interaktionsdomänen. Da für SLy1 keine Enzymdomänen gefunden werden konnten, erfüllte dieses Protein entscheidende Kriterien für eine Funktion als ein neuer Lymphozyten-spezifischer Adapter (Beer, S. et al., 2001). Neben der SH3- und der SAM-Domäne weist SLy1 eine zweigeteilte nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) auf (s. Abb. 3).

Sowohl die spezifische Phosphorylierung von SLy1 am Serin27 nach einer Stimulation von T Zellen über den Antigenrezeptor (Astoul, E. et al., 2003) als auch die beeinträchtigte Proliferation von SLy1<sup>-/-</sup> oder SLy1<sup>ΔΔ</sup> T Zellen in Folge einer allogenen Aktivierung der Zellen deuten auf eine Funktion von SLy1 als ein Adapterprotein in der Antigenrezeptor-Signalkaskade von Lymphozyten hin (Beer, S. et al., 2005; Reis, B. et al., 2009).

Das zweite Molekül der SLy Proteinfamilie – SLy2 – wurde von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen fast zeitgleich kloniert und entweder als HACS1 (Claudio, J.O. et al., 2001) oder Nash1 (Uchida, T. et al., 2001) bezeichnet. Aufgrund seiner Homologie zu SLy1 wird dieses Protein in der vorliegenden Arbeit SLy2 genannt.

SLy1 und SLy2 besitzen eine identische Domänenstruktur. Die Gesamthomologie beider Proteine beträgt zwar nur ungefähr 43%, innerhalb der Domänen jedoch weisen die Moleküle eine hohe Homologie auf.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen SLy1 und SLy2 besteht jedoch in ihrem Expressionsmuster. SLy1 ist ein strikt Lymphozyten-spezifisches Protein, wohingegen SLy2 ein deutlich breiteres Expressionsspektrum zeigt, da es in hämatopoetischen Geweben, Endothelzellen, Muskel- und Herzgewebe, Gehirn, Lunge und auch Myelomen exprimiert wird (Beer, S. et al., 2001; Claudio, J.O. et al., 2001; Uchida, T. et al., 2001).

Interessanterweise lieferte eine BLAST-Analyse der SH3- und der SAM-Domänen von SLy1 und SLy2 kaum vergleichbare Sequenzen in den SH3- und SAM-Domänen anderer Adaptermoleküle. Mit 42% bestand die höchste Homologie zu der SH3-Domäne des Moleküls

„CD2-associated protein“ (CD2-AP). Aufgrund dieses Befunds scheint es sich bei den SLy-Proteinen um eine eigene Familie von Adaptern zu handeln.

Das dritte Mitglied der SLy Familie ist das Molekül SASH1, welches 2003 identifiziert wurde (Zeller, C. et al., 2003). SASH1 unterscheidet sich von SLy1 und SLy2, da es zum einen deutlich größer ist (SASH1: 110 kDa, SLy1: 55 kDa, SLy2: 48 kDa), zum anderen aber auch eine abweichende Domänenstruktur aufweist. SASH1 besitzt neben der zweigeteilten NLS sowie der SH3- und der SAM-Domäne am N-Terminus ein sogenanntes „coiled-coil-Motiv“ und am C-Terminus eine zweite SAM-Domäne. Die Homologie zwischen den Modulen, die in allen drei Proteinen vorkommen, ist jedoch sehr hoch, so dass SASH1 als ein Mitglied der SLy Proteinfamilie anzusehen ist.

Evolutionäre Gesichtspunkte legen die Vermutung nahe, dass das *SASH1*-Gen das ursprünglichste der SLy Familie ist, da sich Orthologe sowohl in Arthropoden als auch in *Drosophila melanogaster* und Vertebraten finden. Das *SLy1*- sowie das *SLy2*-Gen hingegen existieren nur in Knochenfischen und Landwirbeltieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Interaktionsverhalten von SLy1 und SLy2 näher untersucht, um Hinweise auf die Funktion beider Proteine zu erhalten.

## 4.2 Interaktionsanalyse der putativen Adaptermoleküle SLy1 und SLy2

Für eine funktionelle Charakterisierung der putativen Adapterproteine SLy1 und SLy2 ist die Suche nach Interaktionspartnern von entscheidender Bedeutung, da erst die Bindung von Adaptern an ihre Zielmoleküle die Funktion dieser Proteine bewirkt. Die Assoziation von SLy1 und SLy2 mit anderen Molekülen sollte dabei erwartungsgemäß über deren Interaktionsmodule – die SH3- und die SAM-Domäne – stattfinden.

### 4.2.1 Subzelluläre Lokalisation des SLy1- und SLy2-Proteins

Die Analyse der subzellulären Lokalisation des wildtypischen SLy1- und SLy2-Proteins im Vergleich zu Deletionsmutanten (s. Abb. 8 und Abb. 19) lässt einen ersten Rückschluss darauf zu, ob aufgrund des Fehlens charakteristischer Sequenzbereiche eine abweichende Lokalisation beider Moleküle zu beobachten ist. Dies kann nachfolgend einen Einfluss auf das Interaktionsverhalten der Proteine ausüben, da die Bindung von SLy1 und SLy2 an andere Moleküle möglicherweise nur in ganz bestimmten zellulären Kompartimenten stattfindet. Aus vorherigen Analysen war bereits bekannt, dass das wildtypische SLy1-Protein sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert (Beer, S. et al., 2005), wobei sich der mehrheitliche Teil des Moleküls im Zellkern befindet. Zudem findet in primären T Zellen, welche mit

anti-CD3 und anti-CD28 ko-stimuliert wurden, eine Translokation des SLy1-Proteins aus dem Nukleus in das Zytoplasma statt, die nach 60-minütiger Aktivierung der Zellen vollständig ist und mindestens zwei Stunden anhält (Reis, B., Dissertation).

Außerdem konnte in vorherigen Studien für das SLy1 $\Delta$ -Protein, welchem neben der Phosphorylierungsstelle am Serin27 auch ein Teil der NLS fehlt, eine zum Wildtyp-Molekül abweichende subzelluläre Lokalisation beschrieben werden, da die SLy1 $\Delta$ -Mutante nicht mehr im Zellkern, sondern nur noch im Zytoplasma zu finden ist (Beer, S. et al., 2005; Scheikl, T. et al., 2008). Eine Stimulation von primären T Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 hat hierbei auf die Lokalisation des mutierten SLy1-Moleküls keinen Einfluss (Reis, B., Dissertation).

Für das wildtypische SLy2-Protein konnte in vorherigen Experimenten ebenfalls sowohl eine zytoplasmatische als auch eine nukleäre Lokalisation beschrieben werden (v. Holleben, M., Dissertation). Ob SLy2 allerdings ein ähnliches Translokationsverhalten wie SLy1 nach Stimulation der Zellen aufweist, ist bislang noch nicht abschließend geklärt.

Die im Zuge dieser Arbeit generierten Ergebnisse bezüglich der subzellulären Lokalisation von SLy1 und SLy2 bestätigen die bestehenden Befunde (s. Abb. 10 und Abb. 20). Die im Verlauf der Zellfraktionierung verwendeten Jurkat T Zellen waren zwar unstimuliert, allerdings besitzen diese Zellen einen gewissen Grad an Grundstimulation, was sich zum Beispiel in einer erhöhten basalen Phosphorylierung von SLy1 am Serin27 in Tumorzelllinien zeigt (Bernhard Reis).

Das wildtypische SLy1-Molekül ist, genauso wie das wildtypische SLy2-Protein, in der Zellfraktionierung allerdings nicht nur im Zytosol und im Nukleus zu detektieren, sondern befindet sich zu einem relativ geringen Anteil auch in der Membranfraktion. Dieses Ergebnis legt nahe, dass SLy1 und SLy2 eventuell auch in Komplexen an der Zellmembran vorkommen könnten, welche nach einer Stimulation von Zellen generiert werden. Dieser Befund könnte auch mit der im Zuge der vorliegenden Arbeit dargestellten Bindung von SLy1 und SLy2 an Membranlipide erklärt werden (s. Abb. 14 B und Abb. 24). Für SLy1 ist bekannt, dass dieses Protein nach einer Stimulation von T Zellen über den Antigenrezeptor spezifisch am Serin27 phosphoryliert wird (Astoul, E. et al., 2003; Reis, B. Dissertation). Dieser Befund legt nahe, dass SLy1 in der Signalkaskade von T Zellen eine wichtige Rolle spielt und dabei auch in Komplexen in der Nähe des membranständigen T Zellrezeptors vorkommen könnte. Zudem zeigen Immunfluoreszenz-Analysen mit HeLa Zellen, welche stabil mit einem HA-markierten, wildtypischen SLy1-Konstrukt transduziert wurden, eine Lokalisation von SLy1 in der Nähe der Plasmamembran (Daten nicht gezeigt).

Im Zuge der Zellfraktionierung ist in der Membranfraktion allerdings nicht nur die Plasmamembran, sondern sind vielmehr auch membranöse Organellen enthalten. Wildtypisches SLy1 und SLy2 sind in der Zytosol/Mitochondrien-Fraktionierung auch in der mitochondrialen Fraktion detektierbar (s. Abb. 12 und Abb. 22) und binden an das typische Mitochondrien-

membranlipid Cardiolipin (s. Abb. 14 B und Abb. 24). Dieser Befund kann ebenfalls zu dem beobachteten Anteil von SLy1 und SLy2 in der Membranfraktion beitragen.

Das Resultat, dass SLy1 in der Mitochondrienfraktion zu detektieren ist, unterstützt den bereits publizierten Befund, dass SLy1 als ein anti-apoptotisches Molekül während der Entwicklung von Thymozyten fungiert (Reis, B. et al., 2009). Apoptotische Prozesse finden zu weiten Teilen an Mitochondrien statt. Das Mitochondrienlipid Cardiolipin spielt hierbei eine ganz entscheidende Rolle, da das pro-apoptotische Molekül tBid, welches im Zytosol nach der Proteolyse von Bid durch Caspase-8 entsteht, an Cardiolipin bindet (Lutter, M. et al., 2000). Nachfolgend kommt es zu der Freisetzung von Cytochrom c, so dass die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran zerstört wird (Lutter, M. et al., 2000).

Welche molekulare Funktion SLy1 als ein anti-apoptotisches Protein bei diesen Prozessen ausüben könnte, ist bislang noch nicht bekannt. In diesem Zusammenhang könnte die Identifikation von SLy1-Interaktionspartnern eventuell einen Beitrag zum tieferen Verständnis der anti-apoptotischen Funktion von SLy1 liefern.

Eine Funktion von SLy2 bei apoptotischen Prozessen wurde bislang noch nicht analysiert, so dass für das Vorkommen von SLy2 in der mitochondrialen Fraktion noch keine Verknüpfung zu anderen Analysen besteht.

Alle weiteren untersuchten SLy1- und SLy2-Deletionsmutanten (s. Abb. 8 und Abb. 19) – mit Ausnahme des SLy1 $\Delta$ -Moleküls – sind, genauso wie die wildtypischen Proteine, sowohl im Zytosol als auch im Zellkern und in der Membranfraktion zu detektieren. Für die SLy1S27 $\rightarrow$ A-Mutante wurde in vorherigen Studien eine vermehrte Lokalisation im Nukleus beschrieben (Reis, B., Dissertation). Ein solches Ergebnis ist in der im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellfraktionierung nicht eindeutig identifizierbar (s. Abb. 10). Allerdings zeigt diese Mutante trotz der relativ gering eingesetzten Proteinmenge eine deutliche Bande in der Kernfraktion (s. Abb. 10). Diese Bande ist dicker als die in der zytosolischen Fraktion. Eine genaue Quantifizierung der in den jeweiligen Fraktionen vorkommenden Proteinmenge ist jedoch innerhalb der durchgeführten Zellfraktionierung schwierig. Die Resultate sind eher qualitativ zu betrachten. Eine verstärkte Lokalisation des SLy1S27 $\rightarrow$ A-Proteins im Nukleus könnte durch die kaum noch vorhandene Interaktion mit 14-3-3 Proteinen erklärt werden (s. Abb. 18). Über diese Assoziation werden in vielen Fällen Proteine im Zytoplasma zurückgehalten (Tzivion, G. und Avruch, J., 2002; Mackintosh, C., 2004; Yoshida, K. et al., 2005).

Für die SLy2S23 $\rightarrow$ A-Mutante ist keine verstärkte Lokalisation im Zellkern zu detektieren. Da dieses Molekül – anders als das SLy1S27 $\rightarrow$ A-Konstrukt – weiterhin in der Lage ist, an 14-3-3 Proteine zu binden (s. Abb. 28), könnte dies eine Erklärung für den beobachteten Unterschied zwischen SLy1 und SLy2 sein.

Die SLy1 $\Delta$ NLS-Mutante befindet sich – genauso wie das SLy2 $\Delta$ NLS-Molekül - interessanterweise auch in der Membranfraktion (s. Abb. 10 und Abb. 20), wobei diese Moleküle nicht mehr an Lipide binden können (s. Abb. 14 B und Abb. 24). Das Vorkommen dieser Deletionsmutanten in der membranösen Fraktion könnte durch die Generierung von Homodimeren erklärt werden (s. Abb. 13 und Abb. 23). Zudem besteht die Möglichkeit, dass die SLy $\Delta$ NLS-Moleküle mit anderen Proteinen interagieren, welche in einem Komplex an der Plasmamembran zu finden sind. Ein weiterer interessanter Befund ist, dass die SLy $\Delta$ NLS-Mutanten in der Kernfraktion lokalisieren, obwohl der zweite Teil der NLS in diesen Konstrukten fehlt. Dies deutet darauf hin, dass die Deletion dieses Teils der NLS nicht ausreicht, um das Vorkommen von SLy1 und SLy2 im Nukleus zu unterbinden. Eine weitere Möglichkeit besteht auch hier in der Homodimerisierung oder Interaktion mit anderen Proteinen.

Sowohl das  $\Delta$ SH3-Konstrukt von SLy1 und SLy2 als auch die SLy1 $\Delta$ SAM-Mutante zeigen eine mit dem Wildtyp-Molekül vergleichbare subzelluläre Lokalisation. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Deletion beider Domänen für die Lokalisation der Proteine keine Rolle spielt. Die Lokalisation der SLy2 $\Delta$ SAM-Mutante kann mit Hilfe der Zellfraktionierung kaum analysiert werden, da dieses Konstrukt nur sehr schwach in den transduzierten Jurkat Zellen exprimiert wird und die Größe des Moleküls deutlich kleiner als erwartet ist. Möglicherweise ist die Mutante nicht stabil und wird proteolytisch gespalten. Eine Sequenzanalyse des exprimierten Proteins könnte für die Überprüfung dieser Hypothese hilfreich sein. Andererseits könnte die Deletion der SAM-Domäne von SLy2 einen Einfluss auf posttranslationale Modifikationen des SLy2-Proteins ausüben, wodurch eine derartige Größenveränderung ebenfalls erklärt werden könnte.

Die SLy1 $\Delta$ -Mutante ist nicht mehr in der Kernfraktion nachzuweisen. Dieses Ergebnis deckt sich mit vorherigen Beobachtungen (Beer, S. et al., 2005; Scheikl, T. et al., 2008; Reis, B., Dissertation). Da das SLy1 $\Delta$ NLS-Konstrukt und das SLy1S27 $\rightarrow$ A-Protein im Nukleus detektierbar sind, scheint der Bereich, welcher neben dem zweiten Teil der NLS und der Phosphorylierungsstelle am Serin27 zusätzlich in der SLy1 $\Delta$ -Mutante deletiert ist, für das Fehlen in der Kernfraktion verantwortlich zu sein. Möglicherweise findet im Falle der SLy1 $\Delta$ -Mutante jedoch auch eine Interaktion mit anderen Molekülen nicht mehr statt, so dass sich die subzelluläre Lokalisation dieses Proteins verändert.

Weitere Analysen des SLy1 $\Delta$ -Konstrukts oder der SLy1 $\Delta\Delta$ -Mauslinie könnten zur Aufklärung des beobachteten Phänomens dienlich sein. Ein zu der SLy1 $\Delta$ -Mutante analoges Molekül von SLy2 wurde nicht hergestellt, so dass nicht überprüft werden kann, ob eine solche Deletionsmutante von SLy2 ebenfalls nicht mehr im Zellkern lokalisiert.

Insgesamt liefert die im Verlauf der vorliegenden Arbeit durchgeführte Zellfraktionierung wertvolle Basisinformationen bezüglich der subzellulären Lokalisation von SLy1 und SLy2 in

An- und Abwesenheit charakteristischer Sequenzabschnitte. Zudem lassen sich Quervernetzungen zu anderen Analysen der vorliegenden Arbeit erkennen.

#### 4.2.2 Homodimerisierung des SLy1- und SLy2-Proteins

SH3- und SAM-Domänen sind typische Interaktionsmodule bei Adapterproteinen.

SH3-Domänen wurden ursprünglich als an prolinreiche Sequenzen bindende Module identifiziert (Feng, S. et al., 1994). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass diese Domänen ebenfalls mit arginin- und lysinreichen Abschnitten assoziieren (Kang, H. et al., 2000; Berry, D.M. et al., 2002). Zusätzlich konnte eine Bindung an Ubiquitin gezeigt werden (Stamenova, S.D. et al., 2007). Sogenannte „helically extended“ (hSH3)-Domänen wiederum sind in der Lage, mit Lipiden zu interagieren (Heuer, K. et al., 2005). Neben der Verknüpfung unterschiedlicher Proteine über SH3-Domänen und ihre Zielsequenzen wurde jedoch auch die Homodimerisierung von Proteinen mit Hilfe von SH3-Domänen beschrieben. Beispiele hierfür sind das Protein IB1 (Kristensen, O. et al., 2006), die humane Kinase Lck (Romir, J. et al., 2007) und die Tyrosin-Kinase Csk (Levinson, N.M. et al., 2009). Diese Beobachtungen legen nahe, dass SH3-Domänen in ihrem Interaktionsverhalten deutlich vielfältiger sind als zunächst angenommen.

SAM-Domänen sind wie SH3-Module an vielfältigen biologischen Prozessen beteiligt und zeigen ein breites Spektrum an Interaktionsmöglichkeiten. Eine vielfach beschriebene Funktion von Adaptern mit SAM-Domänen ist die Generierung von Homo- oder Heterodimeren. Zudem können SAM-Domänen auch zur Bildung von Oligomeren beitragen. Eine Bindung von SAM-Domänen an RNS wurde ebenfalls beschrieben (Kim, C.A. und Bowie, J.U., 2003). In weiteren Studien konnte zusätzlich auch eine Bindung von SAM-Domänen an Lipide gezeigt werden (Barrera, F.N. et al., 2003; Li, H. et al., 2007).

Da SLy1 und SLy2 sowohl eine SH3- als auch eine SAM-Domäne besitzen und für beide Module die Generierung von Homodimeren beschrieben wurde, bestand ein großes Interesse an einer möglichen Homodimerisierung beider Proteine.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen in der Tat die Homodimerisierung von SLy1 und SLy2, welche über die SH3-Domäne vonstatten geht (s. Abb. 13 und Abb. 23). Sowohl die SLy1 $\Delta$ SAM- als auch die SLy1 $\Delta$ NLS-, die SLy1 $\Delta$ PEST-H- und die SLy1 $\Delta$ PEST-L-Mutante interagieren genauso wie das wildtypische SLy1-Protein mit einem anderen wildtypischen SLy1-Konstrukt.

Das erste Beispiel für eine Homodimerisierung über eine SH3-Domäne war das Protein „Islet-brain 1“ (IB1 oder JIP-1), dessen stabiles Homodimer vielfältige Funktionen – zum Beispiel die Regulation der Insulinsekretion - beeinflusst (Kristensen, O. et al., 2006). IB1 stellt ein Gerüstprotein dar, welches im Signalweg der „c-Jun N-terminal kinase“ (JNK) fungiert (Kristensen, O. et al., 2006). Ähnlich wie bei SLy1 und SLy2 waren bis zur Identifizierung der

Homodimerisierung von IB1 über seine SH3-Domäne keine anderen Proteine bekannt, die an dieses Modul binden. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem in Kooperation mit Dr. Bernhard Reis etliche Versuche unternommen, sowohl für die SH3- als auch für die SAM-Domäne von SLy1 Interaktionspartner zu finden. Eine Affinitätspräzipitation mit einer GST-markierten SLy1-SH3-Domäne beziehungsweise einer GST-markierten SLy1-SAM-Domäne lieferte keinerlei Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnten auch mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems keine Interaktionspartner für die SH3- und die SAM-Domäne von SLy1 identifiziert werden. Hier lassen sich Parallelen zu IB1 erkennen. Für die SH3-Domäne von SLy2 konnte in vorherigen Analysen das Protein Cortactin als Interaktionspartner gefunden werden (v. Holleben, M., Dissertation). Für das SAM-Modul von SLy2 sind bislang jedoch noch keine interagierenden Proteine bekannt.

Die Aminosäureabfolge von IB1 enthält sieben PXXP-Motive, welche typischerweise mit SH3-Domänen interagieren. Allerdings ist an der Homodimerisierung von IB1 kein PXXP-Motiv beteiligt, da die SH3-Domäne selbst keine solche Sequenz aufweist (Kristensen, O. et al., 2006).

Die Analyse der Aminosäuresequenz von SLy1 zeigt, dass dieses Protein ebenfalls drei PXXP-Motive besitzt. SLy2 hingegen weist keinerlei PXXP-Sequenzabschnitte auf.

Vergleichbar mit IB1 ist in der SH3-Domäne von SLy1 jedoch kein solches Motiv vorhanden. Ein PXXP-Motiv findet sich bei SLy1 allerdings in der PEST-Sequenz mit der vorhergesagten hohen Stärke (PEST-H, s. Abb. 9). Interessanterweise ist bei der Homodimerisierung des wildtypischen SLy1-Proteins mit der SLy1 $\Delta$ PEST-H-Deletionsmutante eine sehr dicke Interaktionsbande zu erkennen (s. Abb. 13). Der Grund für dieses Phänomen ist bislang nicht bekannt. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass durch die Deletion des PEST-H-Moduls, und damit einer PXXP-Sequenz, die Interaktion mit der SH3-Domäne eines anderen Moleküls nicht mehr stattfinden kann und somit die Homodimerisierung von SLy1 erleichtert wird. Insgesamt ist die funktionelle Konsequenz einer Homodimerisierung von SLy1 und SLy2 noch nicht bekannt. Homodimerisierungen im Allgemeinen stellen allerdings wichtige regulative Mechanismen dar, um die Funktion von Proteinen zu modulieren. Es besteht zum Beispiel die Möglichkeit, dass Proteine erst als Homodimer funktionell aktiv werden. Auf der anderen Seite kann eine Homodimerisierung auch die Assoziation eines Proteins mit anderen Molekülen verhindern. Für IB1 konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül als ein Homodimer die Aktivität des Enzyms JNK erhöht (Kristensen, O. et al., 2006).

Weitere Untersuchungen bezüglich der Homodimerisierung von SLy1 und SLy2 könnten wichtige Bausteine im Zuge der Charakterisierung der molekularen Funktion dieser Proteine liefern. Zudem wäre eine Strukturanalyse der SH3-Domänen von SLy1 und SLy2 äußerst interessant, um strukturelle Gegebenheiten und Konsequenzen einer Homodimerisierung über dieses Modul näher zu beleuchten. Die Kristallstrukturaufklärung der SH3-Domäne von

IB1 beispielsweise ergab, dass bei der Homodimerisierung dieses Moleküls drei Aminosäuren in der SH3-Domäne entscheidend sind, bei deren Mutation das Dimer instabil wird (Kristensen, O. et al., 2006).

Im Zuge dieser Arbeit wurden bereits Vorarbeiten für die Strukturaufklärung der Domänen von SLy1 und SLy2 geleistet, welche in Ko-Operation mit der Arbeitsgruppe von Prof. D. Willbold in Jülich durchgeführt werden soll.

### 4.2.3 Interaktion von SLy1 und SLy2 mit Lipiden

Neben „klassischen“ Lipidinteraktionsdomänen wurden sowohl SH3-Domänen als auch SAM-Domänen bereits als an Lipide bindende Module identifiziert (Barrera, F.N. et al., 2003; Heuer, K. et al., 2005; Li, H. et al., 2007). Des Weiteren existieren auch polybasische Regionen (PBRs) in der Aminosäuresequenz von Proteinen, mit Hilfe derer diese Moleküle ebenfalls mit Lipiden assoziieren können. Polybasische Regionen sind reich an positiv geladenen Aminosäuren, wie beispielsweise Lysinresten, die an negativ geladene Kopfgruppen von phosphorylierten Lipiden binden können.

SLy1 und SLy2 besitzen keine typischen Protein-Lipid-Interaktionsdomänen. Allerdings ist neben der SH3- auch eine SAM-Domäne vorhanden, und die zweigeteilte NLS von SLy1 und SLy2 weist einen hohen Anteil an positiv geladenen Lysin- und Argininresten auf und stellt somit eine polybasische Region dar. Ein weiteres Indiz für eine mögliche Interaktion von SLy1 und SLy2 mit Lipiden ist die Tatsache, dass beide Proteine in der Zellfraktionierung in der membranösen und in der mitochondrialen Fraktion zu detektieren sind (s. Abb. 10 und Abb. 12 sowie Abb. 20 und Abb. 22). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Lipidinteraktionsanalysen für SLy1 und SLy2 durchgeführt. Diese ergaben, dass die wildtypischen Proteine, die SLy1S27→A-, die SLy2S23→A-, die SLy1ΔSAM-Mutante sowie die ΔSH3-Konstrukte beider Moleküle mit typischen Membranlipiden interagieren. Für das SLy2ΔSAM-Protein kann bezüglich einer Lipidinteraktion keine Aussage getroffen werden, da die bereits erwähnten Probleme mit diesem Konstrukt auch bei diesem Experiment zu Tage traten.

Das SLy1Δ-Molekül und auch die ΔNLS-Mutanten von SLy1 und SLy2 zeigen hingegen keine Assoziation mit Lipiden mehr (s. Abb. 14 B und 24).

SLy1 und SLy2 binden sowohl an die Monophosphoinositide PI(3)P, PI(4)P und PI(5)P als auch an die Diphosphoinositide PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub> und PI(4,5)P<sub>2</sub> sowie an das Triphosphoinositid PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (s. Abb. 14 B und Abb. 15 B sowie Abb. 24 und Abb. 25).

Zusätzlich ist eine Assoziation beider Proteine mit Phosphatidat (Diacylglycerin-3-phosphat), Phosphatidylserin und Cardiolipin (Diphosphatidylglycerin) zu beobachten (s. Abb. 14 B und Abb. 15 B sowie Abb. 24 und Abb. 25). Die Bindung von SLy1 und SLy2 an die verschiede-

nen Phosphoinositide ist zudem von der vorhandenen Lipidmenge abhängig und geschieht mit unterschiedlicher Affinität (s. Abb. 15 B und Abb. 25).

Alle Lipide, an die SLy1 und SLy2 binden, tragen eine negative Ladung und stellen entweder typische Lipide der Plasma- oder der Mitochondrienmembran (Cardiolipin) dar. PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> sind zudem auch im Zellkern lokalisiert (Gozani, O. et al., 2005).

Die Bindung von SLy1 und SLy2 an Cardiolipin kann gut mit der Mitochondrienlokalisierung beider Proteine erklärt werden. Möglicherweise ist die Assoziation mit Cardiolipin entscheidend für die Funktion von SLy1 als ein anti-apoptotisches Molekül während der Entwicklung von Thymozyten (Reis, B. et al., 2009).

Die Bindung von SLy1 und SLy2 an typische Lipide der Plasmamembran wäre eine Erklärung für die Detektion beider Proteine in der Membranfraktion. Das am häufigsten in der Zellmembran vorkommende Phosphoinositid ist PI(4,5)P<sub>2</sub>, an welches SLy1 und SLy2 unter anderem binden. Allerdings sind, wie bereits erwähnt, ein Teil der mit SLy1 und SLy2 interagierenden Lipide auch im Zellkern lokalisiert und modulieren dort eine ganze Reihe nukleärer Prozesse (Martelli, A.M. et al., 2004), unter ihnen auch PI(4,5)P<sub>2</sub>. Dieses Lipid induziert beispielsweise in T Zellen die Assoziation des sogenannten „SWI/SNF-like BAF-Komplexes“ mit Chromatin während der Stimulation der Zellen mit Antigenen und scheint auch beim Splicen von prä-mRNS-Molekülen eine wichtige Rolle zu spielen (Boronenkov, I.V. et al., 1998; Zhao, K. et al., 1998; Osborne, S.L. et al., 2001).

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Lipidinteraktionsexperimente geben keinen direkten Hinweis darauf, in welchem Zellkompartiment die Assoziation von SLy1 und SLy2 mit den jeweiligen Lipiden stattfindet. Dazu wären noch weitergehende Analysen nötig. Allerdings demonstrieren die in Abb. 14 B und Abb. 24 dargestellten Resultate eindeutig, dass sowohl das SLy1 $\Delta$ -Molekül als auch die  $\Delta$ NLS-Mutanten von SLy1 und SLy2 nicht mehr an Lipide binden können. Dies bestätigt die Annahme, dass die polybasische Region in und um die zweigeteilte NLS herum für die Interaktion mit den negativ geladenen Lipiden verantwortlich ist. Das SLy1 $\Delta$ -Molekül lokalisiert nur noch im Zytoplasma (s. Abb. 10). Es ist, genauso wie die  $\Delta$ NLS-Mutanten von SLy1 und SLy2, aber auch noch in der Membranfraktion zu detektieren. Da alle Moleküle nicht mehr eigenständig mit Lipiden interagieren können, ist ihr Auftreten in der Membranfraktion eventuell durch die Assoziation mit anderen Proteinen oder durch eine Homodimerisierung zu erklären. Falls SLy1 und SLy2 auch im Zellkern mit Lipiden interagieren können, wäre in diesem Zusammenhang eine interessante Fragestellung, ob in der  $\Delta$ NLS-Mutante von SLy1 und SLy2 Veränderungen bei nukleären Prozessen zu verzeichnen sind, da diese Moleküle immer noch im Zellkern zu detektieren sind, aber nicht mehr mit Lipiden interagieren.

Sowohl die SLy1 $\Delta$ SAM-Mutante als auch die  $\Delta$ SH3-Konstrukte von SLy1 und SLy2 binden an Lipide. Somit können diese beiden Module für die Lipidinteraktion ausgeschlossen werden. Im Falle der SH3-Domänen war eine Assoziation mit Lipiden allerdings auch eher unwahrscheinlich, da dieses Modul keine Sequenzähnlichkeit mit den mit Lipiden interagierenden sogenannten „helically extended“ (hSH3)-Domänen aufweisen.

Insgesamt liefert die im Zuge dieser Arbeit durchgeführte Lipidinteraktionsanalyse von SLy1 und SLy2 sehr interessante Einsichten in das Interaktionsverhalten dieser Proteine. Lipide sind für die Regulation und Kontrolle vieler zellulärer Funktionen von essenzieller Bedeutung. Insbesondere spielen sie für die Signaltransduktion eine wichtige Rolle.

Vorherige Analysen zu SLy1 zeigen, dass dieses Molekül in der Signaltransduktion nach der Stimulation von T Zellen über den T Zellrezeptor involviert sein könnte. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass eine Assoziation mit Lipiden dabei eine wichtige Rolle spielt. Weitergehende Untersuchungen sind für eine Validierung dieser Vermutung allerdings vonnöten.

Ebenso sind weiterführende Analysen bezüglich der funktionellen Relevanz der Lipidbindung von SLy2 nötig.

#### **4.2.4 Interaktion von SLy1 und SLy2 mit 14-3-3 Proteinen**

Durch die Phosphorylierung von SLy1 am Serin27 entsteht ein Sequenzmuster, welches bis auf eine Position einer Konsensusbindestelle für 14-3-3 Proteine entspricht (Dougherty, M.K. und Morrison, D.K., 2004). Die putative Phosphorylierung von SLy2 am Serin23 generiert ebenfalls eine solche Konsensussequenz.

Die Interaktion von 14-3-3 Proteinen mit ihren Zielmolekülen dient oftmals der Regulation der subzellulären Lokalisation letzterer (Muslin, A.J. und Xing, H., 2000). Häufig findet die Bindung von 14-3-3 Proteinen in der Nähe der NLS ihrer Zielmoleküle statt, wodurch diese maskiert wird. Dies bewirkt nachfolgend eine Retention des Zielproteins im Zytoplasma. Zusätzlich kann die Bindung an 14-3-3 Proteine eine „Gerüstfunktion“ darstellen, so dass makromolekulare Komplexe entstehen können. Die Bindung an 14-3-3 Proteine kann beim Interaktionspartner auch eine Konformationsänderung bewirken, die wiederum für die Eigenschaften dieses Moleküls entscheidend ist (Dougherty, M.K. und Morrison, D.K., 2004; Bridges, D. und Moorhead, G.B., 2005).

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, interagieren wildtypisches SLy1 und SLy2 mit allen sieben in Säugetieren bekannten Isoformen der 14-3-3 Proteine (s. Abb. 18 und Abb. 28). Im Falle einer Mutation der Phosphorylierungsstelle von SLy1 am Serin27 zu einem Alanin wird diese Interaktion fast vollständig unterbunden (s. Abb. 18). Die Phosphorylierungsstelle von SLy1 liegt zwischen den beiden Teilen der NLS. Somit könnte die Interaktion von SLy1 mit 14-3-3 Proteinen einen wichtigen regulativen Mechanismus für die subzelluläre Lokalisation dieses Moleküls darstellen. Die subzelluläre Fraktionierung ergab, dass die

SLy1S27→A-Mutante zwar auch im Zytosol lokalisiert, die deutlich dickere Bande im Nukleus weist jedoch auf eine verstärkte nukleäre Lokalisation hin (s. Abb. 10). Vorherige Analysen zeigen ein vergleichbares beziehungsweise noch deutlicheres Ergebnis (Reis, B. Dissertation).

Die Tatsache, dass bei der SLy1S27→A-Mutante noch eine leichte Interaktionsbande mit 14-3-3 Proteinen zu erkennen ist, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Phosphorylierung am Serin27 zwar die wichtigste Voraussetzung für die Assoziation mit diesen Molekülen ist, aber eventuell noch andere Phosphorylierungsstellen eine untergeordnete Rolle spielen. Dies wäre auch eine Erklärung für den Anteil der SLy1S27→A-Mutante im Zytoplasma.

Interessanterweise sollte das SLy1Δ-Molekül aufgrund des Fehlens der Phosphorylierungsstelle am Serin27 ebenfalls nur sehr schlecht mit 14-3-3 Proteinen interagieren können. Aus diesem Grund sollte man für diese Mutante eine verstärkte Lokalisation im Zellkern erwarten. Dies ist, wie bereits mehrfach erwähnt, nicht der Fall, denn das SLy1Δ-Konstrukt befindet sich ausschließlich im Zytosol (s. Abb. 10). Somit zeigt sich, dass dieses Lokalisationsverhalten durch die teilweise Deletion der NLS und nicht durch das Fehlen der Phosphorylierungsstelle zustande kommt. Eine Interaktion des SLy1Δ-Proteins mit 14-3-3 Proteinen im Zytoplasma sollte vermutlich aber ähnlich schlecht wie bei der SLy1S27→A-Mutante möglich sein.

Zusammen mit Resultaten aus vorherigen Analysen zur subzellulären Lokalisation von SLy1 liefert die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Interaktion von SLy1 mit 14-3-3 Proteinen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der molekularen Funktion von SLy1.

Im Gegensatz zu dem SLy1S27→A-Konstrukt ist die SLy2S23→A-Mutante immer noch in der Lage, ähnlich stark wie das wildtypische SLy2-Protein an 14-3-3 Proteine zu binden (s. Abb. 28). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die putative Phosphorylierung von SLy2 am Serin23 allein nicht ausschlaggebend für die Assoziation mit 14-3-3 Proteinen ist. Vielmehr scheinen noch weitere Phosphorylierungsstellen für diese Interaktion essenziell zu sein. Um das Serin23 herum befinden sich noch zwei weitere Serine, welche ebenfalls phosphoryliert werden könnten. Insgesamt besitzt SLy2 54 Serine und 19 Threonine, so dass etliche weitere Möglichkeiten für eine phosphorylierungsabhängige Assoziation mit 14-3-3 Proteinen bestehen. Oftmals benötigen 14-3-3 Proteine mehr als eine Phosphorylierung an ihrem Zielprotein, um mit diesem interagieren zu können, da 14-3-3 Moleküle häufig als Dimere vorkommen und auch als solche an ihre Zielproteine binden.

In der Aminosäureabfolge von SLy2 konnte keine weitere eindeutige 14-3-3 Konsensusbindestelle identifiziert werden. In der Literatur sind jedoch viele Beispiele beschrieben, bei denen eine Interaktion von Molekülen mit 14-3-3 Proteinen über untypische

Bindemotive stattfindet. Eine weitere Möglichkeit besteht auch in einer phosphorylierungsunabhängigen Assoziation.

Diese Hypothese konnte für SLy2 allerdings nicht bestätigt werden, da nach einer unspezifischen Dephosphorylierung von SLy2-enthaltenden Lysaten eine Interaktion mit 14-3-3 Proteinen nicht mehr nachweisbar war (s. Abb. 29). Dieses Resultat liefert jedoch keinen Hinweis darauf, welche Phosphorylierungsstellen in der Aminosäuresequenz von SLy2 für die Assoziation mit 14-3-3 Proteinen entscheidend sind. Für eine solche Analyse müssten neben dem SLy2S23→A-Konstrukt auch weitere Mutanten von SLy2 erstellt werden, bei denen potenzielle Phosphorylierungsstellen mutiert sind.

Die Bindung von SLy2 an 14-3-3 Proteine wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht nur mittels Affinitätspräzipitation (s. Abb. 28) und Ko-Immünpräzipitation (s. Abb. 27), sondern auch mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen (s. Abb. 30) in Kooperation mit Dr. Cornelia Beuter-Gunia dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass SLy2 und 14-3-3 $\beta$ , welches exemplarisch für die 14-3-3 Proteinfamilie ausgewählt wurde, erwartungsgemäß im Zytoplasma der transfizierten HeLa Zellen ko-lokalisieren. Zudem zeigte die Analyse des nukleären Anteils von SLy2 in An- und Abwesenheit von 14-3-3 $\beta$ , dass dieser Anteil um ungefähr 50% reduziert wird, wenn 14-3-3 $\beta$  anwesend ist. Dieses Resultat bestätigt die bereits erwähnte häufige Funktion einer Assoziation mit 14-3-3 Proteinen, dass die Bindung von 14-3-3 Molekülen an ihre Zielproteine zu einer Retention letzterer im Zytoplasma führt. Aufgrund der Tatsache, dass die SLy2S23→A-Mutante immer noch an 14-3-3 Proteine bindet, eine unspezifische Dephosphorylierung von SLy2 die Assoziation jedoch unterbindet und die Interaktion von SLy2 mit 14-3-3 Proteinen die subzelluläre Lokalisation von SLy2 beeinflusst, ist anzunehmen, dass eine weitere Phosphorylierungsstelle in der Nähe der zweigeteilten NLS von SLy2 für die Assoziation mit 14-3-3 Proteinen essenziell ist. Die potenzielle Phosphorylierung am Serin23 kann dabei auch eine Rolle spielen.

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit generierten Befunde bezüglich der Interaktion von SLy2 mit 14-3-3 Proteinen und deren Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von SLy2 liefern wertvolle Informationen für die funktionelle Charakterisierung dieses Proteins und können als Grundlage für weitere Analysen sehr hilfreich sein.

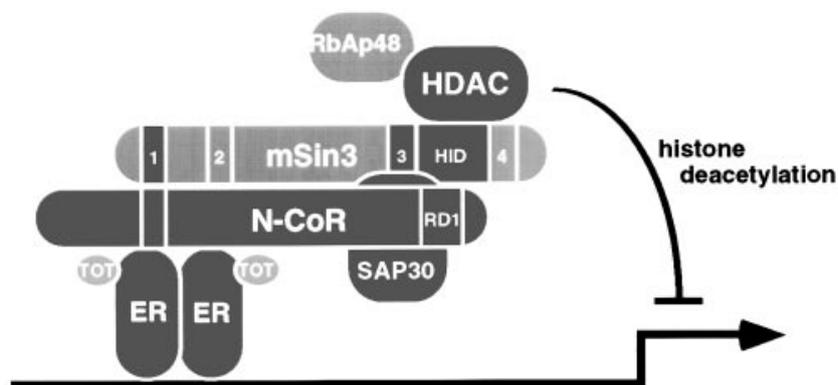
#### **4.2.5 Identifizierung weiterer Interaktionspartner von SLy1 und SLy2**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Suche nach weiteren Interaktionspartnern von SLy1 mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems führte zu keinem Ergebnis. Auch andere Ansätze zur Identifizierung an SLy1 bindender Proteine lieferten keine Resultate. Ein Grund für das Scheitern der unterschiedlichen experimentellen Ansätze ist nicht bekannt. Möglicherweise wurden bislang noch nicht die richtigen Bedingungen für die Interaktionsanalyse von SLy1 eingesetzt.

Eine Heterodimerisierung von SLy1 und SLy2 konnte sowohl in vorherigen Analysen als auch in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Interaktionsanalyse von SLy2 mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems lieferte als Ergebnis das Protein „Sin3-associated polypeptide 30“ (SAP30). Die Assoziation zwischen SLy2 und SAP30 konnte nachfolgend ebenfalls durch Ko-Immunpräzipitationen (s. Abb. 31) und Affinitätspräzipitationen (s. Abb. 32) bestätigt werden.

SAP30 stellt eine Komponente des sogenannten Sin3-HDAC1-Ko-Repressorkomplexes dar, welcher aus mindestens zehn Polypeptiden besteht, deren molekulare Funktion in diesem Komplex in vielen Fällen noch nicht aufgeklärt ist. Bekannte Moleküle des Komplexes sind neben Sin3 und SAP30 auch die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2. Für SAP30 konnte bereits eine molekulare Interaktion mit Sin3 und HDAC1 nachgewiesen werden (Zhang, Y. et al., 1998). Des Weiteren wird SAP30 als ein Gerüstprotein beschrieben, welches verschiedene Transkriptionsrepressoren – zum Beispiel das Molekül „Yin Yang1“ (YY1) – oder Ko-Repressoren wie die Proteine „CBF1-interacting corepressor“ (CIR), „Retinoblastoma-binding protein1“ (RBP1) oder „Nuclear receptor corepressor“ (N-CoR) mit dem Sin3-HDAC1-Komplex assoziiert (s. Abb. 36).



**Abbildung 36: Modell für die Funktion von SAP30 bei der N-CoR-vermittelten Transkriptionsrepression**

Die Repression durch spezifische Transkriptionsfaktoren - wie durch den an Transhydroxytamoxifen (TOT)-gebundenen Östrogen-Rezeptor (ER) – erfordert die Interaktion mit einem Ko-Repressorkomplex, welcher aus N-CoR, mSin3, HDAC und SAP30 besteht. Die nachfolgende Deacetylierung der mit den Zielgenen assoziierten Nucleosomen induziert chromosomale Veränderungen, welche zu einer Inhibition der Transkription der Zielgene führen (nach Laherty, C.D. et al., 1998).

Neuere Studien belegen allerdings, dass SAP30 im Gegensatz zu Sin3 selbst an DNS binden kann (Viiri, K.M. et al., 2009). So konnten Viiri *et al.* demonstrieren, dass SAP30 an nukleäre Monophosphoinositide bindet, und dass diese Lipidinteraktion die Assoziation von SAP30 mit DNS reguliert (Viiri, K.M. et al., 2009).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte neben der Interaktion von SLy2 mit SAP30 auch die Bindung von SLy2 an HDAC1 gezeigt werden (s. Abb. 33). HDAC1 ist, wie bereits erwähnt, ein weiteres Molekül des Sin3-Komplexes und sorgt durch die Deacetylierung von nukleosomalen Histonen für die Transkriptionsrepression von Zielgenen. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit die Generierung eines ternären Komplexes bestehend aus SLy2, SAP30 und HDAC1 dargestellt werden (s. Abb. 34). Funktionell wurde des Weiteren eine gesteigerte enzymatische Aktivität von HDAC1 in Anwesenheit von SLy2 beobachtet (s. Abb. 35).

Als Negativkontrolle wurde eine mögliche Interaktion von SLy1 mit SAP30 und HDAC1 analysiert. SLy1 assoziiert jedoch weder mit SAP30 noch mit HDAC1 (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund stellt einen interessanten Unterschied zwischen den beiden Mitgliedern der SLy Proteinfamilie dar und weist auf eine voneinander abweichende Funktion beider Moleküle hin.

Das putative Adapterprotein SLy2 besitzt mit seiner SH3- und SAM-Domäne zwei typische Interaktionsmodule. Möglicherweise fungiert SLy2 als ein Gerüstmolekül im SAP30-HDAC1-Komplex, welches durch die Interaktion mit weiteren Proteinen zu der Generierung eines Multiprotein-Komplexes beiträgt, der nachfolgend die Aktivität von HDAC1 beeinflusst. Die genaue Charakterisierung der Funktion von SLy2 im SAP30-HDAC1-Komplex bedarf allerdings weiterer Analysen. Eine interessante Fragestellung in diesem Zusammenhang ist, ob SLy2 neben SAP30 und HDAC1 auch mit anderen Molekülen des beschriebenen Sin3-HDAC1-Komplexes interagiert.

In vorherigen Analysen konnte gezeigt werden, dass Proteine, die mit Histondeacetylasen assoziieren, in vielen Fällen eine ko-aktivierende Funktion auf die HDACs ausüben (Gallinari, P. et al., 2007). Aufgereinigte, rekombinante HDACs sind – mit Ausnahme von HDAC8 – in der Regel enzymatisch inaktiv (Sengupta, N. und Seto, E., 2004).

Das Molekül „Suppressor of defective silencing3“ (SDS3) wurde beispielsweise als eine neue integrale Komponente des Sin3-HDAC1-Komplexes identifiziert, welche die Aktivität von HDAC1 steigert (Alland, L. et al., 2002). Die Assoziation spezifischer Proteine mit Histondeacetylasen inklusive einer Steigerung der enzymatischen Aktivität der HDACs könnte einen generellen Mechanismus darstellen, der für eine räumliche Beschränkung der HDAC-Aktivität an spezifischen Promotor-Stellen sorgt (Gallinari, P. et al., 2007). Die Rekrutierung des Sin3-HDAC1-Komplexes zu solchen Promotor-Stellen findet mit Hilfe von Proteinen statt, die sequenzspezifisch an DNS binden.

Claudio *et al.* zeigen eine Expression des humanen SLy2-Gens in Myelomzelllinien sowie in Proben von Patienten, welche an einer akuten myeloiden Leukämie erkrankten (Claudio, J.O. et al., 2001). Yamada *et al.* hingegen beschreiben eine Herunterregulierung der SLy2-Expression in humanen Lungenkarzinomzelllinien (Yamada, H. et al., 2008). Ferner diskutie-

ren die Autoren eine mögliche Rolle von SLy2 als ein Tumorsuppressor. Allerdings konnte die genaue Funktion von SLy2 bei der Entstehung von Lungentumoren im Zuge dieser Publikation nicht dargestellt werden.

Interessanterweise assoziiert der Tumorsuppressor „Inhibitor of cell growth1b“ (ING1b) ebenfalls mit dem Sin3-HDAC1-Komplex (Skowyra, D. et al., 2001). ING1b vermag über seinen sogenannten „plant homeodomain (PHD) finger“ an DNS zu binden (Skowyra, D. et al., 2001). PHD-Finger sind Module, welche häufig in nukleären Proteinen gefunden werden, die einen regulativen Einfluss auf das Chromatin ausüben können. Zudem wurde beschrieben, dass PHD-Finger als nukleäre Rezeptoren für Phosphoinositide dienen (Gozani, O. et al., 2005).

Es gibt zwar keinen Hinweis darauf, dass SLy2 einen PHD-Finger besitzt, allerdings konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Assoziation von SLy2 mit Phosphoinositiden über die polybasische NLS dieses Moleküls gezeigt werden. Unter den mit SLy2 interagierenden Phosphoinositiden befanden sich Spezies, die auch im Zellkern vorkommen. Da jedoch bislang noch nicht geklärt werden konnte, in welchem Zellkompartiment die Lipidinteraktion von SLy2 stattfindet, bedarf es weiterer Analysen, um eine mögliche Relevanz der Bindung von SLy2 an Phosphoinositide bezüglich der Funktion dieses Moleküls im SAP30-HDAC1-Komplex darstellen zu können.

Die im Verlauf dieser Arbeit erzielten Resultate im Hinblick auf die Interaktion von SLy2 mit SAP30 und HDAC1 und die gesteigerte Aktivität von HDAC1 in Anwesenheit von SLy2 sind wichtige Bausteine für die funktionelle Charakterisierung dieses Proteins. Sie beschreiben SLy2 als eine neue, wahrscheinlich temporäre, Komponente eines mittlerweile gut beschriebenen Komplexes.

Ungeklärt ist allerdings, mit welchem Sequenzabschnitt SLy2 an SAP30 und HDAC1 bindet. Sowohl für SAP30 als auch für HDAC1 konnte bislang keine Interaktion mit anderen Molekülen über SH3- oder SAM-Domänen nachgewiesen werden. Analog dazu bindet sowohl die SLy2 $\Delta$ SH3- als auch die SLy2 $\Delta$ SAM-Mutante weiterhin an SAP30 und HDAC1 (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund müssten in weiterführenden Analysen größere Abschnitte der SLy2-Sequenz deletiert und nachfolgend die Assoziation mit SAP30 und HDAC1 untersucht werden.

Eine Funktion von SLy2 bei der Entstehung von Tumoren ist noch nicht abschließend analysiert. Aufgrund der Tatsache, dass der SAP30-HDAC1-Komplex seine transkriptionsreprimierende Funktion auf eine Vielzahl von Genen ausübt, besteht die Möglichkeit, dass SLy2 seine potenzielle Aufgabe bei der Entstehung von Tumoren über diesen Komplex wahrnimmt. Wie bereits erwähnt, assoziieren auch Tumorsuppressoren wie das Molekül ING1b mit dem SAP30-HDAC1-Komplex und erfüllen ihre Funktion mit Hilfe dieses Komplexes.

Für das dritte Mitglied der SLy Proteinfamilie, SASH1, konnte bislang schon eine Tumorsuppressorfunktion bei Brust-, Leber- und Kolonkarzinomen identifiziert werden (Zeller, C. et al., 2003; Rimkus, C. et al., 2006). Aus diesem Grund ist es denkbar, dass auch die anderen Mitglieder der SLy Familie eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen. Eine Interaktion von SASH1 mit Komponenten des SAP30-HDAC1-Komplexes wurde bislang allerdings nicht untersucht.

Weiterführende Analysen, insbesondere auch mit den mittlerweile generierten SLy2<sup>-/-</sup> und den SLy2-transgenen Mäusen, können in Zukunft zusätzliche Erkenntnisse über die genaue molekulare Funktion von SLy2 als Komponente des SAP30-HDAC1-Komplexes liefern.

Bislang konnte noch kein direkter Zusammenhang zwischen einer zuvor beschriebenen Funktion von SLy2 als ein neuer Regulator des Aktin-Zytoskeletts (v. Holleben, M., Dissertation) und der Anwesenheit von SLy2 im SAP30-HDAC1-Komplex gefunden werden. Allerdings ist bekannt, dass die Transkription von *RhoB*, einem Mitglied der Rho Familie kleiner GTPasen, gewebsspezifisch im Verlauf des Zellalterungsprozesses durch Histonmodifikationen über HDAC1 herunterreguliert wird. *RhoB* ist entscheidend für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts und spielt eine essenzielle Rolle bei maligner Transformation sowie bei genotoxischer, stressinduzierter Signalweiterleitung (Yoon, Y.S. et al., 2007). In vorherigen Analysen konnte gezeigt werden, dass *RhoB* als ein Tumorsuppressor beziehungsweise als ein negativ modulierendes Molekül beim Fortschreiten von Tumoren fungiert (Prendergast, G.C., 2001). Das Herunterregulieren der Transkription des *RhoB*-Gens im Zuge des Alterungsprozesses kann somit zu einer vermehrten, gewebsspezifischen malignen Transformation von Zellen führen (Yoon, Y.S. et al., 2007).

Die beschriebenen Effekte von SLy2 auf das Aktin-Zytoskelett scheinen über das ebenfalls zur Rho-Familie kleiner GTPasen gehörende Molekül Rac1 vermittelt zu werden (v. Holleben, M., Dissertation). Bislang ist allerdings ungeklärt, ob auch andere Mitglieder der Rho-Familie an einem Effekt von SLy2 auf das Zytoskelett beteiligt sind. Möglicherweise findet die Modifikation des Zytoskeletts durch SLy2 unter anderem über eine transkriptionelle Regulation statt. Für eine vollständige Aufklärung dieser Befunde sind allerdings weiterführende Analysen vonnöten.

### 4.3 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein wichtiger Beitrag zum Verständnis des molekularen Interaktionsverhaltens der putativen Adapterproteine SLy1 und SLy2 geleistet. Es konnten grundlegende Informationen über die subzelluläre Lokalisation der wildtypischen Proteine im Vergleich zu Deletionsmutanten von SLy1 und SLy2 gewonnen werden.

Die Interaktionsanalyse von SLy1 und SLy2 ergab eine Homodimerisierung beider Moleküle über die SH3-Domäne. Die funktionelle Relevanz dieser Homodimerisierung wird in weiterführenden Analysen zu klären sein. Insbesondere die Strukturaufklärung der vollständigen Proteine beziehungsweise der SH3- und der SAM-Domäne von SLy1 und SLy2 können hierbei einen wichtigen Beitrag leisten.

In dieser Arbeit konnte neben der Homodimerisierung von SLy1 und SLy2 auch deren Assoziation mit negativ geladenen Lipiden identifiziert werden. Die Bindung von Molekülen an Lipide kann einen ganz entscheidenden Einfluss auf ihre molekulare Funktion ausüben. Inwieweit die Interaktion von SLy1 und SLy2 mit Lipiden regulativ auf die Funktion beider Proteine einwirkt, muss in weiteren Experimenten aufgeklärt werden. Besonders aufschlussreich in diesem Zusammenhang wird die Fragestellung sein, in welchem Zellkompartiment SLy1 und SLy2 an die identifizierten Lipide binden. Fraktionierte Zellysen können hierbei Aufschluss geben.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Darstellung einer molekularen Interaktion von SLy1 und SLy2 mit 14-3-3 Proteinen. Diese Assoziation scheint einen essenziellen Einfluss auf die Regulation der subzellulären Lokalisation beider Moleküle auszuüben, da für SLy2 gezeigt werden konnte, dass der nukleäre Anteil dieses Proteins in Anwesenheit von 14-3-3 $\beta$  um ungefähr 50% abnimmt. Eine analoge Analyse für SLy1 muss in zukünftigen Experimenten durchgeführt werden. Die Identifikation einer Bindung von SLy1 und SLy2 an 14-3-3 Proteine stellt eine wichtige Erkenntnis für die molekulare Charakterisierung beider Proteine dar und kann in weiterführenden Analysen als eine entscheidende Grundlage für das Verständnis des Lokalisations- und Interaktionsverhaltens von SLy1 und SLy2 genutzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Interaktionspartner von SLy2 identifiziert: SAP30 und HDAC1. Zudem konnte eine Steigerung der enzymatischen Aktivität von HDAC1 in Anwesenheit von SLy2 dargestellt werden. Dieses Resultat demonstriert eine nukleäre Funktion von SLy2, welche möglicherweise die Basis für die Gesamtfunktion von SLy2 darstellt. Zukünftige Experimente, insbesondere die Identifikation von Zielgenen, die durch die Anwesenheit von SLy2 im SAP30-HDAC1-Komplex beeinflusst werden, können noch tiefer gehende Einblicke in die funktionelle Relevanz von SLy2 im SAP30-HDAC1-Komplex liefern. Eine Analyse der SLy2<sup>-/-</sup>- und der SLy2-transgenen Mäuse wird dabei ebenfalls von Nutzen sein.

## 5 Zusammenfassung

Die putativen Adapterproteine der SLy (SH3 Protein expressed in Lymphocytes) Familie sind durch das Vorhandensein einer SH3- und einer SAM-Domäne sowie einer zweigeteilten nukleären Lokalisationssequenz (NLS) charakterisiert. Für ein tieferes Verständnis der molekularen Funktion von SLy1 und SLy2 wurden in der vorliegenden Arbeit das Interaktionsverhalten sowie die subzelluläre Lokalisation von SLy1 und SLy2 analysiert.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass beide Proteine sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisieren. Sie sind zudem in der Membran- und der Mitochondrienfraktion detektierbar. Weder die Deletion der SH3- und der SAM-Domäne noch die Deletion des zweiten Teils der NLS verändert die subzelluläre Lokalisation beider Moleküle wesentlich. Lediglich das SLy1 $\Delta$ -Protein, bei dem ein Teil der NLS und die phosphorylierbare Aminosäure Serin27 deletiert sind, weist eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation auf.

Im Zuge der Interaktionsanalyse von SLy1 und SLy2 konnte eine über die SH3-Domäne vermittelte Homodimerisierung sowie eine Assoziation von SLy1 und SLy2 mit negativ geladenen Lipiden identifiziert werden. Die Lipid-Interaktion von SLy1 und SLy2 findet mit Hilfe einer polybasischen Region in und um die NLS beider Moleküle statt. Bei den mit SLy1 und SLy2 interagierenden Lipiden handelt es sich um Membran- und nukleäre Lipide.

Im weiteren Verlauf konnte eine phosphorylierungsabhängige Bindung beider SLy-Moleküle an 14-3-3 Proteine dargestellt und insbesondere für SLy2 ein regulativer Mechanismus dieser Interaktion bezüglich der subzellulären Lokalisation aufgezeigt werden. Die Assoziation von SLy2 mit 14-3-3 Proteinen bewirkt eine Retention des Moleküls im Zytoplasma. Für SLy1 wurde die Phosphorylierung am Serin27 als hauptverantwortliche Phosphorylierungsstelle in Bezug auf die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen identifiziert. Die bei SLy2 dazu analoge, potenzielle Phosphorylierungsstelle am Serin23 spielt bei der Assoziation mit 14-3-3 Proteinen hingegen eine eher untergeordnete Rolle.

Für die Suche nach weiteren Interaktionspartnern von SLy1 und SLy2 wurde das Hefe Zwei-Hybrid-System angewendet, mit dessen Hilfe für SLy1 keine Interaktionspartner gefunden werden konnten. Für SLy2 konnte als Interaktionspartner das Molekül SAP30 identifiziert werden, welches eine Komponente des nukleären Sin3-HDAC1-Komplexes ist. Schließlich konnten neben der Bindung von SLy2 an SAP30 auch die Interaktion von SLy2 mit der Histondeacetylase HDAC1 und die Generierung eines ternären Komplexes bestehend aus SAP30, HDAC1 und SLy2 mittels Ko-Immunpräzipitation gezeigt werden. Funktionell bewirkt die Assoziation von SLy2 mit HDAC1 eine Steigerung der enzymatischen Aktivität von HDAC1. Der beobachtete Befund stellt eine wichtige Grundlage für eine weitere funktionelle Charakterisierung von SLy2 dar und könnte eine Erklärung der Funktion von SLy2 bei der malignen Transformation von Zellen liefern.

## 6 Summary

The putative adaptor proteins of the SLy (SH3 Protein expressed in Lymphocytes) family are characterized by the existence of a SH3- and a SAM domain as well as a bipartite nuclear localization sequence (NLS).

For a deeper understanding of the molecular function of SLy1 and SLy2 the interaction behaviour as well as the subcellular localization of SLy1 and SLy2 were analyzed in the present work.

First of all it could be shown that the two proteins localize both in the cytoplasm and in the nucleus. They are furthermore detectable in the membrane and in the mitochondria fraction. Neither the deletion of the SH3 and of the SAM domain nor the deletion of the second part of the NLS considerably changes the subcellular localization of both molecules. Only the SLy1 $\Delta$  protein which lacks a part of the NLS and the phosphorable amino acid serine27 shows an exclusive cytoplasmic localization.

In the course of the interaction analysis of SLy1 and SLy2 a homodimerization mediated via the SH3 domain as well as an association of SLy1 and SLy2 with negatively charged lipids could be identified. The lipid interaction of SLy1 and SLy2 occurs via a polybasic region in and around the NLS of both molecules. The lipids that interact with SLy1 and SLy2 are membrane as well as nuclear lipids.

In the further course a phosphorylation-dependent association of both SLy molecules with 14-3-3 proteins and in particular for SLy2 a regulative mechanism of this interaction concerning the subcellular localization of SLy2 were shown. The association of SLy2 with 14-3-3 proteins causes retention of the molecule in the cytoplasm. For SLy1 the phosphorylation at serine27 was identified to be the main responsible phosphorylation site with respect to the interaction with 14-3-3 proteins. On the other hand the analogous potential SLy2 phosphorylation site at serine23 only plays a subordinate role with regard to the association with 14-3-3 proteins.

For the search of further interaction partners of SLy1 and SLy2 the yeast two hybrid system was applied that did not result in finding interaction partners for SLy1. For SLy2 the molecule SAP30 could be identified as an interaction partner which is a component of the nuclear Sin3-HDAC1 complex. Finally next to the association of SLy2 with SAP30 also the interaction of SLy2 with the histone deacetylase HDAC1 and the generation of a ternary complex composed of SAP30, HDAC1 and SLy2 were shown by means of co-immunoprecipitation. Functionally the association of SLy2 with HDAC1 causes an increase of the enzymatic activity of HDAC1. The observed findings represent an important basis for a further functional characterization of SLy2 and might provide an explanation for the function of SLy2 with respect to the malignant transformation of cells.

## 7 Literaturverzeichnis

Ahringer, J. (2000). NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet.* **16**, 351-356.

Aitken, A. (2002). Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. *Plant Mol. Biol.* **50**, 993-1010.

Aitken, A. (2006). 14-3-3 proteins: a historic overview  
1. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 162-172.

Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J. und Patel, Y. (1995). 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF. *J. Biol. Chem.* **270**, 5706-5709.

Ali, S.A. und Steinkasserer, A. (1995). PCR-ligation-PCR mutagenesis: a protocol for creating gene fusions and mutations. *Biotechniques* **18**, 746-750.

Alland, L., David, G., Shen-Li, H., Potes, J., Muhle, R., Lee, H.C., Hou, H., Jr., Chen, K. und De-Pinho, R.A. (2002). Identification of mammalian Sds3 as an integral component of the Sin3/histone deacetylase corepressor complex  
1. *Mol. Cell Biol.* **22**, 2743-2750.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

Astoul, E., Laurence, A.D., Totty, N., Beer, S., Alexander, D.R. und Cantrell, D.A. (2003). Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* **278**, 9267-9275.

Ayer, D.E., Lawrence, Q.A. und Eisenman, R.N. (1995). Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3  
2. *Cell* **80**, 767-776.

Bannister, A.J., Miska, E.A., Gorlich, D. und Kouzarides, T. (2000). Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr. Biol.* **10**, 467-470.

Barrera, F.N., Poveda, J.A., Gonzalez-Ros, J.M. und Neira, J.L. (2003). Binding of the C-terminal sterile alpha motif (SAM) domain of human p73 to lipid membranes. *J. Biol. Chem.* **278**, 46878-46885.

Beer, S., Scheikl, T., Reis, B., Huser, N., Pfeffer, K. und Holzmann, B. (2005). Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 9646-9660.

Beer, S., Simins, A.B., Schuster, A. und Holzmann, B. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1520**, 89-93.

Berry, D.M., Nash, P., Liu, S.K., Pawson, T. und McGlade, C.J. (2002). A high-affinity Arg-X-X-Lys SH3 binding motif confers specificity for the interaction between Gads and SLP-76 in T cell signaling. *Curr. Biol.* **12**, 1336-1341.

- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Boronenkov, I.V., Loijens, J.C., Umeda, M. und Anderson, R.A. (1998). Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol. Biol. Cell* 9, 3547-3560.
- Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D. und Broach, J.R. (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation  
1. *Genes Dev.* 7, 592-604.
- Bridges, D. und Moorhead, G.B. (2005). 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci. STKE.* 2005, re10.
- Chen, C.A. und Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6, 632-638.
- Claudio, J.O., Zhu, Y.X., Benn, S.J., Shukla, A.H., McGlade, C.J., Falcioni, N. und Stewart, A.K. (2001). HACS1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells. *Oncogene* 20, 5373-5377.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69, 2110-2114.
- Di Pietro, S.M., Cascio, D., Feliciano, D., Bowie, J.U. und Payne, G.S. (2010). Regulation of clathrin adaptor function in endocytosis: novel role for the SAM domain. *EMBO J.*
- Dougherty, M.K. und Morrison, D.K. (2004). Unlocking the code of 14-3-3  
1. *J. Cell Sci.* 117, 1875-1884.
- Emiliani, S., Fischle, W., Van Lint, C., Al Abed, Y. und Verdin, E. (1998). Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 2795-2800.
- Feng, S., Chen, J.K., Yu, H., Simon, J.A. und Schreiber, S.L. (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* 266, 1241-1247.
- Filippakopoulos, P., Kofler, M., Hantschel, O., Gish, G.D., Grebien, F., Salah, E., Neudecker, P., Kay, L.E., Turk, B.E., Superti-Furga, G., Pawson, T. und Knapp, S. (2008). Structural coupling of SH2-kinase domains links Fes and Abl substrate recognition and kinase activation. *Cell* 134, 793-803.
- Fleischer, T.C., Yun, U.J. und Ayer, D.E. (2003). Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex  
1. *Mol. Cell Biol.* 23, 3456-3467.
- Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M. und Steinkuhler, C. (2007). HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics  
1. *Cell Res.* 17, 195-211.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A. und Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.

- Gitton, Y., Dahmane, N., Baik, S., Altaba, A., Neidhardt, L., Scholze, M., Herrmann, B.G., Kahlem, P., Benkahla, A., Schrinner, S., Yildirimman, R., Herwig, R., Lehrach, H. und Yaspo, M.L. (2002). A gene expression map of human chromosome 21 orthologues in the mouse. *Nature* **420**, 586-590.
- Gozani, O., Field, S.J., Ferguson, C.G., Ewalt, M., Mahlke, C., Cantley, L.C., Prestwich, G.D. und Yuan, J. (2005). Modification of protein sub-nuclear localization by synthetic phosphoinositides: evidence for nuclear phosphoinositide signaling mechanisms  
1. *Adv. Enzyme Regul.* **45**, 171-185.
- Gregoret, I.V., Lee, Y.M. und Goodson, H.V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis  
1. *J. Mol. Biol.* **338**, 17-31.
- Grozinger, C.M. und Schreiber, S.L. (2002). Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors  
1. *Chem. Biol.* **9**, 3-16.
- Gu, H., Liang, Y., Mandel, G. und Roizman, B. (2005). Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 7571-7576.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hassig, C.A., Fleischer, T.C., Billin, A.N., Schreiber, S.L. und Ayer, D.E. (1997). Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A  
1. *Cell* **89**, 341-347.
- Hauser, C., Schuettengruber, B., Bartl, S., Lagger, G. und Seiser, C. (2002). Activation of the mouse histone deacetylase 1 gene by cooperative histone phosphorylation and acetylation. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7820-7830.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W. und Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin  
3. *EMBO J.* **7**, 1395-1402.
- Heuer, K., Arbuzova, A., Strauss, H., Kofler, M. und Freund, C. (2005). The helically extended SH3 domain of the T cell adaptor protein ADAP is a novel lipid interaction domain. *J. Mol. Biol.* **348**, 1025-1035.
- Hsieh, J.J., Zhou, S., Chen, L., Young, D.B. und Hayward, S.D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex  
1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 23-28.
- Huang, N.E., Lin, C.H., Lin, Y.S. und Yu, W.C. (2003). Modulation of YY1 activity by SAP30  
1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 267-275.
- Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Araki, K., Kuwano, R. und Takahashi, Y. (1988). Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 7084-7088.
- James, P., Halladay, J. und Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.

- Kang,H., Freund,C., Duke-Cohan,J.S., Musacchio,A., Wagner,G. und Rudd,C.E. (2000). SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *EMBO J.* 19, 2889-2899.
- Kim,C.A. und Bowie,J.U. (2003). SAM domains: uniform structure, diversity of function. *Trends Biochem. Sci.* 28, 625-628.
- Kim,J.Y., Shen,S., Dietz,K., He,Y., Howell,O., Reynolds,R. und Casaccia,P. (2010). HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. *Nat. Neurosci.* 13, 180-189.
- Knoepfler,P.S. und Eisenman,R.N. (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression 1. *Cell* 99, 447-450.
- Kristensen,O., Guenat,S., Dar,I., Allaman-Pillet,N., Abderrahmani,A., Ferdaoussi,M., Roduit,R., Maurer,F., Beckmann,J.S., Kastrop,J.S., Gajhede,M. und Bonny,C. (2006). A unique set of SH3-SH3 interactions controls IB1 homodimerization. *EMBO J.* 25, 785-797.
- Krithivas,A., Young,D.B., Liao,G., Greene,D. und Hayward,S.D. (2000). Human herpesvirus 8 LANA interacts with proteins of the mSin3 corepressor complex and negatively regulates Epstein-Barr virus gene expression in dually infected PEL cells 2. *J. Virol.* 74, 9637-9645.
- Kuzmichev,A., Zhang,Y., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P. und Reinberg,D. (2002). Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1) 1. *Mol. Cell Biol.* 22, 835-848.
- Ladbury,J.E. und Arold,S. (2000). Searching for specificity in SH domains. *Chem. Biol.* 7, R3-R8.
- Lagger,G., O'Carroll,D., Rembold,M., Khier,H., Tischler,J., Weitzer,G., Schuettengruber,B., Hauser,C., Brunmeir,R., Jenuwein,T. und Seiser,C. (2002). Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression 1. *EMBO J.* 21, 2672-2681.
- Laherty,C.D., Billin,A.N., Lavinsky,R.M., Yochum,G.S., Bush,A.C., Sun,J.M., Mullen,T.M., Davie,J.R., Rose,D.W., Glass,C.K., Rosenfeld,M.G., Ayer,D.E. und Eisenman,R.N. (1998). SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors 1. *Mol. Cell* 2, 33-42.
- Laherty,C.D., Yang,W.M., Sun,J.M., Davie,J.R., Seto,E. und Eisenman,R.N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression 1. *Cell* 89, 349-356.
- Lai,A., Kennedy,B.K., Barbie,D.A., Bertos,N.R., Yang,X.J., Theberge,M.C., Tsai,S.C., Seto,E., Zhang,Y., Kuzmichev,A., Lane,W.S., Reinberg,D., Harlow,E. und Branton,P.E. (2001). RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest 1. *Mol. Cell Biol.* 21, 2918-2932.
- Le May,N., Mansuroglu,Z., Leger,P., Josse,T., Blot,G., Billecocq,A., Flick,R., Jacob,Y., Bonney,E. und Bouloy,M. (2008). A SAP30 complex inhibits IFN-beta expression in Rift Valley fever virus infected cells 1. *PLoS. Pathog.* 4, e13.

- Levinson, N.M., Visperas, P.R. und Kuriyan, J. (2009). The tyrosine kinase Csk dimerizes through its SH3 domain. *PLoS. One.* 4, e7683.
- Li, H., Fung, K.L., Jin, D.Y., Chung, S.S., Ching, Y.P., Ng, I.O., Sze, K.H., Ko, B.C. und Sun, H. (2007). Solution structures, dynamics, and lipid-binding of the sterile alpha-motif domain of the deleted in liver cancer 2. *Proteins* 67, 1154-1166.
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R.J., Fu, H. und Liddington, R. (1995). Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 376, 191-194.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X. und Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 2, 754-761.
- Mackintosh, C. (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem. J.* 381, 329-342.
- Martelli, A.M., Manzoli, L. und Cocco, L. (2004). Nuclear inositides: facts and perspectives. *Pharmacol. Ther.* 101, 47-64.
- Mayer, B.J., Hamaguchi, M. und Hanafusa, H. (1988). Characterization of p47gag-crk, a novel oncogene product with sequence similarity to a putative modulatory domain of protein-tyrosine kinases and phospholipase C. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 53 Pt 2, 907-914.
- Mitelman, F., Mertens, F. und Johansson, B. (1997). A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet.* 15 Spec No, 417-474.
- Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C.H., Kuriyan, J. und Miller, W.T. (1997). Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385, 650-653.
- Mongiovi, A.M., Romano, P.R., Panni, S., Mendoza, M., Wong, W.T., Musacchio, A., Cesareni, G. und Di Fiore, P.P. (1999). A novel peptide-SH3 interaction. *EMBO J.* 18, 5300-5309.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27.
- Muslin, A.J. und Xing, H. (2000). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal.* 12, 703-709.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F.H., Trono, D. und Verma, I.M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 11382-11388.
- Osborne, S.L., Thomas, C.L., Gschmeissner, S. und Schiavo, G. (2001). Nuclear PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J. Cell Sci.* 114, 2501-2511.
- Ottmann, C., Yasmin, L., Weyand, M., Veessenmeyer, J.L., Diaz, M.H., Palmer, R.H., Francis, M.S., Hauser, A.R., Wittinghofer, A. und Hallberg, B. (2007). Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis 1. *EMBO J.* 26, 902-913.
- Pawson, T. und Nash, P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445-452.

- Prendergast,G.C. (2001). Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 1, 162-168.
- Reis,B., Pfeffer,K. und Beer-Hammer,S. (2009). The orphan adapter protein SLY1 as a novel anti-apoptotic protein required for thymocyte development. *BMC. Immunol.* 10, 38.
- Renart,J. und Sandoval,I.V. (1984). Western blots. *Methods Enzymol.* 104, 455-460.
- Rensing,L. (1972). Periodic geophysical and biological signals as Zeitgeber and exogenous inducers in animal organisms. *Int. J. Biometeorol.* 16 *Suppl*, 113-125.
- Rimkus,C., Martini,M., Friederichs,J., Rosenberg,R., Doll,D., Siewert,J.R., Holzmann,B. und Janssen,K.P. (2006). Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer. *Br. J. Cancer* 95, 1419-1423.
- Rittinger,K., Budman,J., Xu,J., Volinia,S., Cantley,L.C., Smerdon,S.J., Gamblin,S.J. und Yaffe,M.B. (1999). Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding  
1. *Mol. Cell* 4, 153-166.
- Rojas,J.R., Trievel,R.C., Zhou,J., Mo,Y., Li,X., Berger,S.L., Allis,C.D. und Marmorstein,R. (1999). Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. *Nature* 401, 93-98.
- Romir,J., Lilie,H., Egerer-Sieber,C., Bauer,F., Sticht,H. und Muller,Y.A. (2007). Crystal structure analysis and solution studies of human Lck-SH3; zinc-induced homodimerization competes with the binding of proline-rich motifs. *J. Mol. Biol.* 365, 1417-1428.
- Rosenquist,M., Sehnke,P., Ferl,R.J., Sommarin,M. und Larsson,C. (2000). Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *J. Mol. Evol.* 51, 446-458.
- Sadowski,I., Stone,J.C. und Pawson,T. (1986). A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol. Cell Biol.* 6, 4396-4408.
- Scheikl,T., Reis,B., Pfeffer,K., Holzmann,B. und Beer,S. (2008). Reduced notch activity is associated with an impaired marginal zone B cell development and function in Sly1 mutant mice. *Mol. Immunol.*
- Scholz,R.P., Regner,J., Theil,A., Erlmann,P., Holeiter,G., Jahne,R., Schmid,S., Hausser,A. und Olayioye,M.A. (2009). DLC1 interacts with 14-3-3 proteins to inhibit RhoGAP activity and block nucleocytoplasmic shuttling  
1. *J. Cell Sci.* 122, 92-102.
- Schuettengruber,B., Simboeck,E., Khier,H. und Seiser,C. (2003). Autoregulation of mouse histone deacetylase 1 expression. *Mol. Cell Biol.* 23, 6993-7004.
- Scott,J.D. und Pawson,T. (2009). Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science* 326, 1220-1224.
- Sengupta,N. und Seto,E. (2004). Regulation of histone deacetylase activities  
1. *J. Cell Biochem.* 93, 57-67.

- Shiio, Y., Rose, D.W., Aur, R., Donohoe, S., Aebersold, R. und Eisenman, R.N. (2006). Identification and characterization of SAP25, a novel component of the mSin3 corepressor complex 1. *Mol. Cell Biol.* **26**, 1386-1397.
- Skowrya, D., Zeremski, M., Neznanov, N., Li, M., Choi, Y., Uesugi, M., Hauser, C.A., Gu, W., Gudkov, A.V. und Qin, J. (2001). Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex 2. *J. Biol. Chem.* **276**, 8734-8739.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X.R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T. und . (1994). Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell Biol.* **14**, 2777-2785.
- Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T. und Kramer, O.H. (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 185-198.
- Stamenova, S.D., French, M.E., He, Y., Francis, S.A., Kramer, Z.B. und Hicke, L. (2007). Ubiquitin binds to and regulates a subset of SH3 domains. *Mol. Cell* **25**, 273-284.
- Toker, A., Sellers, L.A., Amess, B., Patel, Y., Harris, A. und Aitken, A. (1992). Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1/14-3-3) from sheep brain. Amino acid sequence of phosphorylated forms. *Eur. J. Biochem.* **206**, 453-461.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 4350-4354.
- Tzivion, G. und Avruch, J. (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 3061-3064.
- Uchida, T., Nakao, A., Nakano, N., Kuramasu, A., Saito, H., Okumura, K., Ra, C. und Ogawa, H. (2001). Identification of Nash1, a novel protein containing a nuclear localization signal, a sterile alpha motif, and an SH3 domain preferentially expressed in mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 137-141.
- Viiri, K.M., Janis, J., Siggers, T., Heinonen, T.Y., Valjakka, J., Bulyk, M.L., Maki, M. und Lohi, O. (2009). DNA-binding and -bending activities of SAP30L and SAP30 are mediated by a zinc-dependent module and monophosphoinositides 1. *Mol. Cell Biol.* **29**, 342-356.
- Vondriska, T.M., Pass, J.M. und Ping, P. (2004). Scaffold proteins and assembly of multiprotein signaling complexes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **37**, 391-397.
- Wang, D., Stewart, A.K., Zhuang, L., Zhu, Y., Wang, Y., Shi, C., Keating, A., Slutsky, A., Zhang, H. und Wen, X.Y. (2010). Enhanced adaptive immunity in mice lacking the immunoinhibitory adaptor Hacs1. *FASEB J.* **24**, 947-956.
- Xiao, B., Smerdon, S.J., Jones, D.H., Dodson, G.G., Soneji, Y., Aitken, A. und Gamblin, S.J. (1995). Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* **376**, 188-191.

- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gambin, S.J., Smerdon, S.J. und Cantley, L.C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity  
1. *Cell* **91**, 961-971.
- Yamada, H., Yanagisawa, K., Tokumaru, S., Taguchi, A., Nimura, Y., Osada, H., Nagino, M. und Takahashi, T. (2008). Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at 21q11-21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes. Cancer* **47**, 810-818.
- Yang, X.J. und Seto, E. (2003). Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression  
1. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 143-153.
- Yoon, Y.S., Choo, J.H., Yoo, T., Kang, K. und Chung, J.H. (2007). RhoB is epigenetically regulated in an age- and tissue-specific manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 164-169.
- Yoshida, K., Yamaguchi, T., Natsume, T., Kufe, D. und Miki, Y. (2005). JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **7**, 278-285.
- You, A., Tong, J.K., Grozinger, C.M. und Schreiber, S.L. (2001). CoREST is an integral component of the Co. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 1454-1458.
- Young, M.A., Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B. und Kuriyan, J. (2001). Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* **105**, 115-126.
- Zeller, C., Hinzmann, B., Seitz, S., Prokoph, H., Burkhard-Goettges, E., Fischer, J., Jandrig, B., Schwarz, L.E., Rosenthal, A. und Scherneck, S. (2003). SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer. *Oncogene* **22**, 2972-2983.
- Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Reinberg, D. (1997). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* **89**, 357-364.
- Zhang, Y. und Jones, C. (2001). The bovine herpesvirus 1 immediate-early protein (bICP0) associates with histone deacetylase 1 to activate transcription. *J. Virol.* **75**, 9571-9578.
- Zhang, Y., Sun, Z.W., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hampsey, M. und Reinberg, D. (1998). SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. *Mol. Cell* **1**, 1021-1031.
- Zhao, K., Wang, W., Rando, O.J., Xue, Y., Swiderek, K., Kuo, A. und Crabtree, G.R. (1998). Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell* **95**, 625-636.
- Zhu, Y.X., Benn, S., Li, Z.H., Wei, E., Masih-Khan, E., Trieu, Y., Bali, M., McGlade, C.J., Claudio, J.O. und Stewart, A.K. (2004). The SH3-SAM adaptor HACS1 is up-regulated in B cell activation signaling cascades. *J. Exp. Med.* **200**, 737-747.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L. und Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* **72**, 9873-9880.

Zupkovitz,G., Tischler,J., Posch,M., Sadzak,I., Ramsauer,K., Egger,G., Grausenburger,R., Schweifer,N., Chiocca,S., Decker,T. und Seiser,C. (2006). Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1  
1. Mol. Cell Biol. 26, 7913-7928.

## 8 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Besonders möchte ich mich bei Frau PD Dr. Sandra Beer-Hammer für die interessante Fragestellung, die kontinuierliche wissenschaftliche und experimentelle Betreuung und das intensive Korrekturlesen des Manuskripts bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf diese Arbeit anfertigen zu dürfen.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Peter Westhoff für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Mentorinnen Dr. Anne Halenius und Dr. Stefanie Scheu sowie bei Prof. Dr. Ingo Schmitz für die tolle wissenschaftliche Unterstützung und Motivation bedanken.

Ein großer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene sowie der AG Schmitz für das tolle Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich mich bei Conny Beuter-Gunia, Julia Hartmann, Nicole Küpper und Sarah Lahme für die Freundschaft und den Spaß auch außerhalb des Labors bedanken. Conny danke ich zudem auch für die Unterstützung bei der Anfertigung der Publikation und für die vielen hilfreichen Diskussionen. Außerdem möchte ich mich bei Daniel Degrandi bedanken, der mir oft mit viel Ruhe und Geduld zur Seite gestanden hat.

Der wohl größte Dank gilt meinem Ehemann Max Brandt, der mir mit seiner Kraft, Liebe und Unterstützung immer den größten Halt gegeben hat. Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie, vor allem bei meinen Eltern Elke und Rainer, für die Unterstützung und Hilfe in allen Lebenslagen bedanken. Meinem Vater danke ich zudem für das Korrekturlesen des Manuskripts.

## 9 Anhang

**Tabelle 17: Sequenzierergebnis der Hefeklone aus dem Versuchsansatz mit der SLy2SAM-Domäne als Köderprotein**

Hefeklon	Sequenzierergebnis
1 – 7	„Proliferating cell nuclear antigen“ (Pcna)
8 – 9	„Transmembrane protein 1“ (Tmem1)
10 – 11	„Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1“
12	„Zinc finger protein 655“
13	„Zinc finger protein 251“
14	„Ancient ubiquitous protein“ (Aup1)
15	„A kinase anchor protein (Gravin) 12“ (Akap12)
16	„actin, beta“
17	„Stem-loop binding protein“ (Slbp)
18	„Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like“
19	„Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1“ (Hnrph1)
20	„Heat shock protein 9“ (Mortalin)
21	„Non-POU domain containing, octamer binding protein“ (Nono)
22	„BH3 interacting death agonist“ (Bid)

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 28. April 2010

Simone Brandt