

Aus dem Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität
Direktor: Prof. Dr. Gabbert

Identifikation neuer Bindungspartner des Metastasierungsregulators Tiam1 mittels Yeast Two Hybrid-Screen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Erika Ulbrich

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: PD Dr. med. Rainer Engers

Koreferent: PD Dr. rer. nat. Lars-Oliver Klotz

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungen	1
II	Einleitung	4
1	Aufbau und funktionelle Relevanz von Tiam1	4
2	Fragestellung	8
III	Material und Methoden	9
1	Material	9
1.1	Hilfsmittel	9
1.1.1	Einwegartikel für Zellkulturen und Plastikgefäße	9
1.1.2	Geräte	9
1.1.3	Software und Server	10
1.2	Chemikalien	10
1.2.1	Flüssigkeiten und Feststoffe	10
1.2.2	Puffer und Lösungen	11
1.3	Enzyme	15
1.4	Molekularbiologische Kits	15
1.5	Kulturen und Medien	16
1.5.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme und Medien	16
1.5.2	Hefe-Stämme und Medien	17
1.5.3	Zelllinien und Medien	18
1.6	Antikörper und aufgereinigte Antiseren	18
1.7	Größenstandards	18
1.7.1	DNA-Längenstandards	18
1.7.2	Protein-Molekulargewichtstandards	19
1.8	Oligonukleotide	19
1.9	Plasmide	21
1.9.1	Vektoren	21
1.9.2	Plasmidkonstrukte	22
1.10	Genbibliothek	23
2	Methoden	24

2.1	Quantifizierung von Nukleinsäuren	24
2.1.1	Photometrische Bestimmung	24
2.1.2	Ethidiumbromid-Fluoreszenz	24
2.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	24
2.2.1	DNA-Präparationen mittels Anionenaustauscherharzsäulen .	24
2.2.2	Glyzerin-Stammkulturen	26
2.3	Modifizierung von DNA-Fragmenten	26
2.3.1	Glätten überhängender Enden von DNA-Fragmenten (Klenow)	26
2.3.2	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	26
2.3.3	Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten („Cippen“)	26
2.3.4	Kontrollierte Deletionen von DNA-Fragmenten („Nested De- letion“)	26
2.3.5	Ligation von DNA	27
2.4	Aufreinigung von DNA	27
2.4.1	Fällung von DNA	27
2.4.2	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	28
2.4.3	Säulen-Trennverfahren	28
2.5	Amplifizierung von DNA	28
2.5.1	mittels Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)	28
2.5.2	„Splicing by overlap Extension“	29
2.6	Analyse von DNA	30
2.6.1	Endonukleolytische Restriktion von DNA	30
2.6.2	DNA-Sequenzierung	30
2.6.3	Native Agarose-Gelelektrophorese	31
2.7	Bakterien	32
2.7.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	32
2.7.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	32
2.7.3	α -Komplementation	32
2.8	Identifikation spezifischer Protein-Protein-Interaktionen mittels Yeast Two Hybrid-Analyse	33
2.8.1	„Screening“ einer humanen Nieren cDNA-Bibliothek	33
2.8.2	Kotransformation (in Y187 bzw. Y190)	34
2.8.3	Hefepaarung („Mating“)	35
2.8.4	„Colony lift filter assay“ zur Bestimmung der β -Galaktosidase- Aktivität	35
2.8.5	Segregation positiver Hefeklone auf -Leucin/Cycloheximid- Selektions-Agarplatten	36
2.8.6	Plasmid-DNA-Isolation aus Hefe	36

2.9	Zellkultur	37
2.9.1	Kultivierung der adhärent wachsenden COS7-Zellen	37
2.9.2	Passage konfluent bewachsener Kulturen	37
2.9.3	Bestimmung der Zellzahl	37
2.9.4	Transiente DEAE-Dextran-Cotransfektion in COS7-Zellen	38
2.9.5	Herstellung von Zellextrakten	38
2.9.6	Photometrische Proteinbestimmung	39
2.10	Co-Präzipitation und Western Blot	39
2.10.1	Co-Präzipitation mittels Glutathion-S-Transferase(= GST)- „Beads“	39
2.10.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen („Western-Blot“)	39
IV	Ergebnisse	42
1	Übersicht über die Vorgehensweise in dieser Arbeit	42
2	Identifikation von Bindungspartnern für Tiam1 mittels „Yeast-Two-Hybrid“- Analyse	42
2.1	Untersuchung einer humanen Nieren-cDNA-Bank	42
2.2	Identifizierung positiver Hefeklonen mittels Segregation	46
2.3	Isolierung positiver Hefeklonen mittels Hefepaarung („Yeast Mating“)	46
2.4	Sequenzanalyse der positiven pACT2-Klone	47
2.5	Kotransformation von N853-Tiam1 mit den positiven pACT2-Plasmiden	49
3	Isolierung und Klonierung der vollständigen Nukleotidsequenzen von Ki- nektin, Galektin1, Vinexin- β und des 13kDa Differenzierungs-assoziierten Proteins	51
3.1	Kinektin (67a)	52
3.2	Differenzierungs-assoziiertes Protein (36b)	56
3.3	Galektin1 (56b)	59
3.4	Vinexin- β (25a)	60
4	Überprüfung von Vinexin- β (25a) und Galektin1(56b) auf spezifische In- teraktion mit Tiam1 mittels Co-Präzipitation	66
4.1	Galektin1	66
4.2	Vinexin- β	67
V	Diskussion	70
1	Neue Bindungspartner von Tiam1	70
2	Vinexin- β	71
3	Galektin1	73
4	Kinektin	74
5	Differenzierungs-assoziiertes Protein	75

6	Ausblick	76
VI	Zusammenfassung	77
C	Danksagung	79
A	Literaturverzeichnis	80
B	Anhang	86
0.1	Nukleotidsequenzen der 5'-Enden der im YTH erhaltenen pACT2-Klone	86
0.2	Kinektin-Alignment	90
D	Lebenslauf	100

Kapitel I

Abkürzungen

Abb.	A bbildung
AD	A ktivator d omäne
Amp	A mpicillin
Aqua bidest.	A qua b idestillata (2-fach destilliertes Wasser)
AS	A minosäure
AT	3 -amino- 1,2,4 -triazole
ATP	A denosin t riphosphat
B	B ase
BD	B indungs d omäne
Bp	B asen p aare
BSA	Rinder(= ' B ovines')- S erum- A lbumin
bzw.	b eziehungs w eise
°C	Temperatur in Grad C elsius
cAMP	3'5' - z yklisches A denosin m onophosphat
cDNA	„ c opy“- D N A
CDS	„ C oding S equ e nce“
CIP	„ C alf I ntestinal P hosphatase“
CLFA	„ C olony L ift F ilter A ssay“
c-Terminus	C arboxyl t er m inus einer Polypeptidkette
CTP	C ytidin t riphosphat
Cyc	C ycloheximid
dATP	D esoxy a denosin t riphosphat
dCTP	D esoxycytosin t riphosphat
ddNTP	D idesoxynukleosid t riphosphat
DEAE	D iethylaminoethyl
DEPC	D iethyl p yrocarbonat
d.h.	d as h eißt
Diff	13 kDa D ifferenzierungs-assoziiertes Protein
DMEM	„ D ulbecco's M odified E agle's M edium“
DMF	N,N - D imethylformamid
DMSO	D imethylsulfoxid
DNA	D esoxyribonukleinsäure
dNTP	D esoxynukleosid t riphosphat

<i>E. coli</i>	„ E scherichia c oli“
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	E thylendiamin- T etraessigsäure
EST	E xpressed S equences T ag
EtBr	E thidiumbromid
et al.	und andere
evtl.	e ventuell
FCS	fötales K älberserum
g	G ramm
g	Normal-Fallbeschleunigung (9,81 m*s ⁻²)
Gal	G alektin1
GEF	guanine nucleotide e xchange f actor
GST	G lutathion- S - T ransferase
GTP	G uanosintriphosphat
h	Stunde
-H	H istidin fehlt
HA	H ämagglutinin
His	H istidin
H ₂ O	Wasser
HPLC	„high pressure liquid chromatography“
IPTG	I sopropyl-β-D-thiogalaktosid
k	kilo (10 ³)
K	K ontrolle
Kap.	K apitel
KB	1000 Basen-(paare)
KD	K ilodalton
Kin	K inectin
l	L iter
-L	L eucin fehlt
LB	L uria- B ertani-Medium
Leu	L eucin
LiAc	L ithiumacetat
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	M eter
m	m illi (10 ⁻³)
M	M olar, mol/l
min	M inute
mRNA	„messenger“- R NA
MW	„molecular weight“, Molekulargewicht
n	n ano (10 ⁻⁹)
NaAc	N atriumacetat
Nt	N ukleotid(e)
N-Terminus	Aminoterminus einer Polypeptidkette
o.a.	o ben angegeben
OD	Extinktion bei der im Index in nm angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
ONPG	o -Nitrophenyl-β-D- G alactopyranosid

ORF	„ O pen R eadin G F rame“
PAGE	P oly a crylamid G elelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Natriumchlorid-Lösung
PCR	P olymerase- K etten- R eaktion
PEG	P olyethylen g lycol
RNA	R ibonukleinsäure
Rnase	R ibonuklease
RT	R aum t emperatur
s	S ekunde
SD	„ S yn t hetical D ropout (Medium)“
SD/DO-Medium	„ S yn t hetical D ropout-Medium“ mit „ D ropout-Supplementen“ versetzt
SDS	Natriumdodecylsulfat
-T	T ryptophan fehlt
Tab.	T abelle
TBE	T ris- B orat- E DTA-Puffer
Tiam	T -lymphoma invasion and metastasis
T_m	M ittlere Schmelz t emperatur
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propandiol
Trp	T ryptophan
u.a.	u nter a nderem
U	Enzymeinheit (u nit)
UAS	„ U pstream A ctivator S equenz“
üN	ü ber N acht
Upm	U mdrehungen p ro M inute
UTP	U ridin t ri p hosfat
UV	U ltraviolett
V	V olt
Vin	V inexin
v/v	ml Volumen /100 ml Gesamtvolumen
w/v	g Gewicht /100 ml Gesamtvolumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
YTH	„ Y east T wo H ybrid“
z.B.	z um B eispiel

Die einzelnen Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz werden durch den Anfangsbuchstaben der Base bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, U: Uracil)

Kapitel II

Einleitung

1 Aufbau und funktionelle Relevanz von Tiam1

Entscheidend für den Verlauf maligner Tumorerkrankungen und damit für die Prognose der betroffenen Patienten, ist die Fähigkeit der Tumoren, Metastasen zu bilden. Eine Schlüsselrolle auf dem Weg zur Metastase spielt der Schritt der Tumorinvasion in das angrenzende Wirtsgewebe. Dabei handelt es sich um einen komplexen biologischen Vorgang, bei dem sich Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors herauslösen und aktiv in das angrenzende Wirtsgewebe eindringen.

Bei einer Suche nach Genen, die in die Regulation der Tumorinvasion und Metastasierung involviert sind, wurde am Beispiel einer murinen T-Lymphomzelllinie mit Hilfe einer retroviralen Insertionsmutagenese das Tiam1-Gen entdeckt [29]. Die bei diesem Ansatz isolierten invasiven Zellklone zeigten entweder eine gesteigerte Expression des Vollängen-Proteins (FL-Tiam1) oder aber die Expression einer N-terminal trunkierten Mutante von Tiam1, die sich aus den C-terminalen 1199 Aminosäuren zusammensetzt und daher als C1199-Tiam1 bezeichnet wurde. Auf Proteinebene setzt sich FL-Tiam1 aus 1591 Aminosäuren zusammen und besitzt mehrere Domänen, deren Funktionen bislang allerdings nur teilweise bekannt sind (Abb. II.1). So finden sich neben einer N-terminalen Myristoylierungsstelle (M) zwei PEST-Domänen, eine PSD-95-Dlg-ZO-1 (PDZ)-Domäne, die auch als „Discs large homology region“ (DHR) bezeichnet wird, zwei „Pleckstrin homology“ (PH)-Domänen und eine katalytische „dbl homology“ (DH)-Domäne [29]. Die N-terminale PH-Domäne (PHn) wird an ihrem C-terminalen Ende von einer „Coiled-coil“ (CC)-Region und einer sogenannten „extended“ (Ex)-Domäne flankiert. Bei letzterer handelt es sich nicht um eine über Konsensussequenzen definierte Domäne im eigentlichen Sinne, sondern vielmehr um einen Abschnitt des Tiam1-Proteins von etwa 300 Aminosäuren, der zusammen mit PHn-CC eine funktionelle Einheit hinsichtlich des Tiam1-induzierten und Rac1-vermittelten „membrane ruffings“ darstellt [75].

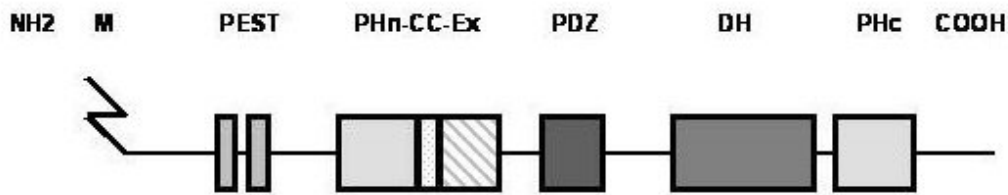


Abbildung II.1: Schematische Darstellung des Tiam1-Proteins.

DH-Domänen sind charakteristisch für Proteine, die biochemisch zur Gruppe der GDP-Dissoziationsstimulatoren (GDS) für Rho-ähnliche GTPasen gehören, und für Tiam1 konnte gezeigt werden, daß es spezifisch die Rho-ähnliche GTPase Rac1 aktiviert [49]. Wie andere Rho-ähnliche GTPasen (Rho-A, -B, -C, -G, Cdc42-Hs1, -Hs2, TC10, TCL) liegt Rac1 entweder in einem GDP-gebundenen inaktiven oder aber einem GTP-gebundenen aktiven Zustand vor. Die Aktivität Rho-ähnlicher GTPasen wird im wesentlichen durch zwei unterschiedliche Proteingruppen reguliert. GDS-Proteine führen zur Freisetzung des an die GTPase gebundenen GDP, so daß diese an das im Exzeß in Zellen vorkommende GTP bindet und hierdurch aktiviert werden kann. Im Gegensatz hierzu stimulieren GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die intrinsische GTPase-Aktivität der GTPasen, was zu einer Inaktivierung führt (Abb. II.2).

Zellbiologisch führt die Aktivierung von Rac1 durch Tiam1 in NIH-3T3-Zellen zur onkogenen Transformation und Induktion von "membrane ruffling", in Cos-7-Zellen zur Aktivierung der „c-Jun N-terminal Kinase“ (JNK) und in einer murinen T-Lymphomzelllinie zur Induktion eines invasiven Phänotyps [84], [49], [50]. Darüber hinaus ist bekannt, daß konstitutiv aktives V12-Rac1 über unterschiedliche Signalwege zu einer Aktivierung der p38 Kinase und des „serum response factors“ (SRF) führt sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) induziert (Abb. II.3) [77], [90], [41], [91], [57], [65]. Außerdem existieren Hinweise darauf, daß aktives Rac die Aktivität der „extracellular signal regulated kinase-2“ (ERK-2) steigern kann [24], [25].

In Übereinstimmung mit den am Beispiel muriner T-Lymphomzellen erzielten Ergebnissen führte die Überexpression von V12-Rac1 in epithelialen Zellen der Mamma zur Induktion von Motilität und Invasion in einem „Boyden chamber assay“ [40]. Im Gegensatz hierzu inhibierten Tiam1 und V12-Rac1 die durch den „hepatocyte growth factor/scatter factor“ (HGF/SF) induzierte Zelldissoziation epithelialer „Madin-Darby canine kidney“ (MDCK)-Zellen in Collagen durch Aktivierung der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion [34]. Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse zur Bedeutung von Rac1 für die Regula-

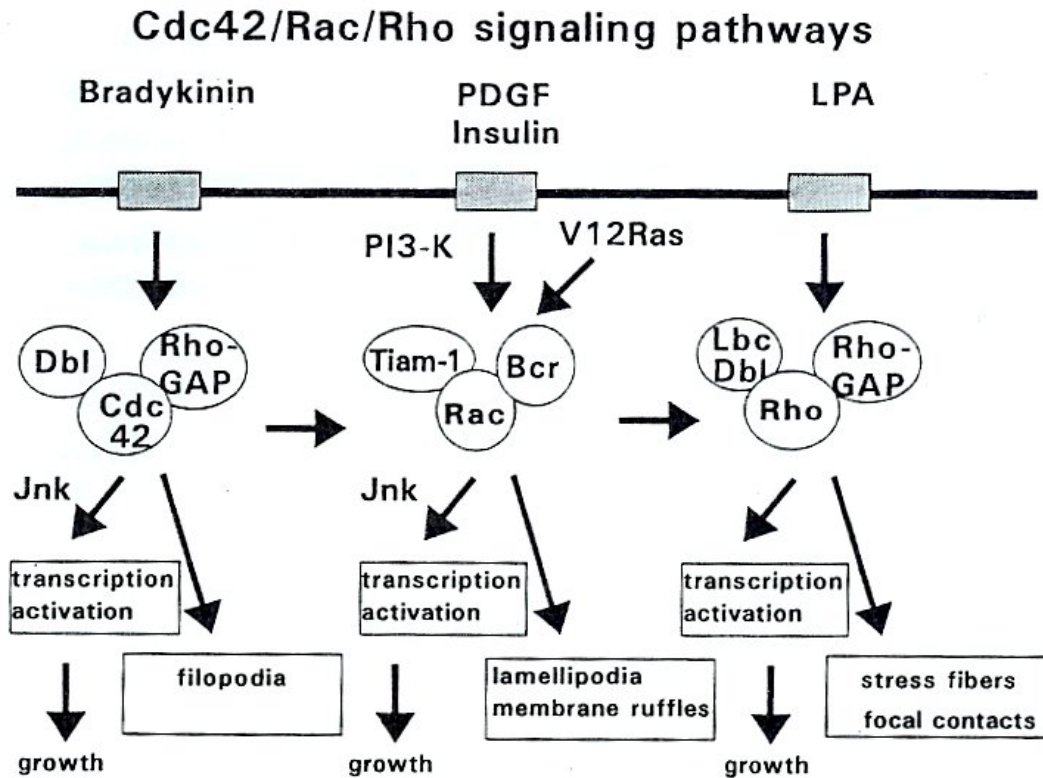


Abbildung II.2: Signalkaskade der Rho-ähnlichen GTPasen. Stimulierung spezifischer Zelloberflächenrezeptoren führt zu einer Aktivierung einer spezifischen GTPase oder zu einer stufenweisen Aktivierung einer Reihe an GTPasen. Spezifische GEF-Proteine für Rho-ähnliche GTPasen sind Dbp, Tiam1 und Lbc, wohingegen Bcr und RhoGAP als GAP-Proteine fungieren [15]. (GEF = „guanine nucleotide exchange factor“, GAP = „GTPase-aktivierende Proteine“)

tion der Invasivität konnten zumindest teilweise durch die Beobachtung erklärt werden, daß Rac1-induzierte Effekte im wesentlichen von zwei Faktoren abhängen: 1. von der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, mit dem die jeweiligen Zellen während der Versuchsdurchführung in Kontakt kommen und 2. von der Frage, ob die Etablierung E-Cadherin-vermittelter Zell-Zellkontakte während der Versuchsdurchführung möglich ist oder inhibiert wird [70].

Darüber hinaus wurde am Beispiel humaner Nieren- und Colonicarcinomzellen gezeigt, daß neben der Aktivierung der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zelladhäsion die selektive Hochregulation der „tissue inhibitors of metalloproteinases“ TIMP-1 und TIMP-2 einen weiteren Mechanismus darstellt, über den Tiam1 und Rac das Invasionsverhalten humaner Carcinome inhibieren [21].

Neben der Regulation von Tumorerinvasion und Metastasierung spielt Tiam1 eine bedeutende Rolle in der onkogenen Transformation. Die erstmals in malignen Tumoren (humane Nierenzellkarzinome) entdeckte und in der PHn-Domäne lokalisierte Tiam1-Mutation A441G führte zur Transformation von NIH-3T3-Zellen [20]. An Tiam1-Knock-

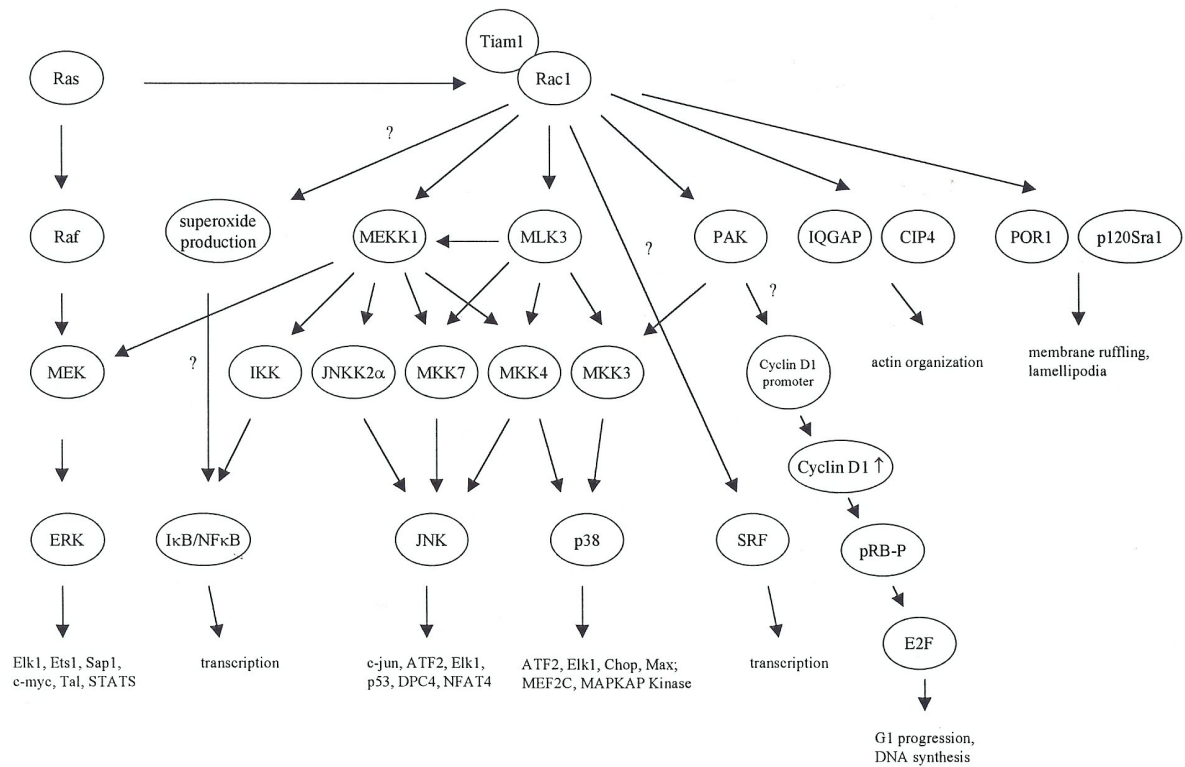


Abbildung II.3: Schematische Darstellung der Signalwege „upstream“ und „downstream“ von Rac1. Insgesamt scheinen mindestens sieben voneinander unabhängige Signalwege „downstream“ von Rac1 zu existieren.

out-Mäusen, denen also der Rac-spezifische Aktivator Tiam1 fehlt, konnte gezeigt werden, dass diese Mäuse gegenüber der Entstehung Ras-induzierter Hauttumoren resistent sind [47].

Obwohl Tiam1 damit eine wichtige regulatorische Rolle für das biologische Verhalten von Tumoren spielt, ist noch relativ wenig darüber bekannt, wie die Aktivität und Funktion von Tiam1 unmittelbar beeinflusst wird. Erste Hinweise deuten jedoch darauf hin, daß Bindungen an Proteine wie Ras, CD44-Rezeptor, nm23-H1 und Ankyrin involviert sein können.

So konnte am Beispiel von 3T3-Zellen gezeigt werden, dass Tiam1 über eine Ras-Bindungsdomäne (RBD) an aktives Ras bindet und diese Bindung zu einer Aktivierung von Rac führt [45].

Des weiteren interagiert Tiam1 (in metastasierenden Brusttumorzellen) mit dem Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 über die PHn-CC-Ex-Region und induziert über diese Bindung eine Aktivierung von Rac1 und Tumorzellmigration (während des Brusttumorprogresses) [8].

Ausserdem wurde für Tiam1 (ebenfalls in metastasierenden Brusttumorzellen) beschrieben, daß das Zytoskelettprotein Ankyrin über eine „Ankyrin repeat domain“ (ARD) an die Ex-Domäne (Ankyrin-Bindedomäne = AS 717-727 von Tiam1) bindet und über diese Bindung ebenfalls eine Aktivierung von Rac1 und somit Brusttumorzellinvasion und -migration induziert [9].

„nm23H1“ dagegen hemmt als Tumorsuppressorgen die Rac1- und c-Jun-Kinase-Aktivität über eine Interaktion mit der aminoterminalen Region von Tiam1 [60].

Schliesslich bindet Tiam1 an die „Myc box II“ von c-myc, einem Transkriptionsfaktor, der für die Kontrolle des Zellwachstums, des Zellzyklus, von Neoplasien und des apoptotischen Zelltodes wichtig ist. Eine Überexpression von Tiam1 in Rat-1-Fibroblasten führt zu einer Unterdrückung der c-myc-Aktivität und somit zu einer Hemmung der c-myc-Apoptose-Aktivität durch diese Protein-Protein-Interaktion, die vermutlich im Nukleus abläuft [61].

2 Fragestellung

Wie oben ausgeführt, ist bislang noch relativ wenig darüber bekannt, über welche molekularen Mechanismen die Aktivität von Tiam1 reguliert wird. Diese bislang vorliegenden Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Aktivität von Tiam1 zumindest teilweise über Protein-Interaktionen vermittelt wird, die über die PHn-CC-Ex-Region bzw. die DH-PHC-Region reguliert wird. Besonders wichtig für die Funktion von Tiam1 scheinen neben der katalytischen DH-Domäne insbesondere der N-Terminus und die erweiterte N-terminale PH-Domäne (PHn-CC-Ex) zu sein. So führt die Trunkierung der N-terminalen 420 Aminosäuren von Tiam1 zu einer Aktivierung des Proteins [29]. Dies deutet darauf hin, daß der N-Terminus ein geeignetes Target für Proteine darstellen könnte, die die Aktivität von Tiam1 regulieren. Von PHn-CC-Ex ist bereits bekannt, daß es eine wichtige funktionelle Rolle spielt für die Membranassoziation von Tiam1, die Induktion von „membrane ruffling“, die Aktivierung der JNK und die Hemmung der Tumorerinvasion in epithelialen Zellen [50],[75],[20].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, neue potentielle Bindungspartner für Tiam1 zu identifizieren. Dabei sollte gezielt nach solchen Bindungspartnern gesucht werden, die entweder an den N-Terminus oder die PHn-CC-Ex-Region des Tiam1-Proteins binden. Hierzu wurde ein sogenannter Yeast Two Hybrid-Screen durchgeführt, bei dem die N-terminalen 853 AS von Tiam1 als „bait“ eingesetzt wurden.

Kapitel III

Material und Methoden

1 Material

1.1 Hilfsmittel

1.1.1 Einwegartikel für Zellkulturen und Plastikgefäße

Plastikartikel wurden von den Firmen Falcon (Becton-Dickinson), Eppendorf und Nunc bezogen.

1.1.2 Geräte

Tabelle III.1: GERÄTE

Gerät	Hersteller
Axioskop	Zeiss, Köln
Bildverarbeitungssystem	Fröbel Datentechnik, Deutschland
Biofuge 13R (Rotor 3743)	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus Instruments BB6060, Hanau
Controlled Environment Incubator Shaker	New Brunswick Scientific Co. Inc.
DU 640 Spektrophotometer	Beckman Instruments, München
Gelelektrophoresekammer GNA 100	Pharmacia Biotech, Freiburg
Gelelektrophoresekammer GNA 200	Pharmacia Biotech, Freiburg
Genetic Analyser 310	Applied Biosystems, Weiterstadt
J2-MC-Zentrifuge (Rotor JA-10)	Beckman Instruments, München
L8-M Ultrazentrifuge	Beckman Instruments, München
Labovort FS	Leitz, Solms
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Hanau
Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster	Hoefer, Freiburg
Mighty Small Transfer Elektrophoresis Unit	Hoefer, Freiburg
pH-Meter 340	Beckman Instruments, München
Sterilbank	Clean Air Deutschland

Tabelle III.1: GERÄTE (Fortsetzung)

Gerät	Hersteller
T1-Thermocycler	Biometra, Göttingen und Perkin Elmer, Überlingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Thermotransferdrucker	P68E, Mitsubishi, Japan
Transilluminator TFX-20M	Vilber Lourmat
Warmluftschüttler	Certomat®HK der Firma Braun
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich

1.1.3 Software und Server

Lasergene DNASTar; Version 4.03

BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

GenBank, EST Data, Swiss-Prot, Prosite Datenbank: (<http://www.ebi.ac.uk>)

1.2 Chemikalien

1.2.1 Flüssigkeiten und Feststoffe

Tabelle III.2: CHEMIKALIEN

Chemikalie	Bezugsquelle
Acrylamid	Biozym, Hess. Oldenburg
Agar	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ammoniumpersulfat	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Ethanol	Merck, Darmstadt
3-AT	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Beads, GST	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Chloroquin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DEAE-Dextran (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DEPC	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DMEM-Medium	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
dNTPs	ROTH, Karlsruhe
Dropout(DO) Supplements	Clontech, Heidelberg
EDTA (Titriplex III)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	ROTH, Karlsruhe
FCS	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
D-Glukose	Merck, Darmstadt

Tabelle III.2: CHEMIKALIEN (Fortsetzung)

Chemikalie	Bezugsquelle
L-Glutamin	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Serva, Heidelberg
Hepes	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Heringssperma (10 mg/ml)	Clontech, Heidelberg
Isopropanol	ROTH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Milchpulver	BIO-RAD, München
Minimal SD (Agar) Base-Medium	Clontech, Heidelberg
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nitrozellulosemembran (Optitran)	Schleicher & Schuell, Dassel
PBS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
PEG	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Pepton	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Phenol, wassergesättigt	Appligene-Oncor
Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Salzsäure, rauchend	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
SDS	ROTH, Karlsruhe
Sucrose (=Saccharose)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
TEMED	BIO-RAD, München
„Template Suppression Reagent“	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Terminator Ready Reaction Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Tris-HCL	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Trypanblau	Biochrom KG, Berlin
Tween 20	Merck, Darmstadt
„Yeast Enzyme Enhancer“	Clontech, Heidelberg
„Yeast Enzyme Salts“	Clontech, Heidelberg
YPD-(Agar)-Medium	Clontech, Heidelberg
Wasser, HPLC-Qualität	ROTH, Karlsruhe
Wasser, Merck	Merck, Darmstadt
Whatman Filter	Whatman International, England

1.2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle III.3: PUFFER, LÖSUNGEN

Substrate	Herstellung
Ampicillin (D[-] α -Aminobenzylpenicillin)	50 mg/ml ad 1 ml Aqua dest.

Tabelle III.3: PUFFER, LÖSUNGEN (Fortsetzung)

Substrate	Herstellung	
Äquilierungspuffer QBT	0,75 M 50 mM 15 % 0,15 %	NaCl MOPS pH 7.0 Isopropanol Triton X-100
2X Puffer	200 mM 2 mM 100 mM 1,33 mg/ml	Natriumphosphat-Puffer, pH 7,3 MgCl ₂ β-Mercapto-Äthanol ONPG
Bradford-Arbeitslösung	3 % 6 % 7 %	Ethanol (abs.) Phosphorsäure Serva blue G
Cycloheximid	1 mg/ml (1000x)	
DEPC-H ₂ O	0,1 % (v/v) ad	Diethylpyrocarbonat Aqua dest.
DO-Lösung (-Leu/-Tryp/-His)	200 g/l 200 mg/l 300 mg/l 300 mg/l 200 mg/l 500 mg/l 2000 mg/l 300 mg/l 200 mg/l 1500 mg/l	L-Adeninhemisulfat L-Argenin HCl L-Isoleucin L-Lysin HCl L-Methionin L-Phenylalanin L-Threonin L-Tyrosin L-Uracil L-Valin
EDTA-Lösung	0,05 % (w/v) ad	EDTA PBS
0,05 % 1M EDTA-PBS-Lösung	500 ml 26,3 ml	PBS (pH 7,3) EDTA (1 %)
Elutionspuffer QF	1,25 M 50 mM 15 %	NaCl Tris-HCl, pH 8,5 Isopropanol)
Ladepuffer für Agarosegele (6X)	100 mM 20 % 0,01 % 0,01 %	EDTA Ficoll400 Bromphenolblau Xylencyanol
Lithiumacetat(=LiAc)(10x)	1 M	Lithiumacetat, pH 7,5 verdünnt in Essigsäure
LB-Agarplatten	10 g 5 g 10 g 1 ml 16 g	Pepton Hefeextrakt NaCl 5 M NaOH Agar

Tabelle III.3: PUFFER, LÖSUNGEN (Fortsetzung)

Substrate	Herstellung
	100 µg/ml Ampicillin (optional) ad 1 l Aqua bidet.
Luria-Bertani-Medium (LB, pH 7,5)	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 1 ml 5 M NaOH ad 1 l Aqua bidest.
Lysepuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 0,2 % BSA 0,5 % Triton X-100
Lysislösung P2	0,2 M NaOH 1 % (v/v) SDS
Natriumacetat	3 M, pH 5,2
Neutralisierungslösung P3	3,0 M Kaliumacetat pH 5,5
PEG/Lithiumacetat	12 ml PEG (50 %) 1,5 ml TE (10X) 1,5 ml Lithiumacetat (10X)
Phenol-/Chloroform-Gemisch	50-50, pH 8
Ponceaurot-Färbelösung	0,5 g Ponceaurot in 1 % Essigsäure
Protease-Inhibitor-Mix (1000X)	5 mg Chymostatin 5 mg Pepstatin A 5 mg Leupeptin 5 mg Antipain DMSO ad 1 ml
Proteaseinhibitoren	-Aprotinin(f.c.: 6,6 µM)(1000x stock) -Leupeptin(f.c.: 4 µM)(1000x stock) -PMSF(18 mg/ml = 100x stock in EtOH) -Soyabean Trypsin inhibitor(f.c.: 10 µg/ml)(1000x stock)
Resuspensionspuffer P1 (Qiagen)	50 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 0,1 mg RNase A/ml
SDS-Gelladepuffer (2X) (=Lämmli-Puffer(2x))	125 mM Tris pH 6,8 2 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol 10 % (v/v) β-Mercapto-Äthanol 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
Stet	8 % Sucrose 50 mM EDTA 5 % Triton 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
„Storage“-Medium	36 % Glycerin

Tabelle III.3: PUFFER, LÖSUNGEN (Fortsetzung)

Substrate	Herstellung	
	12 %	PEG 7500
	12 mM	MgCl ₂ in LB (steril filtrieren)
TBE (5X)	54 g	Tris
	27,5 g	Borsäure
	20 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	Aqua dest. ad 1 l	
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	1 mM	EDTA, pH 8,0
TE-Puffer (10x)	100 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	10 mM	EDTA (pH 7,5)
T0,1E-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	0,1 mM	EDTA, pH 8,0
TE/Lithiumacetat (1X)	1 ml	10xTE
	1 ml	10xLiAc
	8 ml	Aqua bidest.
Trypsin-EDTA-Lösung	10 ml	Trypsin (10X)
	5 ml	EDTA (1 %)
	85 ml	PBS
Waschpuffer QC	1,0 M	NaCl
	50 mM	MOPS pH 7,0
	15 %	Isopropanol
Western-Blot-Blockingpuffer	2 % (w/v)	BSA
	4 % (w/v)	Milchpulver
	ad	PBS
Western-Blot-PAGE-Laufpuffer (1X)	3,5 mM	SDS
	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
Western-Blot-Transferpuffer, pH 8,3	25 mM	Tris-Cl
	192 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol
	in Aqua dest.	
Western-Blot-Waschpuffer	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	0,2 % (v/v)	Tween 20
X-Gal-Stammlösung für Agarplatten (1000X)	20 mg/ml	X-Gal (=5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) in N,N-Dimethylformamid
Yeast Suspension Buffer (=Hefesuspensionspuffer)	Clontech, Heidelberg	
Z-Puffer	16,1 g/l	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O
	5,5 g/l	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
	0,75 g/l	KCl
	0,246 g/l	MgSO ₄ · 7H ₂ O
	ad pH 7,0, autoklavieren	

Tabelle III.3: PUFFER, LÖSUNGEN (Fortsetzung)

Substrate	Herstellung
Z-Puffer/X-Gal-Lösung	100 ml Z-Puffer 0,27 ml β -mercaptoethanol 1,67 ml X-Gal-Stammlösung

1.3 Enzyme

Tabelle III.4: ENZYME

Enzym	Bezugsquelle
ApaI Endonuklease	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
BamHI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
BglII Endonuklease	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
CIP Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
EcoRI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
KpnI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
Large Fragment of DNA Polymerase I	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Lysozym (50 mg/ml)	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
NotI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
NsiI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
PstI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
RnaseA (20 mg/ml)	Roche Diagnostics GmbH, Weiterstadt
SalI Endonuklease	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
SmaI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
Spheroblasting Enzyme Mix	Merck, Darmstadt
T4 DNA Ligase	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein und Promega, Mannheim
T4-Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
XbaI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
XhoI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus

1.4 Molekularbiologische Kits

Tabelle III.5: MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS

Name	Bezugsquelle
Big Dye Primer Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
“Double-stranded Nested Deletion Kit“	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Dye-Ex TM -Säulen	Qiagen, Hilden
Expand Long Template PCR-System	Boehringer, Mannheim
High Pure PCR-Product Purification Kit	Boehringer, Mannheim

Tabelle III.5: MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS (Fortsetzung)

Name	Bezugsquelle
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
MicroSpin Columns S-300	Pharmacia Biotech
pGEM-T u. pGEM-TEasy Vector System I	Promega, Mannheim
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden

1.5 Kulturen und Medien

1.5.1 *Escherichia coli*-Stämme und Medien

Tabelle III.6: ZELLINIEN - Bakterienstämme

Bakt.stamm	Charakterisierung
HB101	supE44, $\Delta(\text{mcrC-mrr})$, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, leuB6, thi-1
DH5 α	F^- (80d lacZ M15) endA1-, recA1- hsdR17 ($r_K^- m_F^-$), supE44-, thr1 -, gyrA96-relA1-, (lacZYA-argF) U196
XL1-Blue F'	Tn10 $proA^+ B^+$ lacq (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (NaI^r) thi hsdR17 ($r - k^- m_k^+$) supE44 relA1 lac

Bakterienkulturen (siehe Tab. III.6) wurden in LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid) bei 37 °C kultiviert. LB-Agar enthielt zusätzlich 1,5 % Agar.

1.5.2 Hefe-Stämme und Medien

Tabelle III.7: ZELLINIEN - Hefestämme

Hefe-stamm	Genotyp	Reporter	Transformations-marker
Y190	Mata, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3,112, gal4 Δ , gal80 Δ , cyh ^r 2, LYS2::GAL1 _{UAS} -HIS3 _{TATA} -HIS3, URA3::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ	His3, lacZ	trp1, leu2, cyhr2
Y187	Mat Δ , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3,112, gal4 Δ , met-, gal80 Δ , URA3::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ	lacZ	trp1, leu2

Referenzen: Harper et al., 1993, Flick & Johnston, 1990

Tabelle III.8: GENOMISCHE BESONDERHEITEN des verwendeten Hefestammes

	Reporter Gen	Origin der UAS	UAS reguliert durch	Origin der TATA Sequenz	Expressions -level
Y190	His3 LacZ	Gal1 Gal1	Gal4 Gal4	Gal1 His3(TC+TR)	High High(leaky)
Y187	His3	Gal1	Gal4	Gal1	High

Y190 enthält zwei verschiedene (induzierbare) Reportergene für die Synthese von Histidin (His3) und β -Galactosidase (lacZ), welche von einer Gal4-abhängigen „upstream activating sequence“ (UAS) reguliert werden. Y190 wird verwendet für: Two-Hybrid-Bibliotheksscreen, Cycloheximid-Segregation, β -Gal-Filtertest, Hefepaarung (siehe Tab. III.8).

Y187 enthält nur das Reportergen für die Synthese von Histidin (His3). Y187 wird verwendet für: Two-Hybrid von bekannten Proteinen, β -Gal-Filtertest, Hefepaarung (siehe Tab. III.8).

Die Hefestämme wurden in YPD-Medium (Vollmedium: 20 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt ad 950 ml Aqua bidest. und 2 %-iger Glukose) der Fa. Clontech (Heidelberg) bei 30 °C kultiviert. YPD-Agar enthielt zusätzlich 20 g/l Agar. Flüssigkulturen wurden in einem Warmluftschüttler angezogen.

Für die Selektion transformierter Hefen wurde ein SD-Medium (Minimal SD Base-Medium: 6,7 g/l Nitrogen-Hefe-Basis ohne AS (Fa. Clontech)) verwendet. Dieses SD-Medium wurde mit 100 ml steriler 10x DO-Lösung(-Leu/-His/-Trp) und evtl. mit den gewünschten Zusätzen (200 mg/l L-Histidin HCl Monohydrat, 1000 mg/l L-Leucin und/oder 200 mg/l L-Tryptophan) versetzt (=SD/DO-Medium) und der pH-Wert auf 5,8 eingestellt. Anschliessend wurden 1 M 3-AT (Konzentration wurde experimentell bestimmt), Cycloheximid

(1 mg/ml) bzw. X-Gal (20 mg/ml in DMF) zugefügt.

1.5.3 Zelllinien und Medien

Tabelle III.9: GENOMISCHE BESONDERHEITEN des verwendeten Bakterienstammes

Zelllinie	Charakterisierung	ECACC Nr.
COS-7	von der afrikanischen grünen Meerkatze stammende Nieren-Zelllinie, SV40 transformiert	87021302

Die Zelllinien (siehe Tab. III.9) wurden mit DMEM (Dulbecco's modified Eagles Medium mit 4,5 g/l Glukose) der Firma Sigma, das 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 1 % Antibiotika/Antimykotika Lösung (Asparagin/Arginin 100x Gibco), 1 % HEPES, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % 0,2 M L-Glutamin enthält, kultiviert. Die Anzucht erfolgte bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C in einem Brutschrank (Heraeus Instruments BB6060).

1.6 Antikörper und aufgereinigte Antiseren

Tabelle III.10: PRIMÄRE ANTIKÖRPER

Antigen	Verdünn.	Beschreibung	Firma
GST-tag	1:500	monoklonal, Maus	Santa Cruz
Myc-tag	unverd.	monoklonal, Maus,	9E10-Überstand

verdünnt in Western-Blot-Blocking-Puffer (siehe Tab. III.3)

Tabelle III.11: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

Antigen	Verdünn.	Urspr.spezies	Firma
Anti-Maus Ig, Peroxidase-gekoppelt	1:3000	Schaf	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

verdünnt in Western-Blot-Blocking-Puffer (siehe Tab. III.3)

1.7 Größenstandards

1.7.1 DNA-Längenstandards

Tabelle III.12: DNA-LÄNGENSTANDARDS

Name	Firma	Fragmentlängen [Bp]
1 kb DNA-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein	75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126,

Tabelle III.12: DNA-LÄNGENSTANDARDS (Fortsetzung)

Name	Firma	Fragmentlängen [Bp]
		8144, 9162, 10180, 11198, 12216; 1 µg/µl
100 bp DNA-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2072; 1 µg/µl

1.7.2 Protein-Molekulargewichtstandards

Tabelle III.13: PROTEIN-MOLEKULARGEWICHTSTANDARDS

Name	Bezugsquelle	Proteingrößen [kD]
Low-Range-Standard	BIO-RAD, München	6.5, 14.4, 21.5, 31.0, 45.0, 66.2, 97.4
Broad-Range-Standard	BIO-RAD, München	6.5, 14.5, 21.5, 31, 45, 66.2, 97.4, 116, 200

1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden als HPLC-gereinigte Lyophilisate von verschiedenen Herstellern (v.a. Fa. Clontech, Heidelberg und MWG, Ebersberg) bezogen.

Tabelle III.14: OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE SEQUENZIERUNG VON VEKTOREN

Name	Sequenz (5'→3')
Matchmaker5'AD LD Insert Screening Amplimer Sense(5') für pAS2-1	TCATCGGAAGAGAGTAG
Matchmaker5'AD LD Insert Screening Amplimer Sense(5') für pACT2	CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC
Matchmaker5'AD LD Insert Screening Amplimer Antisense(3') für pACT2	GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT
SP6 für pGEM-T/pGEM-TEasy(3')	GATTTAGGTGACACTATAG
T7 für pGEM-T/pGEM-TEasy(5')	TAATACGACTCACTATAGGG

Tabelle III.15: OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE SEQUENZIERUNG VON VINEXIN-β

Name	Sequenz (5'→3')	Position
Vinup	CACAAAATGGCTGATGGAGGAA	266-287
Vinlow	AACGTTCCGAATTTCTGGGTCCTC	1210-1233
VinC2	TATGTCGACTTCACGAGACACCTGC	9 B + 774-800
VinN1	AATGAATTCGCCGCCAGGCTCAAGTTT	9 B + 359-412
VinC1	AATGTCGACGGGCAGCACCTCCACATA	9 B + 542-559
VinN2	GAAGAATTCGAGGCTGTGGCCCACT	9 B + 617-632

Tabelle III.15: OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE SEQUENZIERUNG VON VINEXIN- β (Fortsetzung)

Name	Sequenz (5'→3')	Position
Vinlow2	AAT GGTACCG CACCGGGCAACGTAATTT	1240-1258 + 10 B

Tabelle III.16: OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE SEQUENZIERUNG VON KINEKTIN

Name	Sequenz (5'→3')	Position
Kinup 1	TAATTTTCCTCTTCTTCTGGCTTTTCA	128-154
Kinup 2	AGTTACTCGCTGCTGTGAAGGAAGAT	1082-1107
Kinup 3	AGCCACCCCTCCCTCTGA	521-539
Kinup 1809	CCCAGATAGCAGCCCAGACCT	1835-1855
Kinup 2004	AGGCCCTGGCAGGTGGCAACT	2030-2048
Kinup 2299	TGGAATTATTCAGGTGGCAACT	2325-2346
Kinup 2540	TTGAAACAGGAAATAAAGGCTCTAAA	2566-2591
Kinup 2687	TTGGAAGAGAAAGAGAAAGACCT	2713-2735
Kinup 3105	TTGAACACCAGAGGAAGAAAAAC	3131-3153
Kinup 3360	GTGAAAAATACAAATCCGTGGTT	3473-3495
Kinup 3906	TCACAAAGGAGAAAGAGCACTACC	4103-4126
Kinlow 3878	TTTACCGCCTGAAGCAACTG	4075-4094
Kinlow 4021	CTGACAAAGTAGAAAGGGTGAAA	4218-4240
Kinlow 4374	TGCTGACGCCATTACAAAAAC	4571-4601
Kinup 959	TTGCTAAAGGAGAAGTCTGGTGT	985-1007
Kinup 1299	CTCACTTGAAGCAGGAAAATGGTA	1325-1348
Kinup 1707	CAGAGCAGAAAAGGGTGAACA	1733-1753
Kinlow 4	GCTGCCTCATGTTCCGCTGTT	1587-1607
Kinlow 3	GATCCTGTAACCACTTCCCTGTATTG	2739-2764
Kinlow 2	CAATTCATTTCCCTTTTCTTTCAACA	2867-2892
Kinlow 1	GGGGGAAAAGAAGATGCCTGTT	3023-3044

Tabelle III.17: OLIGONUKLEOTIDE FÜR PCR-REAKTIONEN

Primer	Sequenz (5' → 3')	Position des PCR-Fragmentes
Kinup1	TAATTTTCCTCTTCTTCTGGCTTTTC	KinD (2636 Bp: 128-2764)
Kinlow3	GATCCTGTAACCACTTCCCTGTATTG	
Kinup2004	AGGCCCTGGCAAATGAGCA	KinK (2064 Bp: 2030-4094)
Kinlow3878	TTTACCGCCTGAAGCAACTG	
ORF	GTCGACC ATGGAGTTTTATGAGTCAGCA	KinORF (1544 Bp: 63-70-1607)
Kinlow4	GCTGCCTCATGTTCCGCTGTT	
Fett : Restriktionsschnittstelle für SalI		
Gal up	AAT GTCGACC ATGGCTTGTGGTCTGGTCGC	423 Bp: 69-473
Gal low	AAA GGTACCT GTCAAAGGCCACACATTTGATC	

Tabelle III.17: OLIGONUKLEOTIDE FÜR PCR-REAKTIONEN
(Fortsetzung)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Position des PCR-Fragmentes
Fett: Restriktionstelle für SalI bzw. KpnI, Kursiv : Linker		
Diff up	AAT GTCGAC GATGGAGTTAGTGCAGGTCC	453 Bp: 54-488
Diff low	AAA GGTACCT CTTGTAAGGTGTTGAAGGTGGG	
Fett: Restriktionstelle für SalI bzw. KpnI, Kursiv : Linker		
Vin up	CACAAAATGGCTGATGGAGGAA	5´-Ende 967 Bp: 266-1233
Vin low	AACGTTCCGAATTTCTGGGTCCTC	
Vin N2	GAAGAATT C GAGGCTGTGGCCCAGT	3´-Ende 641 Bp: 617-1258
Vin low2	AAT GGTACCG CACCGGGGCAACGTAATTT	
Fett: Restriktionstelle für KpnI, Kursiv : Linker		

1.9 Plasmide

1.9.1 Vektoren

Tabelle III.18: VEKTOREN

Vektor	Beschreibung	Größe (Bp)	Referenz	Bezugsquelle
pCMV-β-Gal	SV40 late 16S/19S Splice signals, Gal4 ₍₈₇₃₋₄₀₁₆₎ , SV40 Polyadenylation signal, <i>amp^r</i>	7164	Okayama & Berg, 1983, MacGregor & Caskey, 1989	Clontech, Heidelberg Acc. Nr.: U02451
pGEM-T		3000		Promega, Mannheim
pGEM-T Easy		3015		Promega, Mannheim
pMT2SM		5024		zur Verfügung gestellt von Dr. Collard, Amsterdam
pMT2SM-myc	myc = 10 AS	5058		”

Selektion(LB-Medium): *Amp^R*

Tabelle III.19: VEKTOREN des Matchmaker Two-Hybrid Systems

Vektor	Beschreibung	Selektion (SD Med.)	Größe (kB)	Acc.Nr.	Referenz
pAS2-1	GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, TRP1, <i>amp^r</i> , CYHs2	-Trp	8,4	U30947	Harper et al., 1993
pACT2	GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, LEU2, <i>amp^r</i> , HA-epitope tag	-Leu	8,1	U29899	Li et al., 1994
pCL1	Positivkontrolle, wt full-length GAL4, LEU2, <i>amp^r</i>	-Leu	~15,3		Fields & Song, 1989
pLAM5'-1	Negativkontrolle, Hum. Lamin C ₍₆₆₋₂₃₀₎ in pAS2-1, TRP1, <i>Amp^r</i>	-Trp	~9,0	M13451 (LamC)	Bartel et al., 1993
pVA3	Positivkontrolle zusammen mit pTD1, Murines p53 ₍₇₂₋₃₉₀₎ in pGBT9, TRP1, <i>amp^r</i>	-Trp	6,4		Iwabuchi et al., 1993
pTD1	Positivkontrolle zusammen mit pTD1, SV40 large T-antigen ₍₈₄₋₇₀₈₎ in pGAD3F, LEU2, <i>amp^r</i>	-Leu	~15,0		Li&Fields, 1993

Bezugsquelle: Clontech, Heidelberg

1.9.2 Plasmidkonstrukte

Tabelle III.20: im Labor bereits vorhandene TIAM1-
PLASMIDKONSTRUKTE

Name	Vektor	Insert	Grösse Insert (Bp)	Gen-Bank Zugriffsnr.	Klonierung
PHn-CC-Ex-Tiam1/ pAS2-1	pAS2-1	PHn-CC-Ex	1391	U05245 1683-3074	EcoR1/BamHI
C580-Tiam1/ pAS2-1	pAS2-1	C580	1740	U05245 3542-5282	SalI/XhoI aus HA-C580- Tiam1/pMT2sm blunt in BamHI blunt pAS2-1
N853-Tiam1/ pAS2-1	pAS2-1	N853	2567	U05245 505-3064	XhoI/EheI-Fragm. N853- Tiam1 in N420-Tiam1/ pAS2-1 (SalI/EheI)
C580-Tiam1- GST(3')/pMT2SM	pMT2SM	C580-GST	1740	U05245 3542-5282	SalI/KpnI
C1199-Tiam1- GST(3')/pMT2SM	pMT2SM	C1199-GST	3597	U05245 1685-5282	SalI/KpnI

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Plasmide konstruiert:

Tabelle III.21: KLON-PLASMIDKONSTRUKTE

Name	Vektor	Insert	Grösse Insert (Bp)	Gen-Bank Zugriffsnr.	Klonierung
KlonGal	pGEMTe	69-473	423	NM_002305	PCR-Fragment (s.o.)
myc(5′)-Gal /pMT2SM	pMT2SM-myc	69-473	412	NM_002305	SalI, KpnI
KlonDiff	pGEMTe	54-488	453	AF112208	PCR-Fragment (s.o.)
myc(5′)-Diff /pMT2SM	pMT2SM-myc	54-488	441	AF112208	SalI, KpnI
Klon5′-Vin	pGEMTe	266-1233	967	NM_005775	PCR-Fragment (s.o.)
Klon3′-Vin	pGEMTe	617-1258	660	NM_005775	PCR-Fragment (s.o.)
KlonVin	pGEMTe	266-1258	992	NM_005775	5′-Vin NotI/BspMI u. 3′-Vin KpnI, NarI → SOE
myc(5′)-Vin /pMT2SM	pMT2SM-myc	266-1258	993	NM_005775	KlonVin SalI, KpnI in pMT2-myc
KlonD	pGEMTe	128-2764	2636	Z22551 CDS 70-4140	PCR-Fragment (s.o.)
KlonK	pGEMTe	2030-4094	2064	Z22551 CDS 70-4140	PCR-Fragment (s.o.)
KlonORF	pGEMT	63-70-1607	1544	Z22551 CDS 70-4140	PCR-Fragment (s.o.)
KlonKD	pGEMTe	128-4094	3966	Z22551 CDS 70-4140	KlonK u. D NsiI, KlonD CIAP
KlonOKD	pGEMT (5′),e(3′)	70-4094	4024	Z22551 CDS 70-4140	KlonKD u. ORF ApaI, BamHI (sequ.)

1.10 Genbibliothek

humane Nieren-cDNA-Bank von der Firma Clontech, einkloniert in die „multiple cloning site“ des pACT2-Hefevektors (Tabelle III.19).

2 Methoden

2.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.1.1 Photometrische Bestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm (Schichtdicke = 1 cm) in einem Spectrophotometer (Beckmann DU-640) bestimmt. Eine Absorption $A_{260}=1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA bzw. 33 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotide. Ein Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm Wellenlänge zeigte die Reinheit der gemessenen Probe an. Der Wert für reine DNA liegt zwischen 1,7 und 1,9. Die Berechnung der in den Proben enthaltenen DNA-Konzentration erfolgte in der Einheit $\text{ng}/\mu\text{l}$ nach der Formel: $OD_{260nm} \times 50x$ Verdünnungsfaktor.

2.1.2 Ethidiumbromid-Fluoreszenz

Für die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Ethidiumbromid-Fluoreszenz wurde die DNA-Lösung zusammen mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration in einem Agarosegel in Gegenwart von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$) aufgetrennt. Die Gele wurden für 10 min in 0,1-prozentiger Ethidiumbromidlösung (in TBE) gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und kann durch Absorption im UV-Bereich sichtbar gemacht werden. Ein Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten der Banden unter UV-Licht (302 nm) erlaubte eine Konzentrationsabschätzung.

Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem digitalen Bildverarbeitungssystem (Fröbel Datentechnik, Deutschland) und einem angeschlossenen Thermotransferdrucker (P68E, Mitsubishi, Japan).

2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Einzelkolonien wurden für DNA-Präparationen in 3 ml-LB-Amp-Medien als „Vorkultur“ angeimpft und mindestens 8 h bei 37 °C unter Schütteln in einem Warmluftschüttler inkubiert.

2.2.1 DNA-Präparationen mittels Anionenaustauscherharzsäulen

Plasmid-DNA wurde mit dem Plasmid Mini/Midi/Maxi-Kit der Fa. Qiagen, basierend auf den von Birnboim 1979 und 1983 beschriebenen Methoden [6][7], isoliert. Das Prinzip ist die alkalische Lyse der Bakterien und die Bindung der Plasmid-DNA an ein Anionenaustauscherharz. Die Aufreinigung der DNA erfolgt durch mehrmaliges Waschen des Harzes und anschließende Elution durch einen Hochsalzpuffer. Anschliessend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt.

Das „Plasmid-Mini-Kit“ wurde für 1,5 ml Kulturvolumen, das „Plasmid-Midi-Kit“ für 25 ml Kulturvolumen und das „Plasmid-Maxi-Kit“ für 100 ml Kulturvolumen verwendet.

2.2.1.1 Minipräparation

Das Bakterien-Pellet einer 1,5 ml LB-Amp-Medium-Vorkultur wurde in 0,3 ml P1-Resuspensionspuffer (siehe Tab. III.3) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 ml P2-Lysispuffer zur Lyse wurde 4-6 mal invertiert und dann bei RT für 5 min inkubiert. Zur Fällung von Proteinen wurde der Ansatz sofort nach dem Vermischen mit 0,3 ml kaltem P3-Neutralisationspuffer für weitere 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation bei 13000 Upm für 10 min bei 4 °C wurden die Überstände filtriert und das Filtrat auf eine Qiagen-tip-20-Säule gegeben, die zuvor mit 1 ml QBT-Äquilibrierungspuffer äquilibriert wurde, verteilt. Anschließend wurde die Säule durch viermalige Zugabe von je 1 ml QC-Waschpuffer gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte jeweils mit 0,8 ml QF-Elutionspuffer. Nach Zugabe von 0,56 ml (=0,7 Volumen) Isopropanol wurde der Ansatz bei 15000 Upm und RT für 30 min zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände wurde das Pellet mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und dann für etwa 10 min bei RT getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde jeweils in 50 µl 1 mM Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert. Die Plasmid-DNA-Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt (siehe 2.1.1).

2.2.1.2 Midi/Maxipräparation

Es wurden jeweils 25 ml (Midi)/100 ml (Maxi)-LB-Amp-Vorkulturen mit einer 1:100 Kulturvolumen der Vorkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Kulturen wurden bei 5000 Upm und 4 °C für 10 min in einer Beckmann J2-MC Zentrifuge (Rotor JA 10) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Pellets zusammen in 4/10 ml Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 4/10 ml Puffer P2 und Inkubation bei RT für 5 min. Proteine wurden mit 4/10 ml eisgekühlter Puffer P3 für 15/20 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation bei 13000 Upm für 30 min bei 4 °C wurden die Überstände filtriert und das Filtrat auf eine Qiagen-tip-100/500-Säule gegeben, die zuvor mit jeweils 4/10 ml Puffer QBT äquilibriert wurde. Anschließend wurden die Säulen durch zweimalige Zugabe von 10/30 ml Puffer QC gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte jeweils mit 5/15 ml Puffer QF. Nach Zugabe von je 3,5/10,5 ml (=0,7 Volumen) Isopropanol wurden die Ansätze bei 15000 Upm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände wurden die Pellets für etwa 10 min bei RT getrocknet. Die Pellets wurden jeweils in 500 µl Tris-0,1 EDTA (pH 8,0) resuspendiert. Die Plasmid-DNA-Menge wurde anschließend photometrisch bestimmt (siehe 2.1.1). Plasmid-DNA konnte für analytische Zwecke auch (statt Reinigung über die Anionenaustauscherharzsäule) direkt nach Zugabe von P3 Neutralisierungspuffer mit Isopropanol gefällt werden.

2.2.2 Glyzerin-Stammkulturen

Für Glyzerin-Stammkulturen wurden die Bakterien-Vorkulturen mit 1/2 Volumen 50 %igem Glyzerin vermischt und bei -80 °C gelagert.

2.3 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.3.1 Glätten überhängender Enden von DNA-Fragmenten (Klenow)

Für eine „Blunt-end“-Ligation wurden die überhängenden 5'-Enden von DNA-Fragmenten mit der grossen Untereinheit der „DNA-PolymeraseI“ (=Klenow Fragment) aufgefüllt nach Herstellerangaben der Firma Gibco BRL. Folgender Ansatz wurde auf Eis vorbereitet: 1 µg DNA wurde mit 0,5 U Klenow-Fragment und 0,5 mM dNTPs in React2-Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I besitzt eine 3' 5'-Exonuklease-Aktivität, so daß überhängende 3'-Enden ebenfalls entfernt werden.

2.3.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Da PCR-Fragmente keine endständigen 5'-Phosphat-Gruppen besitzen, wurden sie vor der Ligation in Vektoren phosphoryliert. Die DNA wurde mit 5-10 U T4-Polynukleotidkinase in dem mitgelieferten Puffer und 1 mM ATP 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 10 min Hitze-Inaktivierung der Kinase bei 65 °C wurden die Fragmente für die Ligation eingesetzt. Wurde vor der Phosphorylierungsreaktion eine Klenow-Reaktion durchgeführt, mußten die Desoxynukleotide entweder durch Ethanol-Fällung (siehe 2.4.1) oder durch Agarosegel-Gelektrophorese (siehe 2.4.2) entfernt werden.

2.3.3 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten („Cippen“)

Vor der Ligation wurden linearisierte Vektoren mit hitzeinaktivierbarer, alkalischer Phosphatase behandelt. Ziel des Cippens des Vektors ist die Entfernung des 5'-Phosphats, sodass eine Religation des Vektors verhindert wird.

Für die Dephosphorylierung wurde dabei die DNA mit 0,1 U CIP(= „Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“)/pmol 5'-terminale Phosphatenden (bei glatten Enden 1 U/pmol) in dem mitgelieferten Puffer 1 h bei 37 °C inkubiert. 2 µg eines 5 kB grossen linearisierten Plasmids entsprechen 1,4 pmol an 5'-Enden. Um die alkalische Phosphatase aus dem Ansatz zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt und die DNA anschliessend gefällt (siehe 2.4.1).

2.3.4 Kontrollierte Deletionen von DNA-Fragmenten („Nested Deletion“)

Für einige Sequenzierungen wurden größere DNA-Fragmente stufenweise verkürzt, um mit den vom Vektor ausgehenden Primern vollständig sequenziert werden zu können. Zur

Erzeugung der Deletionsklone wurde der „double-stranded Nested Deletion Kit“ (Pharmacia) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte gemäß Vorschrift. Für die eigentliche Deletionsreaktion, den Abbau von 5'-überhängenden Enden durch die Exonuklease III, wurden die Reaktionsbedingungen so gewählt, daß der theoretische Abstand der Deletionsprodukte 200 Bp betrug (75 mM NaCl, 30 °C, Probenentnahme alle 2 min). Proben der Reaktionsprodukte wurden anschließend im Agarosegel analysiert, um die Längen der deletionsverkürzten DNA-Fragmente abschätzen zu können.

2.3.5 Ligation von DNA

Für eine Ligation von zwei DNA-Fragmenten wurden die Mengen an Vektor und Insert nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{ngVektor \times Groesse\ des\ Inserts\ in\ kb}{Groesse\ des\ Vektors\ in\ kb} \times molares\ Verhaeltnis \times \frac{Insert}{Vektor} = ng\ Insert$$

Das molare Verhältnis zwischen Insert und Vektor betrug bei „Sticky-end“-Ligation 3:1 und bei „Blunt-end“-Ligation 5:1. Der Ligationsansatz wurde mit 1 U T4-DNA-Ligase und dem vom Hersteller mitgelieferten Inkubationspuffer 1 h bis üN bei 4 °C (bei einer „Blunt-end“-Ligation bei 16 °C) inkubiert.

Die Überprüfung des Ligationserfolges erfolgte elektrophoretisch.

Als Negativkontrolle diente ein Ligationsansatz nur mit Vektor-DNA ohne Insert-DNA.

2.4 Aufreinigung von DNA

2.4.1 Fällung von DNA

DNA wurde vor der Fällung [48] zunächst mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, indem der Ansatz nach 1 min Vortexen 5 min bei 14000 Upm zentrifugiert wurde. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppi überführt und mit 1 Volumen Chloroform versetzt. Nach erneutem Vortexen und 2 min Zentrifugation bei 14000 Upm wurde die wässrige Phase mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 0,7-fachen Volumen Isopropanol bzw. 2-4-fachen Volumen 100 %-igem Ethanol versetzt und vorsichtig vermischt. Die Fällung der DNA erfolgte für 2 h bis üN bei -20 °C. Anschliessend wurde die DNA für 20 min bei 4 °C und 14000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 14000 Upm für 2 min wurde der Überstand abpipetiert, und das Pellet erneut gewaschen. Das Pellet wurde für 2 min bei RT getrocknet und anschließend in TE-Puffer oder sterilen H₂O resuspendiert.

2.4.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen). Die DNA wurde aus dem Agarosegel unter UV-Licht (312 nm) herausgeschnitten und mit dem dreifachen Gelvolumen QB-Puffer (Qiagen) versetzt und für 10 min bei 50 °C inkubiert, bis sich das Gel aufgelöst hat. Die aufgelösten Proben wurden mit einem Gelvolumen 100 %-igem Isopropanol vermischt und auf die Säulen (Qiagen) gegeben. Die Proben wurden für 1 min bei ca. 15000 Upm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Es wurde einmal mit PE-Waschpuffer (Qiagen) gewaschen. Der Durchlauf wurde abermals verworfen. Zum Trocknen der Säule wurde die Zentrifugation ohne Zugabe von Puffer wiederholt. Die DNA wurde mit 50 μ l 1 mM Tris-Cl (pH 7,5) bzw. H₂O eluiert, indem die Säule für 1 min bei 15000 Upm zentrifugiert wurde. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (siehe 2.1.1) bestimmt.

2.4.3 Säulen-Trennverfahren

Um die Reinheit der DNA zu erhöhen, wurde die gewonnene Plasmid-DNA über „Microspin-300-Sepharose-Säulen“ (Pharmacia) gemäss Herstellerangaben aufgereinigt.

2.5 Amplifizierung von DNA

2.5.1 mittels Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die in vitro-Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und spezifischer Oligonukleotide, die an flankierende Sequenzen des 5'- und 3'-Stranges hybridisieren [68].

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle III.22: PCR-ANSATZ

Template	50 ng Nieren-cDNA-Bank
Primer (5'und 3')	je 10 pmol
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	je 350 μ M
Reaktionspuffer	1x PCR-Puffer mit 1,75 mM Mg ²⁺
Taq-Polymerase (= Expand Long Template Enzym)	0,75 U
	ad 50 μ l

Zur Kontrolle, d.h. zum Ausschluß von Kontaminationen mit Fremd-DNA, wurde ein Reaktionsansatz ohne Template mitgeführt. Die Amplifikation erfolgte mit dem Expand Long Template PCR System (Boehringer) (modifiziert nach [68]) nach folgendem Programm in einem Thermocycler von Gene Perkin Elmer oder Biometra:

Tabelle III.23: PCR-PROGRAMM

		Dauer	Temperatur
1	Initiale Denaturierung	2 min	94 °C
2	Denaturierung	10 s	94 °C
3	Hybridisierung	6 min 30 s 60 s 30 s 60 s 60 s 60 s	64 °C (Vinexin)* 58 °C (Vin3')* 58 °C (Vin5')* 58 °C (Diff bzw. Galektin)* 52 °C (KlonD)* 52 °C (KlonK)* 52 °C (KlonORF)*
4	Elongation	1 min (Vinexin) 1 min (Vin3') 2 min (Vin5') 1 min (Diff bzw. Galektin) 3 min (KlonD) 2:30 min (KlonK) 1 min (KlonORF)	72 °C
	10 Zyklen von Schritt 2-4		

*Für die Berechnung der mittleren Schmelztemperatur (T_m) eines Primers wurde die folgende Gleichung benutzt [76]: $T_m = (\text{AnzahlG+C} * 4 \text{ °C}) + (\text{AnzahlA+T} * 2 \text{ °C})$. Die für die PCR gewählte Temperatur der Hybridisierungsreaktion lag jeweils 4 °C unter der T_m des verwendeten Primerpaares. Zum Einfügen von Schnittstellen wurden Oligonukleotide benutzt, deren Sequenz so verändert war, daß die gewünschte Mutation bei der PCR generiert wurde. Zur Kontrolle der PCR-Reaktion wurden Aliquots der Ansätze auf Agarosegelen (siehe 2.6.3) elektrophoretisch aufgetrennt. PCR-Isolate wurden mit dem „HighPurePCR-Product Purification Kit“ (Boehringer) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.5.2 „Splicing by overlap Extension“

Spleissen durch Ausdehnung der Überlappung [35] ist eine neue Methode zur Rekombination von DNA-Molekülen an bestimmten Verknüpfungsstellen unabhängig von der Nukleotidsequenz im Bereich der Rekombinationsstelle und ohne Gebrauch von Restriktionsenzymen oder Ligasen. Die Fragmente, die zusammengefügt werden sollen, werden in separaten PCRs hergestellt. Die Primer werden so designed, dass die Enden dieser Produkte eine komplementäre Sequenz enthalten. Wenn diese beiden PCR-Produkte vermischt, denaturiert und hybridisiert werden, überlappen die Stränge, die die passende Sequenz am 3'-Ende haben und dienen somit als Primer für einander. Durch eine Ausdeh-

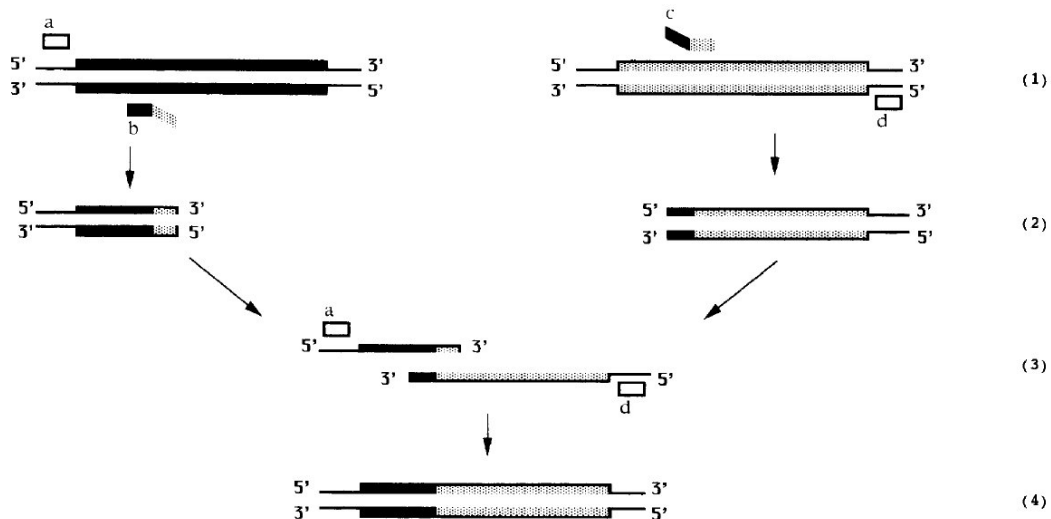


Abbildung III.1: „Splicing by overlap extension“ (Abb. aus Warrens, AN. et al, Gene 186 (1997)) [86]

nung dieser Überlappung durch die DNA-Polymerase erhält man ein Molekül, in dem die beiden Originalsequenzen „zusammengespleisst“ sind. Diese Technik wird zur Konstruktion von Genen benutzt, die ein Mosaik-Fusionsprotein kodieren, die zwei verschiedene MHC-I-Gene enthalten.

2.6 Analyse von DNA

2.6.1 Endonukleolytische Restriktion von DNA

1 μg Plasmid-DNA wurde mit einem 2 bis 3-fachen Überschuß an Enzymeinheiten eine Stunde in dem vom Hersteller gelieferten Puffer und der angegebenen Temperatur inkubiert. Die Proben wurden entweder in einem Agarosegel (siehe 2.6.3) aufgetrennt oder mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und mit Ethanol gefällt (siehe 2.4.1).

2.6.2 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode [72] in einem „ABI-Prism 310 DNA Sequencer“ (Perkin Elmer) durchgeführt.

Die Markierungsreaktion erfolgte mit dem „Big-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit“, wobei 1 μg DNA und 10 pmol Primer eingesetzt wurden. Die Sequenzierungen erfolgten teilweise mit genspezifischen Primern (siehe 1.8), teilweise mit Primern, die im Vektor hybridisierten (siehe 1.8). Im zweiten Fall wurden die zu sequenzierenden Klone zunächst deletionsverkürzt (siehe 2.3.4).

Nach Zugabe von 4 μl des „Terminator-Ready-Reaction-Mix“ (Fa.ABI) wurde das Volumen der Ansätze mit Aqua bidest. auf 20 μl aufgefüllt. Der „Terminator-Ready-Reaction-

Mix“ enthielt AmpliTaq-Polymerase, Puffer, dNTPs und die Farbstoffe (2,3-didesoxy-NTPs (ddNTPs)), die bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren. Nach dem Prinzip des Kettenabbruchs durch Einbau eines ddNTP entstanden bei der anschließenden zyklischen Polymerase-Reaktion fluoreszierende Fragmente unterschiedlicher Länge. Die Polymerase-Reaktion erfolgte nach folgendem Programm im Thermocycler (Biometra oder Perkin Elmer):

Tabelle III.24: SEQUENZIER-PROGRAMM

		Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	10 sec	96 °C
2	Primer-Hybridisierung	5 sec	45 °C
3	Extension	4 min	60 °C
4	25 Zyklen von Schritt 1 bis 3		
5	Abbruch	∞	4 °C

Die DNA wurde von überschüssigen ddNTPs und Taq-Polymerase durch eine Phenol-/Chloroform-Extraktion und anschließende Fällung der DNA mittels einer Ethanol-Acetat-Präzipitation (siehe 2.4.1) entfernt. Das Präzipitat wurde dann in 20 μ l „Template-Suppression-Reagent“ gelöst. Die Proben wurden bei 96 °C für 2 min denaturiert.

Teilweise wurden nicht eingebaute Nukleotide sowie die DNA-Polymerase auch mittels „Dye-ExTM“-Säulen (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Sequenzierungsansatz entfernt.

Die so vorbereiteten Proben wurden dann mit dem Sequenzierer „Genetic Analyzer ABI-Prism 310“ (Perkin Elmer) analysiert. Über die Auftrennung der entstandenen Fragmente in einer Polymermatrix und Messung der Fluoreszenz wurden die Nukleinsäuresequenzen automatisch bestimmt. Anhand der Werte wurden von dem Gerät Elektropherogramme mit einer rechnerisch ermittelten Basensequenz erstellt.

Mit der automatischen Sequenzierung ist es möglich, Nukleinsäuresequenzen bis zu einer Länge von etwa 500 Bp zu erfassen. Die Identifikation der Sequenzen aus dem „Yeast-Two-Hybrid“-Screen erfolgte durch den Vergleich mit bekannten Sequenzen als auch mit unbekannten EST-Sequenzen aus der Datenbank (PubMed, Blast, GenBank, EST Data, Swiss-Prot oder Prosite Datenbank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.6.3 Native Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele benutzt. Je nach erwarteter Länge wurden Agarosegele zwischen 1 % (Auftrennung von Fragmenten > 1000 Bp) und 2 % (Auftrennung von Fragmenten < 500 Bp), wie in [48] beschrieben, verwendet. Die Agarose wurde unter Erhitzen in einer Mikrowelle bei 850 W in 1x TBE Puffer gelöst, auf etwa 60 °C abgekühlt und auf Gelträger gegossen.

Vor dem Auftragen auf die Gele wurden die DNA-Proben mit 1/6 Volumen Ladepuffer (6x) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 60 bis 120 V in 1x TBE.

Anschließend wurden die Gele für 10 min in 0,1-prozentiger Ethidiumbromidlösung (in TBE) gefärbt (siehe 2.1.2).

2.7 Bakterien

2.7.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

50 ml LB-Medium, das 10 mM MgCl_2 und 0,2 % Glucose enthielt, wurden mit 1/10 Volumen einer üN-Bakterienkultur angeimpft, bis zu einer OD_{600} von 0,3 bis 0,6 inkubiert und für 10 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden bei 6000 Upm für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 μl eiskaltem LB-Medium (incl. MgCl_2 , 0,2 % Glucose) aufgenommen und mit 2,5 ml „Storage-Medium“ (36 % Glycerin, 12 % PEG 7500, 12 mM MgCl_2 in LB-Medium, sterilfiltriert) gemischt. Die Bakterien wurden als Aliquots zu je 100 μl bei -80 °C gelagert [56].

2.7.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation, d.h. das Einbringen von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen, erfolgte (modifiziert nach [30]) in selbst hergestellten kompetenten *E. coli*-Zellen-Bakterien (siehe 2.7.1), um eine höhere Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhalten: 10-100 ng DNA bzw. der Ligationsansatz wurden mit je 100 μl kompetenter *E. coli*-Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mit einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und anschließender Kühlung für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 600 μl LB-Medium wurden die Ansätze für 1 h unter Schütteln in einem Eppendorf Thermomixer bei 37 °C inkubiert. Jeweils 100 μl der Ansätze wurden auf LB-Agarplatten, die Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) enthielten, ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert. Nur *E.colis*, die ein Plasmid erhalten haben, welches für Ampicillin-Resistenz kodiert, konnten auf den LB-Amp-Agarplatten wachsen.

2.7.3 α -Komplementation

Zur Identifizierung rekombinanter Plasmide wurde dem Agar 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-Gal (5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl/ β -D-Galaktopyranosid) in Dimethylformamid und 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid) in Wasser zugesetzt. Plasmide, die das lacZ Gen tragen, kodieren für das α -Peptid der β -Galaktosidase. Das IPTG induziert die Bildung der β -Galaktosidase, die das Substrat X-Gal spaltet. Durch die Klonierung eines DNA-Fragmentes in die kodierende Region des α -Peptids, geht die Fähigkeit zur α -Komplementation verloren. Dadurch kann der Stamm DH5 α -Blue keine enzymatisch aktive β -Galaktosidase

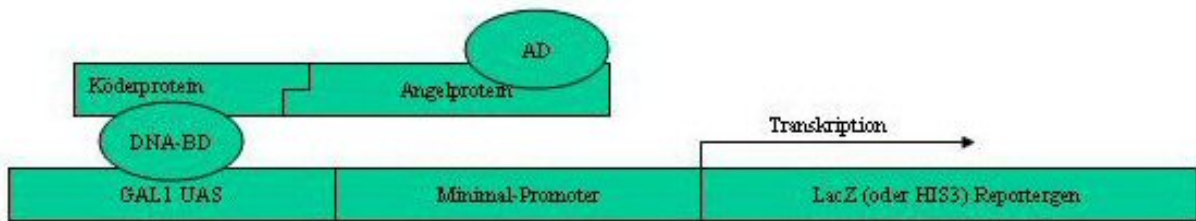


Abbildung III.2: YTH-Prinzip

bilden. Kolonien, in denen enzymatisch aktive β -Galaktosidase gebildet wird, sind blau gefärbt. Kolonien mit rekombinanten Plasmiden sind deshalb weiß.

2.8 Identifikation spezifischer Protein-Protein-Interaktionen mittels Yeast Two Hybrid-Analyse

Das von Fields und Song 1989 [22] erstmalig beschriebene Yeast-Two-Hybrid System dient der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*.

Prinzip des „MATCHMAKER Two-Hybrid System“ der Firma Clontech ist es, eine transkriptionsaktivierende Domäne (Gal4-Aktivierungsdomäne(AD)) und eine DNA-bindende Domäne (Gal4-DNA-Bindedomäne(BD)), die physikalisch voneinander getrennt wurden, mit Hilfe interagierender Proteine in räumliche Nähe zu bringen, die dann die Expression eines nachgeschalteten Reportergens (Gal4-Transkriptionsaktivator der Hefe) regulieren. Bei einer *in vivo* Interaktion der beiden mit den Gal4-Untereinheiten fusionierten Proteine entsteht ein funktionsfähiger Gal4-Transkriptionsaktivator, der die Transkription der entsprechenden Reportergene in der Hefe aktiviert.

2.8.1 „Screening“ einer humanen Nieren cDNA-Bibliothek

Eine humane Nieren cDNA-Gal4-AD-Bank (siehe 1.10) wurde zusammen mit dem Köderplasmid (Gal4-DNA-BD-P), das für die Gal4-Bindedomäne und das Köderpeptid (P) kodiert, in den Hefestamm Y190 kotransformiert (siehe 2.8.2), auf SD („synthetic dropout“-Medium)/-Leu/-Trp/-His (-LTH)/+ 50 mM 3-AT (=3-Amino-1,2,4-Triazol)-Agarplatten ausplattiert und für 6 Tage bei 30 °C inkubiert. Hierbei dienten -Leu und -Trp als Transformationsmarker für die Plasmide pAS2-1(-Leu) bzw. pACT2(-Trp), -His diente der Selektion interagierender Fusionsproteine (s.o.) und der kompetitive His3-Protein Inhibitor 3-AT (3-Amino-1,2,4-Triazole) diente der Unterdrückung des Hintergrundwachstums des Stammes Y190. Entsprechend konnten nur Hefeklonen wachsen, in denen die beiden Fusionsproteine miteinander interagierten.

His⁺-Kolonien, deren Durchmesser > 2 mm war, wurden erneut auf -LTH/+ 50 mM 3-

AT-Platten vereinzelt und erneut für 6 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die β -Galaktosidase-Aktivität mittels „Colony Lift Filter Assay“ (= CLFA) (siehe 2.8.4) in den Hefeklonen bestimmt. Von den positiven Kolonien wurden Glycerin-Stammkulturen (1 Kolonie + 1 ml Kultur + 0,43 ml 50 %-iges Glycerin) angefertigt, die dann nochmals auf -LT-Platten ausgestrichen wurden. Hiervon wurde ein zweiter CLFA durchgeführt, um die Zahl falsch positiver Kolonien, die aufgrund der His-Eigenaktivität entstanden sind, zu verringern.

2.8.2 Kotransformation (in Y187 bzw. Y190)

2.8.2.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

Kompetente Hefezellen wurden nach der Lithium-Acetat Methode [28], wie im „Yeast Protocols Handbook“ der Fa. Clontech beschrieben, hergestellt.

Zunächst wurde zur Herstellung von kompetenten Hefezellen 1 ml YPD mit ca. 6 Y187 bzw. Y190-Hefezellkolonien (siehe Tab. III.7) angeimpft, in 49 ml YPD verdünnt und bei 30 °C üN inkubiert. 150 ml YPD wurden mit der üN-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Nach Umfüllen von je 50 ml der Zellkultur in vier Falcons wurde 5 min bei 1000 x g und RT zentrifugiert. Das Hefezellpellet wurde in je 6 ml sterilem Wasser resuspendiert, die vier Suspensionen wieder in einem Falcon vereint und nochmals 5 min bei 1000 x g und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 0,75 ml 1x TE/LiAc-Lösung aufgenommen.

2.8.2.2 Kotransformation von „Beute- (= prey)“ und „Köder- (= bait)“-Plasmiden

Für die Kotransformation als Kontrolltest wurden zu je 0,1 μ g „bait“-Plasmid, 0,1 μ g „prey“-Plasmid und 0,1 mg Heringssperma 100 μ l kompetente Hefezellen (siehe 2.8.2.1) gegeben. Der Transformationsansatz wurde mit 0,6 ml PEG/LiAc-Lösung versetzt, gevortext und bei 30 °C 30 min geschüttelt. Nach Zugabe von je 70 μ l DMSO wurden die Reagenzgefäße einige Male invertiert. Nach 15 min Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurden die Ansätze für 1-2 min auf Eis abgekühlt. Nach 5 s Zentrifugieren bei 14000 Upm wurden die Pellets in je 0,5 ml 1x TE-Puffer resuspendiert. Je 200 μ l des Ansatzes wurden auf -LT-Platten ausplattiert und für ca. 5 Tage bei 30 °C „upside-down“ inkubiert.

Zur Auswertung wurde der CLFA herangezogen (siehe 2.8.4). Die Kotransformation wurde mit den im CLFA positiv reagierenden Klonen zweimal wiederholt.

Für die Kotransformation eines Bibliotheksscreens (0,1-0,5 mg „prey“-Plasmid-DNA) wurden nach Angaben des Herstellers (Clontech) entsprechend grössere Mengen verwendet.

Zusätzlich wurden folgende Kontrolltransformationen durchgeführt:

Beim Bibliotheksscreen:

1. Transformation mit dem Plasmid pCl1: kodiert für vollständiges wt Gal4 und dient als positive Kontrollreaktion für den β -Galactosidase-Test (s.u.)
2. Kotransformation mit den Plasmiden pTD1 und pVA3-1: pTD1 kodiert für ein Fusionsprotein aus dem „SV40 large T-antigen“ und Gal4-AD; pVA3-1 kodiert für ein Fusionsprotein aus murinem p53 und Gal4-BD. Die Kotransformation dieser beiden Plasmide dient als Positivkontrolle für eine Interaktion zwischen zwei Proteinen.

Beim Kontrolltest:

1. Transformation mit pLam5'-1: kodiert für humanes Lamin C und dient als Negativkontrolle für den β -Galaktosidase-Test (s.u.)
2. Transformation mit pAS2-1: kodiert für die Gal4-Bindedomäne (Gal4-BD) und dient als Negativkontrolle, da der leere Vektor (ohne Köder) bei einer spezifischen Proteinbindung nicht mit der Gal4-AD interagieren darf
3. Transformation mit C580-Tiam-pAS2-1: kodiert für die C-terminalen 580 AS von Tiam1 und dient als Negativkontrolle, da C580 vermutlich keine Rolle bei einer spezifischen Proteinbindung spielt.

2.8.3 Hefepaarung („Mating“)

Die Hefepaarung stellt eine Methode dar, mit der es möglich ist, zwei verschiedene Plasmide in dieselbe Wirtszelle zu schleusen. Je 1 Kolonie eines MAT α (Y187) und MAT α (Y190)-Hefestammes werden zur Paarung gebracht, wobei die Plasmide beider Stämme („Köder“ und „Beute“) zusammengebracht werden.

Hierzu wurden in einem Ansatz je eine Kolonie mit dem „Beuteplasmid“ (in Y190) und eine Kolonie mit dem „Köderplasmid“ (N853 und pLam (als Negativkontrolle)) (in Y187) in 500 μ l YPD resuspendiert und üN bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 100 μ l Aliquots auf -LT-Platten ausplattiert und für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Auswertung wurde der „Colony Lift Filter Assay“ (siehe 2.8.4) verwendet.

2.8.4 „Colony lift filter assay“ zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (β -Gal-Filtertest)

Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität von His⁺-Hefekolonien erfolgte in Form eines „Colony-Lift Filter Assays“ [12] gemäß den Angaben des Herstellers (Clontech). Der Assay beruht auf der enzymatischen Umsetzung von X-Gal in den Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo durch das Enzym β -Galaktosidase, welches bei einer erfolgreichen Protein-Protein-Interaktion in den Hefezellen exprimiert wird.

Dazu wurde steriles, feuchtes Whatman-Papier auf die Zellkolonien gelegt. Währenddessen bereitete man 3 ml Z-Puffer/X-Gal-Lösung in einer Petrischale vor, in der ein Whatman-Papier getränkt wurde. Dann wurde mit einer sterilen Pinzette das Whatman-Papier von den Zellkolonien abgezogen, nachdem man zur Orientierung Löcher mit der Pinzette gestanzt hat. Das Whatman-Papier mit den darauf haftenden Kolonien wurde für 10 s zur Permeabilisierung der Zellen in flüssigen Stickstoff gehalten und nach dem Wiederauftauen, möglichst luftblasenfrei, mit den Kolonien auf der Oberseite, auf den eingeweichten Filter (s.o.) in der 3 ml Z-Puffer/X-Gal-Lsg. gelegt und bei 30 °C inkubiert. Die Auswertung des Tests erfolgte für 1 bis 6 h nach Zugabe des Substrates. Die Färbung der Hefezellen wurde abgeschätzt und je nach Intensität mit 0 (= nicht blau) bis 3 Punkten (= stark blau) bewertet. Der Farbttest wurde jeweils dreimal wiederholt. Klone, die nicht in allen 3 Experimenten positiv (= blaue β -Galaktosidase exprimierende Kolonien) bewertet werden konnten, wurden verworfen. Die blauen Kolonien wurden auf neue Agarplatten ausgestrichen oder in frischem Medium inkubiert.

Als Positivkontrolle wurde β -Galaktosidase alleine verwendet. Hierfür wurde nach Angaben des Herstellers ein mit β -Galaktosidase getränktes Whatman-Papier in die mit Z-Puffer/X-Gal-Lsg. vorbereitete Petrischale gelegt, bis das Whatman-Papier sich blau färbte.

2.8.5 Segregation positiver Hefeklone auf -Leucin/Cycloheximid-Selektions-Agarplatten

Positive Hefeklone aus dem „Library-Screen“ wurden auf -Leucin/Cycloheximid (-Lcyc)-Selektions-Agarplatten ausgestrichen. Der Zusatz von Cycloheximid (1 mg/ml) bewirkt, dass die Hefezellen das Köderplasmid (P-pAS2-1) verlieren, da es nicht für eine Cycloheximid-Resistenz kodiert. Dagegen besitzt das Beuteplasmid (P-pACT2) das Leu2-Gen und kann dementsprechend Leucin exprimieren, sodass Hefezellen, die diesen Vektor besitzen, auf -L/+cyc-Platten (also Medium ohne der AS Leucin und mit dem Antibiotikum Cycloheximid) Kolonien bilden können.

Je eine Zellkolonie von der -LT-Platte wurde mit einer Impföse in 200 μ l steriles Wasser aufgenommen, resuspendiert und dann auf -Lcyc-Platten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C.

2.8.6 Plasmid-DNA-Isolation aus Hefe

Für die Isolation der Hefe-Plasmid-DNA wurden Zellkolonien des „Matings“, die β -Galaktosidase exprimierten, in 0,5 ml -Leucin(-L)-Medium angeimpft und für ca. 22 h bei 30 °C inkubiert. Der Ansatz wurde in einen Erlenmeyer-Kolben mit 10 ml -L-Medium überführt und weitere 15 h bei 30 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 600 x g für 5 min wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 100 μ l Hefesuspensionpuffer resuspendiert.

Der Ansatz wurde erneut für 10 s bei 13000 Upm zentrifugiert und das Pellet in 50 μ l „Yeast Enzyme Enhancer“, 1 μ l „Yeast Enzyme Salts“ und 8 μ l „Spheroblasting Enzyme Mixx“ aufgenommen. Nach ca. 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Hefezellen mit 200 μ l 20 % SDS lysiert, 1 min gevortext und mit 1 ml TE (pH 8) aufgefüllt. Nach zweimaliger Phenol-Chloroform-Extraktion wurde eine Alkohol-Acetat-Präzipitation (siehe 2.4.1) mit einem viermaligen Waschschrift mit 70 %-igem Ethanol durchgeführt. Die getrocknete DNA wurde in 40 μ l 1 mM Tris/HCl (pH 8) gelöst und bei 50 °C für 10 min im Thermomixer gelöst. Ein Teil der isolierten Hefe-Plasmid-DNA wurde für die *E. coli*-Transformation (siehe 2.7.2) eingesetzt. Die restliche DNA wurde mit 20 μ g RNaseA bei 37 °C für 1h behandelt. Zur Entfernung der RNase folgte eine erneute Phenol-Chloroform-Extraktion und Alkohol-Acetat-Präzipitation (siehe 2.4.1). Das reine DNA-Pellet wurde in 50 μ l 1 mM Tris/HCl (pH 8) resuspendiert.

2.9 Zellkultur

2.9.1 Kultivierung der adhärent wachsenden COS7-Zellen

Das Anzüchten der Zellen erfolgte in NunclonTM-Kulturgefäßen der Größen T 30 (25 cm², 4 ml DMEM-Medium), T 60 (75 cm², 15 ml Medium) und T 150 (175 cm², 25-30 ml Medium) unter den in 1.5.3 beschriebenen Bedingungen. Die in einer Kryolösung (70 % DMEM, 20 % FCS, 10 % DMSO) in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen unterschiedlicher Passage wurden zunächst in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät.

Nach 3 bis 4 Tagen wurden die Kulturen mikroskopisch untersucht. Zellen, die zu ca. 80 % konfluent waren, wurden passagiert (siehe 2.9.2), nicht konfluente Zellen erhielten frisches Medium.

2.9.2 Passage konfluent bewachsener Kulturen

Die Zellen wurden wie folgt passagiert: das Medium wurde dekantiert, die Zellen zunächst mit einer 0,05 % 1 M PBS/EDTA-Lösung gespült und mit PBS/EDTA-Lösung für etwa 5 min bei RT überschichtet. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch seitliches Beklopfen der Kulturflasche. Die exakte Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 2.9.3). Erhaltungsschalen wurden so ausgesät, dass sich die Zellen am Anfang der logarithmischen Wachstumsphase befanden.

2.9.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit EDTA/Trypsin-Lösung abgelöst und im Verhältnis 1:2 bis 1:4 mit Trypanblau verdünnt.

Das Auszählen der Zellen erfolgte in einer Neubauer Zählkammer. Nach Aufbringen eines Deckglases wurden einige Tropfen der Zellsuspension in den dafür vorgesehenen Raum

zwischen Deckglas und Kammer eingefüllt. Es wurden nur lebende Zellen gezählt. Diese nehmen im Unterschied zu toten Zellen kein Trypanblau auf und erscheinen in der Phasenkontrastmikroskopie transparent. Alle 4 Eckquadrate der Zählkammer wurden ausgezählt. Zellen, die auf der linken und unteren Begrenzungslinie der Eckquadrate lagen, wurden mitgezählt. Wenn die Werte der Doppelbestimmungen weniger als 15 % voneinander abwichen, wurde als Ergebnis ein Mittelwert aus beiden gebildet, andernfalls wurde die Zellzählung wiederholt.

Zur Berechnung der Lebendzellzahl/ μ l wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{Z}{8 \times 0,1 \times VF} = N$$

N= Lebendzellzahl/ μ l, Z= Mittelwert aus der Zellzählung, VF= Verdünnungsfaktor

2.9.4 Transiente DEAE-Dextran-Cotransfektion in COS7-Zellen

Für die Transfektion mittels DEAE-Dextran [33] wurden am Vortag je 1×10^6 Cos7-Zellen in 100 mm Petrischalen ausgesät und üN bei 37 °C in DMEM-Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10 ml PBS- gewaschen und die zu transfizierende Plasmid-DNA zugegeben (bei Doppeltransfektion je 4 μ g je Plasmid, Ausnahmen: 100 ng je GST-pMT2sm-Plasmid, 400 ng je β -Gal-pCMV-Plasmid, da beide Plasmide eine starke Expression zeigten). Die Ansätze enthielten: je 8 μ g DNA und 500 μ g DEAE-Dextran in 1000 μ l sterilem PBS-. Nach Inkubation für ca. 15 min bei 37 °C hatten sich die Zellen durch das Dextran „abgekugelt“ und es wurde 12 ml DMEM-Medium mit 80 μ M Chloroquin zugefügt. Nach 2,5-3 h bei 37 °C wurde das Chloroquin-DMEM-Medium abgesaugt. Die Zellen wurden für 2,5 min mit 4 ml DMEM-Medium mit 10 % DMSO überschichtet, nach Absaugen des DMSO mit 10 ml normalem DMEM-Medium versehen und dann weitere 48-72 h bei 37 °C inkubiert. Die Proteine konnten durch Lysierung (siehe 2.9.5) geerntet werden.

2.9.5 Herstellung von Zellextrakten

Zur Gewinnung der Proteine wurden die transfizierten Zellen mittels eines Lysepuffers, dem vor Gebrauch Proteaseinhibitoren (siehe Tab. III.3) hinzugefügt wurden, lysiert.

Aus den Petrischalen wurde das DMEM-Medium (siehe 1.5.3) abgesaugt und die Zellen 2x mit je 10 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von je 500 μ l Lysepuffer/Petrischale wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde für 10 min bei 13.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

2.9.6 Photometrische Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte nach der Bradford-Methode [11]. Das Prinzip der Bradford-Methode ist der Vergleich der optischen Dichte von Proteinproben bekannter und unbekannter Konzentration nach Zusatz eines quantitativ bindenden Farbstoffs (Serva blue G, Serva, Heidelberg).

Als Standardkurve diente eine Verdünnungsreihe von 0 - 500 $\mu\text{g/ml}$ BSA erstellt. Zu je 5 μl der Ansätze der Verdünnungsreihe wurden jeweils 795 μl Aqua bidest., sowie 200 μl der Bradford-Arbeitslösung (3 % abs. Ethanol, 6 % Phosphorsäure, 7 % Serva blue G) pipettiert. Ebenso wurde mit den Zellysaten (siehe 2.9.5) verfahren. Die Messung der Extinktionen der Ansätze erfolgte nach 5-minütiger Inkubation als Doppelbestimmung gegen einen Leerwert aus Bradford-Arbeitslösung ohne Zusatz von Albumin bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Beckmann Spektrophotometer. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Standardkurve einer Eichgeraden bestimmt.

2.10 Co-Präzipitation und Western Blot

2.10.1 Co-Präzipitation mittels Glutathion-S-Transferase(= GST)- „Beads“

Zur biochemischen Überprüfung der Proteinbindungen wurde eine Co-Präzipitation von GST-getaggten-Konstrukten mit GST-„Beads“ durchgeführt.

Hierzu wurde der Proteingehalt der Zellysate zunächst mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt (siehe 2.9.6) und 50 μl Zellysat für spätere Western Blot-Untersuchungen zur Überprüfung der erfolgreichen Transfektion bei -20 °C weggefroren. Zu je 500 μg Protein (siehe 2.9.5) wurden jeweils 150 μl 20 %-ige GST-„Beads“ pipettiert, die zuvor im Lysepuffer äquilibriert worden sind. Dieser Ansatz wurde in bei 4 °C auf einem „Rocker wheel“ inkubiert. Nach 1 min Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und die „Beads“ mit eisgekühltem Lysepuffer dreimal gewaschen. Anschliessend wurden den „Beads“ 50 μl SDS-Ladepuffer zupipettiert.

Diese Suspension wurde für 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach 1 min Zentrifugation wurden 15 μl des Überstands auf ein SDS-Proteingel (siehe 2.10.2.1) aufgetragen.

2.10.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen („Western-Blot“)

2.10.2.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht in SDS Proteingelen aufgetrennt [44]. Diese bestehen aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Hochprozentige Trenngele (10 %) wurden zum Auftrennen kleiner Proteine und niedrigprozentige Trenngele (8 %) zum Auftrennen großer Proteine verwendet. Die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle III.25: WESTERN BLOT - Gel-Zusammensetzung

	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %		Sammelgel
H ₂ O	46 %	40 %	H ₂ O	68 %
30 % Acrylamide-Mix	27 %	33 %	30 % Acrylamide-Mix	17 %
1,5 M Tris pH 8,8	25 %	25 %	1,0 M Tris pH 6,8	12,5 %
10 % SDS	1 %	1 %	10 % SDS	1 %
10 % Ammoniumpersulfat	1 %	1 %	10 % Ammoniumpersulfat	1 %
TEMED	0,06 %	0,04 %	TEMED	0,1 %

Die Elektrophorese der Proteinproben erfolgte mit 8 %- und 10 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gelen [69] in Hoefer Gelkammern für 10x10 cm Gele (Pharmacia, Freiburg). Für die Vorbereitung der Gele wurden die mitgelieferten Gelgußsysteme mit 1 mm-Spacern und Gelkämmen benutzt. Die Gele wurden nach [69] angesetzt. Die 8 %- und 10 %-igen Trenngele wurden direkt nach Zusatz von APS und TEMED gegossen und zwar so, daß die Gelfront bis etwa 1 cm unter den Gelkämmen war. Die Gele wurden anschließend mit einer Schicht 2-Butanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte nach etwa 1 h. Die Sammelgele wurden anschließend nach Entfernung des Butanols auf die Trenngele geschichtet.

Für die Elektrophorese wurden jeweils 15 µg Protein eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 1:1 mit 2x SDS-Ladepuffer verdünnt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Das Auftragen der Proben auf die Gele erfolgte mit einer Hamilton-Mikroliter Pipette. Als Proteinstandard wurde ein „broad“- und ein „low-range“- Proteinmarker (Biorad) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1x PAGE-Gellaufpuffer bei einer Stromstärke von 20 mA/Gel bei 4 °C für 2-3 h (solange bis der Blaumarker das untere Ende des Gels erreichte).

2.10.2.2 Western Blotting

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf einen Nitrozellulosefilter transferiert. Hierfür wurde das Tanksystem der Fa. Hoefer verwendet. Der Blot wird dabei in Form eines Sandwiches, zwischen zwei Elektroden, in Transferpuffer plaziert. Der Blotaufbau bestand außen jeweils aus einem Schwamm, darauf jeweils aus zweimal 2 mit Transferpuffer getränkten Stücken Whatman-Papier, zwischen die das Gel und eine Nitrozellulosemembran gelegt wurde. Die Proteine wurden bei 4 °C unter ständigem Rühren des Transferpuffers, in Richtung der Anode, für 1 h bei 100 V auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

2.10.2.3 Färbung der Nitrozellulosemembranen mit Ponceau-Rot

Zur Kontrolle des erfolgreichen Blottings wurden die Nitrozellulosefilter nach [69] mit

Ponceau S-Lösung gefärbt. Dazu wurden die Membranen für 5-10 min in Ponceau-Arbeitslösung gefärbt. Nach Sichtbarwerden der Proteinbanden wurden die Filter in Aqua bidest. gewaschen. Die Proteinbanden des Proteinmarkers wurden auf den Filtern markiert und fotografiert.

2.10.2.4 Spezifische Antikörperdetektion

Vor der Antikörperdetektion wurden die Nitrozellulosefilter zunächst üN bei 4 °C in einer Blocking-Lösung (siehe Tab. III.3) inkubiert, um unspezifische Antikörperreaktionen auf den Nitrozellulosefiltern zu blockieren [69]. Anschließend erfolgte für 1 h bei RT die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper, der im Blocking-Puffer verdünnt wurde. Danach wurden die Membranen für 10 min in Waschpuffer gewaschen.

Für die Detektion des Primärantikörpers wurde ein HRP (= „horseradish peroxidase“)-gekoppeltes antiMaus-Immunglobulin (1:3000) (Sigma) verwendet. Diese sekundäre Immunreaktion wurde für 1 h bei RT durchgeführt. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem ECL-System (= „enhanced Chemoluminescence“). Nach dreimaligem Waschen der Filter wurden die Filter in den Lumi-Light-Lösungen (=ECL) 1 und 2, die zuvor im Verhältnis 1:1 gemischt wurden, für 2 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Peroxidase-Reaktion wurden ECL-Filme auf die Membranen gelegt und nach verschiedenen Expositionszeiten (5 s bis zu 10 min, evtl. auch üN) entwickelt.

Kapitel IV

Ergebnisse

1 Übersicht über die Vorgehensweise in dieser Arbeit

Siehe Abbildung IV.1

2 Identifikation von Bindungspartnern für Tiam1 mittels „Yeast-Two-Hybrid“-Analyse

2.1 Untersuchung einer humanen Nieren-cDNA-Bank

Das Ziel dieser Arbeit war die Suche nach potentiellen Bindungspartnern für Tiam1 (NM_003253). Hierfür wurde ein „Yeast-Two-Hybrid-Screen“ einer humanen Nieren-cDNA-Bank (Human Kidney MATCHMAKER cDNA Library, Clontech) durchgeführt.

Als Köder für den YTH-„Screen“ wurde ein 2,559 kB langes Tiam1-Fragment, das den N-terminalen 853 Aminosäuren des Proteins entspricht, in den pAS2-1 Expressionsvektor (Leu-Resistenz) einkloniert (siehe Abb. IV.2). Der pAS2-1 Vektor besitzt in 5'-Richtung der „multiple-cloning site“ eine Sequenz für die Expression der Gal4-Bindedomäne (Gal4-BD) der Hefe, so daß sich nach Transkription und Translation ein Fusionsprotein ergibt, das aus dem 853-Aminosäuren grossen N-Terminus von Tiam1 und der Gal4-BD besteht (N853-Tiam1-Gal4-BD). Als Expressionsvektor der Nieren-cDNA-Bank diente der Vektor pACT2 (Trp-Resistenz), der für die Gal4-Aktivierungsdomäne (Gal4-AD) kodiert, so daß ein Fusionsprotein aus der GAL4-AD und dem aus der Nieren-cDNA Bank isolierten Genprodukt entsteht (siehe Abb. IV.3).

Im Falle einer Interaktion von Tiam1 mit dem potentiellen Bindungspartner werden die Gal4-Bindedomäne von N853-Tiam1-pAS2-1 und die Gal4-Aktivierungsdomäne von cDNA-pACT2 in physikalische Nähe zueinander gebracht, so daß ein funktionsfähiger Gal4-Transkriptionsaktivator entsteht. Dieser Transkriptionsaktivator ist in der Lage, die nachgeschalteten Reportergene (lacZ und HIS3) des verwendeten Hefestammes Y190 zu

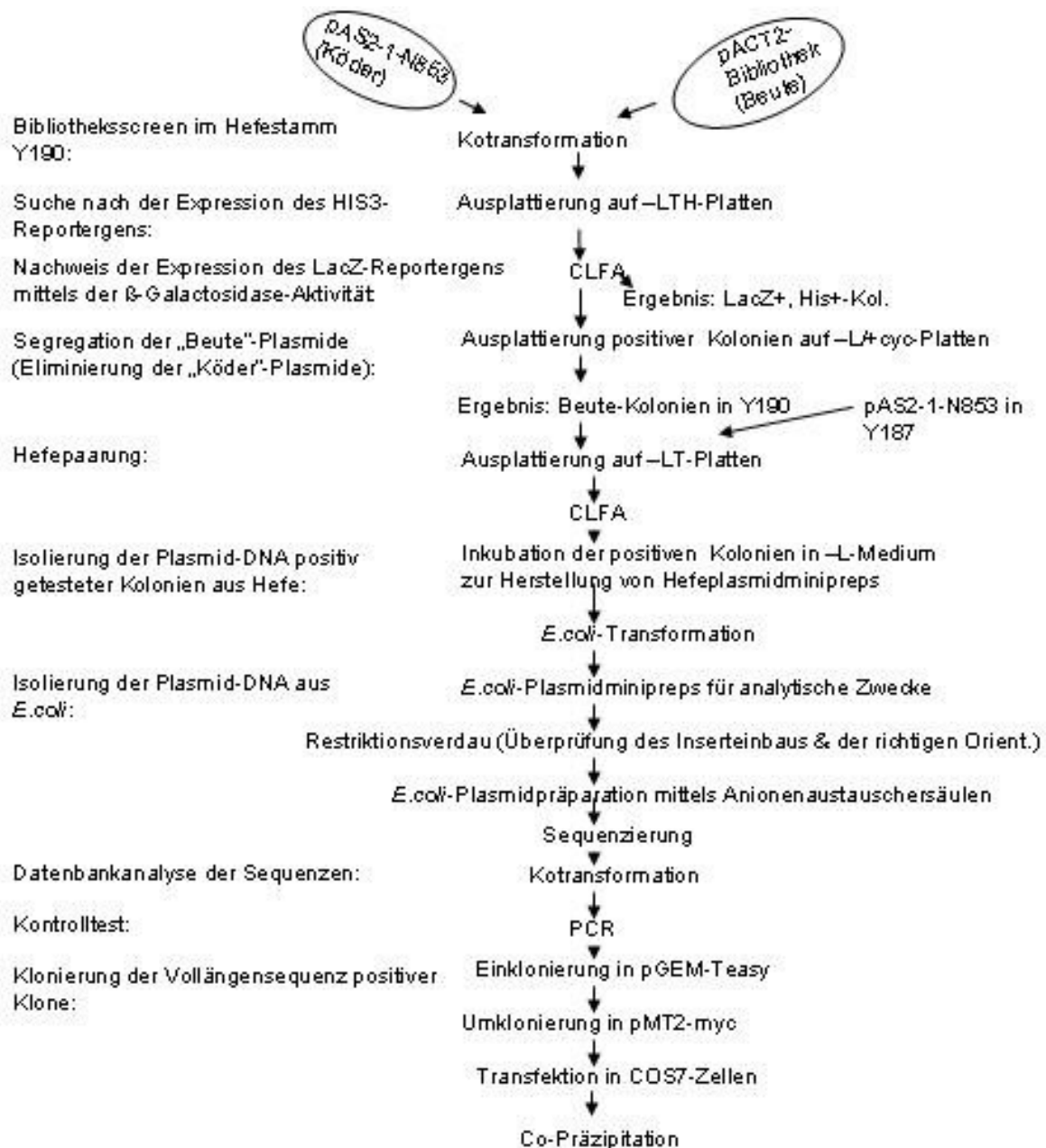


Abbildung IV.1: Übersicht über die Vorgehensweise in dieser Arbeit

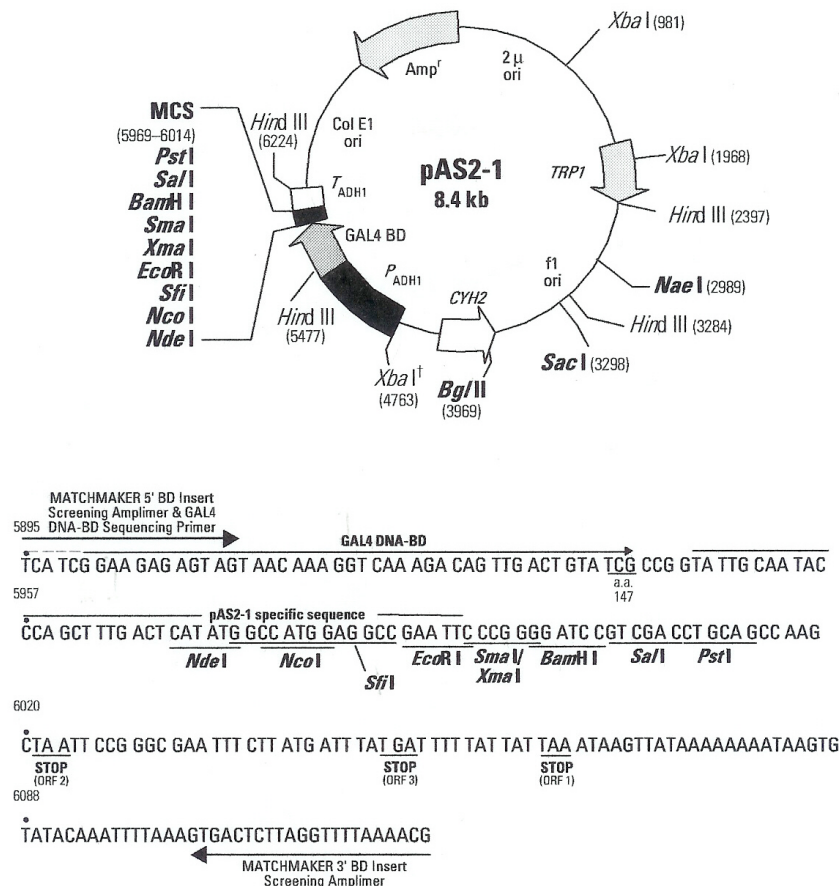


Abbildung IV.2: Vektor pAS2-1: enthält die 2559 Bp grosse Sequenz von N853-Tiam1 sowie die Gal4-BD (=Köder)=(Gal4-BD-N853-Tiam1-pAS2-1)(Abb. aus dem „Matchmaker GAL4 Two-Hybrid Vectors Handbook“ der Firma Clontech)

aktivieren. Die Transkription dieser beiden Gene resultiert in einem Hefe-Phänotyp, der auf His-defizientem Medium wachsen kann und das Enzym β -Galaktosidase exprimiert, das in einem enzymatischen Assay („colony-lift filter assay“) (siehe 2.8.4) nachgewiesen werden kann.

N853-Tiam1 wurde für den Screen ausgewählt, da dieses Konstrukt den für die Regulation der Proteinaktivität höchstwahrscheinlich essentiellen N-Terminus und die PHn-CC-Ex-Region (siehe Kapitel II 1) beinhaltet.

Zunächst wurde eine Kotransformation mit dem Vektor pAS2-1/N853-Tiam1 (=Köder) und dem Vektor pACT2/Nieren-cDNA-Bank (=Beute) durchgeführt. Hefekolonien, die beide Fusionsproteine exprimieren und folglich die His- und LacZ-Reportergene aktivieren können, wurden auf His-defizientem Medium selektioniert (siehe 2.8.1).

His⁺-Kolonien mit einem Durchmesser ≥ 2 mm wurden nochmals auf -LTH/+3-AT-Platten vereinzelt und mittels „Colony lift filter assay“ (= CLFA) wurde in den Hefeklonen die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt (siehe 2.8.4).

Insgesamt wurden so etwa 1×10^6 Hefeklone auf Protein-Protein-Interaktion hin untersucht.

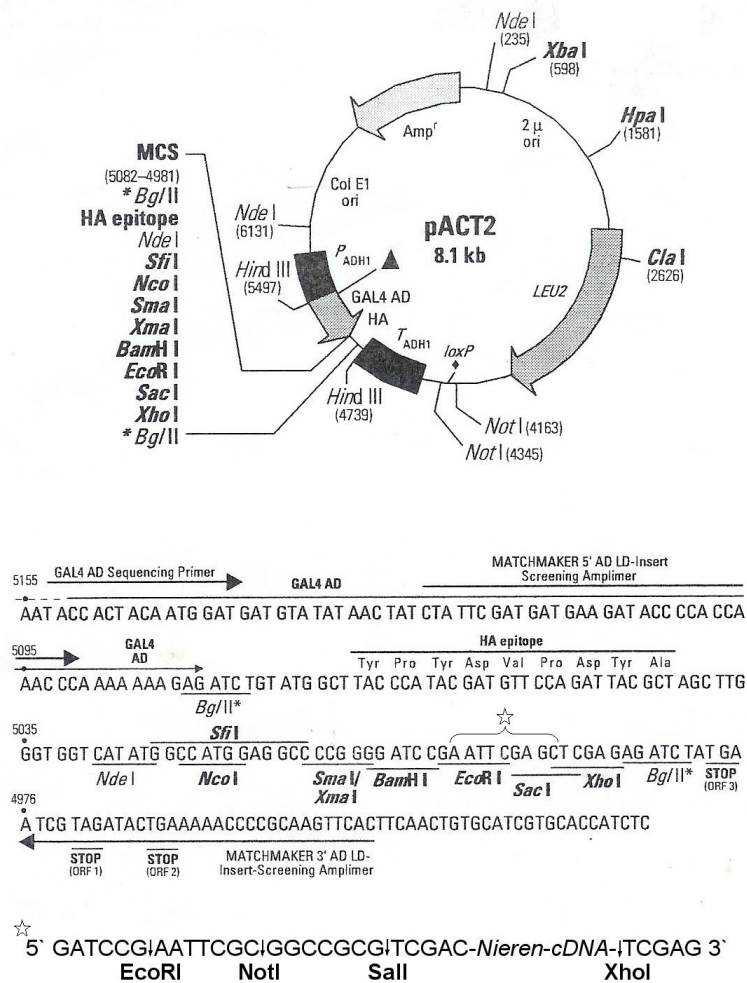


Abbildung IV.3: Vektor pACT2: enthält die Nieren-cDNA-Bank sowie die Gal4-AD (=Beute)(= Gal4-AD-Nieren-cDNA-pACT2)(Abb. aus dem „Matchmaker GAL4 Two-Hybrid Vectors Handbook“ der Firma Clontech)

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde in zwei unabhängigen Untersuchungen bestimmt. 42 von insgesamt 65 Kolonien reagierten positiv, davon wurden 19 als schwach (+), 18 als mittel (++) und 5 als stark positiv (+++) (Mittelwert) bewertet (siehe Tab. IV.1):

Tabelle IV.1: 1.und 2.CLFA von LTH-Platten aus dem N853-Screen (Mittelwerte)

Klon	1.CLFA	2.CLFA	Mittelwerte	Klon	1.CLFA	2.CLFA	Mittelwerte
1a	+	+	+	32a	+	++	+
2a	++	+(+)	++	36b	++	++	++
3a	+	+	+	40a	+	+	+
4b	++	++	++	40b	+	++	+
4c	+	+	+	41a	++	++	++
5a	+	+	+	46a	+(+)	++	++
6a	+++	++(+)	+++	48a	++	++	++

Tabelle IV.1: 1. und 2. CLFA von LTH-Platten aus dem N853-Screen
(Mittelwerte) (Fortsetzung)

Klon	1.CLFA	2.CLFA	Mittelwerte	Klon	1.CLFA	2.CLFA	Mittelwerte
7a	++	+	+	48b	++	++	++
9a	+	+	+	48c	+	+	+
9c	++	++	++	50a	+	+	+
10a	+	+	+	56b	++	++	++
18a	++	++	++	61a	++	++	++
20a	+++	++	++	62a	++	+	+
21b	+	+	+	63a	++	+	+
21d	++	+	+	64a	++	+	+
22b	++	+	+	65a	++	+(+)	++
24a	++	++	++	66a	++	+(+)	++
25a	+++	+++	+++	67a	++(+)	+++	+++
26a	+++	++(+)	+++	73a	+	+	+
30a	+++	++(+)	+++	76b	++	++	++
30b	+++	++	++	78a	++	++	++

2.2 Identifizierung positiver Hefeklone mittels Segregation

Für die weitere Identifizierung mussten zunächst die pAS2-1-Köderplasmide, die das N853-Tiam1-Gal4-BD-Insert enthielten, mittels Segregation aus den positiven Hefeklonen entfernt werden. Diese Methode beruht auf den unterschiedlichen Expressionseigenschaften der Beute- und Köderplasmide (siehe 2.8.5).

Der pACT2-(Beute)-Vektor enthält ein Kodon für die Aminosäure Leucin, so dass die mit dem pACT2-Vektor erfolgreich transformierten Hefen Leucin selbst produzierten und auf -Leu-Platten wuchsen. Die mit dem pAS2-1-(Köder)-Vektor transformierten Hefezellen hingegen besaßen aufgrund der Vektoreigenschaften eine Cycloheximid-Sensitivität, wurden durch Cycloheximid getötet und konnten somit auf +cyc-Platten nicht wachsen. Die 42 positiv getesteten Hefeklone (siehe 2.1) wurden auf -Leu/+cyc-Platten selektiert. Folglich konnten sich nur solche Hefezellen vermehren, die ausschliesslich die positiv getesteten pACT2-cDNA-Konstrukte enthielten.

2.3 Isolierung positiver Hefeklone mittels Hefepaarung („Yeast Mating“)

Zur weiteren Identifizierung positiver Hefeklone und zum weiteren Ausschluss falsch positiver Klone wurde eine Hefepaarung durchgeführt. Hierzu wurden je eine Y190-Hefekolonie, die zuvor durch die Segregation (siehe 2.2) isoliert wurde und das pACT2-(Beute)-Plasmid besaß, mit einer Y187-Hefekolonie, die das pAS2-1-N853-Tiam1-Plasmid enthielt, in YPD-Medium vermischt und auf -LT-Platten ausgestrichen. Folglich konnten nur Kolonien

wachsen, die beide Plasmide besaßen (siehe 2.8.1 & 2.8.3). Als Negativkontrolle wurde der Vektor pLam5'-1 (siehe 1.9.1) eingesetzt - da dieser Vektor keinen Abschnitt des Köderproteins Tiam1 enthält und auch keine β -Gal-Eigenaktivität enthält, durfte hier also auch in Kombination mit einem der Beuteproteine keine β -Gal-Aktivität entstehen.

Zur Überprüfung der Interaktion wurde nochmals ein CLFA durchgeführt (siehe Tab. IV.4). Falsch positive Klone wurden verworfen.

2.4 Sequenzanalyse der positiven pACT2-Klone

Die pACT2-(Beute)-Plasmide wurden aus den Hefekolonien isoliert (siehe 2.8.6) und in *E.coli* transformiert (siehe 2.7.2).

Die Plasmid-Isolation aus *E.coli* erfolgte durch eine *E.coli*-Plasmid-Mini-Präparation (für analyt. Zwecke) (siehe 2.2.1.1). Zur Überprüfung der positiven Klone wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Der Vektor pACT2 enthält eine EcoRI-Schnittstelle sowie eine XhoI-Schnittstelle, zwischen die das Insert einkloniert wurde. Durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI wurde das Insert aus dem Vektor herausgeschnitten. Der Restriktionsverdau wurde auf einem 1 %-igen analytischen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Klone, welche ein Insert enthielten, wurden mit dem Primer „Matchmarker5'AD LD Insert Screening Amplimer Sense(5')“ für pACT2 (siehe 1.8) sequenziert (siehe 2.6.2). Durch Sequenzvergleich dieser 5'-Enden der pACT2-Klone (siehe Kap. XI 0.1) mit internationalen Datenbanken konnten 26 Klone eindeutig identifiziert werden (siehe Tab. IV.2), wobei 7 davon mitochondrial sind (4b, 9a=21d, 18a, 21d, 22b, 73a, 78b) und einige davon identisch sind (2a - ident. mit 65a=66a, 6a - ident. mit 30a, 9a - ident. mit 21d). 8 Klone (7a, 9c, 10a, 20a, 24a, 26a, 30b und 48b) enthielten unbekannte Sequenzen (siehe Tab. IV.3) - diese wurden in einer anderen Arbeit näher untersucht.

Tabelle IV.2: Sequenzanalyse der pACT2-Klone

pACT2-Klon	Bekannte Sequenz	Acc. Nr.	Grösse der Acc.Nr. (Bp)	Insert ident. mit Acc.Nr. ab Bp
2a, ident. 65a,66a	Dipeptidase1 (renal) (DPEP 1)	NM_004413	(1738)	517
3a	Insulin-ähnliches Wachstumsfaktor-Bindeprotein 5 (IGFBp 5)	L27560	(3672)	463
4b	Mitochondriale coxII	X55654	(586)	147
4c	Epididymales sekret. Protein HE1	NM_006432	(808)	15
5a	79 % ident. mit kleinem EDRK-reichem Faktor 1	AF073518	(684)	1
6a, ident. 30a	Integrales Typ1-Protein p24B	AJ132270	(682)	5'UTR
9a, ident. 21d	Mitochondriales Genom, identisch 21d	NC_001807	(16571)	

Tabelle IV.2: Sequenzanalyse der pACT2-Klone (Fortsetzung)

pACT2-Klon	Bekannte Sequenz	Acc. Nr.	Grösse der Acc.Nr. (Bp)	Insert ident. mit Acc.Nr. ab Bp
18a	Mitochondriale Sulfitoxidase, kernkodiert	NM_000456	(2408)	1129
21d, ident. 9a	Mitochondriales Genom, identisch 9a	NC_001807	(16571)	
22b	Mitochondriales Genom	AY39001.1	(16570)	
25a	Vinexin β , SH3-enthaltender Adaptor-1	NM_005775.1 bzw. NM_005775.1	(1283) (2938)	566 1462
30a=6a	Integrales Typ1-Protein p24B	AJ132270	(682)	5'UTR
32a	60Bp ähnlich Prostaglandin D2-Synthase	NM_000954	(647)	
36b	13 kDa Diff.-assoziiertes Protein	NM_018838.2	(608)	12
41a	KIAA0380 mRNA (Fkt. unbekannt)	AB002378	(5790)	5310
46a	Endothelin-B Rezeptor, 3'Ende	D13168	(2972)	
48a	Homo sapiens Zinkfinger-Protein 11b (KOX 2) (ZNF11B), mRNA	NM_006955.1	(5958)	4506
50a	UE Proteasom Typ β 4	NM_002796	(925)	84
56b	LGALS1=Galektin 1	NM_002305	(526)	30
64a	Na,K-ATPase β UE, Exon1+2	M25161	(7675)	1161
65a, ident. 2a,66a	Dipeptidase1 (renal) (DPEP 1)	NM_004413	(1738)	517
66a, ident. 2a,65a	Dipeptidase1 (renal) (DPEP 1)	NM_004413	(1738)	436
67a	Kinektin	Z22551	(4613)	1592
73a	Mitochondriale NADH Dehydrogenase UE2 (partielle CDS)	AF014899	(1041)	22
76b	Chromosom 19, ähnlich MHC KlasseI, HLA-E	NM_005516	(1665)	17
78a	Mitochondriales Cytochrom b (partielle CDS)	U09500	(1143)	24

Tabelle IV.3: Unbekannte Sequenzen der pACT2-Klone

7a	Unbekannt
9c	Unbekannt
10a	Unbekannt
20a	Unbekannt
24a	Genomische Sequenz + EST-Daten bekannt
26a	Genprodukt unbekannt, genomisch bekannt, 3 alternative mRNAs
30b	Unbekannt
48b	Unbekannt

2.5 Kotransformation von N853-Tiam1 mit den positiven pACT2-Plasmiden

Zur nochmaligen Überprüfung der Interaktion von N853-Tiam1 mit den positiven pACT2-Konstrukten (siehe 2.4) wurde für 10 Klone (2a (bzw. 65a u. 66a), 4b, 6a (bzw. 30a), 25a, 36b, 56b, 67a) (siehe Tab. IV.2), die als potentielle Bindungspartner für Tiam1 am interessantesten erschienen, und für die 8 Klone (siehe Tab. IV.3), deren Sequenzen noch nicht bekannt sind, eine Hefekotransformation im Hefestamm Y190 als Kontrolltest angeschlossen. Das Resultat der Interaktion wurde durch „CLFA“ bestimmt. Die Kotransformation wurde je zweimal durchgeführt. Die Ergebnisse der CLFA aus 2.1, 2.3 und 2.5 wurden in Tabelle IV.4 zusammengefasst.

Durch den Kotransformations-Versuch konnten 4 Klone (Klon 25a, Klon 36b, Klon 56b und Klon 67a) als hochinteressante Bindungspartner für Tiam1 identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um Vinexin- β (Klon 25a), 13 kDa Differenzierungs-assoziiertes Protein (Klon 36b), Galektin-1 (Klon 56b) und Kinektin (Klon 67a).

In der Kotransformation mit N853-Tiam1 wiesen die Klone 25a und 67a in beiden „CLFA“-Assays eine starke β -Galaktosidase-Expression und die Klone 36b und 56b eine mittelmässig positive β -Galaktosidase-Aktivität auf. Die Kotransformation aller vier Klone mit PHn-CC-Ex-Tiam1 zeigte jeweils eine schwache β -Galaktosidase-Aktivität. Dagegen konnte weder mit dem Kontrollplasmid pLam bzw. pAS2-1 noch mit C580-Tiam1-pAS2-1 (der carboxyterminalen Sequenz von Tiam1) eine β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Tabelle IV.4: YTH-Analysen der pACT2-Klone

Klone	Bibliotheks-Screen (siehe 2.1)		Hefepaarung (siehe 2.3)		Kotransformation (in Y190) (siehe 2.5)			
	1.Screen (N853)	2.Screen (N853)	N853	pLam5'-1	N853	PHn- CC-Ex	Plam5'-1/ pAS2-1	C580
1a	+	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
2a=65a,66a	++	+	+++	-	+	n.u.	-	-
3a	+	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
3b	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
4a	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
4b	++	++	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
4c	+	+	+	-	+	n.u.	-	-
4d	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
4f	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
5a	+	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
6a=30a	+++	++	+++	-	+	n.u.	-	-
7a	++	+	+	-	+	n.u.	-	-
7b	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

(- keine; + schwache; ++ mittelmässige; +++ starke β -Gal-Aktivität, n.u. nicht untersucht)

Tabelle IV.4: YTH-Analysen der pACT2-Klone (Fortsetzung)

Klone	Bibliothek-Screen (siehe 2.1)		Hefepaarung (siehe 2.3)		Kotransformation (in Y190) (siehe 2.5)			
	1.Screen (N853)	2.Screen (N853)	N853	pLam5'-1	N853	PHn- CC-Ex	Plam5'-1/ pAS2-1	C580
9a	+	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
9b	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
9c	++	++	+	-	+/-	n.u.	-	-
9d	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
10a	+	+	+	-	+	n.u.	-	-
10b	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
10c	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
18a	++	++	++	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
20a	+++	++	++	-	++	n.u.	-	-
21a	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
21b	+	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
21c	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
21d	++	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
22a	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
22b	++	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
24a	++	++	+++	-	++	n.u.	-	-
24b	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
25a	+++	+++	+++	-	+++	+	-	-
26a	+++	++	+++	-	+++	n.u.	-	-
28a	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
30a=6a	+++	++	+++	-	+	n.u.	-	-
30b	+++	++	++	-	++	n.u.	-	-
32a	+	++	+/-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
33a	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
33b	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
36a	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
36b	++	++	+	-	++	+	-	-
37a	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
38a	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
39b	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
40a	+	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
40b	+	++	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
41a	++	++	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
46a	+	++	++	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
48a=76b	++	++	++	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
48b	++	++	++	-	+	n.u.	-	-
48c	+	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
50a	+	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
51a	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
51b	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

(- keine; + schwache; ++ mittelmässige; +++ starke β -Gal-Aktivität, n.u. nicht untersucht)

Tabelle IV.4: YTH-Analysen der pACT2-Klone (Fortsetzung)

Klone	Bibliotheks-Screen (siehe 2.1)		Hefepaarung (siehe 2.3)		Kotransformation (in Y190) (siehe 2.5)			
	1.Screen (N853)	2.Screen (N853)	N853	pLam5'-1	N853	PHn- CC-Ex	Plam5'-1/ pAS2-1	C580
56a	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
56b	++	++	++	-	++	+	-	-
61a	++	++	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
62a	++	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
63a	++	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
64a	++	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
65a=2a,66a	++	+	+++	-	+	n.u.	-	-
66a=2a,65a	++	+	+++	-	+	n.u.	-	-
67a	++	+++	+++	-	+++	+	-	-
73a	+	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
76b=48a	++	++	++	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
78a	++	++	++	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

(- keine; + schwache; ++ mittelmässige; +++ starke β -Gal-Aktivität, n.u. nicht untersucht)

3 Isolierung und Klonierung der vollständigen Nukleotidsequenzen von Kinektin, Galektin1, Vinexin- β und des 13kDa Differenzierungs-assoziierten Proteins

Unter den 26 bereits bekannten Sequenzen (siehe Tab. IV.2) befanden sich 4 Gene (Galektin-1 (Acc. NM_002305), Kinektin-Gen (Acc. Z22551), Vinexin- β (Acc. NM_005775) und das sogenannte „13 kDa differentiation-associated protein“ (Acc. NM_018838.2)), die auch aufgrund ihrer bisher bekannten funktionellen Eigenschaften (siehe Kap. V) hochinteressante Kandidaten für eine Interaktion mit Tiam1 darstellen. Dafür wurden diese Gene im Rahmen dieser Arbeit noch weiter untersucht.

Da die aus dem YTH-Screen isolierten Klone nur unvollständige Sequenzabschnitte enthielten, wurden zunächst mittels PCR die fehlenden 5'- bzw. 3'-cDNA-Enden von Kinektin, Galektin, Vinexin und von dem 13 kDa Differenzierungs-assoziierten Protein amplifiziert und für weitere Untersuchungen in Säugerkzellen wurden die vollständigen Sequenzen in den Säugervektor (pMT2SM) kloniert.

3.1 Kinektin (67a)

Ein Vergleich der gefischten „67a“-Sequenz mit der Datenbank ergab eine 100 %-ige Homologie zu dem Basenpaarabschnitt 1592 bis 3368 des Kinektin 2-Gens (Z22551).

Es existieren zwei humane Kinektin-Spleissvarianten: Die Kinektin 1-mRNA (Acc.Nr. L25616) hat eine Länge von 4416 Bp und die Kinektin 2-Spleissvariante (Acc.Nr. Z22551) eine Länge von 4613 Bp (siehe Tab. IV.5). Beide Sequenzen sind zum grössten Teil identisch. Kinektin 2 (Z22551), welches die gefischte Sequenz enthält, besitzt an einigen Stellen zusätzliche Nukleotide (2-30, 3158-3244, 3753-3836), an drei Stellen eine andere Base (1185, 1203 und 2882) und zwischen den Bp 694 und 695 von Kinektin 2 sind in Kinektin 1 (666-668) noch 3 Bp zusätzlich eingeschoben. Die kodierende Region (CDS) beginnt bei Kinektin 2 bei Bp 70, bei Kinektin 1 bereits bei Bp 41 (siehe Kap. XI 0.2).

Tabelle IV.5: Kinektin-Sequenzen

Name	Insert	Größe Ins (bp)	Größe Ins (AS)	Gen-Bank Zugriffsnr.
Kinektin 1	H.sap.Kinektin mRNA	4416	1300	L25616
Kinektin 2	H.sap.Kinektin Gen	4613	1364 („open reading frame“)	CDS 41 - 3943 Z22551, CDS 70 - 4140

Da die Kinektin 2-cDNA relativ gross (4613 Bp) ist, wurden zur Herstellung der Gesamtlänge von Kinektin 2 (Z22551) 3 PCR-Reaktionen mit dem „Expand-Long-Template-PCR-System“ (Boehringer) (siehe 2.5.1) durchgeführt. Der Vorteil des „Expand-Long-Template-PCR-Systems“ ist, dass man auch grosse PCR-Produkte von 5 bis 20 kB generieren kann.

Tabelle IV.6: Kinektin-PCR-Reaktionen

PCR	Primer	Sequenz (5'→ 3')	Länge des PCR-Fragmentes	Position des PCR-Fragmentes
1	Kinup1 Kinlow3	TAATTTTCCTCTTCTTCTGGCTTTTC GATCCTGTAACCACTTCCCTGTATTG	2636 Bp	KinD 128-2764 Bp
2	Kinup2004 Kinlow3878	AGGCCCTGGCAAATGAGCA TTTACCGCCTGAAGCAACTG	2064 Bp	KinK 2030-4094 Bp
3	ORF Kinlow4	GTCGACC ATGGAGTTTTATGAGTCAGCA GCTGCCTCATGTTCCGCTGTT	1544 Bp	KinORF 63-70-1607 Bp
Fett: Restriktionsstelle für SalI				

Die PCR-Fragmente (siehe Abb. IV.4) wurden in die Vektoren pGEMT- bzw. pGEMT-easy inkloniert. Es resultierte die 5'-Sequenz von Kinektin (Bp 128 - 2764; pGEMT-easy-KinD) (siehe IV.4(a) und Tab. IV.6 - PCR 1), die 3'-Sequenz von Kinektin (Bp 2030 -

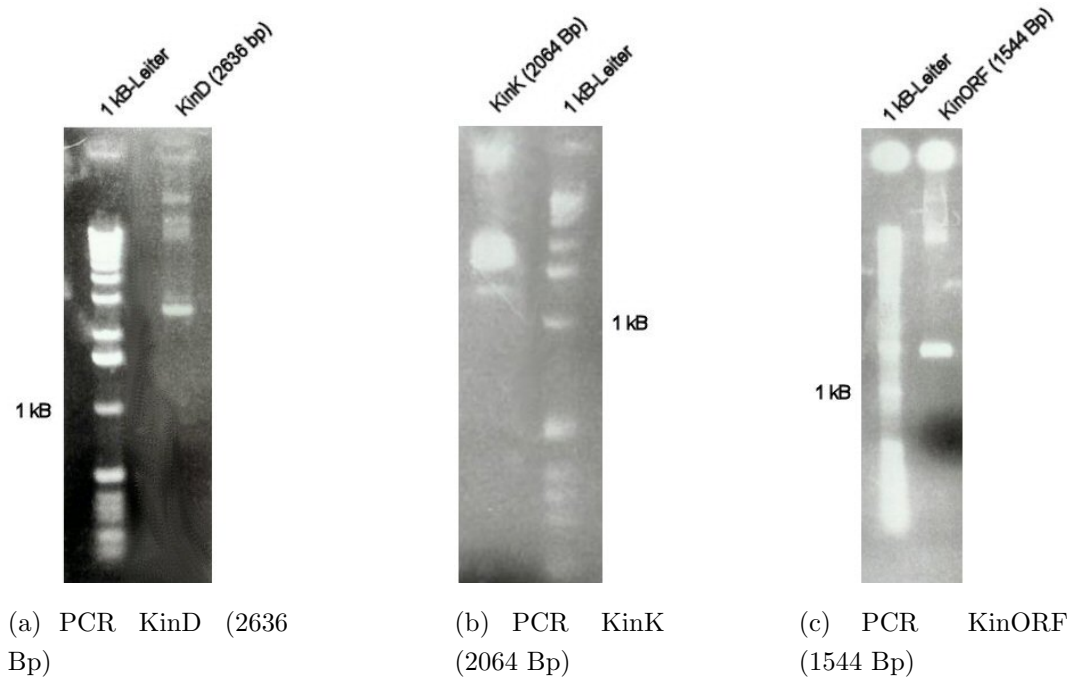


Abbildung IV.4: a) PCR KinD, b) PCR KinK und c) PCR KinORF

4094; pGEMTeasy-KinK) (siehe IV.4(b) und Tab. IV.6 - PCR 2) und die fehlenden 58 Bp des 5'-kodierenden Bereichs von Kinektin (Bp 70 - 1607; pGEMT-KinORF) (siehe Abb. IV.4(c) und Tab. IV.6 - PCR 3). Zur Überprüfung des Ligationserfolges wurden die Ligationen in *E.coli* transformiert und sequenziert.

Die 5'-Sequenz von Kinektin (Z22551) wurde durch Restriktion von pGEM-Te-KinD mit NsiI ausgeschnitten (siehe Abb. IV.6(a)). Kinektin besitzt eine interne NsiI-Schnittstelle bei 2275 Bp und pGEM-Teasy eine NsiI-Schnittstelle in der „multiple cloning site“. Es resultiert ein 489 Bp grosses Kinektin-Fragment (2275-2764 Bp) und ein 5162 Bp grosses pGEM-Teasy-Kinektin-Fragment (128-2275 Bp) (siehe Abb. IV.6(a)). Das 5162 Bp grosse pGEM-Teasy Kinektin wurde dephosphoryliert (siehe III 2.3.3) und geleluert (siehe Kap. III 2.4.2) (siehe Abb. IV.6(b) & IV.6(d)). Die 1819 Bp (2275-4094 Bp) grosse 3'-Kinektin-Sequenz wurde durch Restriktion mit NsiI aus pGEM-Teasy-KinK (5079 Bp) ausgeschnitten (siehe Abb. IV.6(a) & IV.6(c)), geleluert (siehe Abb. IV.6(d)) und mit dem 5162 Bp langen pGEM-Teasy-Kinektin-Fragment ligiert. Es resultiert das 6981 Bp grosse pGEM-Teasy-KinKD (128-4094 Bp) (siehe Abb. IV.7(a)).

Die fehlenden 70-128 Bp des Kinektins wurden durch Restriktion mit ApaI und BamHI aus Klon ORF ausgeschnitten (siehe Abb. IV.7(b)) und mit dem ApaI und BamHI geschnittenen 6212 Bp grossen Kinektin-Fragment aus pGEM-T-KinKD (6981 Bp) ligiert. Es resultiert pGEM-T5'easy3'-KinOKD mit einer Gesamtlänge von 7000 Bp (keine Abbildung).

Die Ligationen wurden in *E.coli* transformiert und der Erfolg der Ligation wurde mittels Restriktion mit ApaI und KpnI sowie durch Sequenzierungen überprüft.

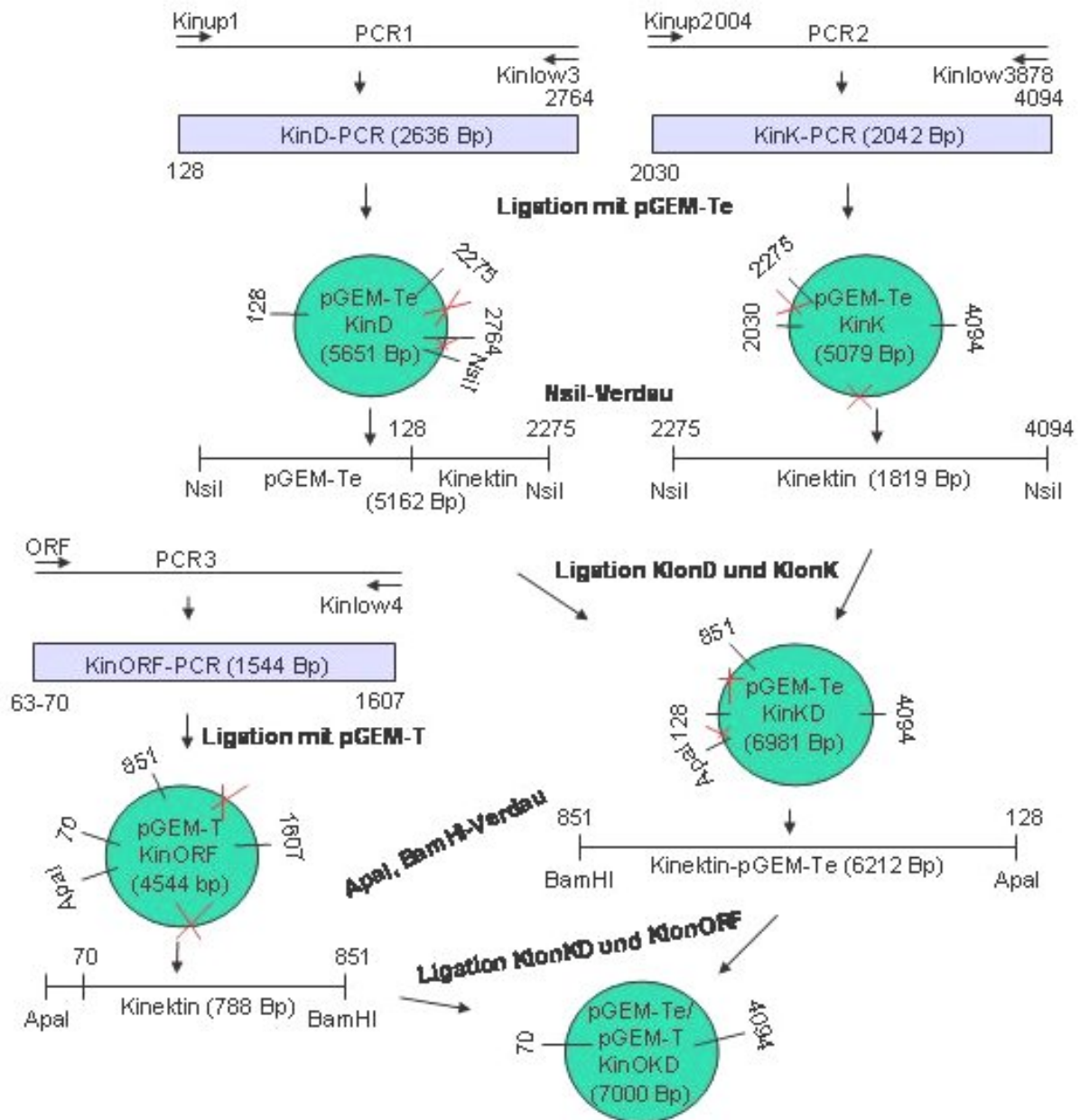
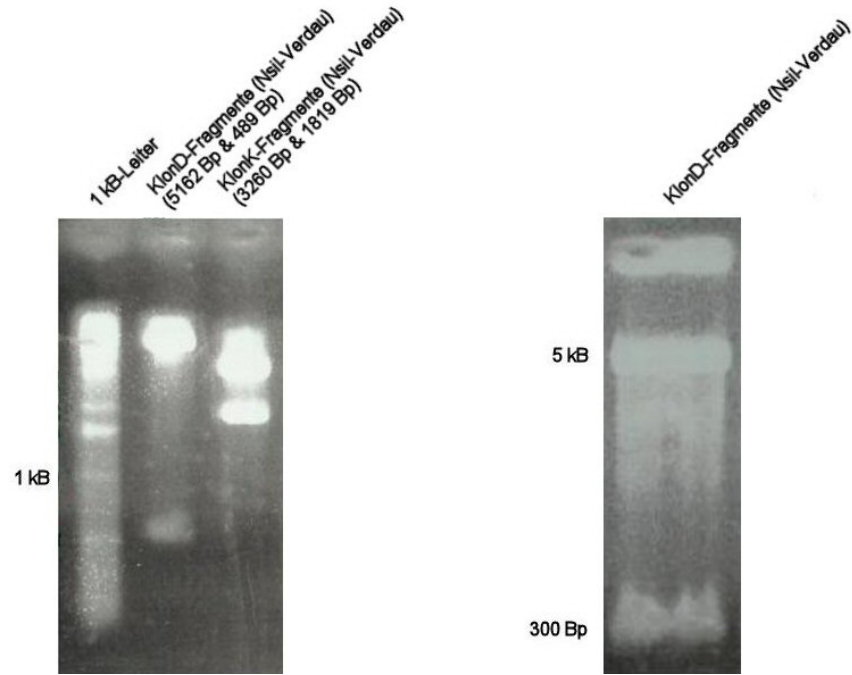
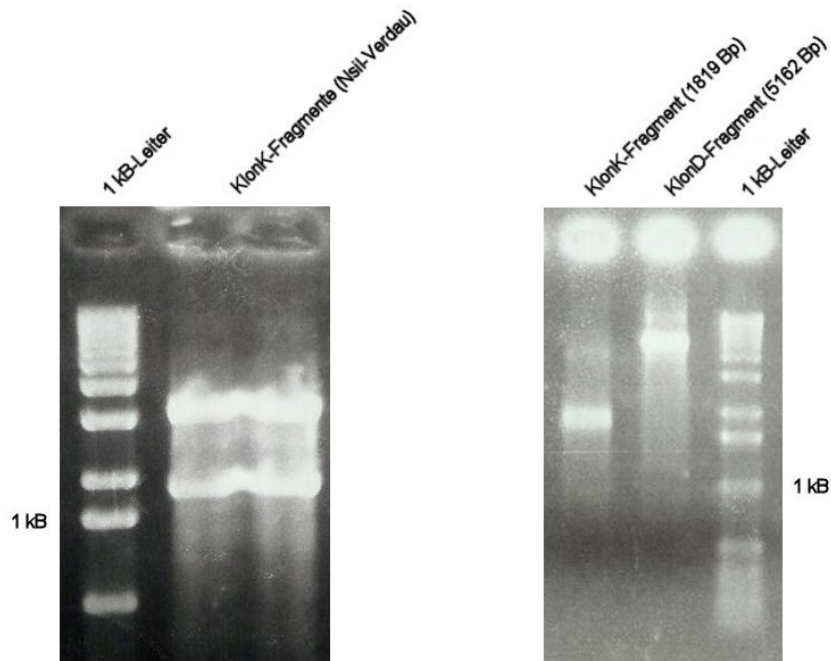


Abbildung IV.5: Konstruktion von KlonOKD



(a) NsiI-Verdau von KlonD (pGEM-Te-KinD) und KlonK (pGEM-Te-KinK). Es resultieren die KlonD-Fragmente 5162 Bp und 489 Bp bzw. die KlonK-Fragmente 3260 Bp und 1819 Bp.

(b) Geleluatfragmente (5162 Bp und 489 Bp) von KlonD (pGEM-Te-KinD) nach NsiI-Verdau



(c) Geleluatfragmente (3260 Bp und 1819 Bp) von KlonK (pGEM-Te-KinK) nach NsiI-Verdau

(d) KlonD-Fragment (5162 Bp) und KlonK-Fragment (1819 Bp) nach Gelextraktion

Abbildung IV.6: NsiI-Verdau von KlonD und KlonK. Gelextraktion von KlonD-Fragment (5162 Bp) und von KlonK-Fragment (1819 Bp)

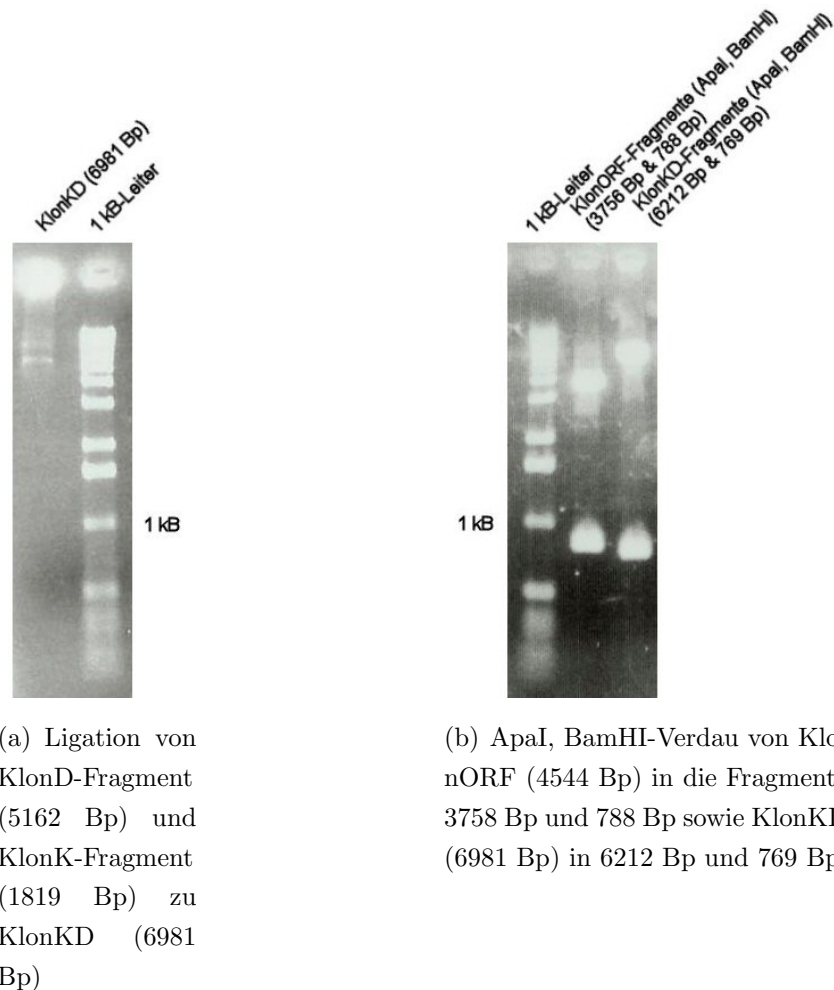


Abbildung IV.7: Ligation von KlonD-Fragment und KlonK-Fragment zu KlonKD und ApaI, BamHI-Verdau von KlonORF und KlonKD

Klon OKD besitzt bis auf einen 46 Bp kodierenden Bereich (4095-4140 Bp) die gesamte Kinektin2-Sequenz.

3.2 Differenzierungs-assoziiertes Protein (36b)

Die mRNA von „13 kDa differentiation-associated protein“ (NM_018838.2) besteht aus 608 Bp, wobei sich die kodierende Region von 12 Bp bis 449 Bp erstreckt. Der gefischte Klon 36b enthält ab Bp 12 vollständig das „13 kDa differentiation-associated protein“ (NM_018838.2) und somit dessen kompletten kodierenden Bereich.

Ein grosser Teil (493 Bp) der gefischten Sequenz (Klon 36b) ist zu 100 % identisch mit einer Sequenz, die für die 17,2-kDa Untereinheit der NADPH:Ubiquinon Oxidoreduktase (AF217092.1) kodiert. Der Sequenzabschnitt Bp 1 bis 493 des 608 Bp langen „13 kDa differentiation-associated protein“ (NM_018838.2) ist vollständig homolog zu den Bp 2 bis 494 der 494 Bp langen 17,2-kDa Untereinheit der NADPH:Ubiquinon Oxidoreduktase (AF217092.1). Somit ist der kodierende Bereich der 17,2-kDa Untereinheit der

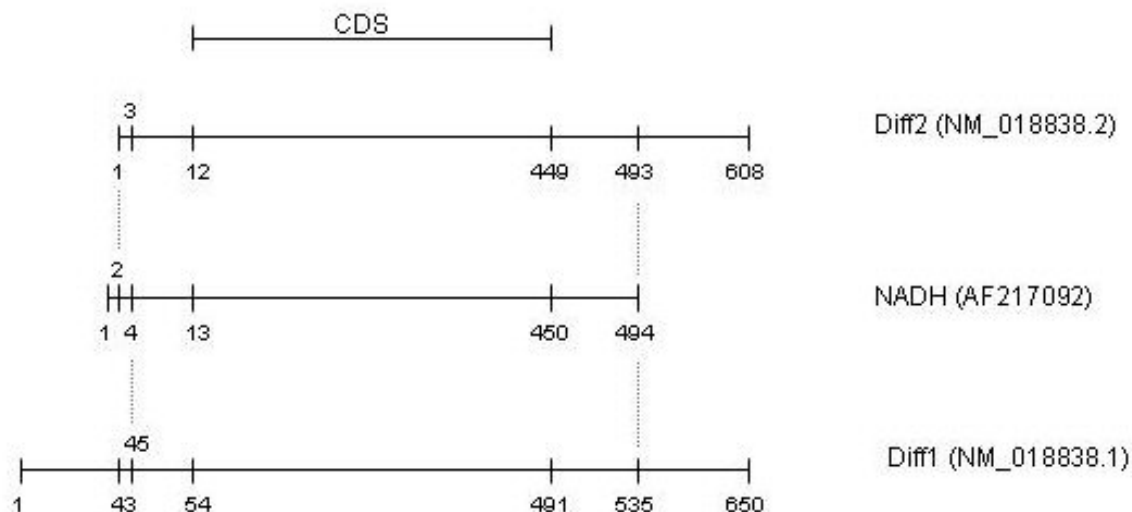


Abbildung IV.8: Spleissvarianten von Diff und Alignment mit NADH. (CDS = „coding sequence“)

NADPH:Ubiquinon Oxidoreduktase (AF217092.1) (Bp 13-450) vollständig in „13 kDa differentiation-associated protein“ (NM_018838.2) (entspricht Bp 12-449) enthalten.

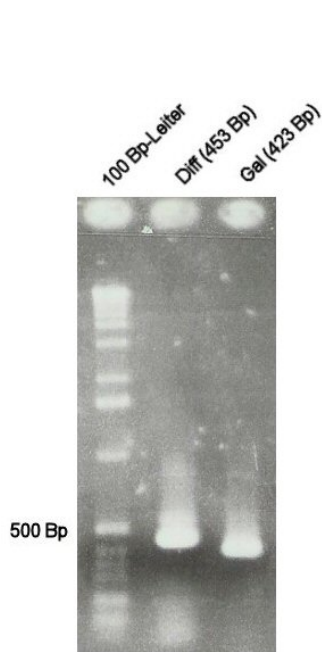
Desweiteren gibt es noch eine zweite Spleissvariante von „13 kDa differentiation-associated protein“ (NM_018838.1). Diese Spleissvariante (NM_018838.1) ist 650 Bp lang und ist von Bp 45 bis Bp 650 identisch mit Bp 3 bis 608 von Spleissvariante 2 (NM_018838.2) (siehe Abb. IV.8).

Tabelle IV.7: Diff-PCR-Reaktionen

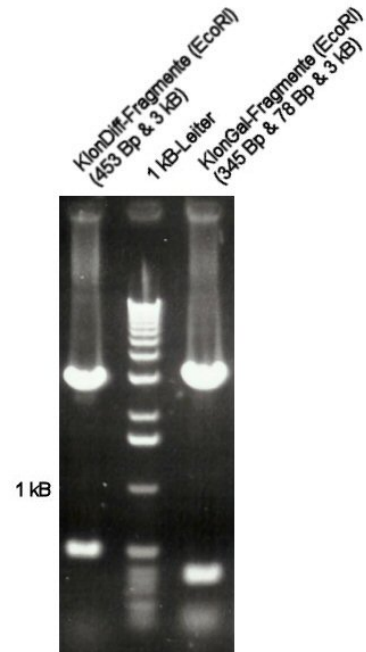
Primer	Sequenz (5' → 3')	Länge des PCR-Fragmentes	Position des PCR-Fragmentes
Diff up	AATGTCGAC GATGGAGTTAGTGCAGGTCC	453 Bp	12-446
Diff low	AAA GGTACCT CTTGTAAGGTGTTGAAGGTGGG		
Fett: Restriktionsstelle für SalI bzw. KpnI, Kursiv : Linker			

Zur Isolierung der gesamten kodierenden cDNA-Sequenz (Bp 42-446) des humanen 13 kDa Differenzierungs-assoziierten Proteins (608 Bp) wurde eine PCR mit den Primern „Diff up“ und „Diff low“ durchgeführt (siehe Tab. IV.7). Als Template diente die humane Nieren-cDNA-Bank (siehe Kap. III 1.10). Mit dem Primer „Diff up“ wurde eine SalI-Schnittstelle und mit „Diff low“ eine KpnI-Schnittstelle eingefügt. Durch die PCR-Reaktion wurde ein 453 Bp grosses Fragment generiert, das die vollständige kodierende Region des Differenzierungs-assoziierten Proteins enthält.

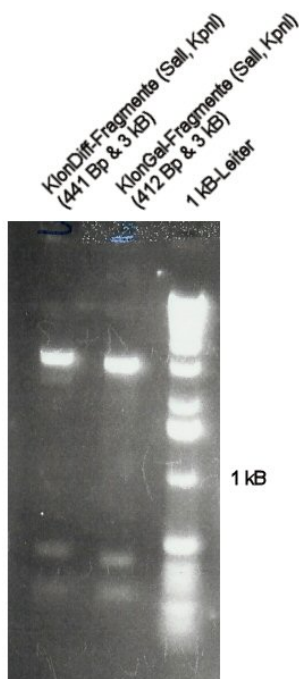
Das PCR-Fragment (siehe Abb. IV.9(a)) wurde in den pGEMTeasy-Vektor (Promega) einkloniert und mittels eines Restriktionsverdaus mit EcoRI (siehe Abb. IV.9(b)) und anschliessender Sequenzierung überprüft.



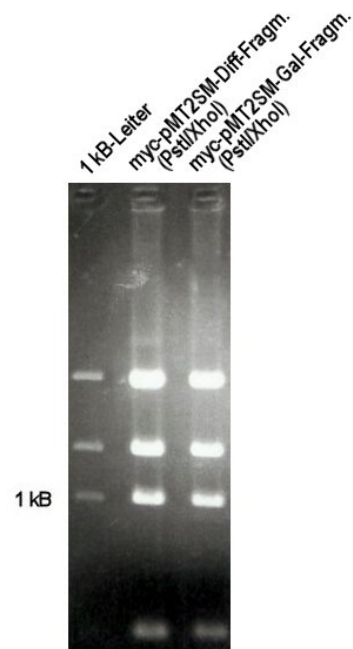
(a) PCR von Differenzierungs-assoziiertem Protein (453 Bp) und Galektin1 (423 Bp)



(b) Überprüfung der Einklonierung mittels EcoRI-Verdau von KlonDiff (3468 Bp) und KlonGal (3438 Bp). Es resultieren die KlonDiff-Fragmente 453 Bp und 3 kB (pGEM-Te) bzw. die KlonGal-Fragmente 345 Bp, 78 Bp und 3 kB (pGEM-Te).



(c) Ausschneiden von Diff (441 Bp) bzw. Gal (412 Bp) aus pGEM-Te durch SalI, KpnI-Verdau von KlonDiff (3468 Bp) und KlonGal (3438 Bp)



(d) PstI/XhoI-Verdau von myc-pMT2SM-Diff bzw myc-pMT2SM-Gal

Abbildung IV.9: Konstruktion von myc-pMT2SM-Diff und myc-pMT2SM-Gal

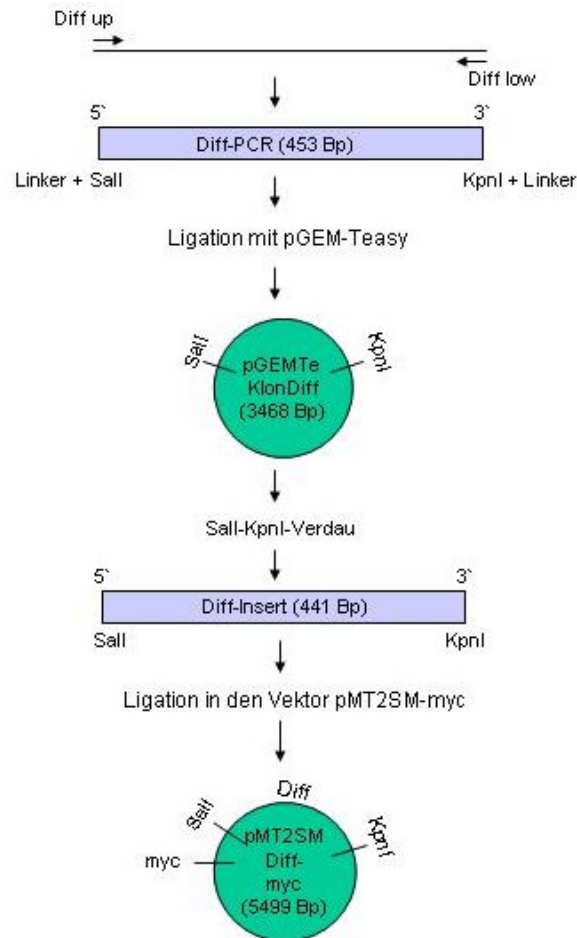


Abbildung IV.10: Konstruktion von Diff-pMT2SM-myc

Das „Differenzierungs-assoziierte Protein“-Insert wurde mit den Restriktionsenzymen SalI und KpnI aus dem pGEM-Teasy-Vektor herausgeschnitten (441 Bp) (siehe Abb. IV.9(c)). Anschliessend wurde der Diff-cDNA-Sequenz durch Klonierung in den Vektor pMT2SM ein myc-Tag (siehe Tab. III.21) angefügt. Der Klonierungserfolg wurde mit PstI und XhoI überprüft (siehe Abb. IV.9(d)).

3.3 Galektin1 (56b)

Galektin1 gehört zur Familie der Galaktosid-bindenden Lektine vom S-Typ. Es ist ein Homodimer aus zwei 135 AS grossen 14 kDa-Untereinheiten [31] (526 Bp) mit einem offenen Leserahmen von 405 Bp (Bp 69 bis Bp 473).

Der gefischte Klon 56b enthält die vollständige Sequenz von Galektin1 ab Bp 30 und somit dessen vollständigen kodierenden Bereich.

Tabelle IV.8: Galektin1-PCR-Reaktionen

Primer	Sequenz (5'→ 3')	Länge des PCR-Fragmentes	Position des PCR-Fragmentes
Gal up	<i>AATGTCGACCATGGCTTGTGGTCTGGTCGC</i>	423 Bp	69-473
Gal low	<i>AAAGGTACCTGTCAAAGGCCACACATTTGATC</i>		
Fett: Restriktionstelle für SalI bzw. KpnI, Kursiv : Linker			

Zur Isolierung der gesamten kodierenden, 526 Bp grossen Sequenz (69-476 Bp) von Galektin wurde eine PCR mit den Primern „Gal up“ und „Gal low“ durchgeführt (siehe Tab. IV.8). Mit dem Primer „Gal up“ wurde an das 5'-Ende eine SalI-Schnittstelle (G↓TCGA↑C) und mit „Gal low“ an das 3'-Ende eine KpnI-Schnittstelle (G↑GTAC↓C) an die Galektin-Sequenz angefügt. Als Template diente die humane Nieren-cDNA-Bank (siehe III 1.10). Es resultierte ein PCR-Fragment von 423 Bp, das die vollständige kodierende Region von Galektin enthält.

Das PCR-Fragment (siehe Abb. IV.9(a)) wurde in den pGEM-Teasy-Vektor inkloniert und mittels eines Restriktionsverdau mit EcoRI (siehe Abb. IV.9(b)) und anschliessender Sequenzierung überprüft. Das Galektin-Insert wurde mit den Restriktionsenzymen SalI und KpnI aus dem pGEMTeasy-Vektor ausgeschnitten (412 Bp) (siehe Abb. IV.9(c)) und in den Vektor pMT2SM-myc (siehe Tab. III.21) inkloniert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurde ein Restriktionsverdau mit PstI und XhoI durchgeführt (siehe Abb. IV.9(d)).

3.4 Vinexin-β (25a)

Vinexin-β ist ein Adapterprotein, das eine Rolle bei der Ausbildung und Organisation des Aktin-Zytoskeletts und der Zellmigration spielt. Es besteht aus 329 Aminosäuren und enthält 3 „Src“-homologe (SH) Domänen, die sich jeweils aus etwa 60 Aminosäuren zusammensetzen.

Es existieren mindestens zwei Varianten von Vinexin-β, wobei die kodierende Region der kleineren Variante (1283 Bp, Acc.Nr.: NM_005775.1) vollständig in der grösseren Variante (2983 Bp, Acc.Nr.: NM_005775.2) enthalten ist. So sind die Bp 147 bis 1261 von NM_005775.1 identisch mit dem Basenpaarabschnitt 1043 bis 2157 von NM_005775.2 und das 3'-Ende der kodierenden Region von NM_005775.2 (Bp 1168 - 2157) ist 100 % identisch mit der kompletten kodierenden Region von NM_005775.1 (Bp 272 - 1261) (siehe Abb. IV.12).

Der in der vorliegenden Arbeit mittels YTH gefischte Klon 25a ist eine gemeinsame Teilsequenz der Spleissvarianten NM_005775.1 (1283 Bp) und NM_005775.2 (2983 Bp) von Vinexin-β, wobei Klon 25a (Sequenz siehe Anhang) ab Bp 566 von NM_005775.1 bzw. ab

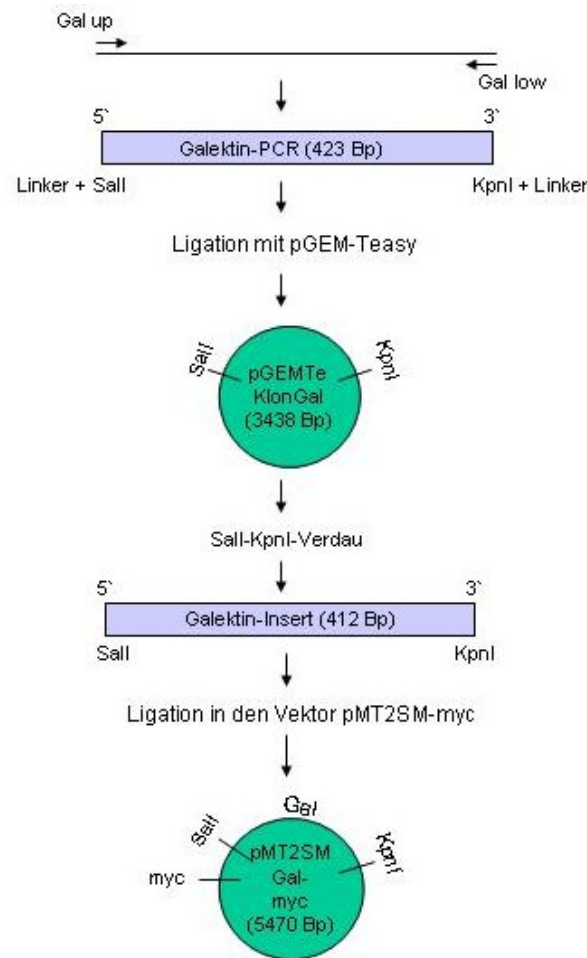


Abbildung IV.11: Konstruktion von Gal-pMT2SM-myc

Bp 1462 von NM_005775.2 beginnt.

Zur Isolierung der gesamten kodierenden Sequenz von Vinexin- β (Bp 272-1261 in NM_005775.1 bzw. Bp 1168-2157 in NM_005775.2) wurden zunächst zwei separate PCR-Reaktionen für das 5'- und das 3'-Ende durchgeführt (siehe Tab. IV.9) - zur Vereinfachung werden in den folgenden Ausführungen die Bp-Angaben hier nur auf die Spleissvariante NM_005775.1 bezogen. Das 5'-Ende (266-1233 Bp) wurde mit den Primern „Vin up“ und „Vin low“ amplifiziert (siehe Abb. IV.13(a)) und das 3'-Ende (617-1258 Bp) mit den Primern „Vin N2“ und „Vin low2“ (siehe Abb. IV.13(b)).

Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM-Teasy einkloniert. Der Einbau der PCR-Produkte in pGEM-Teasy wurde mittels Restriktionsverdau überprüft, indem die Inserts mit EcoRI aus dem Vektor herausgeschnitten wurden (siehe Abb. IV.14(a) & IV.14(b)). Die positiven Klone wurden anschliessend durch Sequenzierung mit den Primern VinN1, VinC1, VinN2, VinC2, sp6 und T7 (siehe Kap. III 1.8) nochmals überprüft.

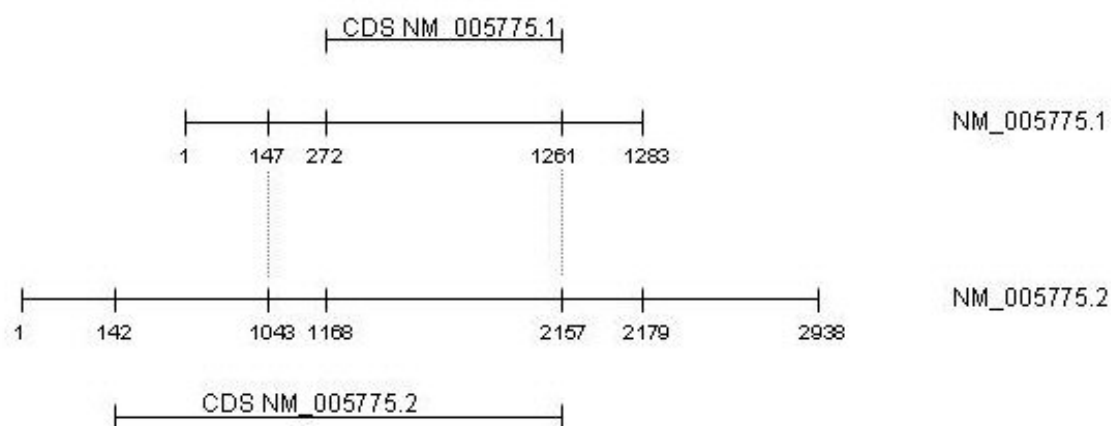


Abbildung IV.12: Alignment der Spleissvarianten von Vinexin-β. (CDS = „coding sequence“)

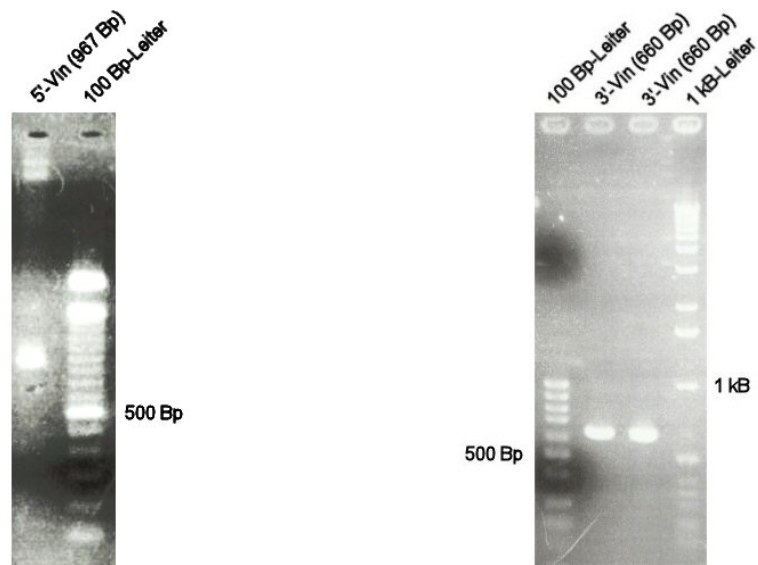
Tabelle IV.9: Vinexin-β-PCR-Reaktionen

Primer	Sequenz (5'→ 3')	Länge des PCR-Fragmentes	Position des PCR-Fragmentes
Vin up	CACAAAATGGCTGATGGAGGAA	967 Bp	5'-Ende
Vin low	AACGTTCCGAATTTCTGGGTCCTC		266-1233
Vin N2	<i>GAAGAATTC</i> GAGGCTGTGGCCAGT	660 Bp	3'-Ende
Vin low2	AAT GGTACCG CACCGGGGCAACGTAATTT		617-1258
Fett: Restriktionsstelle für KpnI, Kursiv : Linker			

Das 5'-Ende von Vinexin-β wurde mit den Enzymen NotI (GC↓GGCC↑GC) und BspMI (5'ACCTGC (N)₄3' & 3'TGGACG(N)₈5') aus dem pGEM-Teasy-Vektor ausgeschnitten. Vinexin besitzt eine interne BspMI-Schnittstelle bei 761 Bp und pGEM-Teasy eine NotI-Schnittstelle in der „multiple cloning site“, so dass durch den Verdau ein Vinexin-β-Fragment entsteht, das von Bp 266-761 reicht und somit eine Länge von 495 Bp besitzt (siehe Abb. IV.15(a)).

Das 3'-Vinexin-β-PCR-Fragment (746-1258 Bp) wurde mit den Enzymen KpnI (G↑GTAC ↓C) und NarI (GG↓CG↑CC) aus dem pGEM-Teasy-Vektor ausgeschnitten. Vinexin besitzt eine interne NarI-Schnittstelle bei 746 Bp und die KpnI-Schnittstelle am 3'-Ende, die durch den PCR-Primer „Vin low2“ eingefügt wurde (512 Bp) (siehe Abb. IV.15(a)).

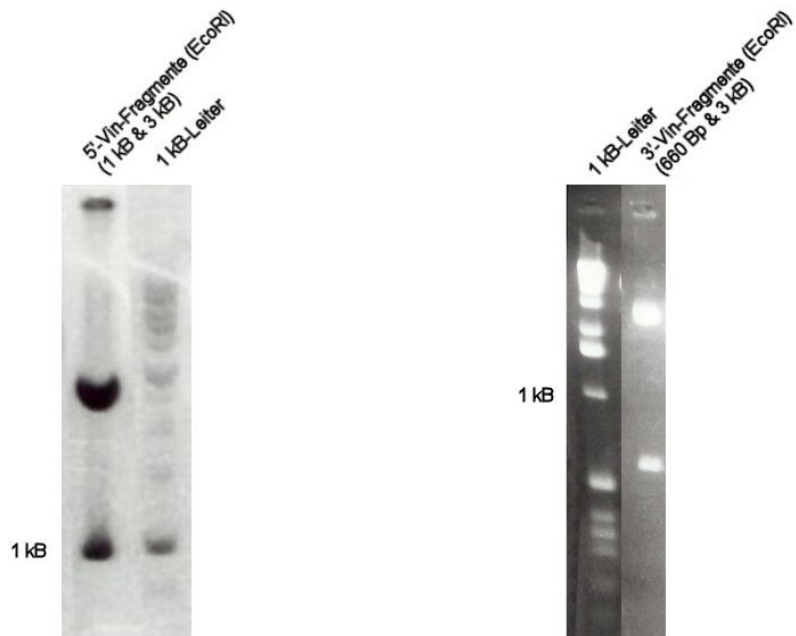
Die vollständige Vinexin-Sequenz wurde dann mittels SOE („splicing overlap extension“) (siehe Kap. III 2.5.2) generiert. Hierfür wurden die beiden 5'- und 3'-Vinexin-Fragmente, welche um ca. 20 Basen überlappen, als Template für die SOE-PCR eingesetzt. Die Primer „Vin up“ und „Vin low2“ (siehe Kap. III 1.8) dienten als Primer. Das 992 Bp grosse PCR-Produkt wurde aufgereinigt und in den Vektor pGEMTeasy einkloniert.



(a) PCR vom 5'-
Ende (967 Bp)
von Vinexin-β

(b) PCR vom 3'-Ende (641
Bp) von Vinexin-β

Abbildung IV.13: PCR 5'-Vin und PCR 3'-Vin



(a) EcoRI-Verdau von
Klon5'-Vin (1 kb und
3 kb (= pGEM-Te))

(b) EcoRI-Verdau von
Klon3'-Vin (660 Bp und 3
kB (=pGEM-Te))

Abbildung IV.14: EcoRI-Verdau von Klon5'-Vin und Klon3'-Vin

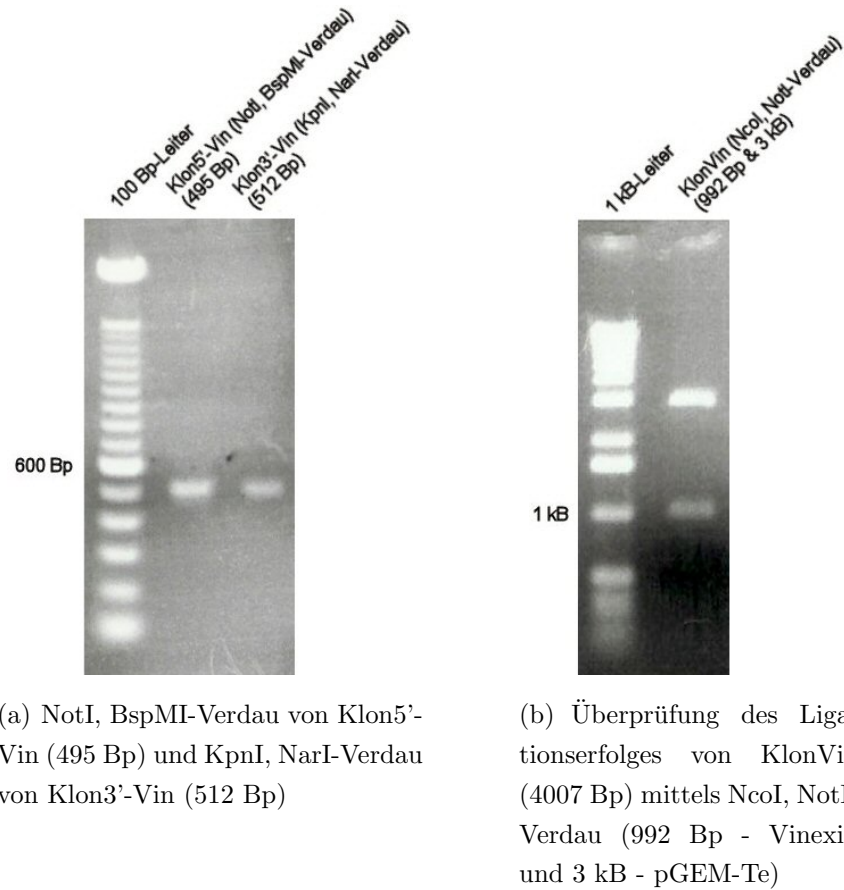


Abbildung IV.15: NotI, BspMI-Verdau von Klon5'-Vin und KpnI, NarI-Verdau von Klon3'-Vin. Überprüfung des Ligationserfolges von KlonVin.

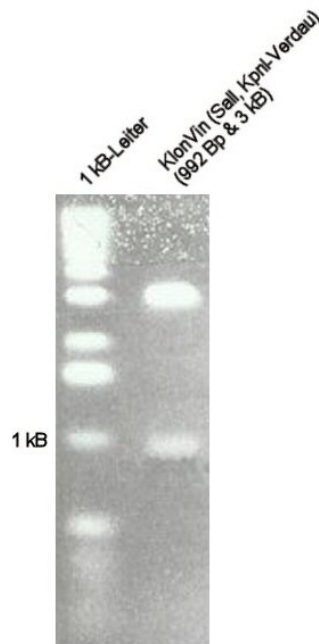


Abbildung IV.16: Herausschneiden von Vinexin (992 Bp) aus pGEM-Te (3 kB) mittels SalI, KpnI-Verdau

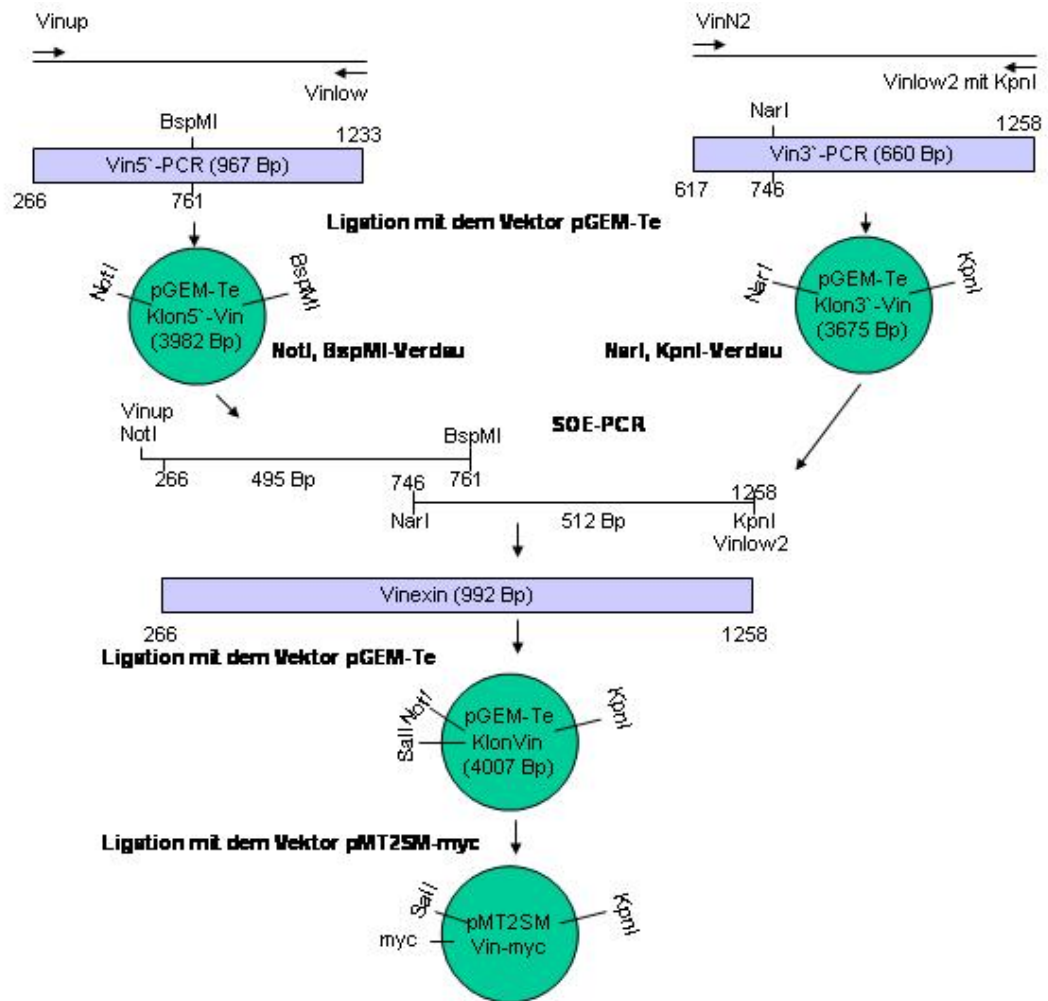


Abbildung IV.17: Konstruktion von Vin-pMT2SM-myc

Die Ligation wurde durch Restriktion mit den Enzymen NcoI und NotI überprüft (siehe Abb. IV.15(b)).

Anschliessend wurde das 992 Bp grosse Vinexin-Fragment (266-1258 Bp), das die gesamte kodierende Sequenz enthielt, als SalI/KpnI-Fragment in den eukaryontischen Vektoren pMT2SM-myc einkloniert. Der Klonierungserfolg wurde mittels Restriktion mit XhoI, PstI-Restriktionsverdau und anschliessender Sequenzierung mit pMT2SM 5', N1, C1, N2, C2, low, pMT2SM 3' (siehe Kap. III 1.8) überprüft.

4 Überprüfung von Vinexin- β (25a) und Galektin1(56b) auf spezifische Interaktion mit Tiam1 mittels Co-Präzipitation

Um zu überprüfen, ob die im YTH gefundenen Bindungen auch auf biochemischer Ebene nachweisbar und zudem spezifisch sind, wurden exemplarisch für Galektin1 und Vinexin- β Co-Präzipitationsuntersuchungen mit verschiedenen Tiam1-Deletionsmutanten durchgeführt.

Hierzu wurde eine DEAE-Dextran-Kotransfektion (siehe Kap. III 2.9.4) von pMT2SM-myc-Gal bzw. pMT2SM-myc-Vin mit pMT2SM-GST, pMT2SM-C580-Tiam1-GST bzw. pMT2SM-C1199-Tiam1-GST (siehe Tab. IV.10) in COS7-Zellen durchgeführt.

Tabelle IV.10: Verwendete Konstrukte (in pMT2SM)

Tiam1-Konstrukt:	AS:	kD:
pMT2SM-GST	218	27
pMT2SM-C580-Tiam1-GST	$580 + 218 = 798$	88
pMT2SM-C1199-Tiam1-GST	$1199 + 218 = 1417$	156
Bindungspartner:	AS:	kD:
myc-Gal-pMT2SM	$141 + 8 = 149$	23
myc-Vin-pMT2SM	$329 + 8 = 337$	58

48 h nach der Transfektion wurden Proteinlysate der kotransfizierten Cos-7-Zellen hergestellt (siehe Kap. III 2.9.5). Durch Zugabe von 20 %-igen GST-Sepharose-„Beads“ wurden die verschiedenen GST-markierten Tiam1-Proteine an die „Beads“ gebunden und durch Zentrifugation aus dem Gesamt-Proteinextrakt präzipitiert (siehe Kap. III 2.10.1). Im Falle einer Wechselwirkung von Vinexin- β bzw. Galektin1 mit PHn-CC-Ex-Tiam1 würden diese Bindungspartner mit C1199-Tiam1, nicht aber mit C580-Tiam1 kopräzipitiert und könnten dann im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert werden (siehe Kap. III 1.6 und III 2.10.2.4).

Je 15 μ l des totalen Zellysats bzw. des Präzipitates wurden auf ein 8 %-iges (für Galektin1 bzw. Vinexin- β) und ein 10 %-iges (für Tiam1) Protein-Gel aufgetragen und anschliessend im Western-Blot untersucht.

4.1 Galektin1

Dabei zeigte sich zunächst, dass die Co-Transfektion von Galektin1 mit GST, C580-Tiam1-GST und C1199-Tiam1-GST erfolgreich war (siehe Abb. IV.18). Ausserdem fand sich, dass Galektin1 nur mit C1199-Tiam1-GST, nicht aber mit GST alleine oder mit C580-Tiam1-GST co-präzipitiert werden konnte (siehe Abb. IV.18). Das bedeutet, dass die Bindung

von Galektin1 an Tiam1 spezifisch ist und offenbar über einen Proteinabschnitt von Tiam1 vermittelt wird, der in C1199-Tiam1 enthalten ist, in C580-Tiam1 aber fehlt - also am ehesten die PHn-CC-Ex-Domäne.

4.2 Vinexin- β

In den anschliessend durchgeführten analogen Untersuchungen zu Vinexin- β zeigten sich ähnliche Ergebnisse. So konnte auch Vinexin- β nur mit C1199-Tiam1-GST, nicht aber mit C580-Tiam1-GST oder aber mit GST alleine präzipitiert werden (siehe Abb. IV.19) und bindet somit spezifisch an die PHn-CC-Ex-Domäne.

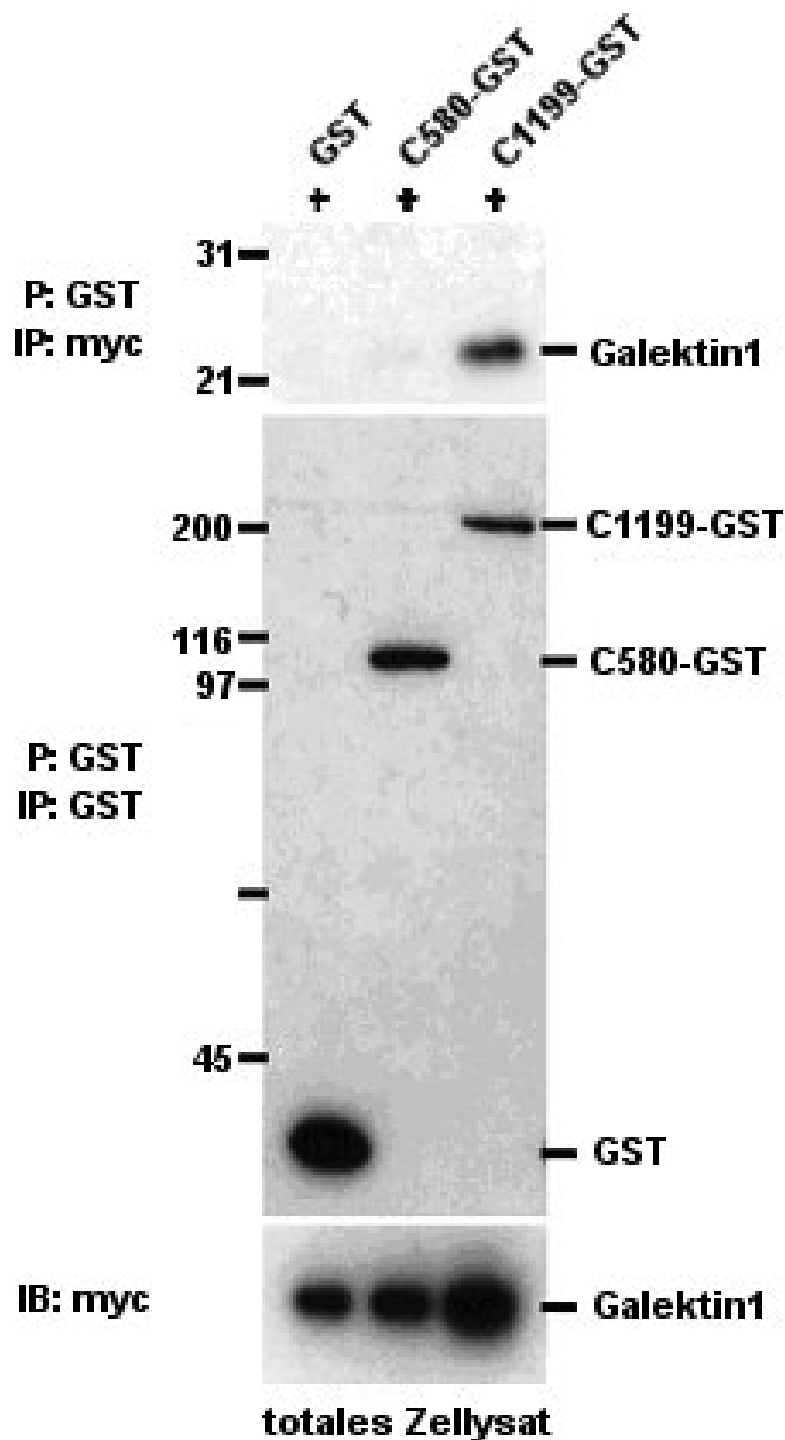


Abbildung IV.18: Bindungsanalysen zwischen myc-markiertem Galektin1 und verschiedenen GST-markierten Tiam1-Deletionsmutanten mittels Co-Präzipitation: In Cos-7-Zellen wurde myc-markiertes Galektin1 mit GST, C580-Tiam1-GST oder C1199-Tiam1-GST kotransfiziert. Nach Präzipitation mit GST-„Beads“ wurde das Präzipitat im Western Blot mit AK gegen myc und GST untersucht. Als Kontrolle der erfolgreichen Galektin1-Transfektion wurde totales Zelllysate im Western Blot untersucht. („IB“: Immunoblot, „P“: Präzipitation)

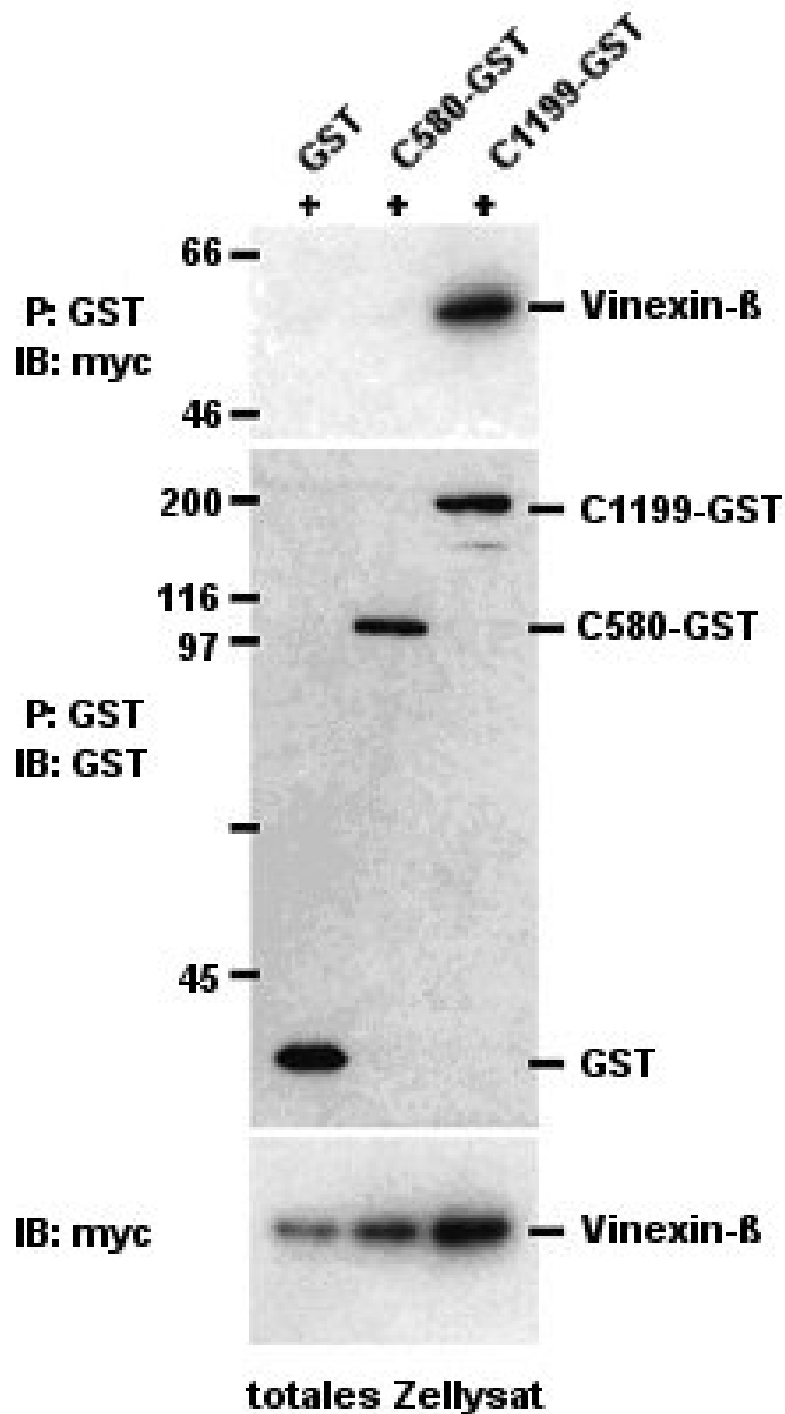


Abbildung IV.19: Bindungsanalysen zwischen myc-markiertem Vinexin-β und verschiedenen GST-markierten Tiam1-Deletionsmutanten mittels Co-Präzipitation: In Cos-7-Zellen wurde myc-markiertes Vinexin-β mit GST, C580-Tiam1-GST oder C1199-Tiam1-GST kotransfiziert. Nach Präzipitation mit GST-„Beads“ wurde das Präzipitat im Western Blot mit AK gegen myc und GST untersucht. Als Kontrolle der erfolgreichen Vinexin-β-Transfektion wurde totales Zelllysate im Western Blot untersucht. („IB“: Immunoblot, „P“: Präzipitation)

Kapitel V

Diskussion

1 Neue Bindungspartner von Tiam1

Auf der Suche nach neuen Bindungspartnern von Tiam1 wurden unter Verwendung einer Nieren-cDNA-Bank mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Screens mehrere Proteine (mit 26 bekannten und 8 unbekannten Sequenzen) gefunden, die in Hefezellen eine Protein-Protein-Interaktion mit Tiam1 zeigten. Von den bekannten Proteinen erwiesen sich Vinexin- β , Galektin1, Differenzierungs-assoziiertes Protein 13 und Kinektin aufgrund ihrer bisher bekannten funktionellen Eigenschaften als besonders interessante Kandidaten für eine Interaktion mit Tiam1. Die Spezifität der Interaktion zwischen Tiam1 und diesen vier potentiellen Bindungspartnern wurde zunächst im Yeast-Two-Hybrid-System verifiziert. Hierzu wurden verschiedene Abschnitte von Tiam1 (N853-Tiam1, PHn-CC-Ex-Tiam1 und C580-Tiam1) in den Hefvektor pACT2 einkloniert und im Yeast-Two-Hybrid-System auf Interaktion mit den in den Hefvektor pAS2-1 einklonierten Bindungspartnern getestet. Dabei war die Interaktion aller vier Bindungspartner mit Tiam1 nur nachweisbar, wenn N853-Tiam1 oder PHn-CC-Ex-Tiam1, nicht aber wenn C580-Tiam1 oder der leere Vektor im Yeast-Two-Hybrid-System beigelegt wurden. Da N853-Tiam1 die PHn-CC-Ex-Region komplett enthält, während sie in C580-Tiam1 vollständig fehlt, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Bindung zwischen Tiam1 und den vier potentiellen Bindungspartnern im Yeast-Two-Hybrid-System spezifisch ist und durch die PHn-CC-Ex-Region von Tiam1 vermittelt wird. Dies wird auch bestätigt durch die auf Proteinebene durchgeführten Bindungsanalysen. Für diese Versuche wurden Vinexin- β und Galektin1 exemplarisch ausgewählt und die entsprechenden cDNAs in den eukaryontischen Expressionsvektor pMT2SM mit einem myc-Tag einkloniert. Nach transienter Co-Transfektion mit leerem Vektor (pMT2SM-GST), C1199-Tiam1-GST und C580-Tiam1-GST konnte dann in Co-Präzipitationsversuchen gezeigt werden, dass sowohl Vinexin- β als auch Galektin1 nur mit C1199-Tiam1, nicht aber mit C580-Tiam1 oder dem leeren Vektor co-präzipitiert werden können. Da die PHn-CC-Ex-Region vollständig in C1199-Tiam1 enthalten ist,

in C580-Tiam1 aber komplett fehlt, zeigen auch diese Experimente auf Proteinebene, dass die Bindung zwischen Tiam1 und den Bindungspartnern Vinexin- β und Galektin1 spezifisch ist und über die PHn-CC-Ex-Region vermittelt wird. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich ähnliche Ergebnisse auf Proteinebene auch für Kinektin und das Differenzierungs-assoziierte Protein 13 nachweisen lassen.

Die folgenden Ausführungen zeigen, dass eine Proteininteraktion mit Tiam1 bei allen vier Proteinen plausibel erscheint, da sie alle in zellbiologische Prozesse verwickelt sind, die mit Tiam1 in Zusammenhang stehen.

2 Vinexin- β

Vinexin ist ein „focal adhesion“ und „cell-cell adhesion protein“, das die Aktin-Zytoskelett-Organisation und die Zellmigration fördert. Vinexin wurde 1999 als Bindungspartner von Vinkulin (siehe unten), einem wichtigen Zytoskelettprotein, im YTH-Screen identifiziert [42].

Vinexin bildet mit CAP (c-Cbl associated Protein)/Ponsin und ArgBP2 (Arg-binding-Protein 2) eine neue Adapterprotein-Familie, die sogenannte Vinexin-Familie. Adapterproteine sind zusammengesetzt aus mindestens zwei Protein-Protein-interagierenden Modulen und besitzen keine eigene Enzymaktivität. Adapterproteine der Vinexin-Familie wurden mit der Regulation zahlreicher zellulärer Funktionen wie der Zelladhäsion, Migration, Proliferation, dem Zellzyklus und dem Überleben der Zelle in Verbindung gebracht [13], [23], [63]. Die Proteine der Vinexin-Familie sind sowohl in der Signaltransduktion als auch in der Zytoskelettorganisation involviert. Sie besitzen alle eine SoHo (sorbin homology)-Domäne in der N-terminalen Region und drei SH3 (src homology 3)-Domänen in der C-terminalen Region. Sorbin ist ein 153 AS grosses Polypeptid [14]. SH3-Domänen gelten als Motive für Protein-Protein-Interaktionen und sind Bestandteil vieler eukaryontischer Proteine, die in Signaltransduktion, Zellpolarisation und Membran-Zytoskelett-Interaktion involviert sind [54]. Viele SH3-Proteine dienen als sogenannte Adapterproteine in der Rekrutierung von Signalproteinen zur Plasmamembran [13]. Die SH3-Domäne bindet an Prolin-reiche Sequenzen, die als Bindemotiv die Sequenz PXXP aufweisen (P, Prolin; X, beliebige AS). Interessanterweise besitzen auch Proteine der Vinexin-Familie selbst solche Prolin-reichen Bindemotive und können so an SH3-Domänen anderer Proteine binden. Proteine der Vinexin-Familie fungieren somit als SH3 Domänen-vermittelnde Adaptoren oder als „Scaffolding“-Moleküle in der Signaltransduktion.

Vinexin besteht aus mindestens 22 Exonen, die über eine Distanz von ca. 30 kB auf dem humanen Chromosom 8 lokalisiert sind. Bislang existieren mindestens zwei Isoformen von Vinexin, Vinexin α (82 kD) und β (32kD) [42] (mehrere andere Spleissvarianten findet man in der GenBank EST Database - die in der vorliegenden Arbeit verwendete Spleissvariante hat eine Bande bei ca. 58 kD). Beide Formen besitzen eine gemeinsame

COOH-terminale-Sequenz, die drei SH3 (Src homology 3)-Domänen beinhaltet. Vinexin β besteht aus 329 AS und enthält 3 SH3-Domänen, die sich jeweils aus etwa 50 AS zusammensetzen. Das grössere Vinexin α (733AS) enthält einen zusätzlichen N-Terminus, der eine SoHo-Domäne beinhaltet und vermutlich für die Aktivierung der Aktin-Zytoskelett-Organisation verantwortlich ist [42].

Vinexin α wird v.a. in der Skelettmuskulatur exprimiert, während Vinexin- β ubiquitär, besonders aber im Herzen exprimiert wird [42]. Eine exogene Expression von Vinexin α in Fibroblasten fördert die Ausbildung von „actin stress fibers“ und sogenannten „focal contacts“. Eine Überexpression von Vinexin- β hingegen führt zu verstärkter Zellmigration auf Fibronectin [42]. Ausserdem steigert Vinexin- β die EGF-induzierte Aktivierung der JNK/SAPK (vermutlich über eine Rac-Aktivierung), ohne jedoch die EGF-induzierte ERK-Aktivierung in adhären Zellen zu beeinflussen [78], sodass hier zwei unterschiedliche Mechanismen für die EGF-abhängige Regulation von JNK und ERK2 vorliegen müssen [1]. Interessanterweise ist Vinexin- β alleine allerdings nicht in der Lage, die JNK zu aktivieren. Für den Effekt von Vinexin- β auf die EGF-induzierte Aktivierung der JNK ist offenbar die Bindung von Vinexin- β an Sos von entscheidender Bedeutung [1]. Sos ist einerseits ein GEF für Ras und vermittelt so die durch Wachstumsfaktoren induzierte Aktivierung von Erk und andererseits ist Sos - ähnlich wie Tiam1 - aber auch ein GEF für Rac und aktiviert so die JNK/SAPK [17], [16], [51], [55]. Desweiteren ist Sos ein wichtiges Signalmolekül in sogenannten „focal contacts“ [52]. Die Bindung zwischen Vinexin- β und Sos erfolgt über die dritte SH3-Domäne von Vinexin- β und eine bestimmte PXXP-Sequenz von Sos [1]. Reguliert wird diese Interaktion durch Wachstumsfaktoren wie PDGF und EGF, die über eine Phosphorylierung von Sos die Dissoziation des Vinexin-Sos-Komplexes induzieren [1], [67].

Ein weiteres Bindungsprotein von Vinexin- β ist Vinkulin. Vinkulin gehört in die Gruppe der Zytoskelettproteine und kommt in sogenannten „focal contacts“ bei Interaktionen von Zellen mit der extrazellulären Matrix vor [5]. Ausserdem spielt Vinkulin eine wichtige Rolle bei der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsionen [46], wo Vinkulin an α -Catenin bindet [87], [88] und vermutlich Konformationsänderungen von Vinkulin für den regulatorischen Mechanismus der Aktin-Zytoskelett-Veränderungen verantwortlich sind [5]. Die Interaktion zwischen Vinexin und Vinkulin wird vermittelt durch die ersten beiden SH3-Domänen von Vinexin und der Prolin-reichen Region (PXXP-Sequenz) innerhalb der „hinge region“ von Vinkulin [42]. Ähnlich wie Vinkulin und Sos, die beide jeweils über eine PXXP-Sequenz an bestimmte SH3-Domänen von Vinexin binden, besitzt auch Tiam1 zwei PXXP-Sequenzen. Interessanterweise ist eine dieser PXXP-Sequenzen im Bereich der PHn-CC-Ex-Domäne lokalisiert (AA 506-509), die im Yeast-Two-Hybrid-System bereits eine spezifische Interaktion mit Vinexin- β zeigte. Dies deutet darauf hin, daß die Bindung zwischen Tiam1 und Vinexin- β möglicherweise durch diese PXXP-Sequenz in der PHn-CC-Ex-Region von Tiam1 und eine der SH3-Domänen von Vinexin- β vermittelt werden

könnte. Das abzuklären bleibt jedoch weiteren Untersuchungen vorbehalten.

3 Galektin1

Galektine gehören zu einer wachsenden Familie der Galaktosid-bindenden Lektine, deren Mitglieder hochkonservierte Sequenzbereiche in ihrer Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (CRD) aufweisen [3]. In Säugerzellen wurden bis jetzt 14 Galektine identifiziert [66]. Allen bekannten Galektinen fehlt ein Signalpeptid und sie werden vermutlich als lösliche Proteine auf einem nicht klassischen Sekretionsweg sezerniert [18]. Galektine kommen sowohl im Zytosol als auch im Zellkern als auch extrazellulär an der Zelloberfläche, in der extrazellulären Matrix und in Zellsekretionen vor [37], was bereits darauf hindeutet, dass sie in eine Vielzahl biologischer Funktionen eingebunden sein dürften. So werden Galektine mit vielen unterschiedlichen biologischen Prozessen wie der Zell-Zell- und Zell-Matrixadhäsion, der Migration, dem Zellwachstum, der Differenzierung, der malignen Transformation und der Metastasierung in Verbindung gebracht [39]. β -Galaktosid-bindende Proteine wie Galektin1 sind negative Wachstumsfaktoren, die einerseits den Übergang von der S-Phase in die G2-Phase im Zellzyklus inhibieren und andererseits auch Apoptose induzieren [89]. Galektin1 ist das erstbeschriebene Mitglied der Familie der Galaktosid-bindenden Lektine und ist auf Chromosom 22 q12-q13.1 lokalisiert [2]. Darüber hinaus wird Galektin1 vor allem in sensorischen, motorischen und olfaktorischen Neuronen sowie in hämatopoetischen und lymphoiden Organen exprimiert, wobei es aber auch aus zahlreichen anderen Geweben isoliert werden konnte.

Biochemisch ist Galektin1 ein nicht-kovalent gebundenes Homodimer aus zwei 14,5 kDa-Untereinheiten [4], die jeweils eine Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (CRD) aus 134 AS enthalten, über die die β -Galaktosid-Bindung vermittelt wird [10]. Desweiteren besitzt Galektin1 eine „cell growth-inhibitory site“, die nicht Teil der β -Galaktosid-Bindestelle (CRD) ist und eine Oberflächenschleife mit den Aminosäuren 25-30 sowie zwei internen β -Strängen beinhaltet [73].

Funktionell bindet Galektin1 vorzugsweise an das Disaccharid N-acetyl-Laktosamin (LacNAc; Gal β 1-4GlcNAc) und da bestimmte Glykoproteine, wie z.B. die Matrixproteine Laminin und Fibronectin sehr viele Polylaktosamin-Ketten enthalten, sind sie sehr gute Liganden für Galektine [66], [62]. Dies deutet darauf hin, dass Galektine eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zell-Matrixinteraktion spielen. Dies wird unterstrichen durch die Beobachtung, dass in Ovarialkarzinomen, in vaskulären glatten Muskelzellen sowie in der extrazellulären Matrix der Plazenta Galektin1 mit Laminin-1 und Fibronectin kolo-kalisiert ist [83]. Desweiteren konnte experimentell gezeigt werden, dass rekombinantes Galektin1 die Adhäsion humaner Melanomzellen an Laminin dosisabhängig steigert, so-dass Galektin1 ein Modulator für Invasion und Metastasierung sein könnte [82]. In die-sem Zellsystem konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Galektin1 und Galektin3

zur Bildung vielzelliger Aggregate führen und somit auch die Zell-Zelladhäsion steigern [79]. Interessanterweise führte auch die Überexpression von C1199-Tiam1 in humanen Karzinomzellen zu einer signifikanten Steigerung der Zelladhäsion an Laminin und einer deutlich gesteigerten Zell-Zelladhäsion [21], sodass möglicherweise ein Teil dieser Tiam1-Funktionen durch Galektin1 vermittelt wird oder umgekehrt.

Ein weiterer Mechanismus, über den Galektin1 die Zelladhäsion und damit möglicherweise auch die Tiam1-Funktion beeinflussen kann, ist die Interaktion von Galektin1 mit β 1-Integrinen. Integrine sind eine große Gruppe heterodimerer transmembranöser Zellmembranrezeptoren, die sich aus einer α - und einer β -Kette zusammensetzen und für die Regulation der Zell-Substratadhäsion und Zellmigration von großer Bedeutung sind [38]. Für Galektin1 konnte gezeigt werden, dass es durch die Bindung an β 1-Integrine einerseits deren Interaktion mit Laminin inhibieren, andererseits aber die β 1-Integrin-abhängige intrazelluläre Signaltransduktion im Sinne eines „outside-in signalling“ stimulieren kann [53]. Wichtig für die funktionelle Interaktion zwischen Galektin1 und Tiam1 könnte auch die Bindung von Galektin-1 an aktives H-Ras sein. So konnte einerseits gezeigt werden, dass Galektin1 direkt an onkogenes V12-Ras bindet [64]. Darüber hinaus führte die Überexpression von Galektin1 zu einer Verstärkung der EGF-stimulierten Ras-Aktivierung, einhergehend mit einer gesteigerten Membranassoziation von Ras und einer gesteigerten Aktivierung des für die Transformation von Zellen wichtigen Ras->Raf->ERK-Signalwegs [64]. Analog hierzu konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Galektin1 an aktives Ras zu einer bevorzugten Aktivierung des Ras->Raf->ERK-Signalwegs führt, während der Ras->PI3K-Signalweg inhibiert wird [19]. Auch Tiam1 bindet an Ras [45] und darüber hinaus wird für die Tiam1-induzierte Aktivierung von Rac PI3K benötigt [45]. Somit ist denkbar, dass Galektin1 über die Bindung an aktives Ras einerseits und an Tiam1 andererseits die Ras-abhängige Signaltransduktion in Richtung auf Tiam1 und damit verschiedene Tiam1-abhängige Zellfunktionen maßgeblich beeinflusst. Dies zu klären, bleibt jedoch weiteren Untersuchungen vorbehalten.

4 Kinektin

Kinektin ist ein 160 kDa großes integrales Membranprotein, das neben einer N-terminalen hydrophoben Transmembran-Helix (von 28 AS) eine zweigeteilte Kernlokalisierungssequenz sowie zwei weitere C-terminale Leuzin-Zipper-Motive enthält [26]. Außerdem findet sich im Bereich der AS 326 bis 1248 eine „alpha-helical coiled coiled“-Region [26]. Sowohl in humanen Zellen als auch in Hühnerzellen existiert neben dem 160 kDa großen Kinektin-Protein eine 120 kDa große Spleißvariante, der die N-terminalen 232 AS des 160kDa großen Proteins fehlen [43]. Funktionell dient Kinektin an Zellorganellen als Membrananker für Kinesin [80], wobei für diese Kinektin/Kinesin-Bindung eine Interaktion der „coiled-coil“-Region von Kinektin mit einer „coiled-coil“-Region im Schwanzbereich von Kinesin ver-

antwortlich gemacht wird [74]. Die Kinesin-Bindedomäne von Kinektin befindet sich in der Nähe des COOH-Terminus und verstärkt die Mikrotubuli-stimulierte Kinesin-ATPase-Aktivität [58]. Kinesin gehört zu den sogenannten Motorproteinen, die die intrazelluläre Bewegung von Organellen entlang der Mikrotubuli oder Aktinfilamente ermöglichen [32]. Desweiteren dient Kinektin auch als Membrananker für den Elongationsfaktor-1 delta (EF-1 delta). Dieser Bindungspartner von Kinektin befindet sich im Endoplasmatischen Retikulum und wurde mittels Yeast-Two-Hybrid gefunden. EF-1 delta gehört ähnlich wie Tiam1 in die Gruppe der GEF-Proteine und aktiviert das G-Protein, EF-1 alpha, das bei der Proteinbiosynthese eine wichtige Rolle spielt [59]. Interessanterweise wurde Kinektin auch in drei unabhängigen Yeast-Two-Hybrid-Experimenten als Bindungspartner für kleine GTP-asen der Rho-Familie identifiziert [36]. So konnte gezeigt werden, dass die GTP-gebundenen Formen von RhoA, Rac1 und Cdc42 spezifisch an Kinektin binden, wobei eine „coiled-coil“-Region in der Kinektinsequenz für diese Bindung verantwortlich gemacht wird [36]. RhoG, ein weiteres Mitglied der Rho-Familie, aktiviert Rac1 und Cdc42 über einen Mikrotubuli-abhängigen Signalweg [27]. Auch für RhoG konnte gezeigt werden, dass es mit Kinektin interagiert und zwar über einen ca 300 AS langen Abschnitt (AS 630 bis 932) der „coiled-coil“-Region von Kinektin (AS 326 bis 1248), die auch die Bindestelle für RhoA enthält [85]. RhoG, Kinektin und Kinesin ko-lokalisieren im endoplasmatischen Retikulum, und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Aktivität. So führt die Überexpression von Kinektin bei erhaltener RhoG-Aktivität zur Induktion Rac1- und Cdc42-abhängiger Zytoskelettveränderungen [85]. Im Gegensatz hierzu induziert Kinektin aber RhoA-abhängige Zytoskelettveränderungen, wenn die RhoG-Aktivität inhibiert wird oder die Mikrotubuli-abhängige Signaltransduktion unterbrochen sind [85]. Kinektin fungiert somit als Mediator der Mikrotubuli-abhängigen RhoG-Aktivität und dient vermutlich auch als Mediator der antagonistischen Signalwege von RhoG und RhoA [85], [71]. Darüber hinaus könnte Kinektin, das nur an aktives, nicht aber an inaktives Rac1 bindet [36], eine weitere Aktivierung von Rac1 durch Tiam1 [49] verhindern, indem es im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus mit Tiam1 interagiert. Die für die Bindung von Kinektin und Tiam1 relevanten Domänen sind bislang nicht bekannt. Da Tiam1 jedoch - ähnlich wie Kinesin - eine „coiled-coil“-Region in seiner PHn-CC-Ex-Domäne besitzt [75] und die Interaktion zwischen Kinektin und Kinesin über „coiled-coil“-Regionen beider Proteine vermittelt wird [74], ist jedoch zu vermuten, dass auch die Tiam1-Kinektin-Bindung über einen ähnlichen Mechanismus erfolgt.

5 Differenzierungs-assoziiertes Protein

Das zunächst als „13 kDa differentiation-associated protein“ (DAP13) bezeichnete Protein wurde erstmalig aus Nierengewebe isoliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Protein um die NADH:Ubiquinon Oxidoreduktase, dem ersten Enzymkom-

plex der mitochondrialen Atmungskette handelt, die im Pathomechanismus der mitochondrialen Enzephalomyopathie eine wichtige Rolle spielt [81]. Interessanterweise wurden in dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Screen neben DAP13 noch weitere Enzyme der mitochondrialen Atmungskette als potentielle Bindungspartner von Tiam1 identifiziert, wobei allerdings schwächere β -Galaktosidase-Aktivitäten als für DAP13 vorlagen. Bei diesen Enzymen handelte es sich z.B. um eine Untereinheit der NADH-Dehydrogenase oder um die Cytochrom C-Oxidase. Tiam1 führt in humanen Karzinomzellen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Engers et al, unveröffentlichte Ergebnisse), sodass sich somit ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen Tiam1 und Komponenten der Atmungskette ergibt.

6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems verschiedene Bindungspartner für Tiam1 identifiziert, wobei sich vier dieser Bindungspartner (Vinexin- β , Galektin1, Kinektin und DAP13) aufgrund funktioneller Überlappungen mit Tiam1 als besonders interessant erwiesen. Für zwei dieser Proteine (Vinexin- β und Galektin1) konnte die Spezifität der Bindung bereits biochemisch verifiziert werden. Das Ziel weiterer Untersuchungen wird sein,

- 1) auch für Kinektin und DAP13 die Spezifität der Interaktion mit Tiam1 auf biochemischer Ebene zu verifizieren,
- 2) die exakten Bindungsstellen in Tiam1 und den jeweiligen Bindungspartnern zu identifizieren (sogenanntes Domänenmapping) und
- 3) die funktionelle Relevanz der jeweiligen Bindungen zu analysieren.

Kapitel VI

Zusammenfassung

Das Proto-Onkogen Tiam1 (= „T-Lymphoma invasion and metastasis“) ist ein GEF-Protein, welches spezifisch die kleine Rho-ähnliche GTP-ase Rac aktiviert und hierüber zu einer signifikanten Hemmung der Tumordinvasion und Zellmigration sowie zu einer gesteigerten Zell-Zell- und Zell-Substratadhäsion führt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Screens einer Nieren-cDNA-Bank nach neuen Bindungspartnern von Tiam1 gesucht. Auf diese Weise wurden mehrere Proteine (26 bekannte und 8 unbekannte Sequenzen) gefunden, die in Hefezellen eine spezifische Protein-Protein-Interaktion mit Tiam1 zeigten. Vier dieser Gene erwiesen sich auch aufgrund ihrer bisher bekannten funktionellen Eigenschaften als besonders interessante Kandidaten für eine Interaktion mit Tiam1: Vinexin- β , Galektin1, Kinektin und das sogenannte Differenzierungs-assoziierte Protein 13. Die Spezifität der Interaktion im Yeast-Two-Hybrid wurde dadurch bestätigt, dass verschiedene Abschnitte von Tiam1 (N853-Tiam1, PHn-CC-Ex-Tiam1 und C580-Tiam1) in den Hefektor pACT2 kloniert und auf Interaktion mit den in den Hefektor pAS2-1 einklonierten Nieren-cDNA-Bank-Genen getestet wurden. Die Bindungspartner interagierten dabei nur mit N853-Tiam1 und PHn-CC-Ex-Tiam1, nicht aber mit C580-Tiam1 oder dem leeren Vektor. N853-Tiam1 enthält die N-terminalen 853 Aminosäuren und somit auch die für die Membranlokalisation von Tiam1 und das Tiam1-induzierte „membrane ruffling“ verantwortliche PHn-CC-Ex-Region.

Für zwei der im Yeast-Two-Hybrid-System spezifisch mit Tiam1 interagierenden Proteinen (Vinexin- β und Galektin1) konnte die Spezifität der Bindung auch auf biochemischer Ebene mittels Co-Immunpräzipitation in Säugerzellen verifiziert werden. So konnten sowohl Vinexin- β als auch Galektin1 nur mit C1199-Tiam1 (das die PHn-CC-Ex-Domäne enthält), nicht aber mit C580-Tiam1 (das die PHn-CC-Ex-Domäne nicht enthält) oder dem leeren Vektor kopräzipitiert werden.

Die vorliegende Arbeit legt somit den Grundbaustein für weitere Untersuchungen, in denen

- 1) auch für Kinektin und das Differenzierungs-assoziierte Protein 13 die Spezifität der Interaktion mit Tiam1 auf biochemischer Ebene verifiziert werden sollte,
- 2) die exakten Bindungsstellen in Tiam1 und den jeweiligen Bindungspartnern identifiziert werden sollten und
- 3) die funktionelle Relevanz der jeweiligen Bindungen analysiert werden sollte.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD.Dr.med. Engers für das Angebot dieser Arbeit, die kompetente Betreuung und ständige Präsenz bei der Besprechung von Problemen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine biologischen Betreuer Dr.rer.nat. Susanne Nockemann, Dr.rer.nat. Verena Kehren und Dr.rer.nat. Erik Springer im Labor. Sie führten mich geduldig und mit viel Eifer in die Methoden der Molekularbiologie ein, unterstützten mich tatkräftig bei der Ausführung meiner Experimente und begeisterten mich für dieses Thema. Sie hatten alle immer ein offenes Ohr für meine Probleme und gaben mir professionelle Ratschläge.

Frau Dr.rer.nat. Verena Kehren gilt mein besonderer Dank für die mühevollen und gewissenhaften Korrekturarbeiten meiner Doktorarbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei der MTLA Sandra Tränkner unserer Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und Hilfe bei der Laborarbeit bedanken.

Vor allem danken möchte ich meinen Eltern, Roswitha und Heinz Ulbrich, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit immer ausgiebig in allen Lebenssituationen unterstützten. Meinem Bruder Alexander Ulbrich gilt ein ganz besonderer Dank, der mir in stundenlanger Arbeit professionell bei der Gestaltung des Layouts dieser Arbeit zur Seite stand.

Literaturverzeichnis

- [1] Akamatsu, M., Aota, S., Suwa, A., Ueda, K., Amachi, T., Yamada, K. M., Akiyama, S. K., and Kioka, N. (1999). Vinexin forms a signaling complex with Sos and modulates epidermal growth factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activities. *J Biol Chem* 274:35933-35937.
- [2] Baldini, A., Gress, T., Patel, K., Muresu, R., Chiariotti, L., Williamson, P., Boyd, Y., Casciano, I., Wells, V., Bruni, C. B., and . (1993). Mapping on human and mouse chromosomes of the gene for the beta-galactoside-binding protein, an autocrine-negative growth factor. *Genomics* 15:216-218.
- [3] Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., et al. (1994). Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76:597-598.
- [4] Barondes, S. H., Cooper, D. N., Gitt, M. A., and Leffler, H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 269:20807-20810.
- [5] Ben-Ze'ev, A. (1997). Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol* 9:99-108.
- [6] Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- [7] Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100:243-55.
- [8] Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L., and Chen, Y. W. (2000). CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J Biol Chem* 275: 1829-1838.
- [9] Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L., and Chen, Y. W. (2000). Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. *J Cell Biol* 150: 177-191.
- [10] Bourne, Y., Bolgiano, B., Liao, D. I., Strecker, G., Cantau, P., Herzberg, O., Feizi, T., and Cambil-lau, C. (1994). Crosslinking of mammalian lectin (galectin-1) by complex biantennary saccharides. *Nat Struct Biol* 1:863-870.
- [11] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- [12] Breeden, L. and Nasmyth, K. (1985). Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50:643-650.
- [13] Buday, L (1999). Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1422:187-204.

- [14] Charpin, G., Chikh-Issa, A.R., Guignard, H., Jourdan, G., Dumas, C., Pansu, D., and Descroix-Vagnee, M. (1992). Effect of sorbin on duodenal absorption of water and electrolytes in the rat. *Gastroenterology* 103:1568-1573.
- [15] Collard, J. G. (1996). Signaling pathways regulated by Rho-like proteins: a possible role in tumor formation and metastasis. *Int J Onc* 8: 131-138
- [16] Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J.S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81:1137-1146.
- [17] Crews, C.M., and Erikson, R.L. (1993). Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell* 74:215-217.
- [18] Dunphy, J.L., Barcham, G.J., Bischof, R.J., Young, A.R., Nash, A., Meenseen, E.N. (2002). Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. *J Biol Chem* 277:14916-14924.
- [19] Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Ballan, E., Gabius, H. J., and Kloog, Y. (2002). Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 277:37169-37175.
- [20] Engers, R., Zwaka, T. P., Gohr, L., Weber, A., Gerharz, C. D., and Gabbert, H. E. (2000). Tiam1 mutations in human renal-cell carcinomas. *Int J Cancer* 88: 369-376.
- [21] Engers, R., Springer, E., Michiels, F., Collard, J. G., and Gabbert, H. E. (2001). Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J Biol Chem* 276:41889-41897.
- [22] Fields, S., Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.
- [23] Flynn, D.C. (2001). Adaptor proteins. *Oncogene* 20:6270-6272.
- [24] Frost, J. A., Xu, S., Hutchison, M. R., Marcus, S., and Cobb, M. H. (1996). Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol Cell Biol* 16: 3707-3713.
- [25] Frost, J. A., Steen, H., Shapiro, P., Lewis, T., Ahn, N., Shaw, P. E., and Cobb, M. H. (1997). Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *EMBO J* 16: 6426-6438.
- [26] Futterer, A., Kruppa, G., Kramer, B., Lemke, H., and Kronke, M. (1995). Molecular cloning and characterization of human kinectin. *Mol Biol Cell* 6:161-170.
- [27] Gauthier-Rouviere, C., Vignal, E., Meriane, M., Roux, P., Montcourier, P., Fort, P. (1998). RhoG Gtpase controls a pathway that independently activates Rac1 and Cdc42Hs. *Mol Biol Cell* 9(6): 1379-94.
- [28] Guthrie, F., Fink, G.R. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Academic Press, London.
- [29] Habets, G. G., Scholtes, E. H., Zuydgeest, D., van der Kammen, R. A., Stam, J. C., Berns, A., and Collard, J. G. (1994). Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell* 77: 537-549.

- [30] Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F.R. (1985). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204:63-113.
- [31] Hirabayashi, J., Ayaki, H., Soma, G., and Kasai, K. (1989). Production and purification of a recombinant human 14 kDa beta- galactoside-binding lectin. *FEBS Lett* 250:161-165.
- [32] Hirokawa, N., Takemura, R. (2004). Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res*. 15;301(1):50-9. Review.
- [33] Holter, W., Fordis, C. M., and Howard, B. H. (1989). Efficient gene transfer by sequential treatment of mammalian cells with DEAE-dextran and deoxyribonucleic acid. *Exp Cell Res* 184:546-551.
- [34] Hordijk, P. L., ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Oomen, L. C., and Collard, J. G. (1997). Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* 278: 1464-1466.
- [35] Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77 (1): 61-8.
- [36] Hotta, K., Tanaka, K., Mino, A., Kohno, H., and Takai, Y. (1996). Interaction of the Rho family small G proteins with kinectin, an anchoring protein of kinesin motor. *Biochem Biophys Res Commun* 225:69-74.
- [37] Hughes, R. C. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1473:172-185.
- [38] Humphries, M.J., Travis, M.A., Clark, K., Mould, A.P. (2004). Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins.
- [39] Itzkowitz, S. H. (1997). Galectins: multipurpose carbohydrate-binding proteins implicated in tumor biology. *Gastroenterology* 113:2003-2005.
- [40] Keely, P.J., Westwick, J.K., Whitehead, I.P., Der, C.J., Parise, L.V. (1997). Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature*: 390(6660):632-6.
- [41] Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M., and Werb, Z. (1998). Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 280: 898-902.
- [42] Kioka, N., Sakata, S., Kawauchi, T., Amachi, T., Akiyama, S. K., Okazaki, K., Yaen, C., Yamada, K. M., and Aota, S. (1999). Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J Cell Biol* 144:59-69.
- [43] Kumar, J., Erickson, H. P., and Sheetz, M. P. (1998). Ultrastructural and biochemical properties of the 120-kDa form of chick kinectin. *J Biol Chem* 273:31738-31743.
- [44] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- [45] Lambert, J.M., Lambert, Q.T., Reuther, G.W., Malliri, A., Siderovski, D.P., Sondek, J., Collard, J.G., and Der, C.J. (2002). Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol* 4:621-625.
- [46] Lampugnani, M. G., Zanetti, A., Breviario, F., Balconi, G., Orsenigo, F., Corada, M., Spagnuolo, R., Betson, M., Braga, V., and Dejana, E. (2002). VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Mol Biol Cell* 13:1175-1189.

- [47] Malliri, A., van der Kammen, R.A., Clark, K., van der Valk, M., Michiels, F., Collard, J.G. (2002). Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature*: 417(6891):867-71.
- [48] Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [49] Michiels, F., Habets, G. G., Stam, J. C., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1995). A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* 375: 338-340.
- [50] Michiels, F., Stam, J. C., Hordijk, P. L., van der Kammen, R. A., Ruuls-Van Stalle, L., Feltkamp, C. A., and Collard, J. G. (1997). Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation. *J Cell Biol* 137: 387-398.
- [51] Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A., and Karin, M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81:1147-1157.
- [52] Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K., and Yamada, K.M. (1995). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 131:791-805.
- [53] Moiseeva, E.P., Williams, B., Goodall, A.H., and Samani, N.J. (2003). Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem Biophys Res Commun* 310:1010-1016.
- [54] Musacchio, A., Gibson, T., Lehto, V.P., and Saraste, M. (1992). SH3-an abundant protein domain in search of a function. *FEBS Lett* 307:55-61.
- [55] Nimnual, A.S., Yatsula, B.A., and Bar-Sagi, D. (1998). Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 279:560-563.
- [56] Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., and Sugino, Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* 18:6169.
- [57] Nobes, C. D. and Hall, A. (1995). Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* 23: 456-459.
- [58] Ong, L. L., Lim, A. P., Er, C. P., Kuznetsov, S. A., and Yu, H. (2000). Kinectin-kinesin binding domains and their effects on organelle motility. *J Biol Chem* 275:32854-32860.
- [59] Ong, L.L., Er, C.P., Ho, A., Aung, M.T., and Yu, H. (2003). Kinectin anchors the translation elongation factor-1 delta to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 278:32115-32123.
- [60] Otsuki, Y., Tanaka, M., Yoshii, S., Kawazoe, N., Nakaya, K., and Sugimura, H. (2001). Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98 : 4385-4390.
- [61] Otsuki, Y., Tanaka, M., Kamo, T., Kitanaka, C., Kichino, Y., Sugimura, H. (2003). Guanine nucleotide exchange factor, Tiam1, directly binds to c-Myc and interferes with c-Myc-mediated apoptosis in rat1 fibroblasts. *J Biol Chem* 278 (7): 5132-40.
- [62] Ozeki, Y., Matsui, T., Yamamoto, Y., Funahashi, M., Hamako, J., and Titani, K. (1995). Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1. *Glycobiology* 5:255-261.
- [63] Pawson, T., and Scott, J.D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278:2075-2080.

- [64] Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E., and Kloog, Y. (2001). Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 20:7486-7493.
- [65] Qiu, R. G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., and Symons, M. (1995). An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374: 457-459.
- [66] Rabinovich, G. A., Rubinstein, N., and Toscano, M. A. (2002). Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta* 1572:274-284.
- [67] Rozakis-Adcock, M. Fernley, R., Wade, J., Pawson, T., and Bowtell, D. (1993). The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363:83-85.
- [68] Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839):487-91.
- [69] Sambrook, J. and Gething, M. J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342:224-225.
- [70] Sander, E. E., van Delft, S., ten Klooster, J. P., Reid, T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., and Collard, J. G. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* 143: 1385-1398.
- [71] Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 147: 1009-1022.
- [72] Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- [73] Scott, K. and Zhang, J. (2002). Partial identification by site-directed mutagenesis of a cell growth inhibitory site on the human galectin-1 molecule. *BMC Cell Biol* 3:3.
- [74] Sheetz, M. P. (1999). Motor and cargo interactions. *Eur J Biochem* 262:19-25.
- [75] Stam, J. C., Sander, E. E., Michiels, F., Van Leeuwen, F. N., Kain, H. E., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1997). Targeting of Tiam1 to the plasma membrane requires the cooperative function of the N-terminal pleckstrin homology domain and an adjacent protein interaction domain. *J Biol Chem* 272: 28447-28454.
- [76] Suggs, S.N., Hirose, H., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M.J., Itakura, K., Wallace, R.B. (1981). Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. In D.D. Brown and C.F. Fox (eds.): *Developmental biology using purified genes* 683-693. Academic Press, New York.
- [77] Sulciner, D. J., Irani, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Goldschmidt-Clermont, P., and Finkel, T. (1996). Rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 16: 7115-7121.
- [78] Suwa, A., Mitsushima, M., Ito, T., Akamatsu, M., Ueda, K., Amachi, T., and Kioka, N. (2002). Vinexin beta regulates the anchorage dependence of ERK2 activation stimulated by epidermal growth factor. *J Biol Chem* 277:13053-13058.

- [79] Tinari, N., Kuwabara, I., Huflejt, M. E., Shen, P. F., Iacobelli, S., and Liu, F. T. (2001). Glycoprotein 90K/MAC-2BP interacts with galectin-1 and mediates galectin-1-induced cell aggregation. *Int J Cancer* 91:167-172.
- [80] Toyoshima, I., Yu, H., Steuer, E. R., and Sheetz, M. P. (1992). Kinectin, a major kinesin-binding protein on ER. *J Cell Biol* 118:1121-1131.
- [81] Triepels, R., Smeitink, J., Loeffen, J., Smeets, R., Trijbels, F., and van den, H.L. (2000). Characterization of the human complex I NDUF7 and 17.2-kDa cDNAs and mutational analysis of 19 genes of the HP fraction in complex I-deficient-patients. *Hum Genet* 106:385-391.
- [82] van den Brule, F. A., Buicu, C., Baldet, M., Sobel, M. E., Cooper, D. N., Marschal, P., and Castronovo, V. (1995). Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin. *Biochem Biophys Res Commun* 209:760-767.
- [83] van den Brule, F. A., Califice, S., Garnier, F., Fernandez, P. L., Berchuck, A., and Castronovo, V. (2003). Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin. *Lab Invest* 83:377-386.
- [84] Van Leeuwen, F. N., van der Kammen, R. A., Habets, G. G., and Collard, J. G. (1995). Oncogenic activity of Tiam1 and Rac1 in NIH3T3 cells. *Oncogene* 11: 2215-2221.
- [85] Vignal, E., Blangy, A., Martin, M., Gauthier-Rouviere, C., and Fort, P. (2001). Kinectin is a key effector of RhoG microtubule-dependent cellular activity. *Mol Cell Biol* 21:8022-8034.
- [86] Warrens, A.N., Jones, M.D., Lechler, R.I. (1997). Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* 186: 29-35.
- [87] Watabe-Uchida, M., Uccida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E.D., and Takeichi, M. (1998). Alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol* 142:847-857.
- [88] Weiss, E.E., Kroemker, M., Rudiger, A.H., Jockusch, B.M., and Rudiger, M. (1998). Vinculin is a part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol* 141:755-764.
- [89] Wells, V., Davies, D., and Mallucci, L. (1999). Cell cycle arrest and induction of apoptosis by beta galactoside binding protein (beta GBP) in human mammary cancer cells. A potential new approach to cancer control. *Eur J Cancer* 35:978-983.
- [90] Westwick, J. K., Lambert, Q. T., Clark, G. J., Symons, M., Van Aelst, L., Pestell, R. G., and Der, C. J. (1997). Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* 17:1324-1335.
- [91] Woo, C. H., Lee, Z. W., Kim, B. C., Ha, K. S., and Kim, J. H. (2000). Involvement of cytosolic phospholipase A2, and the subsequent release of arachidonic acid, in signalling by rac for the generation of intracellular reactive oxygen species in rat-2 fibroblasts. *Biochem J* 348 Pt 3: 525-530.

Anhang

0.1 Nukleotidsequenzen der 5'-Enden der im YTH erhaltenen pACT2-Klone

Klon 2a bzw Klon 65a bzw Klon 66a

```
CTTTGTGGGAGGCCAGTTCTGGTCCGTGTACACGCCCTGCGACACCCAGAACAAAGACGCC
GTGCGGAGGACGCTGGAGCAGATGGACGTGGTCCACCGCATGTGCCAGGAGTACCCGGAGA
CCTTCCTGTATGTCACCAGCAGTGCAGGCATTCCGGCAGGCCTTCCGGGAAGGGAAGGTGGC
CAGCCTGATCGGCGTGGAGGGCGGCCACTCCATTGACAGCAGTTTGGGCGTCCTGCGGGCA
CTCTATCAGCTGGGCATGCGGTACCTGACCCTACCCACAGCTTGCAACACGCCCTGGCTGAC
AACTGGCTTGGTGGACACGGGAGACAGCGAGCCCAAGAACCAAGGCTTGTACCCTTTGGGC
AGCGTGTGTGAAGGACTGAACCGTCTGGGGTCTNATGACTGGCTACTGTCTGNGGCACATG
AGGCACCTTNAGTGTGTCAGAGCCCGNNTTTAGCATCTTGGCTANNCGTNTCCAACCGCNAACN
CTGNANTCTAGGT
```

Klon 3a

```
TTGACAGTGATTCCCCACGTGTGTTTCATCTGCACCCACCGAGCCAGGCAGAGGCCAGCCCTC
CGTGGTGCACACAGCACGCGCCTCAGTCCATCCCATTTTAGTCTTTAAACCCCTCAGGAAGTC
ACAGTCTCCGGACACCACACCACATGAGCCCAACAGGTCCACGATGGATCCACCAGTCCAC
CCAGCCTTTTCTTTTCATCTGAACAGAATGTGCATTTTGGAAAGCCTCCCTCACTCTCCAT
GCTGGCAGAGCAGGAGGGGAGACTGAAGTAAGAGATGGCAGAGGGAGATGGTGGCAAAANGG
TTAGATGCAGGAGAACAGTAGATGGATGGGTNCGGNCAGAGTCATGTGGGGAGGAACAAAG
GCTNAAGGAAAAGGGCTTACTGGTCATTCTACTTTGGNCAAGCAGNNAAGGGGAAAAGCCA
TNAATTNCTTANTTCCCATTGATTTCTAGGTTGAAGGAAAAAGGAATGGGGANGGTTNAATA
```

Klon 4b

```
CAACGATCCCTCCCTTACCATCAAATCAATTGGCCACCAATGGTACTGAACCTACGAGTACAC
CGACTACGGCGGACTAATCTTCAACTCCTACATACTTCCCCCATTATTTCCTAGAACCAGGCGA
CCTGCGACTCCTTGACGTTGACAATCGAGTAGTACTCCCGATTGAAGCCCCCATTTCGTATAAT
AATTACANCACAAGACGTCTTGCACATCATGAGCTGTCCCCACATTAGGCTTAAAAACAGATGC
AATTCCCGGACGTCTAAACCAAACCACCTTTTACCGCTACACGACCGGGGGTATACTACGGTCA
ATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACCACAGTTTCATGCCCATCGTCCTAGAATTAATTCCCTA
AAAATCTTTGAAATAGGGCCGNATTTACCCTATACACCCTTTACCCCTTTAGAGCAAAAAAAA
AAAANGAAAAANNNNAAAAAAA
```

Klon 4c

```
CGAGCTTGGAACCTTCGTTATCCGCGATGCGTTTTCTGGCAGCTACATTCCTGCTCCTGGCGCT
CAGCACCGCTGCCCAGGCGCAACCGGTGCAGTTCAAGGACTGCGGTTCTGTGGATGGAGTTA
TAAAGGAAGTGAATGTGAGCCCATGCCCCACCCAACCTGCCAGCTGAGCAAAGGACAGTCTT
ACAGCGTCAATGTCACCTTCACCAGCAATATTAGTCTAAAAGCAGCAAGGCCCTATCAAAAA
GACAAGACCTATAGCTCCTGNTTAAACTACCAGTGAAAAGCGAATATCCTCTATAAACTGGTGG
TGGAGTGGCACTTTAGGATACAAAACCAAAGCTTTCTGTGGAAATCCAGTCAANC GTTCTAT
TTTAAGNGCCTATTGAATCGGGNATTGGCATGATTG
```

Klon 5a

```
TGCGGGGATCCCCGCTTCAGTCGGCAGAGAGAGAGCTCGCGGGTGGTTCCGGTCCGGCTTT
TCAGGCCGGACGGGTGCCTGCCCTCAGGTGCGAGTTTGTGCGGTAAAGAACACACCCCGG
AGATGTGGACACGGCCCGCCAGGAGGGTCCTTGTTGGAGGTGGAAATCAACGAGAACTT
GCCCCGCCAGAAAAACATGAAGAAAACCCAGGAAATTAGCAAGGGAAAGAGGAAAGAGGATA
GCTTGACTGCCTCTCAGAGAAAGCAGAGGGACTCTGAGATCATGCAAGAAAAGCAGAAGGC
AGCTAATGAGAAGAAGTCTATTGCAGACAAGAGAAAAGTGATGACTGGCTATTTGGAAACCT
```

GGGTGCTCTGCAACTGGGTGATCATAAGCTCT

Klon 6a bzw Klon 30a

CTGAGCCGCGGCCCTCCCGGAAGCGCAGAGCTCCGCTGGTGCCACGTTTATCCCCTTACAT
CCTCCTAGGACCCGGTCCGGTAGTCGTCGCCCNAGCCCGCGGGGCGCAGNGCCCGAGCCG
CGGCCCTCGAGACGGGACCGAGAGCATCATGGGCAGCACTGTCCCGCGCTCCGNCTCCGTG
CTGCTTCTGCTGCTGCTCCTGCGCCGGGCGGAGCAGCCCTGCGGNGCCGAGCTCACCTTCCG
AGCTGCCGGAACAACGCCAGCANTGCTTCCACGAGGAGGTGGAGCATAGCGTGAAGTTCTCC
CTGAATTACCAGGTCATANTGGAGGCCACTACGATGTTGACTGCTATGTNAAGGACCCNAGG
GNAACACCATTACAGA

Klon 7a

CACCTGGCACTGCCCCCAACCAAAGTCATGAGGGCAAGGCTCCGGTTCTGCCCCTCACAGG
GTCCCAGAAGCAAGGGCAGTGAGGACCTGGCCACGTCCCTGGCACGGGCTGTCTGATTCT
CCTTCGCTGTGGCGGGAAGATGGCCGGATTTGAAGGCCTCCGCTGCTCACTGCTGTGCCTT
GATCGGCCTGGACGAGCCCGCCCACACCTCCATCATAACCAGTGTGAAGAGGGGCTGGGGAC
CCACCACTCCTGAGAACAGCATCCTTGGGAAGACCCAGCTGTGAGTGCACAGCAGGCACAGT
CCCTCAGGCCCAGGTGCTATGGGGCCGCAGAGCATCAACAGCCTCTCTCAGCTGCTGCAGCA
GCTNTTTGGGCTGTGGTGAGAACGCCTGGTGTCACTCTNTGGAAGTCGGGTGCGCAACCAA
GANGCNAGACTTTGGAGCNCAAATAAAGGTTGCTGTCAACCAACCAGACCGTCTTNCGGTG
CTCTAGACAGACTTTTTT

Klon 9a bzw Klon 21d

TAGCATTTACCATCTCACTTCTAGGAATACTAGTATATCGCTCACACCTCATATCCTCCCTACT
ATGCCCTAGAAGGAATAAAGTAGTCTTTGCCGCTTGCAGAGCAGCGGTGGGCCTAGCCCTACTA
GTCTCAATCTCCAACACATATGGCCTAGACTACGTACATAACCTAAACCTACTCCAATGCTAAA
ACTAATCGTCCCAACAATTATATTACTACCACTGACATGACTTTCCAAAAAACACATAATTTGA
ATCACACAACCAACCCACAGCCTAATTATTAGCATCATCCTCTACTATTTTTTAACCAAATCAACA
CANCTATTTAGCTGGTCCCAACCTTTCTCGACCCTAACCAACCCCTCTAACTACTACTGACTCTA
CCCTACATNTGGAGCAACGCNNTAT

Klon 9c

GTCTTTGATTTAAACCAAAGCCATTATAGAAAGGTCTGCCCTTTCCAATATAAACTTATAAAA
CATATATATATAAATTACATTGGATGTAACTTGTGTATATATAACTTACATTAATGACTGCTGTA
GTCATTGTATATATCTTACATTGTTGTCCCTTCTCAGGCCATATTTGTAAATGAGATGTATTTT
TTGTTTGTTTTTTATTGATCCTTATTCTTAGAAATGTAAATGAGATGTAAATAAGACCAACTGT
TTTCCAAGACTTGTAAGTAGAAAAATTACTATATATACATATATTATAAATATATATTNTATTT
CCTTTTTCCCTTCTCTTGAAAGCAAAAAAAAAAANAAAA

Klon 10a

CTCGGCTCGCTGCAACCTCCATCTCCCGGGTTTCAGGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGACT
AGGTGGAGTTACAGGTGTGCATCACCCTCCCGGCTAATGCTTTTGTATTTTGGTAGAGACA
GGGTCTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCCGACCTCAGGTGATCCGCCCCGCTCG
GCCTCCCAAAGTGCTGGAATTACAGGCATGAGCCACTATGCCCGGCTTGGGTAGCCTTTTATA
TGAGGTATTTTCCAAGATACTTTCATATTTATTATCTCATTGATACACACAAATGCACACACAC
ACACACACACACACACACACTCATGCATGCACGCACCCTGAGAGATGGATAGGTTCTGG
NTAAGTGAATTTTCAATAGACAGTTCATGGCAAACCTGAGGTTAAAGTGTTTGATCANCTTTGG
CTACAAGGGAAGACTGATACTAGTGGTNAAAGCAGCCATTTANTTGAAAGNT

Klon 18a

CTAGAGCCCTTCTGGGCCCTCTATGCTGTTTACAACCAAGTCCCATGTGCGTGAGTTACTGGCT
CAGTACAAGATTGGGGAGCTGAATCCTGAAGACAAGGTAGCCCCACGTGGAGACCTCTGAC
CCTTATGCTGATGATCCTGTACGTCACCCAGCCCTGAAGGTCAACAGCCAGCGGCCCTTTAAT
GCAGAGCCTCCCCCTGAGCTGCTGACAGAAACTACATCACACCCAACCCTATCTTCTTCACC
CGGAACCATCTGCTGTACCTAACCTGGATCCAGACACCTATCGCTTACACGTAGTAGGAGCAC
CTGGGGTCCAGTACTGCTCTTTCCCTGGATGACTTGCACAANTTTTCAAGTCCAGATCCAGTACT
TTGNATGTGCCGNAACCACG

Klon 20a

ATAATTTATAGATTTTGTGACAGTAATGATTTACATATGCCCAATATNTGCCTTATTTTTTAAATA
AGTCATTCTGTATAAAGTCATTTTGTGTTGTTTCAGAGAAATCAAGATCTTATTCACAAAGAA
AAACATTTTATANATTGATCGCATTTTCTTTAAGTCAAAATGTTAAACTGGAGGCAGTATTTAA
CTTTGCAATTAGGAGTTTCAGAGATGCCTTGGCATACCACGAAAAACACTGTCAATATCCAAC
TCATTATAATTGTTATCAAGAATTAACCTAATAACTTTAAGTAAGGACAAGCAGCATCCTAGCA
CTTGGAAGTAGTCTTGGGTTCCCAGCAGAGTATCCAGTAACCTTNTGCACTCATCAGAATTTT

CAGCTGCCAAT

Klon 22b

CTACTTCTAACCTCCCTGTTCTTATGAATTCGAACAGCATAACCCCGATTCCGCTACGACCAAC
TCATACACCTCCTATGAAAAAACTTCTACCCTACCCTAGCATTACTTATATGATATGTCTC
CATACCCATTACAATCTCCAGCATTCCCCCTCAAACCTAAAAAAAAGTAAAACCCAGCCCAT
GACCCCTAACAGGGGGCCCTCTCAGCCCTCCTAATGACCTCCGGCCTAGCCATGTGATTTCACT
TCCACTCCATAACCGCTCCTTATACTAGGCCTACTAACCAACACACTAACCATATACCAATGATG
GCGCCGATGTANCACGAGAAAGC

Klon 24a

TTTAAAGTAATTTTTTCTAATTTTGTGAAGAATGGCAGTGGTAGTTTGATAGGATTAGTATTGA
ATCTATAAATGACTTTGAATCTATAAATGACTCTACATTGAATCTATAGATGACTTAGGAATCCA
TCATACAAGGCATGTGAACGACCTCTTCAAGGAGAACTACCAACCACTGCTCAACGAAATAAA
AGAGGATACTAACAAATGGAAGAACATTCCATGCTCATGGATAGGAAGAATCAGTATCATGAAA
TGGCCATACTGCCCAAGGTAATTTATGGATTTAATATGTCTTCTTTTTAGAAATATCTTTTCAA
ATCCTTTGCCCATTTATTGATTGAATATTAGAGTTTTTCCTATAGAGTATTTAACTCCTTATGTA
TTANAGCTTTAATCTTTGCANAGTGGTAGTTGAAAT

Klon 25a

GAGATCCCTAAGCCCATCAAGCCCCGACCTACCAGGTGCTGGAGTATGGAGAGGGCTGTGGCC
CAGTACACCTTCANGGGGGACCTGGAGGTGGAGCTGTCTTCCGCAAGGGAGAGCACATCTG
CCTGATCCGCAAGGTGAACGAGAACTGGTACGAGGGACGCATCACGGGCACGGGGCGCCAAG
GCATATTCCCTGCCAGCTACGTGCAGGTGTCTCGTGAACCCCGGCTCCGGCTCTGTGACGAC
GGCCCCCAGCTCCCCACGTCTCCCCGCCTGACCGCTGCCGCCGCTCAGCCCGTACCCAGCTC
CCCTCAGCCCTGCGCAGCCAGCTGACCCACCGACTTGGGGGGACAGACTTCCCCCGTCGACT
GCTTC

Klon 26a

CGGGTGCGGACGCAGCCGGCCCTTCTCAGGTGCATTTTAGTGTTACCAGGTTGCCACGTATT
TGAAGTGGTGTGAGAGCNCCTCGTTTGAACCGTTGTGGATTTTCAAATAGGAAAATCAAAA
GGCCCCAAAGAGACAGCTCACTGNACCATGCTTTGGGATTTTCATANNTTGAGTAATTCCTA
TGGGCTCTACCACCCAGCGAGTTAAAGAAGACAAGATTCCACCCCCAGGGGGTTGTGGTTCTG
GGAATGTGAGCAGCTTGTTTTTCAGGAGATCTGCATCTNGATCTGCCTGCTATTA

Klon 30b

CAGACGCCTGTCCCCACGAGTCCCCACTCTCATAGGCACACACCACTGTCAACCAACCCCATCC
CTACATCTCCATGCCCTTCACATAGAAGGAGGGTGCCTGGTTCTCCTTCCTGCAAGAAGCTG
GAGCAGGCAGACAGGGCGGACAGGTCTCTCCTTCCCCTGACCTCGCTCTTTCTCCTACCCCT
GAGAAGCAGCAGGGGCTAAGGCCACGTTGGAGGGGCTCAGGCCTTCTGGAAGGTGGCAAG
AGGGGCTTTGGATGGGGAGGGAAGG

Klon 32a

CACTGGGGCAGCACCTACTCCGTGTCAGTGGTGGAGACCGACTACGACCAGTACGCGCTGCT
CAGGACCCCTATCCCAGCTCACAGTGCCCAACCATCTCACCAGGAGAAAGAGCCACATCCCCA
CGTTAGGACCACGGAGACTGACCACACCTGACCCCCCAAACCCACGCACACGACGCTTGC
AGGACAGGCGCGCGCAGCGGGCAGGGGCTTGCCCGGCCAACCCTCCNTCCCCACCTTCC
CCACTGCGCGTTACTCCAGGATATGCCGAGTGACGTTAAGGNCATCTTTCGTCGTCCCGTG
GACCTCCCCTTCTNTGGCACGTCNTCCAACGTGGGACTGGCGTGTGCGGCTTCCCTGGGANG
ATCTTGGAGGTGNTCTCTGANAG

Klon 36b

CACTGGGGCAGCACCTACTCCGTGTCAGTGGTGGAGACCGACTACGACCAGTACGCGCTGCT
CAGGACCCCTATCCCAGCTCACAGTGCCCAACCATCTCACCAGGAGAAAGAGCCACATCCCCA
CGTTAGGACCACGGAGACTGACCACACCTGACCCCCCAAACCCACGCACACGACGCTTGC
AGGACAGGCGCGCGCAGCGGGCAGGGGCTTGCCCGGCCAACCCTCCNTCCCCACCTTCC
CACTGCGCGTTACTCCAGGATATGCCGAGTGACGTTAAGGNCATCTTTCGTCGTCCCGTG
ACCTCCCCTTCTNTGGCACGTCNTCCAACGTGGGACTGGCGTGTGCGGCTTCCCTGGGANG
TCTTGGAGGTGNTCTCTGANAG

Klon 41a

CATAACCGTACAAACCACCAAATCCTCTGCGTCCCCACTCCTCCTTCAGGGACTGGCCTGAGA
CCGGGGCACAGGGTAGGGGGGATCCCAACACTCCTCCCTGTGGAGGAGGCAGTTAGGGAAAC
TAGGATCCAGCCAAGGCCCGGGGGGAGACCCGCATGTTGCTTGGTCTGCTCAAGTCGGAGTC
AGGTTTCAGTGCTTTTTCCCTCCCTTAGCCCAACCCTCCAAGGCCTCATGTCTCCTAAGCATG

CTGACTGCATCCGAAAAGGCCCCCTCACCATGGTCTGCCTTACCCACATATGTGTGTACA
CGCGCACGCTGTATGTGCGCTGACTAAACATGCAAGTGAAAGGAGGAGCTTCT

Klon 46a

GACATTATTTATGTTAAATATACAATTATCAAGCAAGTATGAAGTTATTCAATTAAAATGCCACA
TTTCTGGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Klon 48a

ACAAAAAGTTAGCCGGGCGTGGTGGCATGCGTGTATAATCCAAGCTACTCAGGAGGCTGAGG
CAGAAGAATCACTTGAACCTGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATTGTGCCACTGTAC
TCCAGCCTGGGTGACAGAGTGAGACTCCATCTCAATAAAATTAATAATAATAAAACCTTCCAAA
AAAAGTGCCGGGACCAAATGGATTCACTGATGTGCATTTTTTCGAGATACTTAAGGTAGAAATG
ATCCAAGTCTGTACTGTCTCTTTTCAGAAAATAAAAGCAGGGATAACACTTCCCAATCATTTTTGT
GAGGCCAGGATTCCCTAATACCAAAGCCAGGCAAAACATTCAGAAAGGAAAACCTANGATCAA
TATTTCACTGACCGTTTAACAGCCANAAAATAAAAAA

Klon 48b

CGCCAGCGCCAGCGCTAGTCGGTCTGGTAAGGATTTACAAAAGGTGCAGGTATGAGCAGGT
CTGAAGACTAACATTTTTGTGAAGTTGTAAAACAGAAAACCTGTTAGAAATGTGGTGGTTTCA
GCAAGGCCTCAGTTTTCCTTCCTTCAGCCCTTGTAATTTGGACATCTGCTGCTTTCATATTTTC
ATACATTACTGCAGTAACACTCCACCATATAGACCCGGCTTTACCTTATATCAGTGACACTGGT
ACAGTAGCTCCAGAAAAATGCTTATTTGGGGCAATGCTAAATATTGCGGCAAGTTTTATGCAT
TGCTCCATTATGTTTCGTTATAAGCAAGTTCATGCTCTGAGTCCTGAAGAGAACGTTATCATCA
ATTAACAAGGCTGGCTTGA

Klon 50a

TTTTACCGCATTCCATCCACTCCCGATTCCCTTCATGGATCCGGCGTCTGCACCTTTACAGAGGT
CCAATCACGCGGACCCAGAACCCCATGGTGACCGGGACCTCAGTCCTCGGCGTTAAGTTTCA
GGCGGAGTGATTGCGCAGACATGCTGGGATCCTACGGCTCCTTGGCTCGTTTCCGCA
ACATCTCTCGCATTATGCGAGTCAACAACAGTACCATGCTGGGTGCCTCTGGCGACTACGCTG
ATTTCCAGTATTTGAAGCAAGTTCTCGGCCAGATGGTGATTGATGAGGAGCTTCTGGGAGAT
GGACACAGCTATAGTCCTAGAGCTATTCATTTCATGGCTGACCAGGGCCATGTCAGCCGGCGCT
CGAAGATGAACCTTTGTGGACACCATGGCATCGAAGCTTTC

Klon 56b

CTGGTGCGCCTGCCCGGAACATCCTCCTGGACTCAATCATGGCTTGTGGGTCTGGTCCGCA
GCAACCTGAATCTCAAACCTGGAGAGTGCCTTCGAGTGCGAGGCGAGGTGGCTCCTGACGCT
TAAGAGCTTCGTGCTGAACCTGGGCAAAGACAGCAACAACCTGTGCCTGGCACTTCAACCCT
CGTTTAAACGCCACGCGACGCCAACACCATTCGTGTGCAAAACAAGGGACGGNNGGGCCCTGG
GGGACCCGAGCCAANNGGAGGGTTGNCTTTCCCTTNCNAGCCTNGAAA

Klon 64a

CGGGAGTGCCGGTGGCGCCCCGCAGTCCGCTTGTCCGTCCTTCCCTCTCTGACTCTCCTACC
CCGGGCTGTCTCTGCAGAGGTCAGGGGAGGCGGGGGCCAGCACACGTCCCCAGTGGCAG
CGGGAGCGGCAGCTACGGGTTTCGCGGAGCCCCGACCCCCCAAGGGCTAGAGGAGCGCTCG
GCGGACCAAAGAAAGCCCGCAGCGGCTGCGCGCCCAACCAATAGGTGCGGGGCTCGGAGCC
GCGAGCCCTGCGCGCTCCTCCCTCCGCCCCGCGCGCGCGCGCGCTNCCCTCTCTCT
GTCCTGCTTGGTTCTCCGNCGCGGTNCGCACTCCGAGAGCGAANCAGGAGCGGCGCGTCTG
CTTGANAAACAGCCGAAAACCACGGNCA

Klon 67a

CGGAACATGAGGCAGCACAGCAAGATTTACAGAGTAAATTTGTGGCCAAAGAAAATGAAGTA
CAGAGTCTGCATAGTAAGCTTACAGATACCTTGGTATCAAAACAACAGTTGGAGCAAAGACTA
ATGCAGTTAATGGAATCAGAGCAGAAAAGGGTGAACAAAGAAGAGTCTCTACAAATGCAGGT
TCAGGATATTTTGAGCAGAATGAGGCTTTGAAAGCTCAAATTCAGCAGTTCCATTCCCAGA
TAGAGCCCTGCGCCTCCTCCCTCAGTTCTAGCAGAGAAGATTTCATAAAGTGATTGCAGAAAAG
ATAAGCAGATAAACAGACTGAAGATCTTTAGCAAGTGAACGTGATCGTTAACAAGTAAGANAA
GAACCTTAGGGTTTCCGAATATGAATT

Klon 73a

GTCATCTACTCTACCATCTTTGCAGGCACACTCATCACAGCGCTAAGCTCGCACTGATTTTTT
ACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACATGCTAGCTTTTATTCCAGTTCTAACCAAAAAATAAAC
CCTCGTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGTATTTCTCACGCAAGCAACCGCATCCATAATCCTT
CTAATAGCTATCCTCTTCAACAATATACTCTCCGGACAATGAACCATAACCAATACTACCAATC
AGTACTCATCATTAATAATCATAATGGCTATAGCAATAAACTAGGAATAGCCCCCTTTACTTN

Klon 76b
GGAACCCTCCTTTTACTCCTCTCGGAGGCCCTGGCCCTTACCCAGACCTNGGCGGGCTCCCA
CTCCTTGAAGTATTTCCACACTTCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCT
CTGTGGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTGCGCTTCGACAACGACGCCGCGAGTCCGAG
GATGGTGCCGCGGGCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGGTCAGAGTATTGGGACCGGGAGACA
CGGAGCGCCAGGGACANCGNACAGATTTTCCGAGTGAACCTGCGGACGCTGCGCGGCTACTA
CATTAGACGAGCGCGGGTCTACACCTGCAGTGGATGCATTGGCTGCAACTGGGGCCCCGAC
AGGCCTTTCTTCCGCGGGTATTAAC

Klon 78a
CTAACCCCCTAATAAAATTAATTAACCACTCATTCATCGACCTCCCCACCCCATCCAACATCTC
CGCATGATGAACTTCGGCTCACTCCTTGCGCCTGCCTGATCCTCCAAATCACCACAGGAC
TATTCCTAGCCATGCACTACTACCAGACGCCTCAACCGCCTTTTCATCAATCGCCCACATCA
CTCGAGACGTAAATTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCACGCCAATGGCGCCTCAATATTCT
TTATCTGCCTCTTCCTACACATCGGGCGAGGCCTATATTACGGATCATTTCTCTACTCAGAAA
CCTGGAACATCGGCATTATCCTTCTGCTTGCAACTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTATGTCT
TCCGTGAGGCCAATATA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

93

	1750																1760																1770																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
1712	C	A	G	A	A	A	A	G	G	G	T	G	A	A	C	A	A	A	G	A	A	G	A	G	T	C	T	C	T	A	Kinektin1																		
1738	C	A	G	A	A	A	A	G	G	G	T	G	A	A	C	A	A	A	G	A	A	G	A	G	T	C	T	C	T	A	Kinektin2																		
	1780																1790																1800																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
1742	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	T	T	C	A	G	G	A	T	A	T	T	T	T	G	G	A	G	C	A	G	Kinektin1																		
1768	C	A	A	A	T	G	C	A	G	G	T	T	C	A	G	G	A	T	A	T	T	T	T	G	G	A	G	C	A	G	Kinektin2																		
	1810																1820																1830																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
1772	A	A	T	G	A	G	G	C	T	T	T	G	A	A	A	G	C	T	C	A	A	A	T	T	C	A	G	C	A	G	Kinektin1																		
1798	A	A	T	G	A	G	G	C	T	T	T	G	A	A	A	G	C	T	C	A	A	A	T	T	C	A	G	C	A	G	Kinektin2																		
	1840																1850																1860																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
1802	T	T	C	C	A	T	T	C	C	C	A	G	A	T	A	G	C	A	G	C	C	C	A	G	A	C	C	T	C	C	Kinektin1																		
1828	T	T	C	C	A	T	T	C	C	C	A	G	A	T	A	G	C	A	G	C	C	C	A	G	A	C	C	T	C	C	Kinektin2																		
	1870																1880																1890																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
1832	G	C	T	T	C	A	G	T	T	C	T	A	G	C	A	G	A	A	G	A	A	T	T	A	C	A	T	A	A	A	Kinektin1																		
1858	G	C	T	T	C	A	G	T	T	C	T	A	G	C	A	G	A	A	G	A	A	T	T	A	C	A	T	A	A	A	Kinektin2																		
	1900																1910																1920																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
1862	G	T	G	A	T	T	G	C	A	G	A	A	A	A	G	G	A	T	A	A	G	C	A	G	A	T	A	A	A	A	Kinektin1																		
1888	G	T	G	A	T	T	G	C	A	G	A	A	A	A	G	G	A	T	A	A	G	C	A	G	A	T	A	A	A	A	Kinektin2																		
	1930																1940																1950																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
1892	C	A	G	A	C	T	G	A	A	G	A	T	T	C	T	T	T	A	G	C	A	A	G	T	G	A	A	C	G	T	Kinektin1																		
1918	C	A	G	A	C	T	G	A	A	G	A	T	T	C	T	T	T	A	G	C	A	A	G	T	G	A	A	C	G	T	Kinektin2																		
	1960																1970																1980																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
1922	G	A	T	C	G	T	T	T	A	A	C	A	A	G	T	A	A	A	G	A	A	G	A	G	G	A	A	C	T	T	Kinektin1																		
1948	G	A	T	C	G	T	T	T	A	A	C	A	A	G	T	A	A	A	G	A	A	G	A	G	G	A	A	C	T	T	Kinektin2																		
	1990																2000																2010																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
1952	A	A	G	G	A	T	A	T	A	C	A	G	A	A	T	A	T	G	A	A	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	Kinektin1																		
1978	A	A	G	G	A	T	A	T	A	C	A	G	A	A	T	A	T	G	A	A	T	T	T	C	T	T	A	T	T	A	Kinektin2																		
	2020																2030																2040																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
1982	A	A	A	G	C	T	G	A	A	G	T	G	C	A	G	A	A	A	T	T	A	C	A	G	G	C	C	C	T	G	Kinektin1																		
2008	A	A	A	G	C	T	G	A	A	G	T	G	C	A	G	A	A	A	T	T	A	C	A	G	G	C	C	C	T	G	Kinektin2																		
	2050																2060																2070																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
2012	G	C	A	A	A	T	G	A	G	C	A	G	G	C	T	G	C	T	G	C	T	G	C	A	C	A	T	G	A	A	Kinektin1																		
2038	G	C	A	A	A	T	G	A	G	C	A	G	G	C	T	G	C	T	G	C	T	G	C	A	C	A	T	G	A	A	Kinektin2																		
	2080																2090																2100																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
2042	T	T	G	G	A	G	A	A	G	A	T	G	C	A	A	C	A	A	A	G	T	G	T	T	T	A	T	G	T	T	Kinektin1																		
2068	T	T	G	G	A	G	A	A	G	A	T	G	C	A	A	C	A	A	A	G	T	G	T	T	T	A	T	G	T	T	Kinektin2																		
	2110																2120																2130																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
2072	A	A	A	G	A	T	G	A	T	A	A	A	A	T	A	A	G	A	T	T	G	C	T	G	G	A	A	G	A	G	Kinektin1																		
2098	A	A	A	G	A	T	G	A	T	A	A	A	A	T	A	A	G	A	T	T	G	C	T	G	G	A	A	G	A	G	Kinektin2																		
	2140																2150																2160																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
2102	C	A	A	C	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	A	A	T	T	T	C	A	A	A	C	A	A	A	A	T	G	Kinektin1																		
2128	C	A	A	C	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	A	A	T	T	T	C	A	A	A	C	A	A	A	A	T	G	Kinektin2																		
	2170																2180																2190																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
2132	G	A	A	G	A	A	T	T	T	A	A	G	A	T	T	C	T	A	A	A	T	G	A	C	C	A	A	A	A	C	Kinektin1																		
2158	G	A	A	G	A	A	T	T	T	A	A	G	A	T	T	C	T	A	A	A	T	G	A	C	C	A	A	A	A	C	Kinektin2																		
	2200																2210																2220																
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																			
2162	A	A	A	G	C	A	T	T	A	A	A	A	T	C	A	G	A	A	G	T	T	C	A	G	A	A	G	C	T	A	Kinektin1																		
2188	A	A	A	G	C	A	T	T	A	A	A	A	T	C	A	G	A	A	G	T	T	C	A	G	A	A	G	C	T	A	Kinektin2																		

[illegible]

		2710										2720										2730										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
2672	A C C A T G A A	G G C T G T T T T	G G A A G A G A A A	G A G	Kinektin1																											
2698	A C C A T G A A	G G C T G T T T T	G G A A G A G A A A	G A G	Kinektin2																											
		2740										2750										2760										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
2702	A A A G A C C T	A G C C A A T A C A	G G G A A G T G G T T A		Kinektin1																											
2728	A A A G A C C T	A G C C A A T A C A	G G G A A G T G G T T A		Kinektin2																											
		2770										2780										2790										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
2732	C A G G A T C T	T C A A G A A G A A A	A T G A A T C T T T A		Kinektin1																											
2758	C A G G A T C T	T C A A G A A G A A A	A T G A A T C T T T A		Kinektin2																											
		2800										2810										2820										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
2762	A A A G C A C A	T G T T C A G G A A G	T A G C A C A A C A T		Kinektin1																											
2788	A A A G C A C A	T G T T C A G G A A G	T A G C A C A A C A T		Kinektin2																											
		2830										2840										2850										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
2792	A A C T T G A A	A G A G G C C T C T T	C T G C A T C A C A G		Kinektin1																											
2818	A A C T T G A A	A G A G G C C T C T T	C T G C A T C A C A G		Kinektin2																											
		2860										2870										2880										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
2822	T T T G A A G A	A C T T G A G A T T G	T G T T G A A A G A A		Kinektin1																											
2848	T T T G A A G A	A C T T G A G A T T G	T G T T G A A A G A A		Kinektin2																											
		2890										2900										2910										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
2852	A A G G A A A A	T G A A T T G A A G A	G G T T A G A A G C C		Kinektin1																											
2878	A A G G G A A A	T G A A T T G A A G A	G G T T A G A A G C C		Kinektin2																											
		2920										2930										2940										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
2882	A T G C T A A A	A G A G A G G G A G A	G T G A T C T T T C T		Kinektin1																											
2908	A T G C T A A A	A G A G A G G G A G A	G T G A T C T T T C T		Kinektin2																											
		2950										2960										2970										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
2912	A G C A A A A C	A C A G C T G T T A C	A G G A T G T A C A A		Kinektin1																											
2938	A G C A A A A C	A C A G C T G T T A C	A G G A T G T A C A A		Kinektin2																											
		2980										2990										3000										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
2942	G A T G A A A A	C A A A T T G T T T A	A A G T C C C A A A T T		Kinektin1																											
2968	G A T G A A A A	C A A A T T G T T T A	A A G T C C C A A A T T		Kinektin2																											
		3010										3020										3030										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
2972	G A G C A G C T	T A A A C A A C A A A	A C T A C C A A C A G		Kinektin1																											
2998	G A G C A G C T	T A A A C A A C A A A	A C T A C C A A C A G		Kinektin2																											
		3040										3050										3060										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
3002	G C A T C T T C	T T T T C C C C C T C	A T G A A G A A T T A		Kinektin1																											
3028	G C A T C T T C	T T T T C C C C C T C	A T G A A G A A T T A		Kinektin2																											
		3070										3080										3090										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
3032	T T A A A A G T	A A T T T C A G A A A	G A G A G A A A G A A		Kinektin1																											
3058	T T A A A A G T	A A T T T C A G A A A	G A G A G A A A G A A		Kinektin2																											
		3100										3110										3120										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
3062	A T A A G T G G	T C T C T G G A A T G	A G T T A G A T T C T		Kinektin1																											
3088	A T A A G T G G	T C T C T G G A A T G	A G T T A G A T T C T		Kinektin2																											
		3130										3140										3150										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
3092	T T G A A G G A	T G C A G T T G A A C	A C C C A G A G G A A G		Kinektin1																											
3118	T T G A A G G A	T G C A G T T G A A C	A C C C A G A G G A A G		Kinektin2																											
		3160										3170										3180										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-							
3122	A A A A A C A A	T G - - - - - - - - -	- - - - - - - - -		Kinektin1																											
3148	A A A A A C A A	T G A C C T T C G G G	A G A A A A A A C T G G		Kinektin2																											

		3190		3200		3210	
	-	-	-	-	-	-	-
3132	-	-	-	-	-	-	-
3178	G	A	A	G	C	A	A
		3220		3230		3240	
	-	-	-	-	-	-	-
3132	-	-	-	-	-	-	-
3208	A	A	A	A	T	G	C
		3250		3260		3270	
	-	-	-	-	-	-	-
3132	-	-	-	-	-	-	-
3238	T	C	C	A	A	G	G
		3280		3290		3300	
	-	-	-	-	-	-	-
3155	G	T	T	G	A	G	T
3268	G	T	T	G	A	G	T
		3310		3320		3330	
	-	-	-	-	-	-	-
3185	A	A	A	T	T	A	T
3298	A	A	A	T	T	A	T
		3340		3350		3360	
	-	-	-	-	-	-	-
3215	A	A	T	T	T	G	A
3328	A	A	T	T	T	G	A
		3370		3380		3390	
	-	-	-	-	-	-	-
3245	T	T	T	G	A	A	A
3358	T	T	T	G	A	A	A
		3400		3410		3420	
	-	-	-	-	-	-	-
3275	G	G	A	A	C	T	T
3388	G	G	A	A	C	T	T
		3430		3440		3450	
	-	-	-	-	-	-	-
3305	C	T	A	G	A	G	C
3418	C	T	A	G	A	G	C
		3460		3470		3480	
	-	-	-	-	-	-	-
3335	A	T	G	C	A	C	A
3448	A	T	G	C	A	C	A
		3490		3500		3510	
	-	-	-	-	-	-	-
3365	A	A	A	T	A	C	A
3478	A	A	A	T	A	C	A
		3520		3530		3540	
	-	-	-	-	-	-	-
3395	G	G	A	A	T	T	T
3508	G	G	A	A	T	T	T
		3550		3560		3570	
	-	-	-	-	-	-	-
3425	G	A	G	C	A	A	G
3538	G	A	G	C	A	A	G
		3580		3590		3600	
	-	-	-	-	-	-	-
3455	G	T	C	G	A	T	G
3568	G	T	C	G	A	T	G
		3610		3620		3630	
	-	-	-	-	-	-	-
3485	A	T	G	C	A	G	T
3598	A	T	G	C	A	G	T
		3640		3650		3660	
	-	-	-	-	-	-	-
3515	G	A	G	C	T	A	G
3628	G	A	G	C	T	A	G

[illegible]

[illegible]

Lebenslauf

von
Erika Ulbrich, geb. am 28.01.1977 in München

Familie:

Vater: o. Prof.Dr.-Ing.Dr.-Ing.habil. Heinz Ulbrich, Ordinarius TU München
Mutter: Roswitha Ulbrich, Betriebswirt VWA
Geschwister: Dipl.-Inf. Alexander Ulbrich, geb. am 28.12.1979 in München

Schul Ausbildung:

1983-87 Grundschole (Ostpreußenschule) in München
1987-94 Luitpold-Gymnasium in München (bis zur 11.Klasse)
1994-96 Geschwister-Scholl-Gymnasium in Velbert
1996-2002 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Auslandsaufenthalte mit Schulbesuch:

1985 Elementary School, Southampton, England (3 Monate)
1989 North Olmsted Middle School, Vorort von Cleveland, Ohio, USA (8 Monate)
1995 North Olmsted High School, Vorort von Cleveland, Ohio, USA (1 Monat)

Famulaturen:

09/1998 CT-Famulatur in der Radiologie der HHU Düsseldorf, bei Prof. Mödder
03/1999 Pathologie der HHU Düsseldorf, bei Prof. Gabbert
03/2000 Sono-Famulatur in der Inneren des St.Josef-Krankenhauses in Haan, bei PD Dr. Cüppers
08/2000 Unfallchirurgie des Krankenhauses Neuwerk in Mönchengladbach, bei Prof. Raunest
09/2000 Fachklinik für Orthopädie und Sportmedizin, Medicalpark-Chiemsee in Prien, bei Prof. Krahle
09/2000 Gynäkologie im Rechts der Isar, TU München, bei Prof. Graeff
03/2001 Allgemeinmedizinpraktikum in einer Praxis in Bozen, Südtirol
04/2001 FKDS-Famulatur in verschiedenen Abt. der Univ. Düs.

Tutoren- und Klinikttätigkeiten an der Universität Düsseldorf:

als Vorpräparantin, Sono-, CT- und FKDS-Tutorin bei Dr. Hofer im Medizindidaktischen Pilotprojekt
als Aushilfskraft auf der Intensivstation von der Inneren und der Chirurgie

Praktisches Jahr:

1.Tertial (10/2001 - 02/2002) Diagn. Radiologie, HHU Düsseldorf, bei Prof. Mödder
2.Tertial (02/2002 - 05/2002) Innere, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, Frankreich
2 Monate Allgemeine Innere, bei Prof. Patri
2 Monate Kardiologische Intensivstation, bei Prof. Desnos
3.Tertial (06/2002 - 08/2002) Chirurgie, Kantonspital St. Gallen, Schweiz, bei Prof. Lange

Assistenzarztstelle:

seit 03/2003 Diagn. Radiologie, Inselspital Bern, Schweiz, bei Prof. Vock
03/2005 1. Teilfacharztprüfung Radiologie (Schweiz)

Zusammenfassung (Abstract)

Das Proto-Onkogen Tiam1 (= "T-Lymphoma invasion and metastasis") ist ein GEF-Protein, welches spezifisch die kleine Rho-ähnliche GTP-ase Rac aktiviert und hierüber zu einer signifikanten Hemmung der Tumordinvasion und Zellmigration sowie zu einer gesteigerten Zell-Zell- und Zell-Substratadhäsion führt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Screens einer Nieren-cDNA-Bank nach neuen Bindungspartnern von Tiam1 gesucht. Auf diese Weise wurden mehrere Proteine (26 bekannte und 8 unbekannte Sequenzen) gefunden, die in Hefezellen eine spezifische Protein-Protein-Interaktion mit Tiam1 zeigten. Vier dieser Gene erwiesen sich auch aufgrund ihrer bisher bekannten funktionellen Eigenschaften als besonders interessante Kandidaten für eine Interaktion mit Tiam1: Vinexin- β , Galektin1, Kinektin und das sogenannte Differenzierungs-assoziierte Protein 13. Die Spezifität der Interaktion im Yeast-Two-Hybrid wurde dadurch bestätigt, dass verschiedene Abschnitte von Tiam1 (N853-Tiam1, PHn-CC-Ex-Tiam1 und C580-Tiam1) in den Hefektor pACT2 kloniert und auf Interaktion mit den in den Hefektor pAS2-1 einklonierten Nieren-cDNA-Bank-Genen getestet wurden. Die Bindungspartner interagierten dabei nur mit N853-Tiam1 und PHn-CC-Ex-Tiam1, nicht aber mit C580-Tiam1 oder dem leeren Vektor. N853-Tiam1 enthält die N-terminalen 853 Aminosäuren und somit auch die für die Membranlokalisation von Tiam1 und das Tiam1-induzierte "membrane ruffling" verantwortliche PHn-CC-Ex-Region.

Für zwei der im Yeast-Two-Hybrid-System spezifisch mit Tiam1 interagierenden Proteinen (Vinexin- β und Galektin1) konnte die Spezifität der Bindung auch auf biochemischer Ebene mittels Co-Immunpräzipitation in Säugerzellen verifiziert werden. So konnten sowohl Vinexin- β als auch Galektin1 nur mit C1199-Tiam1 (das die PHn-CC-Ex-Domäne enthält), nicht aber mit C580-Tiam1 (das die PHn-CC-Ex-Domäne nicht enthält) oder dem leeren Vektor kopräzipitiert werden.

Die vorliegende Arbeit legt somit den Grundbaustein für weitere Untersuchungen, in denen

- 1) auch für Kinektin und das Differenzierungs-assoziierte Protein 13 die Spezifität der Interaktion mit Tiam1 auf biochemischer Ebene verifiziert werden sollte,
- 2) die exakten Bindungsstellen in Tiam1 und den jeweiligen Bindungspartnern identifiziert werden sollten und
- 3) die funktionelle Relevanz der jeweiligen Bindungen analysiert werden sollte.