

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Etablierung eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems zur
Suche nach zytoplasmatischen Interaktionspartnern der α -Protocadherine**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Alexandra Goischke
aus Rheinberg

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. R. Geßner
2. Prof. Dr. K. Sperling
3. Prof. Dr. med. Th. Arendt

Datum der Promotion: 14. Juni 2009

Meinen Eltern

I Inhaltsverzeichnis

II	Abkürzungsverzeichnis.....	V
1	Einleitung	1
1.1	Zelladhäsion.....	1
1.2	Zelladhäsionsmoleküle.....	1
1.2.1	Selektine	2
1.2.2	Integrine	2
1.2.3	Die Immunglobulin-Superfamilie	3
1.2.4	Cadherine	3
1.3	Die Cadherin-Superfamilie.....	5
1.3.1	Klassische Cadherine	5
1.3.2	Desmosomale Cadherine	6
1.3.3	7D-Cadherine	7
1.4	Protocadherine	7
1.4.1	Organisation und Transkription der geclusterten Protocadherin-Gene	8
1.4.2	Expression und Funktion der geclusterten Protocadherine.....	10
1.5	Die Rolle der Fyn-Tyrosinkinase	11
1.6	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	12
1.7	Zielsetzung	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Reagenzien	17
2.1.2	Reaktionskits und fertige Lösungen	19
2.1.3	Puffer.....	20
2.1.4	Medien.....	20
2.1.5	Oligonukleotide.....	22
2.1.6	Antikörper	25
2.1.7	Bakterienstämme	25
2.1.8	Hefestämme.....	26
2.1.9	Enzyme.....	26
2.1.10	Molekulargewichtsstandards	27
2.1.11	Plasmidvektoren	27
2.1.12	Geräte	28
2.1.13	Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	29

2.2	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.1	Methoden zur Arbeit mit RNA.....	30
2.2.2	DNA-Amplifikation und -Modifikation	32
2.2.3	DNA-Analyse.....	38
2.2.4	DNA-Präparation und Aufreinigung	41
2.2.5	Herstellung kompetenter Bakterienzellen und Transformation.....	43
2.3	Proteinchemische Methoden	46
2.3.1	Herstellung von Protein-Lysaten aus Hefezellen	46
2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	46
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	47
2.3.4	Western Blot.....	48
2.4	Methoden zur Arbeit mit Hefezellen im Hefe-Zwei-Hybrid-System	50
2.4.1	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
2.4.2	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	50
2.4.3	Transformation von Hefezellen.....	51
2.4.4	Konstruktion einer murinen cDNA-Hirn-Bank	52
2.4.5	Kreuzung haploider Hefestämme (Mating).....	54
2.4.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen.....	56
2.4.7	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA aus Hefezellen	57
2.4.8	Rescreen	57
2.4.9	Sequenzanalyse der positiven Klone	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Klonierung von mPcdh α-cDNA	59
3.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Maushirn	59
3.1.2	mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA.....	60
3.1.3	cDNA-Synthese aus mRNA mittels Reverser Transkriptase	60
3.1.4	Klonierung der mPcdh α	61
3.2	Herstellung der <i>Bait</i>-Konstrukte CPv, CPc und CPvc für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen	63
3.2.1	Etablierung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.....	63
3.2.2	Subklonierung der mPcdh α 7-CP-Fragmente in den GAL4-BD-Vektor (pGBKT7)	65
3.3	Vorversuche (Überprüfung der Hefestämme und der Fusionskonstrukte)	70
3.3.1	Expression der Fusionsproteine in Hefe	70
3.3.2	Überprüfung der Hefestämme und Etablierung einer Positiv- und Negativkontrolle.....	71
3.3.3	Kontrolle der drei Pcdh-CP-Bait-Konstrukte auf direkte Transkriptionsaktivierung	74
3.3.4	Ausschluss einer Dimerisierung der zytoplasmatischen Domäne des Pcdh α 7	75
3.3.5	Test auf Toxizität der DNA-BD-Konstrukte	79
3.4	Herstellung eines Fyn-Prey-Vektors als Positivkontrolle.....	79
3.4.1	Klonierung der Fyn-Tyrosinkinase.....	79

3.4.2	Western Blot.....	81
3.4.3	Test auf Toxizität	81
3.5	Konstruktion einer murinen cDNA-Bank im pGADT7-Prey-Expressionsvektor	82
3.6	Hefe-Zwei-Hybrid-Screen	87
3.6.1	Mating	87
3.6.2	Initialer Screen auf Interaktionen der cDNA-Bank mit den beiden <i>Baits</i> CPv und CPvc	88
3.6.3	Eingrenzung der positiven Klone des initialen Screens durch Hinzunahme eines weiteren Selektionsmarkers (<i>MEL1</i>).....	89
3.6.4	Isolierung der <i>Prey</i> -DNA	91
3.6.5	Datenbankanalyse mittels BLAST	91
3.6.6	Verifizierung der Interaktionen durch einen Rescreen	94
3.6.7	mPcdh α 7-cyt interagiert mit einer unbekanntem Sequenz	96
4	Diskussion.....	97
4.1	Klonierung der murinen Protocadherine des α -Clusters	98
4.2	Konstruktion der Hefe-Zwei-Hybrid- <i>Bait</i> -Vektoren	99
4.3	Überprüfung der Hefe-Zwei-Hybrid- <i>Bait</i> -Konstrukte	100
4.4	Ausschluss einer homotypischen Dimerisierung der zytoplasmatischen Domäne von Pcdh α 7 102	
4.5	Fyn-Tyrosinkinase als bekannter Interaktionspartner.....	102
4.6	Herstellung und Validierung einer cDNA-Bank im Hefe-Zwei-Hybrid- <i>Prey</i> -Vektor.....	103
4.7	Hefe-Zwei-Hybrid-Screen der cDNA-Bank mit den beiden <i>Bait</i> -Vektoren	105
4.8	Eingrenzung der gefundenen Klone durch Hinzunahme eines dritten Reporters	106
4.9	Identifizierung der positiven Klone mittels Sequenzierung.....	107
4.10	Rescreen der identifizierten cDNA-Klone.....	108
4.11	Bewertung der Resultate des Hefe-2-Hybrid-Screens.....	109
4.12	Zusammenfassung und Ausblick	110
4.13	Summary.....	113
5	Literaturverzeichnis	115
6	Anhang.....	127
6.1	Abbildungsverzeichnis	127
6.2	Tabellenverzeichnis.....	128
6.3	Danksagung	129

6.4	Erklärung an Eides Statt	130
------------	---------------------------------------	------------

II. Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
α -Gal	Alpha-Galactosidase
α -Pcdh	Protocadherin(e) des α -Clusters
A	Adenin
$A_{260/280/600}$	Absorption bei Wellenlänge 260/280/600 nm
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne von GAL4
<i>ADE</i>	Adeningen (Hefe)
<i>AMP</i>	Ampicillin-Gen
amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
β -Gal	Beta-Galactosidase
BD	Bindungsdomäne (von GAL4)
β -Pcdh	Protocadherin(e) des β -Klusters
BCA	Bicinchoninsäure
°C	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calcium
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA („copy DNA“)
cfu	Koloniebildende Einheit („Colony forming units“)
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm („calf intestine phosphatase“)
CNR	Cadherin-related-Neuronal-Receptor (α -Protocadherine)
CPv	Variabler Bereich der zytoplasmatischen Domäne von mPcdh $\alpha 7$
CPc	Constanter Bereich der zytoplasmatischen Domäne von mPcdh $\alpha 7$
CPvc	Gesamter Bereich der zytoplasmatischen Domäne von mPcdh $\alpha 7$

DNA-BD	DNA-Bindungsdomäne (von GAL4)
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("deoxyribonucleic acid")
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DSCAM	Down Syndrome Cellular Adhesion Molecule
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	extrazelluläre Cadherin-Domäne
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Farad
γ	Gamma
γ-Pcdh	Protocadherin(e) des γ-Klusters
GAL4	Galactosidase-induzierter Transkriptionsfaktor
h	Stunde(n)
H	Histidin
<i>HIS</i>	Histidingen
HRP	Meerrettich-Peroxidase ("horseradish peroxidase")
Ig	Immunglobulin
ICAM	Inter-Cellular-Adhesion-Molecules-Subfamilie
Ig-CAM	Ig-Cell-Adhesion-Molecules
kDa	Kilodalton
L	Leucin
LD-PCR	Long-Distance- Polymerasekettenreaktion
<i>LEU</i>	Leucingen (Hefe)
M	Molar (mol/l)

mA	Milliamper
MES	2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure-Monohydrat
ml	Milliliter
min	Minute(n)
mPcdh	Murine Protocadherine
NCAM	Neural-Cell-Adhesion-Molecule
Ni ²⁺	Nickel
Ω	Ohm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate-buffered saline“)
Pcdh	Protocadherin(e)
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde(n)
SD-Medium	Synthetic Dropout Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Tryptophan
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung („tris-buffered saline“)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>TRP</i>	Tryptophangen (Hefe)

Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Einheiten („units“)
UAS	Upstream activating sequences
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
YPD	Hefe-Vollmedium (Yeast-Extrakt, Peptone, Dextrose)
YPD(A)	Hefe-Vollmedium (Yeast-Extrakt, Peptone, Dextrose) + Adenin-Hemisulfat
x g	x-fache Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Zelladhäsion

Die Zelladhäsion wird definiert als eine spezifische Interaktion zwischen einzelnen Zellen bzw. einer Zelle und der sie umgebenden extrazellulären Matrix (ECM) und ist ein fundamentaler Prozess bei multizellulären Organismen. Dieser Prozess ist Voraussetzung für die Entstehung und Aufrechterhaltung komplexer Strukturen, sei es die Entwicklung von Einzellern zu Vielzellern im Laufe der Evolution oder die Ausbildung von Geweben und Organen während der Embryonalentwicklung (Übersicht in Nelson 1992, Gumbiner 1993). Im adulten Organismus ist die Zelladhäsion verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Integrität, Polarität und Zellarchitektur. Störungen in diesem System finden ihren Ausdruck in fehlerhaften Anlagen von Geweben oder aber auch in Entdifferenzierungsvorgängen, zum Beispiel in der Entstehung malignen Wachstums oder bei Metastasierungsvorgängen (Birchmeier & Behrens 1994; Christofori & Semb 1999). Vermittelt wird die Zelladhäsion durch eine Vielzahl membranständiger Proteine, den sogenannten Zelladhäsionsmolekülen (Übersicht in Chothia & Jones 1997).

Lange Zeit wurde der Begriff der Zelladhäsion beschränkt auf das simple Zusammenheften benachbarter Zellen. Heute ist jedoch bekannt, dass die Zelladhäsionsmoleküle für viele weitere physiologische und pathologische Prozesse von zentraler Bedeutung sind. Man kann sie als dynamische Einheiten betrachten, die Signale aus der äußeren Umgebung aufnehmen, verarbeiten und weiterleiten können (Ruoslahti & Obrink 1996).

Im Folgenden werden die verschiedenen Klassen der Zelladhäsionsmoleküle beschrieben, um die Vielfalt der durch sie beeinflussten Vorgänge zu verstehen.

1.2 Zelladhäsionsmoleküle

Bei den Zelladhäsionsrezeptoren handelt es sich um transmembranäre Glykoproteine, die sich in Ca^{2+} -abhängige und Ca^{2+} -unabhängige Moleküle einteilen lassen (Takeichi 1977). Des Weiteren stellt man die homotypische Interaktion zwischen Molekülen gleichen Typs der heterotypischen Interaktion zwischen unterschiedlichen Molekülen gegenüber (Edelman 1985).

Traditionell werden Zelladhäsionsmoleküle auf der Basis ihrer Primärstrukturen in vier Klassen eingeteilt (Hynes, 1999):

1. Selektine,
2. Integrine,
3. Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und
4. Cadherine.

Daneben gibt es zahllose weitere Moleküle, die ebenfalls die Zelladhäsion vermitteln.

1.2.1 Selektine

Selektine bilden die kleinste Familie der Zelladhäsionsmoleküle. Sie bestehen aus lediglich drei Mitgliedern (McEver 2002, Rosen & Bertozzi 1994):

1. dem Endothelial (E)-,
2. dem Platelet (P)- und
3. dem Lymphocyte (L)-Selectin.

Selektine sind lektinartige Rezeptoren, die Ca^{2+} -abhängig heterotypische Zell-Zell-Adhäsion durch Bindung an sialylierte Glykane vermitteln. Die durch Selektine vermittelte Zelladhäsion beruht daher als einzige nicht auf Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Eine entscheidende Rolle spielen die Selektine bei Entzündungsprozessen, da sie den initialen Kontakt von Leukozyten mit dem Endothel ermöglichen (Tedder et al. 1995; Vestweber & Blanks 1999).

1.2.2 Integrine

Integrine sind Heterodimere und bestehen aus zwei Untereinheiten, der α - und der β -Kette, die nicht-kovalent miteinander verknüpft sind (Übersicht in Hynes 2002). Die beiden Ketten bilden nach ihrer Synthese im endoplasmatischen Retikulum eine stabile Einheit. Durch die Kombination von verschiedenen α - und β -Untereinheiten werden unterschiedliche Integrine erzeugt, die eine Vielfalt an spezifischen Ca^{2+} -abhängigen Interaktionen ermöglichen. In Vertebraten spielen Integrine u.a. eine Rolle bei der Wanderung von Nervenzellen und bei der Synaptogenese (Emsley & Hagg 2003).

1.2.3 Die Immunglobulin-Superfamilie

Zur Immunglobulin(Ig)-Superfamilie gehören die Ig-Cell-Adhesion-Molecules (IgCAM). Sie besitzen eine oder mehrere Immunglobulin-Domänen und zusätzlich oft noch eine oder mehrere Fibronectin-III-Domänen (Walsh & Doherty 1997). Die IgCAM können Ca^{2+} -unabhängig sowohl homotypische als auch heterotypische Interaktionen vermitteln.

Das sogenannte Neural-Cell-Adhesion-Molecule (NCAM), das an der neuronalen Differenzierung beteiligt ist, zeigt beispielsweise ein homotypisches Bindungsverhalten, während Vertreter der Inter-Cellular-Adhesion-Molecules-Subfamilie (ICAM), wie sie bei den Adhäsionsrezeptoren im Immunsystem vorkommen, eine heterotypische Interaktion mit Integrinen auf der Oberfläche von Leukozyten eingehen (Aplin et al. 1998).

Abgesehen von einer Beteiligung bei der Immunantwort spielen die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Cunningham 1995).

1.2.4 Cadherine

Cadherine („calcium-dependent-adherent-proteins“) sind Ca^{2+} -abhängige Zelladhäsionsmoleküle, die in verschiedenen Formen in nahezu allen tierischen Mehrzellern zu finden sind und im Allgemeinen eine homotypische Interaktion vermitteln. Bislang sind mehrere hundert Cadherin-Sequenzen in Vertebraten bekannt, von denen alleine beim Menschen über 80 vorkommen (Tepass et al. 2000).

Im extrazellulären Teil dieser Proteine befinden sich charakteristische wiederholende Domänen, sogenannte Cadherin-Domänen oder Cadherin-Repeats. Diese hintereinander angeordneten Cadherin-Domänen bestehen jeweils aus ungefähr 110 Aminosäuren und sind hoch konserviert. Sie weisen große strukturelle Ähnlichkeit mit der Immunglobulin-Domäne auf und sind aus einem zylindrisch rückgefalteten β -Faltblattes („ β -barrel“) aufgebaut, das aus sieben antiparallelen Einzelsträngen besteht. Die Ca^{2+} -Bindungsstellen liegen zwischen den einzelnen Cadherin-Domänen und zeichnen sich durch die konservierten Sequenzmotive LDRE, DXNDN und DXD aus. Diese Aminosäuren bilden am Übergang von zwei Cadherin-Domänen eine Art Tasche, in der Ca^{2+} -Ionen über die sauren Seitengruppen von Glutamin- und Asparaginsäure stabilisiert werden (Nagar et al. 1996). Die Konformation der einzelnen Cadherin-Domänen scheint maßgeblich von der Calciumkonzentration abzuhängen, da sie unter Ca^{2+} -Entzug eine ungeordnete Struktur aufweisen (Pokutta et al. 1994). Erst in

Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen wird das Protein stabilisiert und zeigt eine starre, perlschnurartige Anordnung der einzelnen Cadherin-Domänen (Pertz et al. 1999).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der Cadherine ist die Transmembran-Domäne. Eine Ausnahme stellt das Truncated (T)-Cadherin dar, welches über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden ist (Ranscht & Dours-Zimmermann 1991).

An die Transmembran-Domäne schließt sich der zytoplasmatische Teil an, der zwischen den einzelnen Cadherin-Familien stark variiert. Anhand dieses zytoplasmatischen Anteils sowie an der Homologie und der Anzahl der Cadherinmotive werden die Cadherine in verschiedene Untergruppen (Abb. 1) aufgeteilt (Angst et al. 2001; Nollet et al. 2000), auf die ausführlicher im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

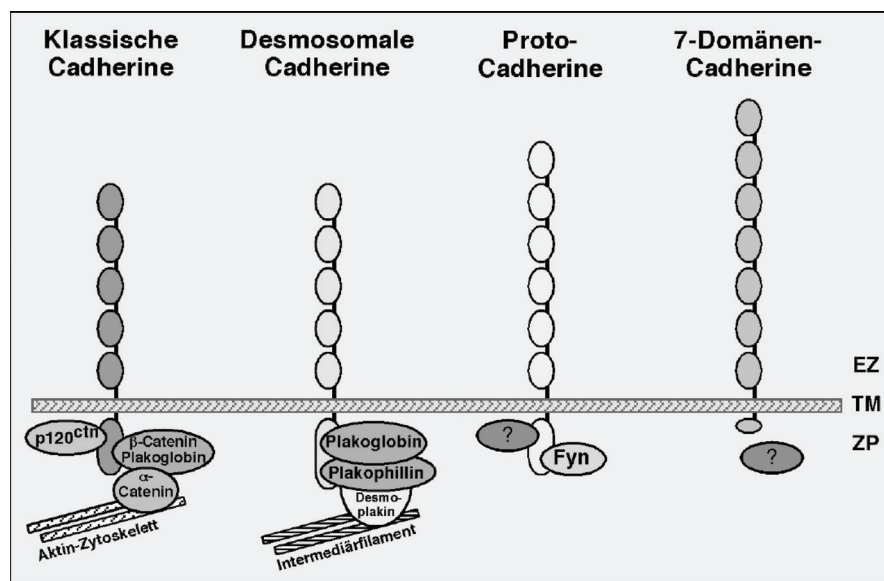


Abb. 1: Die Cadherin-Superfamilie (modifiziert nach Geßner & Tauber 2000).

Struktur und intrazelluläre Interaktionspartner von Vertretern der verschiedenen Cadherin-Subfamilien. Klassische und desmosomale Cadherine sind über Armadillo-Proteine mit dem Zytoskelett verbunden. Für die Protocadherine ist bisher nur ein Bindungspartner (Fyn-Tyrosinkinase) beschrieben worden. Für die Vertreter der 7-Domänen-Cadherine (7D-Cadherine) wurden bislang keine zyttoplasmatischen Interaktionspartner gefunden. **EZ:** extrazellulär, **TM:** transmembranär und **CP:** zytoplasmatisch

1.3 Die Cadherin-Superfamilie

1.3.1 Klassische Cadherine

Die klassischen Cadherine bestehen aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne mit fünf strukturellen Cadherin-Motiven (EC1–5) von 110 Aminosäuren, einer transmembranären Region und einem hochkonservierten, ca. 150 Aminosäuren umfassenden zytoplasmatischen Segment.

Sie wurden ursprünglich als Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 120–140 kDa identifiziert und bekamen ihren Namen nach den Geweben, in denen sie zuerst detektiert wurden oder am stärksten exprimiert sind. So wurde E-Cadherin z.B. auf Epithelzellen, N-Cadherin im auf Nervenzellen, P-Cadherin in der Plazenta und R-Cadherin in der Retina gefunden (Geiger & Ayalon 1992). Die Expression der einzelnen Cadherine ist jedoch meist nicht auf diese Gewebe und Organe beschränkt, sondern sie können vorübergehend oder permanent auch in anderen Geweben und Organen exprimiert werden.

Auf genomischer Ebene zeigen die klassischen Cadherine untereinander starke Ähnlichkeiten. Charakteristisch ist, dass die kodierende Region auf meist 16 Exons verteilt ist und dass die Exons 2 und 3 durch ein sehr großes Intron (> 40 kb bei der Maus und > 60 kb beim Menschen) getrennt werden.

Viele Cadherine sind in Clustern organisiert. So liegen beispielsweise das E- und das P-Cadherin zusammen mit weiteren Cadherinen wie dem VE-, Ksp-, T- und M-Cadherin bei der Maus auf dem gleichen Abschnitt von Chromosom 8 (Huber et al. 1996c; Ringwald et al. 1991). Beim Menschen sind sie in gleicher Anordnung auf dem Chromosom 16q22.1 zu finden (Nollet et al. 2000).

Cadherinen wurde zunächst lediglich eine statische Rolle während der stabilen Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Adhäsion zugesprochen. Verschiedene Untersuchungen belegen jedoch, dass die extrazelluläre Domäne der klassischen Cadherine alleine nicht ausreicht, um diese Zell-Zell-Adhäsion zu vermitteln, sondern dass sie vielmehr auf die Verknüpfung mit dem Aktin-Zytoskelett angewiesen sind (Übersicht in Kemler 1993) und somit an dynamischen morphogenetischen Prozessen beteiligt sind.

Die Interaktion mit dem Zytoskelett erfolgt jedoch nicht direkt, sondern über eine Gruppe zytoplasmatischer Proteine, den sogenannten Cateninen (Nagafuchi & Takeichi 1988, Ozawa et al. 1989), die an den konservierten C-Terminus der klassischen Cadherine binden (Über-

sicht in Gumbiner 1993). Dieser Bereich im zytoplasmatischen Abschnitt wird demnach auch als Catenin-Bindungssequenz bezeichnet und ist neben der extrazellulären EC 1-Domäne am stärksten konserviert.

Beteiligung klassischer Cadherine an der Signaltransduktion

Mehrere in den letzten Jahren durchgeführte Studien zeigen, dass klassische Cadherine an komplexen Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind (Wheelock & Johnson 2003).

Die wohl bekannteste Rolle ist die Beteiligung von E-Cadherin an der Regulierung des Wnt-Signalwegs: die stark konservierte zytoplasmatische Domäne der N- und E-Cadherine beinhaltet ein Bindungsmotiv für die Armadillo-Proteine Plakoglobin (γ -Catenin) und β -Catenin (Kemler 1993). β -Catenin verbindet die Cadherine über α -Catenin mit Vinculin und anderen Proteinen des Zytoskeletts (Yagi & Takeichi 2000).

Die Bindung an β -Catenin stellt die funktionelle Verbindung zum Wnt-Signalweg her (Gumbiner 1993, 1995; Orsulic et al. 1999). Dieser Signalweg steuert viele morphogenetische Prozesse während der Embryonalentwicklung. Eine Deregulierung des Signalweges oder Mutationen in β -Catenin wurden in Tumoren von Brustdrüse, Darm, Leber und Prostata beschrieben (Cowin et al. 2005; Verras et al. 2006).

Ein weiteres Armadillo-Protein, das p120^{ctn}, bindet membrannah an die zytoplasmatische Domäne der klassischen Cadherine und reguliert deren Bindungsstärke über die Modulation der GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 (Anastasiadis & Reynolds 2001).

Einige Studien beschreiben auch den Zusammenhang zwischen Rezeptor-Tyrosinkinasen und Cadherinen, die sich gegenseitig beeinflussen können. So wurde gezeigt, dass N-Cadherin während des Wachstums von Neuriten eine Dimerisierung des Fibroblast-Growth-Factor (FGF)-Rezeptors induziert, und so dessen Signalkaskade aktiviert, auch ohne dass der Wachstumsfaktor FGF vorhanden ist (Doherty et al. 2000; Williams et al. 2001).

1.3.2 Desmosomale Cadherine

Desmosomale Cadherine sind am Aufbau von Desmosomen (Macula adhaerens) beteiligt. Sie lassen sich in zwei Gruppen, die Desmogleine und Desmocolline, einteilen, von denen wiederum jeweils drei Vertreter identifiziert werden konnten (Garrod et al. 2002).

Die extrazelluläre Domäne der desmosomalen Cadherine besteht wie bei den klassischen Cadherinen aus fünf Cadherin-Repeats. Auch im zytoplasmatischen Bereich lässt sich eine

partielle Homologie zu den klassischen Cadherinen feststellen (Übersicht in Koch et al. 1994).

Desmocolline und Desmogleine vermitteln als Bestandteile von Desmosomen die Verbindung benachbarter Zellen. Dies geschieht über ihre extrazellulären Abschnitte in der für Cadherine typischen Ca^{2+} -abhängigen Weise. Intrazellulär stehen sie über desmosomale Plaque-Proteine, die Armadillo-Proteine Plakoglobin sowie Plakophilin 1, 2 und 3, mit dem Intermediärfilament in Verbindung. Es wird dadurch sowohl eine inter- als auch intrazelluläre Ordnung und Stabilität gewährleistet (Marcozzi et al. 1998).

1.3.3 7D-Cadherine

Im Gegensatz zu den klassischen und den desmosomalen Cadherinen setzt sich die extrazelluläre Domäne der 7D-Cadherine aus sieben Cadherin-Repeats zusammen. Der zytoplasmatische Anteil ist kurz: Er umfasst nur ca. 25 Aminosäuren (Geßner & Tauber 2000). Die bislang einzigen Vertreter dieser Familie stellen das Liver-Intestine (LI)-Cadherin und das Kidney-specific (Ksp)-Cadherin dar (Berndorff et al. 1994; Thomson et al. 1995).

Die 7D-Cadherine wurden nach ihren Hauptexpressionsorten benannt. Das LI-Cadherin wird bei der Ratte in Leber und Darm exprimiert, ist jedoch bei Mensch und Maus vorwiegend im Darm nachzuweisen (Angres et al. 2001; Zitt 1997). Das Ksp-Cadherin wird vorwiegend in der Niere exprimiert (Thomson et al. 1995).

Für das LI-Cadherin konnte im Gegensatz zu klassischen und desmosomalen Cadherinen keine direkte Interaktion mit dem Zytosklett nachgewiesen werden. Es vermittelt jedoch trotzdem eine Zelladhäsion (Wendeler et al. 2004).

1.4 Protocadherine

Protocadherine stellen die größte Familie innerhalb der Cadherin Superfamilie dar (Nollet et al. 2000; Angst et al. 2001).

Durch den Einsatz degenerierter Primer für den extrazellulären Teil der bekannten Cadherine gelang es, die ersten Mitglieder dieser Untergruppe der Cadherin-Familie zu identifizieren (Sano et al. 1993). Da die dabei erhaltenen Sequenzen aufgrund ihrer Homologien für phylogenetisch früh auftretende, evolutionär konservierte Cadherin-Motive gehalten wurden, bezeichnete man sie nach dem griechischen Wort „Protos“ (= das Erste) als Protocadherine (Pcdh). Tatsächlich konnte aber bis heute weder in *Drosophila melanogaster* noch

Caenorhabditis elegans ein zu Vertebraten orthologes Protocadherin identifiziert werden, was für deren späteres evolutionäres Auftreten spricht.

Weitere Protocadherine wurden im Hefe-Zwei-Hybrid-System über ihre Bindung an die Tyrosinkinase Fyn isoliert und als Cadherin-related-Neuronal-Receptor (CNR) bezeichnet (Kohmura et al. 1998).

Mit einem Molekulargewicht von 150–170 kDa sind die Protocadherine somit unwesentlich größer als die klassischen Cadherine, enthalten aber in ihrem extrazellulären Bereich eine oder zwei zusätzliche Cadherin-Domänen. Allen Protocadherinen gemeinsam sind auch die in den EC-Domänen konservierten Aminosäuresequenzen DXDXGXN, AXDXGXPXL und VXVXVXSXNDNAPXF (Wu & Maniatis 1999). Des Weiteren besitzen die Protocadherine untypische zytoplasmatische Domänen, die keine Homologie zu denen der klassischen Cadherine aufweisen.

Mit der Entdeckung von 52 humanen Protocadherinen, die in drei Genclustern auf dem humanen Chromosom 5 (5q31) arrangiert sind, gewinnen die Protocadherine zunehmend an Bedeutung (Wu & Maniatis 1999). Im Genom der Maus liegen die Protocadherin-Cluster auf dem Chromosom 18 (Sugino et al. 2000). Die sequenziell angeordneten, kodierenden Sequenzen des Genclusters lassen sich nach ihrer Sequenzhomologie und Organisation in drei Klassen unterteilen: α -, β - und γ -Protocadherine.

Es bleibt anzumerken, dass es neben den geclusterten Protocadherinen zahlreiche nicht geclusterte gibt, die über das Genom verteilt sind und kürzlich in der neu definierten Gruppe der δ -Protocadherine zusammengefasst werden (Frank & Kemler 2002; Kim et al. 2007).

1.4.1 Organisation und Transkription der geclusterten Protocadherin-Gene

Ein herausragendes genomisches Merkmal der Protocadherin-Gene und ein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal zu den klassischen Cadherinen ist – neben der Anordnung in Genclustern – das Vorkommen großer singulärer, kodierender Exons und das weitgehende Fehlen herkömmlicher Exon-Intron-Strukturen. Dies könnte auf einen evolutionären Ursprung der Protocadherine durch reverse Transkription klassischer Cadherine mit anschließender Integration ins Genom hindeuten (Wu & Maniatis 1999; Sugino et al. 2004).

In jeder Klasse werden die gesamte extrazelluläre Domäne, die Transmembranregion und ein kurzer zytoplasmatischer Anteil von jeweils einem einzigen 2,4 kb-Exon kodiert, welches in einem als „variable Region“ (VR) bezeichneten, genomischen Bereich liegt (Abb. 2). Im Falle

der α - und γ -Protocadherine ist der C-terminale Teil der zytoplasmatischen Domäne innerhalb eines Clusters identisch. Er wird durch 3 Exons kodiert, die hinter den 14 Einzelgenen des α -Clusters bzw. den 22 Einzelgenen des γ -Clusters liegen und die „konstante Region“ (CR) bilden. Die 14 Einzelgene der variablen Region des α -Clusters bzw. die 19 Einzelgene der variablen Region des γ -Clusters werden durch cis-Spleißen jeweils mit der gleichen konstanten Region auf RNA-Ebene zusammengebracht (Tasic et al. 2002; Sugino 2004). Die Expression der geclusterten Protocadherin-Gene wird durch eine konservierte 22 bp-Konsensus-Sequenz kontrolliert, die der jeweiligen variablen Region der α -Protocadherine und γ -Protocadherine vorgeschaltet ist (Tasic et al. 2002). Damit erinnert die genomische Organisation der Protocadherine deutlich an die der Immunglobulin- bzw. T-Zell-Rezeptor-Gencluster (Wu & Maniatis 1999; Sugino et al. 2000).

Es bleibt anzumerken, dass der Genlocus der β -Protocadherine keine Sequenzen für ein gemeinsames, konserviertes C-terminales Ende besitzt (Vanhalst et al. 2001).

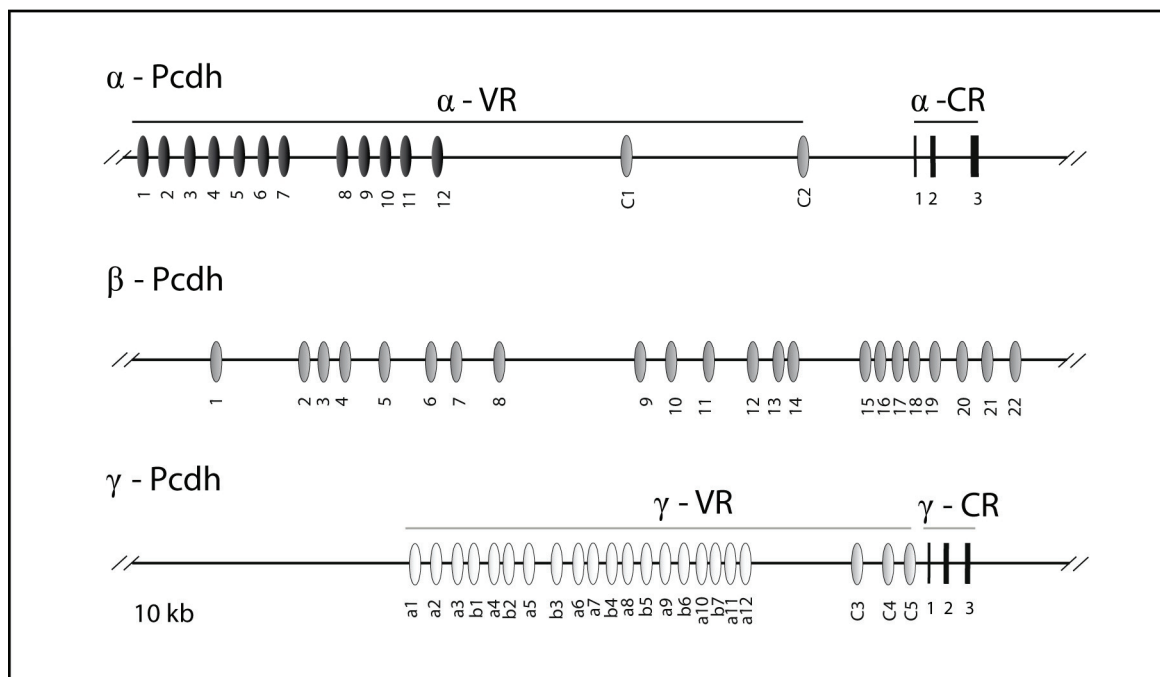


Abb. 2: Organisation des 900 kb umfassenden murinen Pcdh-Genclusters nach Wu & Maniatis (1999).

Die Exons der variablen Region sind durch Ovale, die Exons der konstanten Region durch vertikale Striche symbolisiert.

1.4.2 Expression und Funktion der geclusterten Protocadherine

Seit ihrer Entdeckung Anfang der 90er Jahre ist die Genfamilie der Protocadherine Gegenstand vielfältiger Expressions- und Funktionsanalysen. So wurde gezeigt, dass die meisten Protocadherine relativ stark im ZNS und deutlich schwächer in einer Vielzahl weiterer Gewebe exprimiert werden (Senzaki et al. 1999).

Die Annahme, dass Protocadherine eine Art adhäsiven Code für den Aufbau spezifischer Gehirnstrukturen vermitteln, wird gestützt durch die hohe Diversität und Expressionsprofile der geclusterten Protocadherine (Kohmura et al. 1998; Esumi et al. 2005).

Die geclusterten Protocadherine wurden bisher im Genom von Mensch (Sano et al. 1993; Wu & Maniatis 1999), Maus (Senzaki et al. 1999), Ratte (Yanase et al. 2004), Huhn (Sugino et al. 2004) und Zebrafisch (Noonan et al. 2004) nachgewiesen. In den Genomen von Invertebraten fehlen sie. Hier fällt ein anderes Zelladhäsionsmolekül, das Cell-Adhesion-Molecule (DSCAM) durch hohe Diversität auf. Bemerkenswerterweise wurde kürzlich herausgefunden, dass durch die Vielfalt von DSCAM jedem Neuron eine eindeutige Identität verliehen wird, dass es dazu fähig ist, zwischen eigenen und nicht eigenen Zellen zu unterscheiden (Hattori et al. 2007).

Dies unterstreicht die „Chemoaffinitätstheorie“ von Sperry (1963). Die genaue molekulare Basis der Chemoaffinität bei Vertebraten ist noch nicht geklärt. Es wird aber angenommen, dass den Zelladhäsionsmolekülen hierbei eine tragende Rolle zukommt (Übersicht in Scheiffele et al. 2003; Washbourne et al. 2004).

Auch das genaue Expressionsmuster der geclusterten Protocadherine ist noch nicht geklärt. Mittels RT-PCR und in-situ-Hybridisierung wurde versucht, Aussagen über die Expression zu treffen. Die Protocadherine des α - und γ -Clusters werden gleichermaßen im Neocortex, im Bulbus olfactorius, im Hippocampus und im Cerebellum exprimiert (Kohmura et al. 1998, Blank et al. 2004). Im Thalamus, im Colliculus inferior und im Rückenmark scheinen die γ -Protocadherine ein stärkeres Expressionsmuster als die α -Protocadherine aufzuweisen (Wang et al. 2002; Kallenbach et al. 2003). Ebenfalls scheinen die α -Protocadherine postsynaptisch zu fehlen (Blank et al. 2004).

Auffällig ist außerdem, dass die geclusterten Protocadherine im Gegensatz zu den ungeclusterten eher nach einem unspezifischen Muster und nicht funktionell korreliert über das gesamte ZNS verstreut sind (Frank et al. 2005).

Bei der Untersuchung von Mäusehirnen in verschiedenen Entwicklungsstadien mittels Northern Blot wurden die α - und γ -Protocadherine ab dem 14. embryonalen Tag nachgewiesen. Das Expressionsmaximum liegt ca. am 10. postnatalen Tag, anschließend erfolgt eine leichte Herabregulierung (Hamada et al. 2001; Frank et al. 2005). Bisher existieren nur wenige funktionelle Informationen über die Protocadherin vermittelte Adhäsion.

Die durch die EC-Domänen der Protocadherine erzielten homophilen und heterophilen Adhäsionskräfte scheinen jedoch gering zu sein (Mutoh et al. 2004), weswegen es sich bei dieser Funktion offenbar nicht nur um eine Stärkung der physischen Verbindungen von Zellen zu handeln scheint. Durch die in den letzten Jahren gefundenen fakultativen Interaktionspartner der Protocadherine kann auf eine Beteiligung in der Signaltransduktion geschlossen werden (Senzaki et al. 1999; Gilmore & Herrup 2000, Rice & Curran 2001).

1.5 Die Rolle der Fyn-Tyrosinkinase

Bei der Suche nach molekularen Interaktionspartnern der Fyn-Tyrosinkinase im Mäusehirn entdeckten Kohmura und Kollegen (1998) Mitglieder des Protocadherin- α -Clusters. Dafür wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-Screen durchgeführt und als Köder (*Bait*) die SH3-SH2-Domäne (Non-catalytic-Domäne) der Fyn-Tyrosinkinase eingesetzt. Die Fyn-Tyrosinkinase bietet somit eine Positivkontrolle für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen dieser Untersuchung. Da der C-Terminus des zytosomatischen Anteils aller α -Protocadherine identisch ist, müssten theoretisch alle α -Protocadherine mit Fyn interagieren.

Bei den Tyrosinkinasen handelt es sich um eine Klasse von Enzymen, die die Übertragung des endständigen Phosphats von ATP auf die Hydroxylgruppe der Aminosäure Tyrosin katalysieren. Somit kommt ihnen eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion zu.

Die Tyrosinkinasen werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt: in Rezeptor-Tyrosinkinasen und in Non-Rezeptor-oder auch zytosolische Tyrosinkinasen.

Die Rezeptor-Tyrosinkinasen weisen einen extrazellulären Teil, einen Transmembranteil und einen intrazellulären Teil auf, während die zytosolischen Tyrosinkinasen ausschließlich intrazellulär vorliegen.

Die Fyn-Tyrosinkinase ist eine Non-Rezeptor-Tyrosinkinase und gehört zur Familie der Src-Protein-Tyrosinkinasen. Hierzu gehören neun Proteine mit ausgeprägter struktureller Homologie. Besonders hervorzuheben sind die SH2- und SH3-Domäne, die in allen Kinasen der Src-Familie konserviert sind (Brown & Cooper 1996). Es sind Aminosäuremotive mit

hoher Affinität für Phosphotyrosin (SH2-Domäne) oder für prolinreiche Sequenzen (SH3-Domäne). Die meisten Kinasen der Src-Familie werden ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, wo sie oft redundant sind (Smith et al. 2001).

Yes, Lyn, Fyn und Src sind andererseits ubiquitär exprimiert (Thomas et al. 1995). Zu finden sind sie hauptsächlich im Zytosol, im Kern und an der Innenseite der Plasmamembran

Die biologischen Funktionen der Fyn-Tyrosinkinase sind vielfältig, da sie mit einer großen Anzahl von Signalmolekülen interagieren. So spielen sie z. B. eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Differenzierung und -Aktivierung (Zamoyska et al. 2003) und bei der Mitose (Roche et al. 1995).

Eine bedeutende Funktion scheint die Fyn-Tyrosinkinase auch für den Aufbau von Gehirnstrukturen in der frühen neuronalen Entwicklung zu besitzen. Hier wird ein Einfluss auf die Induktion des Axonwachstums angenommen (Bixby & Jhabvala 1993).

Eine Inaktivierung des Fyn-Gens führt im Mausmodell zu Defekten in der Myelinisierung (Osterhout et al. 1999) sowie zu starken Verhaltensauffälligkeiten mit Orientierungslosigkeit (Grant et al. 1992) und Störungen bei Lernprozessen sowie des Erinnerungsvermögens (Kojima et al. 1997).

1.6 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System stellt gegenwärtig eine der leistungsfähigsten Methoden dar, um in lebenden Zellen nach Interaktionspartnern für ein bestimmtes Protein zu suchen (Fields & Song 1989; Chien et al. 1991; Fields & Sternglanz, 1994). Diese Technik führte bereits zur Identifizierung ganzer Netzwerke von Proteinen, die wichtige zelluläre Funktionen steuern.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über diese Methode und ihre Anwendungsmöglichkeiten gegeben werden.

Das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

In Hefen kontrollieren zwei regulatorische Proteine, GAL4 und GAL80, die Transkription der für den Galaktose-Stoffwechsel benötigten Gene. GAL4 aktiviert dabei die Transkription dieser Gene, GAL80 hemmt sie (Guthrie & Fink 1991).

Die Grundlage des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems besteht aus der Beobachtung, dass der GAL4-Transkriptionsfaktor – wie viele andere eukaryontische Transkriptionsfaktoren – aus zwei funktionell unabhängigen, physikalisch trennbaren Domänen besteht: einer DNA-

Bindungsdomäne (DNA-BD) und einer transkriptionsaktivierenden Domäne (AD) (Sadowski et al. 1988). Diese beiden Domänen lassen sich voneinander trennen, ohne dass sie ihre Funktion verlieren. Die beiden physikalisch getrennten Domänen sind für sich alleine nicht in der Lage, die Transkription von Genen einzuleiten (Ma & Ptashne 1987; Brent & Ptashne 1985). Werden jedoch die beiden Domänen auf andere Weise miteinander verbunden (und so in räumliche Nähe gebracht), so erwerben sie die gleichen transkriptionsaktivierenden Eigenschaften wie das Ursprungsprotein.

Von dieser Modularität von Transkriptionsfaktoren gingen Fields und Song (1989) bei der Entwicklung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems aus und zeigten erstmals, dass die Transkription eines Hefe-Reportergens dazu verwendet werden kann, die Interaktion zwischen zwei Proteinen zu demonstrieren.

Dazu wird ein Interaktionspartner mit der DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und der andere Bindungspartner mit der Aktivierungsdomäne (AD) eines Transkriptionsfaktors (meist GAL4) fusioniert (Fields & Song 1989). Die DNA-bindende Domäne erkennt eine spezifische Sequenz, die stromaufwärts vor der für die basale Transkription verantwortlichen TATA-Box liegt und als „Upstream-activating-Sequence“ (UAS) bezeichnet wird. Diese Sequenz enthält mehrere konservierte, palindromische Sequenzen, an die die transaktivierende DNA-BD-Domäne von GAL4 spezifisch binden kann. Die Aktivierungsdomäne interagiert mit Komponenten des RNA-Polymerase-II-Komplexes und initiiert dadurch die Transkription eines Reportergens.

Die gängigen Systeme beinhalten drei Komponenten:

1. Einen Vektor, der die Expression eines Proteins vermittelt, für das Interaktionspartner identifiziert werden sollen. Dieses Protein wird als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsfaktors (meist GAL4 oder LexA) in Hefezellen exprimiert und als Köder (*Bait*) bezeichnet.
2. Einen Vektor, der die Expression einer cDNA-Bank vermittelt. Die durch die cDNA-Bank kodierten Proteine sind an eine Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors (meist GAL4 oder LexA) fusioniert und werden als Beute (*Prey*) bezeichnet.
3. Ein oder mehrere Reportergene, welche die spezifische DNA-Bindungsstelle (Upstream activating Sequence [UAS]) enthalten, die von der DNA-BD erkannt wird. In der Regel kodieren diese Reportergene für Enzyme, die an der Biosynthese von Aminosäuren beteiligt sind (z.B. *HIS3*), sodass eine Selektion auf Mangelmedien ohne Histidin erfolgen

kann. Eine Detektion positiver Klone wird auch durch zwei typische Reportergene, *LacZ* (kodiert für eine β -Galaktosidase) und *MEL1* (kodiert für eine α -Galaktosidase), ermöglicht. Die beiden Reportergene sind in der Lage, X- β -Gal bzw. X- α -Gal durch Hydrolyse in einen blauen Farbstoff umzuwandeln.

Das *Bait*-Fusionsprotein und die *Prey*-Fusionsproteine werden in entsprechenden Hefestämmen auf Interaktion untersucht. Um zu gewährleisten, dass ein Hefeklon tatsächlich beide Plasmide aufgenommen hat, besitzen die beiden Vektoren unterschiedliche Selektionsmarker (Vektoren mit der DNA-Bindungsdomäne meist ein Enzym zur Tryptophan-Synthese [*TRP1*], Vektoren mit der Aktivierungsdomäne meist ein Enzym zur Leucin-Synthese [*LEU2*]). Die verwendeten Hefestämme sind durch Deletion von *TRP1* und *LEU2* auxotroph für Tryptophan und Leucin. Nach Transformation mit dem Köder- oder Beutevektor kann daher durch Ausplattieren auf Mangelmedium, das kein Tryptophan bzw. Leucin erhält, auf Transformanten selektiert werden.

Interagieren die beiden Fusionsproteine miteinander, so gelangt die GAL4-AD in räumliche Nähe der GAL4-DNA-BD und es entsteht ein rekonstituierter und somit funktionsfähiger GAL4-Transkriptionsfaktor. Die genannten Reportergene können dann transkribiert werden. Um eine Aktivierung der Transkription durch endogenes GAL4 zu unterbinden, sind die Gene *GAL4* und *GAL80* in dem verwendeten Hefestamm deletiert.

Der Vorteil des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems ist, dass zwar Protein-Protein-Interaktionen detektiert, aber anschließend die cDNA und nicht die Proteine sequenziert werden. Der Aufbau des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems ist beispielhaft in Abb. 3 dargestellt.

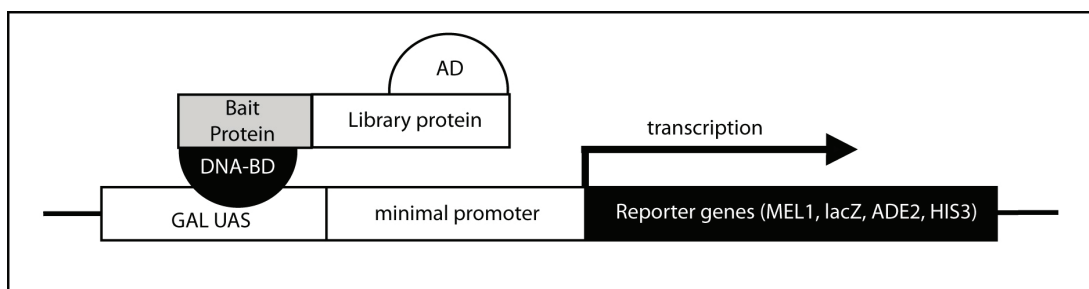


Abb. 3: Das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (modifiziert nach Clontech, Heidelberg).

Mittlerweile wurde das ursprüngliche Hefe-Zwei-Hybrid-System vielfach verändert und ergänzt und wird in vielen Bereichen der Molekularbiologie eingesetzt. Beispiele hierfür sind verwandte Methoden wie das One-Hybrid-System (Wilson et al. 1991), das die Analyse von Protein-DNA-Interaktionen ermöglicht, und das Three-Hybrid-System (SenGupta et al. 1996) zur Untersuchung von Protein-RNA-Interaktionen.

1.7 Zielsetzung

Betrachtet man Adhäsionsmoleküle genauer, lässt sich feststellen, dass diese nicht nur statische Haltemoleküle darstellen, sondern vielmehr als dynamische Systembestandteile für die zelluläre Organisation und Kommunikation anzusehen sind. Derartige Funktionen erfordern die Weiterleitung von extrazellulären Signalen in das Zellinnere und sind daher häufig auf die Existenz zytoplasmatischer Interaktionspartner angewiesen. Dennoch sind bisher nur wenige intrazelluläre Bindungspartner von Zelladhäsionsmolekülen entdeckt worden.

Protocadherine sind die größte Familie innerhalb der Cadherin-Superfamilie Ca^{2+} -abhängiger Adhäsionsmoleküle. Aufgrund ihrer im Vergleich zu klassischen Cadherinen deutlich abweichenden Struktur wird erwartet, dass sich eine eventuell stattfindende Signaltransduktion erheblich von der der klassischen Cadherine unterscheidet. Hinweise darauf ergeben sich vor allem in der Betrachtung der zytoplasmatischen Domänen, die keinerlei Homologien zu denen der klassischen Cadherine aufweisen, aber gleichermaßen stark konserviert sind. Insbesondere besteht keine Ähnlichkeit zu der in der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin identifizierten β -Catenin-Bindungsstelle.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, potenzielle Bindungspartner analog zu den bekannten Signaltransduktionswegen des E-Cadherins zu identifizieren.

Eine Möglichkeit, nach unbekanntem Protein-Protein-Interaktionen zu suchen, besteht in der Durchmusterung von cDNA-Banken mit Hefe-Zwei-Hybrid-Systemen. Hierzu sollte in dieser Arbeit die intrazelluläre Domäne eines α -Protocadherins bei der Suche nach Bindungspartnern eingesetzt werden. Dazu wurden zunächst einzelne Vertreter der murinen Protocadherine des α -Clusters kloniert und anschließend spezifische *Bait*-Produkte der zytoplasmatischen Domäne von mPcdh $\alpha 7$ hergestellt. Für den Einsatz der *Preys* musste zudem eine geeignete cDNA-Bank aus Maushirn hergestellt werden.

Ein Signalprotein, das an den zytoplasmatischen Anteil der murinen Protocadherine des α -Clusters bindet, wurde bereits identifiziert (Fyn).

Es wird jedoch angenommen, dass in Anlehnung an die klassischen Cadherine eine Signalkaskade für die Vermittlung der spezifischen biologischen Funktion der α -Protocadherine verantwortlich ist. Diese Vermutung wird dadurch gestärkt, dass sich die Signaltransduktion von Zelladhäsionsrezeptoren gewöhnlich aus zwei relevanten Schritten zusammensetzt: der reversiblen Proteinphosphorylierung und der Interaktion mit zytoplasmatischen Signalproteinen (Hunter 2000). Wie bereits bekannt ist, wird die Phosphorylierung der α -Protocadherine von der Fyn-Tyrosinkinase übernommen (Kohmura et al., 1998). Es gilt nun, mithilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems zytoplasmatische Proteine als Bindungspartner zu identifizieren.

In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls die Fyn-Tyrosinkinase kloniert, mit deren Hilfe die Protocadherine entdeckt wurden und die sich somit als Positivkontrolle für das Hefe-Zwei-Hybrid-System eignet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Reagenzien	Bezugsquelle
Acrylamid, Rotiphorese [®] -GEL 30, 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (29:1) und (19:1) für ABI- Sequenziergeräte	Bio-Rad, München
Agarose, NA	Amersham Pharmacia, Freiburg
Agarose, ultra pure	GIBCO/BRL, Eggenstein
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma, München
ATP (Adenosin-5'-Triphosphat)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Bacto-Trypton	Dico, Detroit, USA
BCA-Protein Assay Reagent	Pierce, Weiskirchen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma, München
Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	Amersham Pharmacia Freiburg)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva, Heidelberg
ECL [™] Western blotting detection reagents	Amersham-Buchler, Braunschweig
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, München
Formaldehyd	Merck, Darmstadt

Reagenzien	Bezugsquelle
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Amersham Pharmacia, Freiburg
Hefeextrakt	GIBCO/BRL, Eggenstein
Kanamycin-Sulfat	GIBCO/BRL, Eggenstein
L-Lysin	Sigma, München
Magermilchpulver	Nestlé, Frankfurt/M.)
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MOPS (3-[N-Morpholino]Propansulfonsäure)	Sigma, München
Phenol, Tris-gepuffert auf pH 7.8	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Sigma, München
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC)	Roche, Mannheim
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Select-Agar	GIBCO/BRL, Eggenstein
Sephadex G-50	Sigma, Taufkirchen
Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethan)	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	Sigma, München
X- α -Gal	Clontech, Heidelberg

Alle weiteren handelsüblichen Laborchemikalien wurden von Sigma (München), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Reaktionskits und fertige Lösungen

Reaktionskits	Bezugsquelle
ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
BCA-Protein Assay Reagent	Pierce; über KFM Laborchemie, St. Augustin
ECL™ Western Blotting detection reagents	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAQuick Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAQuick PCR Purification/ Gel Extraction/Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
TA Cloning® Kit	Invitrogen, Leek, Holland
Topo TA Cloning® Kit	Invitrogen, Leek, Holland
MATCHMAKER Library Construction & Screening Kit	Clontech, Heidelberg

2.1.3 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Blotpuffer	25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 10 % (v/v) Methanol
Laemmli-Puffer	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 3 % (w/v) SDS; 5 % (w/v) 2-Mercaptoethanol; 10 % (w/v) Glycerin; 0,025 mg/ml Bromphenolblau
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O; pH 7,4
SDS-Laufpuffer	0,3 % (w/v) Trisbase; 1,44 % (w/v) Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
TAE	40 mM Tris/Essigsäure, pH 8,3; 1 mM EDTA
TBE	40 mM Tris/Essigsäure, pH 8,3; 1 mM EDTA
TBS-T	25 mM Tris/HCl, pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,05 % Tween 20
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA

2.1.4 Medien

Bakterienmedien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (w/v) Bactotrypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; pH 7,4
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar
SOB	2 % (w/v) Bactotrypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl

Dropout-Lösungen

Die 10 x-Dropout-Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

Aminosäuren/10x Dropout-Lösungen (DO-Lsg)	-HALT (mg/l)	-HAT (mg/l)	-LT (mg/l)	-L (mg/l)	-T (mg/l)
L-Isoleucin	300	300	300	300	300
L-Valin	1500	1500	1500	1500	1500
Adenin-Hemisulfat-Salz	–	–	200	200	200
L-Arginin HCl	200	200	200	200	200
L-Histidin-HCl-Monohydrat	–	–	200	200	200
L-Leucin	–	1000	–	–	1000
L-Lysin-HCl	300	300	300	300	300
L-Methionin	200	200	200	200	200
L-Phenylalanin	500	500	500	500	500
L-Threonin	2000	2000	2000	2000	2000
L-Tryptophan	–	–	–	200	–
L-Tyrosin	300	300	300	300	300
Uracil	200	200	200	200	200

Anmerkung: Serin, Aspartat und Glutamat wurden nicht hinzugefügt, da sie den pH des Mediums ansäuern. Hefezellen können diese Aminosäuren endogen synthetisieren.

Hefemedien

Medium	Zusammensetzung pro l Medium
YPD-Medium	20 g Bacto-Pepton + 10 g Hefe-Extrakt + 50 ml 40 % Glucose
YPD-Platten	+ 15 g Bacto-Agar
YPDA-Medium	YPD mit 0,1 g Adenin-Hemisulfat
SD-Medium	6,7 g "Yeast nitrogen base" ohne Aminosäuren 50 ml 40 % Glucose 10 ml der gewünschten 10 x "Dropout-Lsg"
SD-Platten	+ 15 g Bacto-Agar

YPD-, YPDA- und SD-Medien werden für 20 min bei 121 °C autoklaviert, die Glucoselösung sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

2.1.5 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide für die sequenzspezifische DNA-Synthese oder die Sequenzierungsreaktionen wurden von TIB Molbiol (Berlin) bezogen. Artifizial eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung
AA 01	5'-AAG TAT GAT CTT GGT GTG ACA GCG ATA CGG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 1
AA 02	5'-ACG ACA GGA GAA GCA GCA GGA TTT GAG CAG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 2
AA 03	5'-TGG ATC GGC GAG AGA GCA ACC AAA CAT TCG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 3

Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung
AA 04	5'-GGA TGC AGT GGC GAT GGA CTA ACG GAT TAG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 4
AA 05	5'-GTG GTG CTG CAA TAG AGA CTG GAG AAG TGG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 5
AA 06	5'-TCC AAG ACT GCT GAA GGA TGG CGA ATG CAG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 6
AA 07	5'-TGC TCC ACA ATG GCC AGC ATC TCG GGA CTG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 7
AA 08	5'-TGA TGA GCA ATG GTG AAC ACG GAA GGG TGG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 8
AA 09	5'-GAT AGG AAG TAG CTA CGT TCG GAG ATC TCG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 9
AA 10	5'-TCA GAT CAT CTG CAG ACC GGA AAG AAG CTG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 10
AA 11	5'-AAT CAG CGA AGA GAG ACA TTT TGG AGG CCG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 11
AA 12	5'-CTA CTG TAG CTA CTA CCG TAT CTT TCT GCG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 12
AR 01	5'-AGG AGA AAG GAG CGG GGA GTT GCT ACA TGG-3'	Rückwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 1–12
AR 02	5'-CAG ACA CAG GGA ACT TTC TGC AGA TTT CTG-3'	Rückwärtsprimer zur Klonierung von mPcdh α 1–12
mPcdA7 A	5'-ATC <u>GAA TTC</u> ACA GCG CTG CGC TGT TCG GCG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung des <i>Bait</i> - Konstrukts CPv und CPvc
mPcdA7 B2	5'-AAC <u>TGC AGT</u> CAG TTA TCT GTA GAG CTG GGA-3'	Rückwärtsprimer zur Klonierung des <i>Bait</i> -Konstrukts CPv

Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung
mPcdA7 C	5'-ATC <u>GAA TTC</u> CCC CGG CAG CCC AAC CCT GAC-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung des <i>Bait</i> -Konstrukts CPc
mPcdA7 D2	5'-AAC <u>TGC AGT</u> CAG CCG AAG GTT ATA AAA TCG-3'	Rückwärtsprimer zur Klonierung des <i>Bait</i> -Konstrukts CPc und CPvc
Fyn Eco F	5'-GTC <u>GAA TTC</u> ATG GGC TGT GTG CAA TGT AAG-3'	Vorwärtsprimer zur Klonierung der Fyn-Tyrosinkinase
Fyn Pst R	5'-ATG <u>CTG CAG</u> TCA CAG GTT TTC ACC GGG CTG-3'	Rückwärtsprimer zur Klonierung der Fyn-Tyrosinkinase
SMART-III TM -Oligo	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ATG GCC GGG-3'	Oligonukleotide für SMART-Technik
CDS III/6 Primer	5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG- NNNNNN-3'	Random-Primer zur First-Strand-cDNA-Synthese
cDNA-Amplifikation 5'-PCR-Primer	5'-TTC CAC CCA AGC AGT GGT ATC AAC GCA GAG TGG-3'	Vorwärtsprimer für eine LD-PCR
cDNA-Amplifikation 3'-PCR-Primer	5'-GTA TCG ATG CCC ACC CTC TAG AGG CCG AGG CGG CCG ACA-3'	Rückwärtsprimer für eine LD-PCR
T7 Sequencing Primer	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3'	Vorwärtssequenzierprimer für den pGADT7-Rec-Vektor (<i>Prey</i> -Vektor) und pGBKT7-Vektor (<i>Bait</i> -Vektor)
3'-AD Sequencing Primer	5'-AGA TGG TGC ACG ATG CAC AG-3'	Rückwärtssequenzierprimer für den pGADT7-Rec-Vektor (<i>Prey</i> -Vektor)

Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung
3' DNA-BD Sequencing Primer	5'-TTT TCG TTT TAA AAC CTA AGA GTC	Rückwärtssequenzierprimer für den pGBKT7-Vektor (<i>Bait</i> -Vektor)

2.1.6 Antikörper

Antikörper	Spezies	Herkunft
Primärantikörper: Anti-GAL4-DNA-BD (monoklonal)	Maus	Clontech, Heidelberg
Primärantikörper: Anti-GAL4-AD (monoklonal)	Maus	Clontech, Heidelberg
Sekundärantikörper: Anti-Maus, HRP-konjugiert	Kaninchen	Dako, Hamburg

2.1.7 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> Top10F'	[F' lacIq, Tn10(tetR)], mcrA D(mrrhsdRMS-mcrBC), ϕ 80, lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139 Δ (ara-leu)7679, galU, galK, rpsL(Str ^R), endA1, nupG	Invitrogen, Leek, Holland
<i>E. coli</i> DH5 α	supE44, Δ lac, U169, (ϕ 80, lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Stratagene, Heidelberg

2.1.8 Hefestämme

Hefestamm	Genotyp	Referenz
AH109	MAT _a , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2 : : GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3 : : MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1	James et al. 1996
Y187	MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1- 901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met ⁻ , gal80 Δ , URA3 : : GAL1UASGAL1TATA-lacZ, MEL1	Harper et al. 1993

2.1.9 Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase, „CIP“)	Roche, Mannheim
PowerScript Reverse Transkriptase	Clontech, Heidelberg
Pfu DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	NEB Schwalbach/Taunus; Boehringer/Roche, Mannheim
RNase I	Clontech, Heidelberg
RNase A, DNase frei	QIAGEN, Hilden
T4 DNA-Ligase	GIBCO/BRL, Eggenstein oder NEB, Schwalbach/Taunus
Taq-DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt
Titanium-Taq-DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt

2.1.10 Molekulargewichtsstandards

Molekulargewichtsstandards	Fragmentgrößen (bp)
100 bp DNA-Leiter (GIBCO/BRL, Eggenstein)	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2072
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, 8144, 9162, 1018, 11198, 12216
Molekulare Massen (kDa)	
SDS-7B Molekulargewichtsstandard, gefärbt (Sigma, Taufkirchen)	26, 36, 48, 58, 84, 116, 180
LMW-Marker (Low molecular Weight Marker) (Amersham Pharmacia Biotech)	14.4, 20.1, 30, 43, 67, 94

2.1.11 Plasmidvektoren

Plasmid	Verwendung	Bezugsquelle
pCR4Blunt-TOPO	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten (PFU)	Invitrogen, Leek, Holland
pCR4-TOPO	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten (TAQ)	Invitrogen, Leek, Holland
pGBKT7	<i>Bait</i> -Expressionsvektor (enthält die GAL4-DNA-BD)	Clontech, Heidelberg
pGADT7-Rec	<i>Prey</i> -Expressionsvektor (enthält die GAL4-AD)	Clontech, Heidelberg
pGAD424	<i>Prey</i> -Expressionsvektor (enthält die GAL4-AD)	Clontech, Heidelberg

2.1.12 Geräte

Sterile Einwegmaterialien wie Pipetten, Röhrchen oder Platten für die Bakterien- bzw. Hefekultur wurden von Falcon/Beckton-Dickinson (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) oder Greiner (Nürtingen) bezogen.

Geräte	Bezugsquelle
Kühlzentrifuge RC 5C Plus mit SS34- und GSA-Rotoren	Sorvall/DuPont, Bad Homburg
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5402, temperierbar	Eppendorf, Hamburg
Zellzentrifuge RT 6000D	Sorvall/DuPont, Bad Homburg
Horizontal-Gelapparatur 30008	Renner, Dannstadt-Schauernheim
Horizontal-Gelapparatur Mini Sub-Cell; Mini Protean II System, Mini Trans Blot; Netzgerät 200/2.0	Bio-Rad, München
Geldokumentationseinrichtung Gel-Doc II	Biometra, Göttingen
Geltrockner 583	Bio-Rad München
ABI DNA-Sequencer 377,	Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler DNA-Thermal-Cycler 480	Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Scanner Studio Scan II	AGFA, Deutschland
Speed-Vac Centrivac	Heraeus-Christ, Hanau
Ultra-Tiefkühltruhe U54285	New Brunswick Scientific/Labotec, Göttingen
Ultraschallgerät Branson Sonifier 250 D	Heinemann, Schwäbisch. Gmünd

Geräte	Bezugsquelle
Brutschrank B 6060	Heraeus-Christ, Hanau
Sterile Werkbank Gelaire ® BSB 4A	Flow Laboratories, Meckenheim
Inkubationsschüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel

2.1.13 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
BioMax-Film	Eastman-Kodak, Rochester, New York, USA
Centri-Sep spin columns	Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt
Einweg-Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Den Haag, Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier 3MM	Whatman International Ltd., Maidstone, GB
Nitrocellulose-Membranen, Hybond-C	Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
Objektträger und Deckgläschen	Menzel-Gläser, Bad Wildungen
PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml	FMC Biozym, Hameln

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Methoden zur Arbeit mit RNA

Maßnahmen im Umgang mit RNA

Da RNA sehr viel instabiler als DNA und zusätzlich noch den ubiquitär vorhandenen RNAsen ausgesetzt ist, ist im Umgang mit RNA Sorgfalt notwendig. Hierzu gehören das Tragen von Einmalhandschuhen, die Verwendung eines gesonderten Pipettensatzes und eigens für den Umgang mit RNA bestimmte Plastikmaterialien. Das in weiteren Schritten verwendete Wasser, das mit RNA in Berührung kommen kann, wird zuvor mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt, um RNAsen zu inaktivieren.

Gesamt-RNA-Extraktion aus Gewebe mit Trizol

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben erfolgt mithilfe des Trizol-Reagenz (Gibco BRL, Eggenstein) gemäß den Angaben des Herstellers. Die RNA-Isolierung beruht auf einer Ein-Stufen-Isolierung von RNA mittels saurer Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion und stellt eine Optimierung der ursprünglich von Chomczynski & Sacchi (1987) entwickelten Methode dar (Jung, 1999).

Für die Isolierung von RNA aus Maushirn wird das Gewebe ohne Zeitverzögerung in Trizol mithilfe eines Ultra-Thurax-Homogenisators für 3–5 min zerkleinert. Die einzusetzende Menge an Trizol ist abhängig vom Gewicht des Gewebes; wenn möglich wird ein Verhältnis von 1 ml Trizol pro 50 mg Gewebe nicht unterschritten. Die weitere Aufarbeitung erfolgt gemäß den Herstellervorschriften für das Trizol-Reagenz. Die isolierte RNA wird nach der Ethanol-Fällung in DEPC-behandeltem ddH₂O resuspendiert und bei –80 °C gelagert. Für eine längerfristige Lagerung (> 2 Wochen) wird eine Aufbewahrung bei –80 °C als Aliquots in Ethanol-Präzipitat bevorzugt.

Die RNA-Ausbeute wird photometrisch bestimmt, während die Integrität der präparierten RNA in einem denaturierenden, formaldehydhaltigen Agarosegel anhand ribosomaler RNA-Banden abgeschätzt wird.

Isolierung von Poly-A⁺-RNA

Um möglichst effektiv cDNA herzustellen, wird zunächst aus der Gesamt-RNA die messenger RNA aufgrund ihrer 3'-Polyadenylierung als poly-A⁺-RNA isoliert. Zur Anreicherung der mRNA wird der Oligotex-mRNA-Kit (QIAGEN) benutzt und die Isolierung entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Reinigung beruht auf der Basenpaarung von mRNA-Molekülen mit Polyadenylierung oder RNA-Molekülen mit sonstigen Poly-Adenosin-Sequenzen an oligo-desoxy-Thymidin, das an Latexpartikel gebunden ist. Die Latexpartikel werden abzentrifugiert (14.000 x g, 2 min, RT, Eppendorffzentrifuge), anschließend erfolgt eine RNA-Eluierung entsprechend den Herstellerangaben. Die eluierte m-RNA wird einer Ethanol-fällung unterzogen und wie die Gesamt-RNA gelagert.

Gelelektrophorese von RNA

Um die Rückbildung der Sekundärstruktur der RNA während der Gelelektrophorese zu verhindern, wird dem 1%igen Agarosegel (gelöst in 1 x MOPS) eine Formaldehyd-Lösung zugesetzt (Endkonzentration 6,6 %). Die RNA-Proben sowie der RNA-Größenstandard (Gibco BRL) werden folgendermaßen vorbereitet:

- 9 µl RNA in DEPC-behandeltem Wasser (bis 35 µg Gesamt-RNA bzw. bis 4 µg Poly-A⁺-RNA)
- 10 µl deionisiertes Formamid
- 4 µl Formaldehyd (37 %)
- 3 µl 10 x MOPS
- 1 µl Ethidiumbromid (500 µg/ml)

Die Proben werden zur vollständigen Denaturierung für 5 min bei 65 °C inkubiert und auf Eis schockgekühlt. Vor dem Auftrag auf das Gel werden noch 3 µl RNA-Auftragspuffer hinzugegeben. Der Gellauf erfolgt unter dem Abzug mit 1 x MOPS-Puffer als Laufpuffer bei einer Spannung von 8 V/cm Gelbreite für ca. 3 h. Das Gel kann zur Detektion der RNA-Moleküle direkt unter UV-Licht betrachtet werden.

Reverse-Transkriptase-PCR

RT-PCR stellt eine Kombination aus reverser Transkription und PCR dar. Mittels der Reversen Transkriptase (RT), einem Enzym aus RNA-Tumoviren, wird ein zur RNA-Matrize komplementärer DNA-Einzel-Strang synthetisiert. Als Startpunkt können entweder Oligo-(dT)-Primer, die mit der Poly-A⁺-Sequenz der mRNA hybridisieren, oder bekannte genspezifische Primer nutzen. Die Verwendung von spezifischen Primern ist vor allem bei sehr großen mRNA-Molekülen von Vorteil, bei denen durch die Verwendung des 3'-Oligo-(dT)-Primers das 5'-Ende der mRNA durch vorzeitigen Abbruch der Synthese unter Umständen nicht erreicht wird.

Zur Vermeidung von störenden Sekundärstrukturen wird die mRNA anfangs denaturiert. Dazu wird die mRNA-Lösung (1–5 µg Gesamt-RNA oder 50–500 ng mRNA in 10 µl DEPC-Wasser) zusammen mit 1 µl Oligo(dT)-Primer (500 µg/ml) und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) für 5 min bei 65 °C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis inkubiert.

Zu diesem Ansatz werden folgende Komponenten hinzugefügt:

- 12 µl Ansatz (RNA, Primer und dNTP)
- 4 µl 5 x Reverse-Transkriptase-Puffer
- 2 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript, 200 U)
- ad 20 µl H₂O Gesamtansatz

Der Reaktionsansatz wird 1 h bei 42 °C inkubiert. Die so gewonnene cDNA wird entweder gleich mittels PCR untersucht oder bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C eingefroren.

2.2.2 DNA-Amplifikation und -Modifikation

Primerdesign

Ein entscheidender Schritt für eine erfolgreiche PCR stellt die Primerauswahl dar.

Wichtige Regeln beim Primerdesign sind:

- Die vier Basen sollten etwa gleich häufig vorkommen.
- Der GC-Gehalt sollte 40-60 % betragen.

- Sich wiederholende Sequenzen oder komplementäre Strukturen innerhalb eines Primers sollten wegen der Gefahr des Auftretens von Sekundärstrukturen vermieden werden.
- Komplementäre Sequenzen zwischen den beiden Primern (vor allem an den 3'-Enden) sollten vermieden werden, um die Entstehung von Primerdimeren und deren Amplifizierung zu verhindern.
- Vorwärts- und Rückwärtsprimer sollten in etwa die gleiche Annealingtemperatur besitzen.

Die Sequenzen der Primer wurden nach obigen Kriterien bestimmt, wobei die veröffentlichten mRNA-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank benutzt wurden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) kann bei Wahl geeigneter Primer zur in-vitro-Amplifikation von DNA-Abschnitten verwendet werden (Saiki et al. 1985, Übersicht in Arnheim et al. 1992). Dazu wird eine doppelsträngige DNA-Matrize in Anwesenheit von zwei den amplifizierenden Bereich begrenzenden Primern einer kontinuierlich aufeinanderfolgenden Reihe von Denaturierungen, Primerhybridisierungen und DNA-Polymerisierungen in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und hitzeresistenter DNA-Polymerase ausgesetzt (Chien et al. 1976). Die Primer haben unter Umständen an den 5'-Enden einen Überhang von nicht hybridisierenden Nukleotiden, mit deren Hilfe andere Sequenzen, wie z. B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, in das Amplifikat eingeführt werden können. Häufig werden die PCR-Produkte zunächst mithilfe einer TA-Ligation in Plasmide eingebaut und kloniert.

Um die DNA-Matrize zu Beginn der Reaktion vollständig zu denaturieren, wird für den ersten Zyklus eine Denaturierungsdauer von 3 min gewählt. Für den letzten Zyklus wird eine Polymerisationsdauer von 5 min verwendet, um vollständig polymerisierte Endprodukte zu erhalten. Die Hybridisierungstemperatur (T_H) eines bestimmten Oligonukleotids wird anhand seiner Basenzusammensetzung folgendermaßen abgeschätzt (Suggs et al. 1981):

$$T_H = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 2$$

Mit einem programmierbaren Thermocycler werden die Zyklen automatisch gesteuert. Die DNA kann aus Agarosegelen isoliert werden. Tab. 1 beschreibt einen Standardansatz für die in dieser Arbeit angewandte PCR.

Tab. 1: Standardansatz für die PCR.

Komponente	Volumen (μl)
Wasser	20,55
Template-DNA (375 pg)	0,25
Reaktionspuffer, 10 x	2,5
Nukleotide, 25 mM pro Nukleotid	0,2
Primer 1, 10 μM	0,5
Primer 2, 10 μM	0,5
Pfu-Polymerase, 2,5 U/ μl	0,5
Endvolumen	25,0

Kolonie-PCR

Eine im Rahmen dieser Dissertation verwendete Variante der PCR stellt die Kolonie-PCR dar. Die Kolonie-PCR wird zum Nachweis von Insert-Fragmenten in ligierten Vektoren verwendet. Dabei wird direkt Zellmaterial von einer Plattenkolonie eingesetzt, um das gesuchte Fragment mithilfe geeigneter Primer zu amplifizieren. Zur Durchführung der PCR wird eine kleine Menge Zellmaterial von Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher direkt in dem vorbereiteten PCR-Reaktionsgemisch suspendiert.

DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifische palindromische Sequenzen von 4–8 Basenpaaren doppelsträngiger DNA. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen beider Stränge, wobei DNA-Moleküle mit definierten Enden entstehen, die sich zu Klonierungszwecken eignen.

Für analytische Restriktionsspaltungen wird 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die dabei eingesetzten Enzymmengen betragen in der Regel 5 U/µg DNA. Die Reaktionen erfolgen in den von den Herstellern mitgelieferten Puffern und werden gemäß den angegebenen Bedingungen hinsichtlich Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur durchgeführt. In allen Fällen wird darauf geachtet, dass die Menge des eingesetzten Enzyms 10 % des Reaktionsvolumens nicht überschreitet, da zu hohe Glycerinmengen zu unspezifischer Enzymaktivität führen können.

Nach der Inkubationszeit (1–16 h) wird der Verdau gestoppt. Dies erfolgt durch Hitzeinaktivierung oder durch Zugabe von Stopperlösung (100 mM EDTA; 4 x TAE; 50 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau), die gleichzeitig DNA-Auftragspuffer für Agarosegele ist. Ein Aliquot des Restriktionsansatzes wird elektrophoretisch mithilfe eines Agarosegels aufgetrennt und analysiert.

In den Fällen, in denen die zu verdauende DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt werden muss, wird zunächst nur mit einem Enzym verdaut. Nach einer Phenol-Chloroform-Reinigung wird die DNA anschließend mit dem zweiten Enzym gespalten. Der Aufreinigungsschritt kann jedoch entfallen, falls beide Enzyme in dem gleichen Reaktionspuffer eine ausreichend hohe Aktivität besitzen. In einem solchen Fall werden beide Restriktionsenzyme (je 5 U/µg DNA) hinzugefügt.

Partieller Verdau durch sukzessive Verdünnung der Restriktionsendonuklease

Im Gegensatz zum vollständigen Verdau, bei dem die DNA solange verdaut wird, bis alle Schnittstellen von dem jeweiligen Enzym geschnitten worden sind, wird beim partiellen Verdau mit einer geringen Enzymmenge gearbeitet. Dadurch bleiben einige Schnittstellen intakt. Der partielle Verdau wird dann nötig, wenn man z. B. im Rahmen einer Klonierung auf eine Schnittstelle angewiesen ist, die mehrmals vorkommt. Um einen singulären Schnitt zu erhalten, wird dann partiell verdaut.

Dafür wird ein 100 µl-Restriktionsansatz, der die zu verdauende DNA und 1 x Restriktionspuffer enthält, in 5 Eppendorfgefäße so verteilt, dass das erste Gefäß 30 µl, das zweite bis vierte Gefäß je 20 µl und das letzte 10 µl der Reaktionsmischung enthält. Die Restriktionsendonuklease (3–10 U/µg DNA) wird mit 30 µl Reaktionsmischung im ersten Gefäß auf Eis versetzt und gut gemischt. Dann werden der Reihe nach 20 µl aus dem vorgehenden Gefäß in das nachfolgende auf dem Eis pipettiert, wodurch eine sukzessive Verdünnung der Restriktionsendonuklease in den Reaktionsansätzen erreicht wird.

Alle 5 Reaktionsansätze werden 15 min bei 37 °C inkubiert, die Reaktion wird in allen Ansätzen gleichzeitig durch Inkubation in einem Eisbad abgestoppt. Die Restriktionsfragmente werden in einer Agarosegel-Elektrophorese getrennt. Das Fragment mit der richtigen Größe wird aus dem Gel isoliert.

5'-Dephosphorylierung von DNA

Um bei einer Klonierungsreaktion eine Religation von linearisierter Vektor-DNA, die nur mit einem Enzym geschnitten ist oder die ein „glatt“-geschnittenes Doppelstrang-DNA-Ende, ein sogenanntes Blunt-End besitzt, zu verhindern, kann das Plasmid dephosphoryliert werden. Dazu wird nach der Restriktionsspaltung der Ansatz, der den linearisierten Vektor enthält, mit 0,1 Volumenteilchen des 10-fach konzentrierten Dephosphorylierungspuffers versetzt. Danach wird 1 U CIP (Calf Intestine Phosphatase; NEB, Schwalbach/Taunus) hinzugefügt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C werden alle Enzyme durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt.

Ligation von DNA-Molekülen

Die geschnittenen, isolierten und gegebenenfalls dephosphorylierten DNA-Fragmente werden direkt in die komplementären Restriktionsschnittstellen des Plasmid-Vektors ligiert.

Dazu werden 20–50 ng Vektor-DNA und ein 5–10-facher molarer Überschuss der einzufügenden DNA in einem finalem Reaktionsvolumen von 10 µl eingesetzt. Der Ligationsansatz wird entweder 12 h bei 16 °C mit 7,5 U T4-DNA-Ligase (Amersham/Pharmacia, Freiburg) oder 2 h bei 24 °C mit 3 U hoch konzentrierter T4-DNA-Ligase (Gibco BRL) inkubiert. Die optimalen Pufferbedingungen werden durch anteilige Zugabe der 5- oder 10-fach konzentrierten Pufferstammlösungen entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Sie enthalten in jedem Fall Magnesiumionen und ATP.

Subklonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte werden zunächst in TOPO-Vektoren zwischenkloniert, sequenziert und korrekte Gensequenzen unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen umkloniert.

Produkte aus einer PCR, die mit Taq-Polymerase erzeugt wurden, besitzen Template-unabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an ihren 3'-Enden. Sogenannte TA-Klonierungssysteme (z.B. TOPO TA Cloning[®] Kit, Invitrogen) machen sich diese Eigenschaft zunutze, indem die geöffneten Enden eines Plasmidvektors mit einem komplementären 5'-Desoxythymosin-Überhang versehen werden und so eine Basenpaarung mit dem zu ligierenden PCR-Produkt eingehen können. Für die Ligation von 50 ng Vektor mit dem PCR-Produkt wird ein molares 1:1-Verhältnis empfohlen, maximal werden jedoch 2 µl ungereinigtes PCR-Produkt eingesetzt. Die Ligation wird entsprechend den Herstellerangaben aus den Kit-Komponenten angesetzt und erfolgt bei 16 °C über Nacht.

TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten

Die TOPO-TA-Klonierung stellt eine Weiterentwicklung der in zuvor beschriebenen TA-Klonierung von PCR-Produkten dar (TOPO TA Cloning[®] Kit, Invitrogen). Das Funktionsprinzip beruht ebenfalls auf den unspezifisch angehängten 3'-Desoxyadenosinen an durch Taq-Polymerase generierten PCR-Produkten. Im Unterschied zur klassischen TA-Klonierung erfolgt die Ligrationsreaktion nicht durch eine T4-DNA-Ligase, sondern mittels einer Topoisomerase, mit der der Plasmidvektor vorinkubiert wurde. Gibt man zu diesem System ein PCR-Produkt, erfolgt innerhalb von 5 min eine Ligation bei Raumtemperatur, sodass man unter minimalem Zeitaufwand mit einer Bakterientransformation fortfahren kann. Das Zusammenfügen der Kit-Komponenten erfolgt entsprechend den Herstellerangaben.

TOPO-BLUNT-Klonierung von PCR-Produkten

Für die meisten Klonierungen wird die DNA-Polymerase PFU verwendet, da dieses Enzym durch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität geringere Mutationsraten aufweist als die Taq-Polymerase. PCR-Produkte, die mit der DNA-Polymerase PFU amplifiziert werden, besitzen jedoch kein überhängendes Adenosin, sondern glatte Enden (Blunt-End). Das TOPO-Blunt-System basiert auf dem linearisierten pCR4-Blunt-TOPO-Vektor, an dessen 3'-Enden die Vaccinia-Virus-Topoisomerase-I kovalent gebunden ist. Dies ermöglicht eine effiziente Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden. Das Zusammenfügen der Kit-Komponenten erfolgt entsprechend den Herstellerangaben (Blunt End Cloning Kit, Invitrogen).

2.2.3 DNA-Analyse

Agarosegel-Elektrophorese von DNA

DNA-Fragmente lassen sich elektrophoretisch in Agarosegelen auftrennen. Dazu wird eine Spannung an den Enden eines Agarosegels angelegt und auf diese Weise ein elektrisches Feld generiert, in dem die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung der Anode wandern. Die Migrationsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle wird durch den Reibungswiderstand der Agarosegelmatrix beeinflusst: größere Moleküle werden stärker gebremst als kleinere, sodass eine Auftrennung nach Größe erfolgt. Dabei gilt, dass die Migrationsgeschwindigkeit eines linearen DNA-Moleküls umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichtes ist (Helling 1974). Das Molekulargewicht eines DNA-Fragmentes wird mithilfe eines Molekulargewichtsmarkers bestimmt, in dem DNA-Fragmente definierter Größe enthalten sind. Dazu wird die Laufstrecke des DNA-Fragmentes mit den Laufstrecken der DNA-Moleküle des Molekulargewichtsmarkers verglichen.

Um DNA-Moleküle im Agarosegel detektieren zu können, wird dem Gel vor der Elektrophorese Ethidiumbromid zugesetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff schiebt sich zwischen die Basenpaare der DNA (Interkalation) und fluoresziert nach Bestrahlung mit UV-Licht (260–360 nm) im rotorangen (560 nm) Spektralbereich (Lodish 1996).

Je nach zu trennenden DNA-Größen werden 0,7–1,5%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele wird die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf Handwärme mit 4 µg Ethidiumbromid/ml versetzt. Die Gellösung wird anschließend in eine Gelwanne gegossen, mit Gelkämmen versetzt und zum Verfestigen bei Raumtemperatur belassen. Danach werden die Kämmen entfernt und die Gelkammer mit dem erstarrten Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und mit 1 x TAE-Elektrophorese-puffer bedeckt. Die DNA-Proben werden mit 0,25 Volumenteilen Stopperlösung (100 mM EDTA, 4 x TAE; 50 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau) versetzt und in die Geltaschen pipettiert, wobei die aufgetragene Menge 1 µg pro 0,5 cm Gelbreite nicht überschreiten sollte. Mindestens eine Spur wird parallel mit einem geeigneten Molekulargewichtsmarker beladen. Die Auftrennung erfolgt für 50 min bei konstant 100 V bzw. bis zu 10 h bei konstant 20 V für hochmolekulare DNA.

Quantifizierung von Nucleinsäuren

Von kleineren DNA-Mengen, d.h. weniger als 200 ng absolut bzw. Konzentrationen unter 100 µg/µl, werden Aliquots auf Agarosegelen parallel mit einem Massenstandard (GibcoBRL, definierte DNA-Banden zwischen 10–120 ng) aufgetrennt. Nach Ethidiumbromidfärbung erfolgt eine Abschätzung der DNA-Menge durch den Vergleich der Bandenintensität unter UV-Licht.

Nucleinsäuren in höherer Konzentration oder großen Mengen werden im Photometer in 500 µl-Quarzküvetten vermessen und auf Ihre Reinheit überprüft. Nach Abgleichen der Nullwerte kann das Absorptionsmaximum der gemessenen Nucleinsäuren (bei 260 nm) bestimmt und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) bzw. Salze (bei 230 nm) festgelegt werden.

Die Berechnung der Nucleinsäurekonzentration wird nach folgender Formel durchgeführt:

$$C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (A_{260} - A_{320}) \times f \times c$$

E = Extinktion

f = Verdünnungsfaktor

c = nucleinsäurespezifischer Koeffizient in µg/µl

doppelsträngige DNA: c = 0,05 µg/µl

einzelsträngige DNA: c = 0,025 µg/µl

RNA: c = 0,04 µg/µl

Der Quotient A_{260}/A_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte $2,0 \pm 0,2$ betragen.

Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden

Die Sequenzierung wird modifiziert nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Prinzip der durch den Einbau von Didesoxynucleotiden statistisch unterbrochenen DNA-Neusynthese. Für die Sequenzierungs-PCR wird das BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Applied Biosystems (PE, Weiterstadt) eingesetzt.

Der Standard-Sequenzieransatz besteht aus den in Tab. 2 aufgeführten Komponenten.

Tab. 2: Standard-Sequenzieransatz.

Komponente	Volumen (μl)
Template-DNA (aufgereinigt): 0,5–1 μg Plasmid-DNA	$\leq 4,0$
Sequenzierprimer (10 μM)	0,4
BigDye [®] Ready Reaction Mix	6,0
ddH ₂ O	3,6 (abzüglich Volumen der DNA)
Endvolumen	10,0

Ist das Volumen der benötigten DNA-Menge größer als 3,5 μl , wird die DNA entweder gefällt oder der Reaktionsansatz unter Einsatz von 6 bzw. 8 μl BigDye[®] Terminator auf 15 bzw. 20 μl vergrößert. Die Reaktionsbedingungen (s. u.) für das sogenannte „Cycle Sequencing“ folgen den Herstellermaßgaben mit Ausnahme eines verlängerten primären Denaturierungsschrittes. Verwendet wird ausschließlich ein Thermal-Cycler TC480 (Perkin Elmer, Weiterstadt).

Die Reaktionsbedingungen für das Cycle Sequencing lauten wie folgt:

- 2 min bei 94 °C
- 25 x (30 s bei 95 °C; 20 s bei 50°C; 4 min bei 60 °C)
- Kühlen auf 4 °C

Die Sequenzierprodukte werden unter Verwendung von Centri-Sep-Säulchen mit Sephadex-G50 (Sigma, Taufkirchen) von nicht eingebauten Fluoreszenz-Nukleotiden und Primern abgetrennt. Acrylamid-Sequenziergele für die automatische Sequenzierung werden entsprechend den Herstellerangaben (ABI PRISM Tipps, Stand: Oktober 1998) erstellt. Es werden folgende Gelsysteme verwendet:

ABI 377: 48 cm effektive Trennstrecke im Gel („well to read“, WTR)

Zusammensetzung:

- 18,0 g Harnstoff
- 7,1 ml 30%iges Acrylamid (29:1, Acryl:Bisacrylamid; BioRad, München),
- 6,0 ml 10 x TBE-Puffer
- 21 ml ddH₂O
- 20 µl TEMED
- 300 µl 10%iges APS

Die Analyse der gereinigten Sequenzierprodukte erfolgt mit Sequenzierautomaten der Firma Applied Biosystems/Perkin Elmer (ABI Prism® 377 DNA Sequencer). Die Nukleotidsequenzen werden mithilfe der Tetra-Analyse/Complign Software (MacMollyR Tetra software package, Version 3.7, Soft Gene GmbH, Berlin) bearbeitet.

2.2.4 DNA-Präparation und Aufreinigung

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wird die gewünschte Fragment-Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht geringer Intensität aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Die Aufreinigung erfolgt in Abhängigkeit vom Gewicht mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers. Kernstück der Reinigung ist nach dem Schmelzen der Agarosegel-Fragmente die Isolierung über Miniatursäulchen mit Silica-Matrix.

Plasmid-DNA-Präparation

Präparation in kleinem Maßstab (Minipräp)

Um kleine Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wird ein Kit zur Aufreinigung aus 1,5 ml Über-Nacht-Kulturen verwendet (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN). Hierbei erfolgt der Zellaufschluss durch die alkalische Lyse.

Die Minipräparation von DNA nach der Methode der alkalischen Lyse stellt eine modifizierte Version der Methode von Birnboim & Doly (1979) dar. Bei dieser Methode der alkalischen Lyse wird die DNA bei stark alkalischem pH denaturiert. Nach der Neutralisation mit Essigsäure hybridisieren die beiden Stränge der Plasmid-DNA wieder, während die weit

größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und im Komplex mit Proteinen und Zelltrümmern ausfällt. Ein höherer Reinheitsgrad wird dadurch erreicht, dass die Plasmid-DNA nach dem Entfernen der Proteine und der Zelldebris mithilfe kleiner Schleudersäulchen unter Benutzung einer Tischzentrifuge an eine Silica-Matrix gebunden wird. Nach einem Waschschrift kann die gereinigte DNA in einer Menge von max. 10 µg (Herstellerangabe) eluiert werden. Alle Lösungen sowie die Säulchen sind in dem Kit enthalten und werden entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

Präparation in großem Maßstab (Midi- oder Maxipräparation)

Hier wird Plasmid-DNA, die in 30 ml (Midipräparation) oder 100 ml (Maxipräparation) Bakterien-Über-Nacht-Kultur amplifiziert worden ist, ebenfalls zunächst durch eine alkalische Lyse gewonnen. Anschließend wird die Plasmid-DNA über Anionenaustauschersäulchen gereinigt, wobei die negativ geladene Plasmid-DNA an die positiv geladenen DEAE-Gruppen des Anionenaustauschers gebunden wird. Verunreinigungen werden mit einem Puffer mittelstarker Salzkonzentration von der Säule gewaschen. Die Plasmid-DNA wird mit einem Hochsalzpuffer eluiert und dann mit einer Isopropanolfällung aufkonzentriert. Mit dieser Methode können aus dem beschriebenen Ansatz zwischen 200 und 500 µg Plasmid-DNA isoliert werden. Die Ausbeute wird mithilfe eines UV-Photometers bestimmt (Kap. 0). Alle Lösungen sowie die Säulen sind im Kit (QIAGEN Plasmid Midi Kit bzw. QIAGEN Plasmid Maxi Kit) enthalten und werden entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

Fällung und Reinigung von Nukleinsäuren

Ethanol-fällung

Zur Entsalzung und/oder Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen werden diese mit reinem Ethanol gefällt. Dazu werden der Probelösung 0,1 Volumenteile 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugefügt und vermischt. Danach werden 2,5 Volumenteile absolutes Ethanol (auf 0°C abgekühlt) hinzugegeben und erneut vermischt. Nach 30 min Inkubation bei -20 °C wird das ausgebildete Präzipitat in einer Tischzentrifuge bei 16.500 x g oder bei großen Volumina in einer Sorvall RC 5 plus 20.000 x g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und das Pellet mit eiskaltem 70%igen Ethanol überschichtet. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 16.500 x g für 10 min wird der Überstand vorsichtig mit einer Pipette quantitativ entfernt. Das DNA-Pellet wird dann für 5–10 min luftgetrocknet und anschließend in einem angemessenen Volumen Tris/HCl (pH 8,0) oder in ddH₂O resuspendiert.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Nukleinsäurelösungen von unerwünschten Stoffen wie Proteinen und Lipiden zu befreien, wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Das verwendete Phenol ist mit TE-Puffer (pH 8,0) gesättigt und zusätzlich als Antioxidationsmittel mit 1 mg/ml 8-Hydroxyquinolin versetzt, welches zu einer Gelbfärbung des Phenols führt. Die zu reinigende Lösung wird mit einem halben Volumen Phenol und einem halben Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und 5 min geschüttelt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 16.500 x g wird die obere wässrige Phase ohne Berührung der meist sichtbaren weißen Interphase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgt eine zweite Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), um noch vorhandene Reste von Phenol aus der wässrigen Phase zu entfernen.

Nach erneuter Zentrifugation und dem Überführen der wässrigen Phase in ein frisches Gefäß wird das Volumen bestimmt und eine Ethanol-fällung durchgeführt (s. o.).

Aufreinigung von PCR-Produkten

Um Produkte aus einer PCR von den verwendeten Oligonukleotiden und Enzymen zu trennen, wird das QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet. Bei dieser Methode kommen Silicagel-Säulchen zum Einsatz. Nach der Adsorption und einem Waschschriff wird die DNA mit H₂O bidest. von der Säule eluiert. Die Verwendung von Silicagel-Säulchen ist auch eine mögliche Alternative zu der in Kap. 0 aufgeführten Phenol-Chloroform-Extraktion zur Reinigung von Plasmiden oder DNA-Restriktionsfragmenten.

2.2.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen und Transformation

Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Um Bakterienzellen für die DNA-Aufnahme empfänglich zu machen, werden kompetente Zellen nach der Methode von Hanahan (1983) hergestellt. Ausgehend von einem Bakterienausstrich des gewünschten *E. coli*-Stammes wird eine Über-Nacht-Flüssigkultur angelegt. 100 ml FI-Medium (2 % (w/v) Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 20 mM MgSO₄, 10 mM KCl; pH 7,6 mit KOH) werden mit 1 ml der Über-Nacht-Kultur inokuliert und bis zum Erreichen einer A₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Anschließend werden die Bakterien auf Eis abgekühlt und in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 4000 rpm/2500 x g (SLA 1500 Rotor) sedimentiert. Das Pellet wird in 30 ml TFB1-

Puffer resuspendiert und 5–10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s. o.) werden die Zellen in 8 ml TFB2-Puffer (30 mM Kaliumacetat, pH 7,5 (Essigsäure), 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 15 % [v/v] Glycerin) resuspendiert, aliquotiert (200 µl Zellen + 40 µl Glycerin) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgt bei –80 °C.

Herstellung elektrisch kompetenter Bakterienzellen

Um Bakterien für die Elektroporation kompetent zu machen, werden 500 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 25 ml einer Bakterien-Über-Nacht-Kultur beimpft und bis zum Erreichen einer A₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Kultur 30 min auf Eis gestellt, danach 5 min bei 4 °C und 2.000 x g (3.800 rpm, SLA 1500-Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden zunächst im gleichen und nach erneuter Zentrifugation bei 7.400 x g (7.000 U/min, SLA 1500-Rotor, Sorvall) im halben Volumen eiskaltem ddH₂O gewaschen. Nach einem weiterem Waschschrift in 20 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin werden die Bakterien 15 min bei 4.000 x g (6.000 U/min, SS34-Rotor, Sorvall) abzentrifugiert, in 1 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt für maximal 6 Monate bei –80 °C.

E.-coli-Transformation

Um Plasmid-DNA zu amplifizieren, wird sie in Bakterien eingeschleust. Das Prinzip der Standardtransformation besteht darin, dass *E. coli*-Zellen hohen Konzentrationen bestimmter zweiwertiger Kationen ausgesetzt werden, sodass ein kleiner Anteil von ihnen für fremde DNA durchlässig wird (Lodish 1996).

Das eingeführte Plasmid trägt typischerweise ein Resistenzgen wie z.B. das Ampicillin-Resistenzgen, welches für das Enzym β-Lactamase kodiert, welche das Antibiotikum Ampicillin inaktiviert. Durch das Wachstum auf antibiotikumhaltigem LB-Festmedium bei 37 °C können nach Inkubation der *E. coli*-Zellen mit Plasmidvektoren diejenigen Zellen selektiert werden, die das Plasmid aufgenommen haben, da nur sie aufgrund des aufgenommenen Antibiotikum-Resistenzgens überleben und wachsen können.

Zur Standardtransformation werden 80 µl kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Nach 10 min Inkubation auf Eis werden 1–2 µl Ligationsansatz zugegeben und nochmals 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgt ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium werden die transformierten Bakterien zur Regeneration für 60 min unter

Schütteln bei 37 °C inkubiert, bevor sie in einer 20 µl- und einer 100 µl-Portion auf LB-Agarplatten mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert werden. Folgende Antibiotika finden Verwendung:

- Ampicillin: 50 µg/ml,
- Kanamycin: 30 µg/ml

Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C bilden sich bei erfolgreicher Transformation Bakterienkolonien aus. Von den Platten, auf denen Einzelkolonien gut voneinander zu trennen sind, werden 10–30 Klone mit einem sterilem Zahnstocher gepickt und in 1,5 ml einer mit Antibiotika versetzten LB-Flüssigkultur inokuliert. Nach Plasmidisolierung, Restriktionsverdau und Auftrennung der DNA in einem Agarosegel können positive Klone identifiziert werden.

Eine andere Methode der Transformation von Bakterienzellen mit besserer Transformations-effizienz ist die Elektroporation. Bei diesem Verfahren werden die Zellen nach einem kurzen elektrischen Schock von einigen 1000 V vorübergehend für DNA durchlässig. Dabei entstehen wahrscheinlich kurzzeitig Löcher in der Zellmembran, durch die die DNA in die Zellen gelangen kann, bevor sich die Löcher wieder schließen (Lodish 1996).

Der Ligationsansatz wird zunächst als schwimmender Tropfen auf einem Mikrofilter mit 25 nm Porengröße (Millipore) gegen ddH₂O für mindestens 2 h dialysiert, um störende Salze zu entfernen.

Zur Elektroporation von *E. coli* werden 40 µl eisgekühlte und für die Elektroporation kompetente Bakterien mit 2 µl des dialysierten Ligationsansatzes oder 100 pg Plasmid-DNA versetzt und in eine eisgekühlte Küvette (2 mm Elektrodenabstand) überführt. Mithilfe des Elektroporationsgerätes wird an die Elektroden der Küvette ein Spannungsimpuls von 2,5 kV angelegt. Der Spannungsimpuls wird dabei von einem Kondensator mit einer Kapazität von 25 µF generiert. Durch die Puls-Controller-Einheit des Gerätes wird ein Widerstand von 200 Ω eingestellt. Der Widerstand dient dem Schutz des Gerätes und hat keinen direkten Einfluss auf den elektrischen Puls. Nach der Elektroschock-Behandlung wird die Bakteriensuspension sofort mit 750 µl auf Raumtemperatur erwärmtem SOC-Medium versetzt, vorsichtig durchmischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Alle weiteren Schritte entsprechen denen einer Hitzeschock-Transformation (s. o.).

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Protein-Lysaten aus Hefezellen

Für die Proteinextraktion wird eine 50 ml-YPD-Hauptkultur mit 5 ml einer Über-Nacht-Kultur (Selektivmedium) angeimpft und bei 30°C unter Schütteln (220–250 rpm) inkubiert. Bei einer A_{600} von 0,4–0,6 erfolgt die Ernte der Zellen durch Zentrifugation bei 3.000 x g für 5 min bei 4 °C. Das Pellet wird mit 50 ml eiskaltem ddH₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Herstellung von Protein-Lysaten erfolgt ein Zellaufschluss per Ultraschall. Zur Lyse wird das Zellpellet mit 150 µl PBS/0,1 % (v/v) TritonX-100 resuspendiert und die Zellen für 2 x 45 s mit einem Branson-Sonifier bei Stufe 6 auf Eis beschallt. Anschließend erfolgt eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 x g.

Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Gesamtproteinkonzentration bestimmt (BCA-Assay, s. u.). Geeignete Mengen des Zelllysates können nun mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt und für die SDS-PAGE (Kap. 2.3.3) eingesetzt werden.

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wird nach der Methode von Bradford et al. (1985) mit der Bicinchoninsäuremethode bestimmt. Die Reaktion wird in Mikrotiterplatten mit gebrauchsfertigen BCA-Protein-Assay-Reagentien (Pierce, Weißkirchen) durchgeführt. Zu je 10 µl einer Proteinlösung werden 200 µl des BCA-Reagenz gegeben und die Ansätze für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Reaktionsprinzip dieser Nachweismethode basiert darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen reduzieren, die dann mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bilden. Die Menge dieses Farbstoffkomplexes wird bei 570 nm in einem Photometer bestimmt, wobei sich der lineare Messbereich von 0,2–1,4 mg Protein/ml erstreckt. Der zugehörige Extinktionskoeffizient wird mithilfe einer Kalibriergeraden mit BSA-Proteinstandards parallel zu jeder Messung ermittelt. Zu beachten ist, dass die Proteine frei von Reduktionsmitteln wie zum Beispiel größeren Mengen von Zuckern sein müssen, da die Messung sonst fehlerhaft ist.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgt durch die vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970).

Die Proteine werden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-Moleküle im Probenpuffer proportional zur Anzahl ihrer Aminosäuren mit negativen Ladungen besetzt, sodass sie in einem elektrischen Feld nach ihrer Ladung bzw. Größe aufgetrennt werden können.

Zur Auftrennung von Proteingemischen werden je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine Trenngele mit 7,5–15 % Polyacrylamidgehalt sowie ein Acrylamid/Bisacrylamid-Sammelgel von 3 % verwendet.

Zur Herstellung der SDS-PAGE-Gele werden die in Tab. 3 aufgeführten Lösungen für das Trenngel zusammenpipettiert, kurz gemischt, entgast und in eine Mini-Protean-II-Kammer (Bio-Rad, München) mit den Gelmaßen 80 x 55 x 0,75 mm gefüllt (bis zu ca. $\frac{3}{4}$ der Gelhöhe). Das Trenngel wird mit n-Butanol überschichtet und ca. 1 h polymerisiert. Anschließend wird das n-Butanol abgeschüttet, die Oberkante des Gels mit Wasser gespült und das Sammelgel bis zur oberen Kante der Gelkammern gegossen.

Die Gelkammer sollte luftblasenfrei eingesetzt werden. Nach der Auspolymerisation wird das Gel in die Pufferkammer gesetzt, Laufpuffer eingefüllt, der Kamm vorsichtig gezogen und die Taschen mit Laufpuffer gespült.

Die Proteinlösungen werden mit $\frac{1}{3}$ Volumen des 4-fach konzentrierten Laemmli-Probenpuffers versetzt und vor dem Auftrag auf das Gel 5 min bei 96 °C denaturiert. Das Probenvolumen beträgt maximal 25 µl pro Tasche und sollte eine Proteinmenge von 50 µg nicht überschreiten.

Die Elektrophorese erfolgt während des Einlaufens in das Sammelgel zunächst für etwas 15 min bei 20 mA. Die eigentliche Auftrennung beginnt mit Erreichen des Trenngels und wird für etwas 60 min bei 40 mA durchgeführt.

Tab. 3: Pipettierschema zur Herstellung eines SDS-PAGE-Gels.

Lösungen	Sammelgel 3 %	Trenngel		
		7,5 %	12,5 %	15 %
Acrylamid/Bisacrylamid (ml)	2,40	6,90	9,30	10,85
1 M Tris-HCl (pH 8,7) (ml)	–	7,50	7,50	7,50
1 M Tris-HCl (pH 6,8) (ml)	1,25	–	–	–
SDS (10 %) (ml)	0,10	0,10	0,10	0,10
ddH ₂ O (ml)	6,30	5,40	3,00	1,40
TEMED (µl)	25	70	70	70
APS (µl)	50	17	17	17

2.3.4 Western Blot

Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membranen

Um Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch nachweisen zu können, werden sie nach dem „Semi-dry“-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen transferriert. Das ungefärbte Polyacrylamid-Gel wird zunächst mit Blotpuffer äquilibriert, bevor der sogenannte „Blotsandwich“ wie folgt aufgebaut wird:

- ein Kunststoffschwamm
- 3 Lagen Whatman[®]-3MM-Filterpapier (getränkt in Blotpuffer)
- das äquilibrierte Gel
- eine Nitrozellulose-Membran (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg), getränkt in Blotpuffer
- 3 Lagen Whatman[®]-3MM-Filterpapier (getränkt in Blotpuffer)
- ein Kunststoffschwamm

Der Transfer erfolgt in einer Mini-Trans-Blot-Apparatur (Bio-Rad, München) für 60 min bei 400 mA auf Eis.

Ponceau-Färbung von Proteinen

Um den Erfolg des Proteintransfers auf die Membran zu überprüfen, kann die Membran mit Ponceau S (0,2 % [w/v] in 0,3 % [v/v] Trichloressigsäure) reversibel angefärbt werden. Das Färben erfolgt durch leichtes Schwenken der Membran für 1 min in Ponceau-Lösung. Durch 3-maliges Waschen in ddH₂O wird der Membranhintergrund entfärbt und die transferierten Proteine werden sichtbar. Jetzt können die Banden des Proteinmarkers mit einem Kugelschreiber auf der Membran markiert werden. Die Färbung der Proteine verschwindet durch Waschen in TBS.

Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Auf Nitrozellulose übertragene Proteine können indirekt durch enzymgekoppelte Antikörperreaktionen nachgewiesen werden. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran werden zunächst mindestens 1 h mit Blotto (5 % Magermilchpulver in PBS) geblockt. Danach wird die Membran mit einem Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist, für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Ungebundene Antikörper werden durch 3-maliges Waschen mit TBS-T für jeweils 10 min entfernt. Anschließend wird die Membran mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper aus einer anderen Spezies, der mit Peroxidase (POD) gekoppelt ist, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörper werden durch 3-maliges Waschen mit TBS-T für jeweils 10 min entfernt. Der Sekundärantikörper ist nun an den Primärantikörper gebunden. Die enzymatische Umsetzung eines luminogenen Substrates durch die Peroxidase führt an der Stelle, an der der Sekundärantikörper auf der Membran gebunden ist, zu einer Lichtemission, die mithilfe eines Röntgenfilms detektiert werden kann. Dazu wird die Membran für 1 min mit 4–8 ml frisch angesetztem ECL-Reagenz (1 Vol Lösung 1 + 1 Vol Lösung 2) überschichtet. Die überschüssige Lösung wird durch kurzes Auflegen eines Whatman[®]-3MM-Filterpapiers entfernt, die Membran in Folie eingehüllt und in einer Filmkassette fixiert. Die Exposition eines Röntgenfilms erfolgt für eine Dauer von 5 s bis 1 h.

2.4 Methoden zur Arbeit mit Hefezellen im Hefe-Zwei-Hybrid-System

2.4.1 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* wird nach etablierten Protokollen kultiviert (Guthrie und Fink 1991). Überdies werden die Empfehlungen des Yeast Protocols Handbook (BD Clontech, Heidelberg 2001) befolgt. Das Standard-Medium für den Hefestamm AH109 ist YPDA und für den Hefestamm Y187 YPD. Zur Selektion auf Auxotrophie-Marker wird SD-Medium verwendet, das den Selektionsbedingungen entsprechend durch Drop-out-Zusätze (BD Clontech, Heidelberg) und gegebenenfalls weitere Aminosäuren (Sigma) supplementiert ist. Zur Kultivierung auf festen Medien werden 2 % Bacto-Agar zugesetzt. Die Kultivierung in flüssigem Medium erfolgt unter Schütteln im Erlenmeyerkolben. Die Temperatur für die Kultivierung von Hefezellen beträgt 30 °C. Eine Lagerung der Hefe-Stämme auf Agar-Platten ist bei 4 °C für eine Dauer von bis zu zwei Monaten möglich. Für längere Lagerung werden die Hefen in 15 % (v/v) Glycerin bei –80 °C eingefroren.

2.4.2 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Für die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse wird das GAL4-basierende System von Clontech (Heidelberg) verwendet (Kap. 1.6). Es umfasst den *Bait*-Vektor pGBKT7 (*Trp*⁺), den *Prey*-Vektor pGADT7-Rec (*Leu*⁺) und die Hefestämme AH109 und Y187 (Reportergene dargestellt in Abb.4.).

Nach Transfektion von *Bait*- und *Prey*-Vektor in Y187 bzw. AH109 kann auf Expression und Interaktion der Fusionsproteine folgendermaßen selektioniert werden:

1. Selektion auf Expression des *Bait*-Proteins: Trp-freies Medium (SD/–T).
2. Selektion auf Expression des *Prey*-Proteins: Leu-freies Medium (SD/–L).
3. Selektion auf Interaktion von *Bait*- und *Prey*-Protein: His-, Ade-, Leu-, Trp-freie Medien (SD/–HALT).
4. Detektion auf Interaktion von *Bait*- und *Prey*-Protein: Hydrolyse von X-β-Gal bzw. X-α-Gal zu einem blauen Farbstoff.

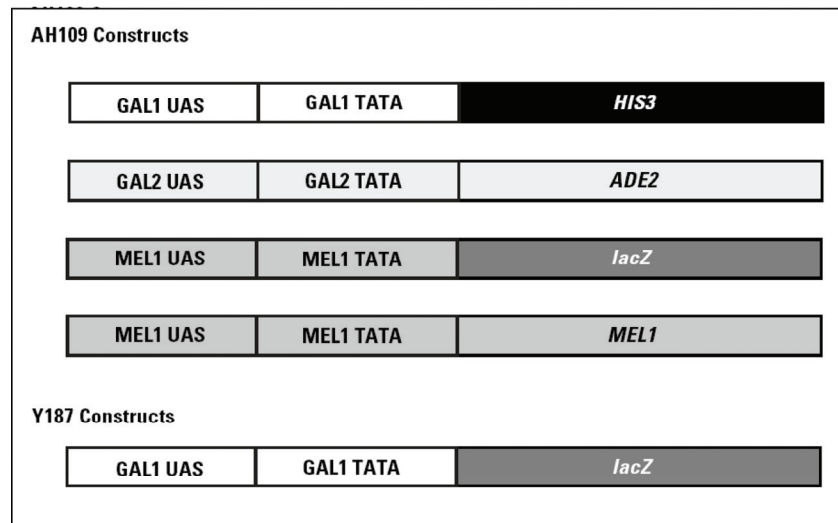


Abb. 4: Reportergenkonstrukte in *S. cerevisiae* AH109 und Y187 (nach MATCHMAKER Library Construction and Screening Kit User Manual).

2.4.3 Transformation von Hefezellen

Herstellung kompetenter Hefezellen

Für die Aufnahme von Fremd-DNA durch Hefezellen wird die Lithiumacetat-Methode (Gietz et al. 1992) verwendet. Dazu werden zunächst kompetente Zellen hergestellt. Dies sind Zellen, die fähig sind, Fremd-DNA aufzunehmen. Dafür wird eine Kolonie von Hefezellen (Y187 bzw. AH109, Clontech, Heidelberg) von einer YPD(A)-Agarplatte (2–3 mm im Durchmesser) in 1 ml YPD(A)-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird dann in einen 50 ml Erlenmyerkolben mit 25 ml YPD(A) überführt.

Die Kultur wird über Nacht bei 30 °C in einem Schüttler (250 rpm) inkubiert, bis die $A_{600} > 1$ beträgt. 150 ml frisches YPD(A) werden mit einer genügenden Menge Über-Nacht-Kultur beimpft, um eine A_{600} von 0,2 zu erreichen.

Die Zellen werden dann für 3–6 h wiederum bei 30 °C in einem Schüttler inkubiert, bis eine A_{600} von 0,5–0,6 erreicht wird. Danach werden die Zellen für 5 min mit 1000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert und das resultierende Zellsediment in 25 ml ddH₂O gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift werden die Zellen erneut zentrifugiert und anschließend in 750 ml frisch hergestelltem TE/LiAc resuspendiert.

Nach diesem Schritt sind die Hefen für die Transformation vorbereitet und können für einige Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden. Im Gegensatz zu *E. coli*-Zellen ist es nicht möglich, kompetente Hefezellen über einen längeren Zeitraum bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu lagern. Die kompetenten Hefezellen müssen vor jeder Transformation frisch hergestellt werden.

Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen

Es werden jeweils 0,1–0,5 μg Plasmid-DNA mit 50 μg Heringsperma-DNA gemischt. Diese sogenannte Carrier-DNA wird vorher für 20 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekocht und auf Eis abgekühlt.

Anschließend gibt man 50 μl der frisch hergestellten kompetenten Zellen zur DNA und mischt gut durch. Nach Hinzufügen von 300 μl einer frischen PEG/LiAc-Lösung vortext man kurz und inkubiert den Ansatz dann für 30 min bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln (200 rpm). Nach der Zugabe von 35 μl DMSO und vorsichtigem Durchmischen folgt ein Hitzeschock für 15 min bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad. Nach einer einminütigen Inkubation auf Eis werden die Ansätze 5 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellsediment in 250 μl TE-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden nun auf SD-Agarplatten mit den entsprechenden Aminosäuren ausgestrichen und für 3–7 Tage bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

2.4.4 Konstruktion einer murinen cDNA-Hirn-Bank

Erststrangsynthese der murinen Hirn-cDNA

Für die Erststrangsynthese werden 1 μl RNA (1 μg murine Poly-A⁺-RNA), 1 μl CDSIII/6-Primer (Random-Primer) und 2 μl ddH₂O in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis vereint. Die Probe wird zunächst 2 min bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Bei Raumtemperatur werden 2 μl 5 x First-strand-Puffer, 1 μl DTT (20 mM), 1 μl dNTP Mix (10 mM) und 1 μl Power Script Reverse Transkriptase zugegeben, gemischt, kurz abzentrifugiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Reaktionsgefäß wird 10 min auf $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Nach Zugabe von 1 μl SMART-III -Oligonukleotiden wird die Probe 1 h bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, danach 10 min auf $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und wieder auf Raumtemperatur abkühlen gelassen, anschließend erfolgt die Zugabe von 1 μl (1 μl = 2 Einheiten) RNase H. Die Erststrangsynthese endet nach einer 20-minütigen Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Erststrang-cDNA ist bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mind. drei Monate haltbar.

Bestimmung der optimalen Zyklenzahl für die Amplifikation der Einzelstrang-cDNA

In diesem Schritt wird die generierte Einzelstrang-cDNA (ss cDNA) durch PCR zu einer Doppelstrang-cDNA-amplifiziert. Um eine möglichst heterogene cDNA-Population zu erhalten, muss die optimale Zyklenzahl für die PCR ermittelt werden. Dazu wird mit den entsprechenden Komponenten eine Long-Distance-PCR durchgeführt. Nach den ersten 15 Zyklen wird nach der Abkühlung auf 4 °C ein 7 µl-Aliquot entnommen und auf Eis gestellt. Danach wird die Reaktion für weitere 3 Zyklen erneut gestartet, wobei die Probe solange auf Eis gehalten wird, bis die PCR-Maschine wieder eine Temperatur von 95 °C erreicht hat. Diese Prozedur (in 3-Zyklen-Schritten) wird bis zu einer Gesamtzyklenzahl von 30 wiederholt. Die Analyse der gesammelten 7 µl-Aliquots erfolgt auf einem 1%igen Agarosegel. Allgemein wird davon ausgegangen, dass durch eine geringere Anzahl von PCR-Zyklen weniger unspezifische PCR-Produkte amplifiziert werden.

Amplifizierung der cDNA durch Long-Distance-PCR

In einem PCR-Reaktionsgefäß werden 2 µl Erststrang-cDNA, 70 µl deionisiertes H₂O, 10 µl 10 x Advantage-2-PCR-Puffer, 2 µl 50 x dNTP Mix, 2 µl 5'-PCR-Primer, 2 µl 3'-PCR-Primer, 10 µl 10 x GC-Melt-Solution und 2 µl 50 x Advantage-2-Polymerase-Mix vereint, gut gemischt, herunterzentrifugiert und in den auf 95°C vorgeheizten PCR-Thermocycler gestellt. Denaturiert wird 30 s bei 95 °C, anschließend folgen 26 Zyklen mit je 10 s Denaturierung bei 95 °C, Annealen der Primer und Synthese bei 68 °C für 5 min, wobei sich die Annealingzeit pro Zyklus um 5 s verlängert. Die Synthese wird mit 5-minütiger Inkubation bei 68 °C beendet. Anschließend werden 7 µl des PCR-Produkts auf einem dünnen, 1,2%igen Agarose/EtBr-Gel analysiert. Aus dem restlichen Ansatz wird die amplifizierte ds cDNA über eine CHROMA SPIN+TE-400 Säule gereinigt, gefällt und bei -20 °C gelagert.

Transformation von AH109 mit ds cDNA und pGADT7-Rec-Vektor

Um mittels homologer Rekombination die ds cDNA in den Hefevektor einzubauen, werden in einem sterilen, vorgekühlten 15 ml-Falcon 20 µl ds cDNA mit 6 µl pGADT7-Rec (0,5 µg/µl) und 20 µl denaturierter Hering-Testes-Carrier-DNA vereint. Dazu gibt man 600 µl frisch hergestellte kompetente Hefezellen und mischt durch Vortexen. Nach Zugabe von 2,5 ml PEG/LiAc-Lösung wird erneut gevortext und der Transformationansatz 45 min bei 30 °C inkubiert. Alle 15 min werden die Zellen gevortext. Anschließend werden 160 µl DMSO zugegeben und gemischt. Hitzeschock erfolgt bei 42 °C im Wasserbad für 20 min, wobei die

Zellen alle 10 min gevortext werden. Die transformierten Zellen werden bei 700 x g und Raumtemperatur 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml YPD-Plus-Liquid-Medium (Clontech, Heidelberg) aufgenommen. Nach einer 90-minütigen Inkubation bei 30 °C im Schüttler wird erneut abzentrifugiert und das Pellet in 15 ml 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert. Die Hefezellen werden auf 100 SD/-Leu-Platten (150 mm) ausplattiert und bei 30 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar sind. Nach 3–4 Tagen werden die Kolonien geerntet. Dazu werden die Platten zunächst vier Stunden bei 4 °C gekühlt. Anschließend werden auf jede Platte 5 ml Freezing-Medium (YPD-Medium + 25 % Glycerin) gegeben und die Kolonien mit einem Spatel vorsichtig abgekratzt. Die Flüssigkeiten werden in einem sterilen Erlenmeyerkolben vereint und die Zelldichte gemessen. Die Zellen werden zu je 1 ml Aliquots (Zelldichte $> 2 \times 10^7$) in sterile 2 ml Reaktionsgefäße abgefüllt. Die erhaltene Bank ist bei –80 °C ein Jahr stabil.

Bestimmung der Transformationseffizienz der cDNA-Bank

Um die Größe der Bank zu bestimmen, werden jeweils 100 µl einer 1:100, 1:1.000 und einer 1:10.000 Verdünnung auf je 100 mm SD/-Leu-Platten ausgestrichen. Zur Berechnung der Colony-forming-Units (cfu)/ml wird die SD-Leu-Platte herausgesucht, bei der die Kolonien gut zu zählen sind. Sie wird nach folgender Formel berechnet:

Transformierte Klone/3 µg pGADT7-Rec = gezählte Koloniezahl x Verdünnungsfaktor

2.4.5 Kreuzung haploider Hefestämme (Mating)

Um die Fusionsproteine des mPcdh $\alpha 7$ auf mögliche Interaktionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System zu untersuchen, werden die *Bait*-Proteine durch Integration der entsprechenden Gensequenz in den Vektor pGBKT7 mit der GAL4-BD fusioniert und anschließend in Y 187 transformiert. Als *Prey* wird eine selbst hergestellte in AH109-Hefezellen eingebrachte cDNA-Bank (im pGADT7-*Prey*-Vektor) aus dem Hirn einer 14 Tage alten Maus verwendet (Kap.2.4.4).

Beim sogenannten „Mating“ macht man sich die Tatsache zunutze, dass haploide Hefezellen als zwei verschiedene Paarungstypen vorliegen können (Mat- α und Mat-a). Diese beiden Paarungstypen können unter entsprechenden Bedingungen zu einer diploiden Zygote verschmelzen, die ihrerseits wieder diploide Tochterzellen produziert. Wenn die beiden

Paarungstypen Träger unterschiedlicher Plasmide sind, enthält die diploide Zygote nach der Verschmelzung auch beide Plasmide der Ausgangszellen.

Der Hefestamm Y187 (Mat- α) wird zum einen mit dem Plasmid pGBKT7-mPcdh α 7-CPv, zum anderen mit dem Plasmid pGBKT7-mPcdh α 7-CPvc transformiert, während der Hefestamm AH109 (Mat-a) mit der sich im pGADT7-Rec-Vektor befindenden cDNA-Bank transformiert wird. Anschließend werden 45 ml einer YPDA-Lösung mit beiden Stämmen beimpft und für 20 h unter leichtem Schütteln (250–270 rpm) bei 30 °C inkubiert. Sind nach 20 h noch Zygoten zu erkennen, wird für weitere 4 h bei 30°C inkubiert. Anschließend werden die Hefen auf SD-Platten ausgestrichen, die kein Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin enthalten (SD/-HALT). Auf diesen Platten sind nur Hefen zu Wachstum befähigt, die eine Interaktion der beiden exprimierten Hybridproteine zeigen. Ebenfalls verwendet werden SD/-HALT-Platten, die mit AT versetzt sind, um ein eventuell auftretendes Hintergrundwachstum durch eine unzureichende Kontrolle der *HIS3*-Genaktivität zu verhindern. Parallel werden Kreuzungsansätze auf SD/-L, SD/-T und SD/-LT-Platten ausgestrichen, um den positiven Verlauf der Kreuzung zu bestätigen (und die Matingeffizienz zu bestimmen). Nach 3–7 Tagen Inkubation bei 30 °C sind die Hefen gewachsen.

Ermittlung der Matingeffizienz

Eine Suspension von 100 μ l der diploiden Hefezellen wird in einer Verdünnung von 1:10, 1:100 und 1:1000 jeweils auf SD/-T, SD/-L und SD/-LT-Selektionsagarplatten mit einem Durchmesser von 100 mm ausgestrichen. Die Platten werden bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar werden.

Zur Berechnung der in den jeweiligen Medium lebensfähigen Zellen pro ml wird für jedes Medium eine Platte herausgesucht, auf der sich zwischen 30 und 300 Kolonien befinden und ausgezählt.

Die Anzahl der lebensfähigen Klone (cfu) pro ml wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{cfu/ml} = \frac{\text{gezählte Koloniezahl}}{\text{Ausplattiertes Volumen (in ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Der Hefestamm, der die geringere Lebensfähigkeit hat, ist der limitierende Partner bei der Paarung. In diesem Versuch ist der Hefestamm AH109, der das Bankplasmid enthält, der limitierende Partner. Damit wird sichergestellt, dass eine maximale Anzahl von

Bankproteinen einen Matingpartner findet. Die Matingeffizienz errechnet sich aus nun aus folgender Formel:

$$\text{Matingeffizienz} = \frac{\text{cfu/ml der diploiden Hefeklone}}{\text{cfu/ml des limitierenden Partners}} \times 100\%$$

Schließlich kann mit folgender Formel eine Abschätzung der Anzahl der gescreenten Klone erfolgen:

$$\text{Anzahl der gescreenten Klone} = \text{cfu/ml der diploiden Hefeklone} \times \text{Zellsuspensionsvolumen } (\mu\text{l})$$

Nachweis von α -Galaktosidase

Das Produkt des dritten Reportergens (*MEL1*) des Hefestammes AH109 stellt die α -Galaktosidase dar.

Der qualitative Nachweis erfolgt mittels Bildung eines blauen Spaltproduktes (5-Brom-4-Chlor-3-Indol) beim enzymatischen Abbau von X- α -Gal durch sekretierte α -Galaktosidase (Schneider et al. 1996). Dazu werden die zu untersuchenden Hefeklone auf SD/-HALT-Platten ausgestrichen, die mit X- α -Gal (40 mg pro 1 Dropout-Lsg) versetzt waren. Positive Interaktionen zeigen sich in Kolonien, die auf diesen Platten blaues Wachstumsverhalten zeigen.

Herstellung von Dauerkulturen

Zur Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen werden 2 ml *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* sedimentiert und die Zellen in einen Milliliter des entsprechenden Mediums ohne Antibiotika aufgenommen. Nach Zugabe von 80 % Glycerin wird die Dauerkultur in ein Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Kulturen werden anschließend bei -70 °C gelagert und können bei Bedarf auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen werden.

2.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus diploiden Hefezellen ist nur in sehr geringen Ausbeuten und mit Verunreinigung genomischer DNA möglich. Außerdem liegen bei dieser Präparation sowohl *Bait*- als auch *Prey*-Plasmid vor. Deshalb liefert diese Methode Plasmid-DNA, die in einem weiteren Schritt (siehe Abschnitt 2.4.5) in Bakterien amplifiziert werden muss.

Diploide Zellen werden von den –HALT-Agarplatten gepickt, in 5 ml SD/–Leu-Medium resuspendiert und für 24 h bei 30 °C unter Schütteln (230 rpm) inkubiert. 3 ml der Kultur werden in ein Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 200 µl Hefe-Lysispuffer resuspendiert, mit 200 µl Phenol/Chloroform und 300 mg säuregewaschenen Glasperlen (ø 425–600 µm) gemischt und für 2 min kräftig durchmischt. Die Hefesuspension wird für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, anschließend wird die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Die Plasmid-DNA wird zweimal mit Ethanol gefällt und letztlich in 10 µl ddH₂O resuspendiert.

Hefe-Lysis-Puffer:

- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 1 mM EDTA
- 2 % Triton X-100
- 1 % Natriumdodecylsulfat

2.4.7 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA aus Hefezellen

Mit der aus Hefezellen isolierten Plasmid-DNA werden entsprechend der in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Elektroporationsmethode DH5α-*E. coli*-Zellen transformiert. Anschließend werden auf LB-Medium mit Ampicillin die Bakterien selektioniert, die das cDNA-Bank-Plasmid tragen (Ampicillin-Resistenz). Aus einzelnen Klonen wird Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und BamHI kontrolliert. Von den Kolonien mit eindeutigen Klonen wird die Plasmid-DNA mittels der Minipräparationsmethode isoliert. Zusätzlich wird von diesen Klonen jeweils eine *E. coli*-Dauerkultur angelegt.

2.4.8 Rescreen

Die positiven Klone werden zur Verifikation der Interaktion einem Rescreen unterzogen. Dabei wird die cDNA des vermuteten interagierenden, unbekanntes Proteins zusammen mit dem *Bait* in AH109 kotransformiert.

2.4.9 Sequenzanalyse der positiven Klone

Zur Identifizierung der einzelnen Inserts werden die mittels PCR amplifizierten Fragmente sequenziert und sowohl auf Nukleinsäureebene als auch auf Proteinebene mittels Datenbankvergleich untersucht. Zur Suche auf Nukleinsäureebene werden mit den Programmen BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und TBLASTN die Datenbanken Genbank, EST Division, EMBL, DDBJ und PDB durchsucht (Altschul et al. 1990). Während BLASTN möglichst schnell sehr ähnliche Sequenzen mit hoher Homologie erkennt, werden mit dem Programm TBLASTN ähnliche Sequenzen mit größeren Lücken ermittelt.

3 Ergebnisse

Die hier beschriebenen Ergebnisse lassen sich in sechs Abschnitte gliedern. Der erste Abschnitt befasst sich mit der Klonierung der murinen Protocadherine des α -Clusters (mPcdh α). Im zweiten Abschnitt wird die Herstellung der *Bait*-Konstrukte und im dritten Abschnitt deren Überprüfung beschrieben. Der vierte Abschnitt schildert die Konstruktion einer Positivkontrolle. Im fünften Abschnitt wird auf die Herstellung der *Preys* durch die Konstruktion einer murinen cDNA-Bank eingegangen. Der abschließende Abschnitt behandelt die Durchführung des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens und dessen Überprüfung durch einen Rescreen.

3.1 Klonierung von mPcdh α -cDNA

3.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Maushirn

Zur Klonierung der murinen Protocadherine des α -Clusters wurde als Ausgangsmaterial cDNA benutzt, die mithilfe der Reversen Transkriptase aus Maushirn mRNA hergestellt wurde. Dazu war eine möglichst sorgfältige Präparation von RNA aus dem entsprechenden Gewebe notwendig, um qualitativ und quantitativ gutes Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese zu gewinnen. Hierbei galt es, den Einfluss von RNasen durch entsprechende Maßnahmen gering zu halten (Kap.2.2.1) und einen möglichst hohen Anteil intakter mRNA-Moleküle zu gewinnen.

Nach der Homogenisierung eines frisch entnommenen Maushirns wurde nach der Trizol-Methode (Kap.2.2.1) Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde zur Qualitätskontrolle in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Abb. 5 zeigt ein repräsentatives Agarosegel, auf dem die hellen Banden der 28S- (4,5 kb) und 18S-rRNA (1,9 kb) deutlich zu erkennen sind, wobei die Intensität der 28S-rRNA entsprechend ihres größeren Molekulargewichts stärker ist als die der 18S-rRNA. Die gute Sichtbarkeit der beiden Banden und das Fehlen von Fragmentbanden sprechen für eine gute Qualität der Präparation. Aus den beiden Proben konnten 2,0 bzw. 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gesamt-RNA isoliert werden. Der Quotient A_{260}/A_{280} lag bei beiden Proben im Bereich von 1,8, was für die Reinheit der RNA spricht.

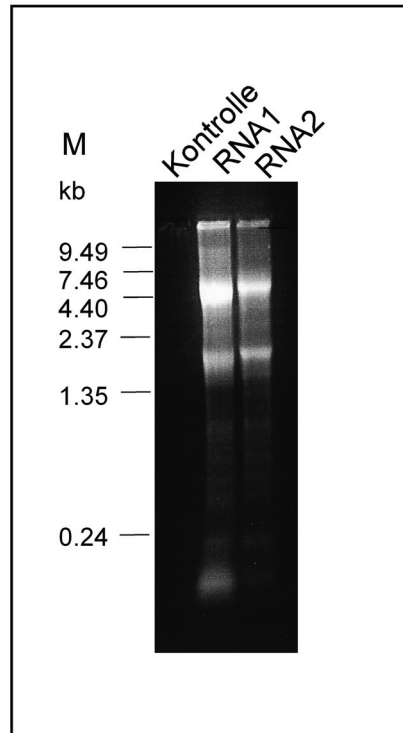


Abb. 5: Qualitätskontrolle der RNA-Präparation.

Ethidiumbromid gefärbtes, denaturierendes Agarosegel; aufgetragen sind jeweils 25 µg Gesamt-RNA präpariert aus zwei verschiedenen Maushirnen (RNA 1 und RNA 2), M: RNA-Längenstandard.

3.1.2 mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur mRNA-Isolierung das OligotexTM mRNA-Purifikationskit (Qiagen, Hilden) verwendet, mit dessen Hilfe die Abtrennung vor allem der in der Gesamt-RNA dominierenden ribosomalen RNA am besten realisiert werden konnte (Kap. 2.2.1). Hierbei macht man sich das Vorhandensein eines Poly-A⁺-Tails am 3'-Ende eukaryotischer mRNA zunutze, über den die mRNA durch Bindung an Poly-T⁺ der OligotexTM-Suspension leicht isoliert werden kann.

Für die Präparation der mRNA aus der Gesamt-RNA-Population des Maushirns wurden insgesamt 90 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Eine Konzentrationsbestimmung der erhaltenen mRNA erfolgte mithilfe der Spektralphotometrie (Kap. 2.2.3.) und ergab 3,2 µg mRNA. Dies entspricht einer Ausbeute von 3,5 %.

3.1.3 cDNA-Synthese aus mRNA mittels Reverser Transkriptase

Die gewonnene Poly-A⁺-RNA aus Maushirn wurde mithilfe der Reversen Transkriptase in Erststrang-cDNA umgeschrieben. Als Ausgangsmaterial diente 1 µg m-RNA aus Maushirn in

zwei getrennten Ansätzen. Als Kontrolle wurde parallel ein weiterer Ansatz mit 1 µg Poly-A⁺-RNA aus humaner Plazenta mitgeführt. Für das Experiment wurden Oligo-(dT)-Primer eingesetzt. Die cDNA wurde in den weiteren Versuchen als Template für verschiedene PCR-Amplifikationen verwendet.

3.1.4 Klonierung der mPcdh α

Zur Amplifizierung der mPcdh α wurden spezifische Primer generiert (Kap.2.2.2). Mithilfe dieser Primer und der in Kapitel 3.1.3 synthetisierten cDNA aus Maushirn wurde zunächst nur ein Protocadherin (mPcdh α 7) mittels PCR amplifiziert, um optimale Bedingungen bei der PCR zu erreichen.

Abb. 6 zeigt das gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkt auf dem Gradientencycler in der erwarteten Größe (2,8 kb) bei verschiedenen Annealingtemperaturen. Mit zunehmender Temperatur nahm die Spezifität zunächst zu, wobei sich bei einer Annealingtemperatur von 67,9 °C (Probe 9) ein Produkt mit den geringsten Nebenbanden ergab. Bei einer Annealingtemperatur ab 70,1 °C (Probe 10) war ein deutlich schwächeres PCR-Produkt zu sehen und ab 71,5 °C (Probe 11 und 12) war fast kein Produkt mehr im Gel zu detektieren.

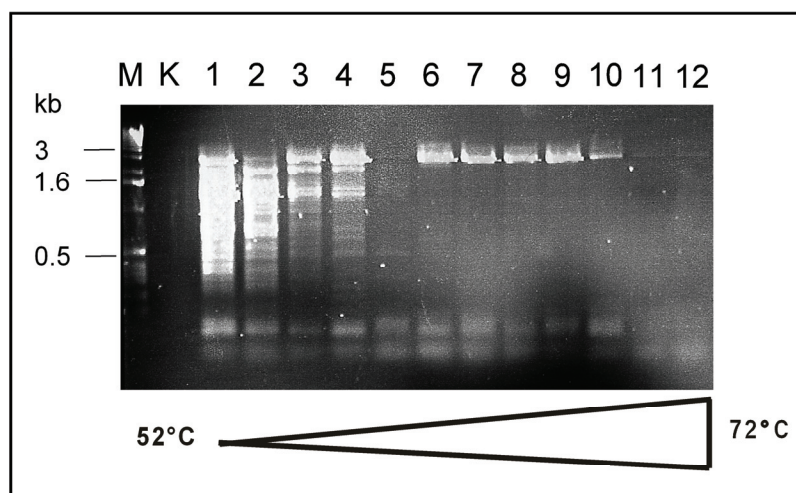


Abb. 6: PCR-Produkte des mPcdh α 7.

Das Bild zeigt ein 1,2%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel. Mittels PCR wurde das gesamte mPcdh α 7 amplifiziert. Die PCR wurde bei 12 verschiedenen Annealingtemperaturen (50°–72°C, Proben 1–12) durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne cDNA-Template. Aufgetragen wurde jeweils der gesamte PCR-Ansatz (20 µl). **K**: Kontrolle; **M**: DNA-Längensstandard, **1–12**: PCR-Produkt des mPcdh α 7 bei verschiedenen Annealingtemperaturen

Das PCR-Produkt aus Probe 9 wurde aus dem Gel isoliert und in einen TOPO-Expressionsvektor für Blunt-end-PCR-Produkte (pCR4Blunt-Vektor) ligiert, da für die Amplifikation die DNA-Polymerase PFU verwendet worden war. Anschließend erfolgte eine Transformation von *E.coli*-Zellen mit dem erhaltenen Vektor.

Die Zellen wurden auf Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen. Mehrere Klone wurden gepickt, in Über-Nacht-Kulturen angezogen und zur Plasmidisolierung eingesetzt (Minipräp). Die erhaltene Vektor-DNA wurde mittels Restriktionsanalysen überprüft.

Abb. 7 zeigt 7 Klone nach einem Restriktionsverdau mit *EcoRI*. Dieses Enzym schneidet das Insert aus dem TOPO-Vektor und schneidet es zusätzlich bei 0,35 kb, sodass aus dem Insert zwei Fragmente von 2,8 und 0,35 kb entstehen.

Demnach besaß ein Klon kein Insert, zwei andere enthielten Inserts, deren Länge nicht dem erwarteten Produkt entsprach. Die Klone 2, 3 und 6 erschienen nach dem *EcoRI*-Verdau korrekt und wurden durch eine bidirektionale Sequenzierung überprüft, um eventuelle Mutationen, die durch die PCR entstehen können, auszuschließen.

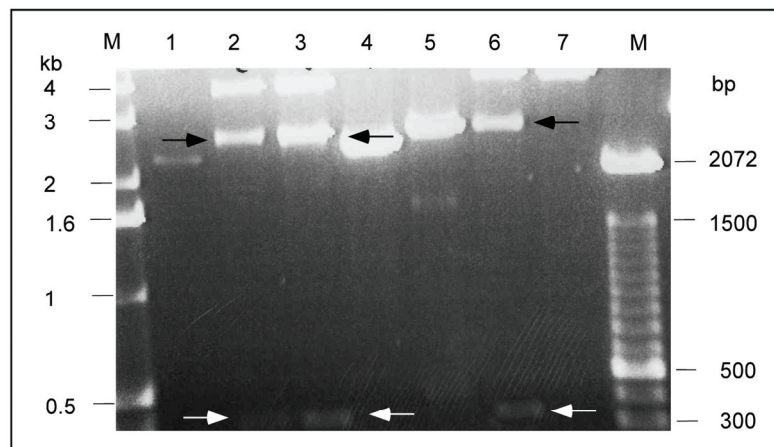


Abb. 7: Restriktionsanalysen mit *EcoRI* einzelner Klone des mPcdh $\alpha 7$ im TOPO®-BLUNT-Vektor.

Das Bild zeigt ein 1%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel. Aufgetrennt wurde die mit *EcoRI* geschnittene Plasmid-DNA von 7 Klonen des mPcdh $\alpha 7$ im TOPO-BLUNT-Vektor. Probe 2, 3 und 6 (Pfeile) beinhalten ein Insert in der zu erwartenden Größe. M: DNA-Längenstandard, 1–7: Restriktionsanalysen

Nach dem gleichen Prinzip wurden die restlichen α -Protocadherine (mPcdh- $\alpha 1$ –12, außer - $\alpha 7$) kloniert. Abb. 8 zeigt die gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikate.

In allen Ansätzen – außer für mPcdh- α 6 und - α 8 – sind DNA-Banden der erwarteten Größe (2,8 kb) zu erkennen. Die entsprechenden Banden wurden analog zu mPcdh- α 7 (s.o.) aus dem Gel isoliert und die erhaltenen PCR-Produkte kloniert.

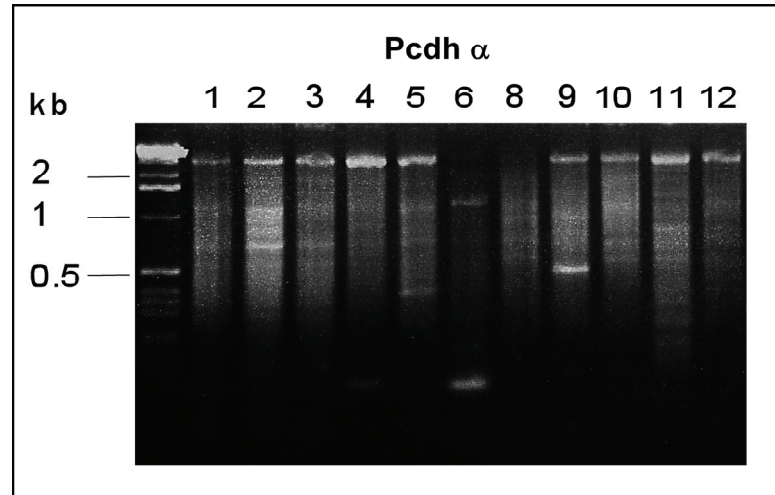


Abb. 8: PCR-Amplifikation der cDNAs der mPcdh α 1–12 (Ausnahme mPcdh α 7).

Das Bild zeigt ein 1,2%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel. Aufgetragen wurde jeweils der gesamte PCR-Ansatz (20 μ l). **K**: Kontrolle, **M**: DNA-Längenstandard, **1–12**: mPcdh α 1 bis 12.

3.2 Herstellung der *Bait*-Konstrukte CPv, CPc und CPvc für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

3.2.1 Etablierung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Die MatchmakerTM-Hefe-Zwei-Hybrid-Systeme der Fa. Clontech (Heidelberg) basieren auf dem Hefetranskriptionsfaktor GAL4 (Abb. 9). Zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen (im Rahmen dieser Arbeit Interaktionen mit dem zytoplasmatischen Anteil von mPcdh α 7) werden zwei Fusionsproteine, *Bait* (Köder) und *Prey* (Beute), in Hefezellen exprimiert.

Das *Bait*-Konstrukt besteht aus der GAL4-Bindungsdomäne (GAL4-BD), wird durch den *Bait*-Vektor pGBKT7 (*Trp1*+) kodiert und mit cDNA-Sequenzen des mPcdh α 7, die den zytoplasmatischen Abschnitt kodieren, fusioniert. Die DNA-Bindungsdomäne erkennt die Upstream-activating-Sequence (UAS) stromaufwärts der GAL4 kontrollierten Gene.

Für die *Prey*-Konstrukte wurde eine cDNA-Bank aus Maushirn hergestellt und die zufälligen cDNA-Sequenzen mit dem pGADT7-Rekombinationsvektor (*Leu2+*) fusioniert, der die GAL4-AD enthält.

Die Aktivierungsdomäne interagiert mit Komponenten des RNA-Polymerase-II-Komplexes und induziert in der Folge die Transkription dieser Gene, wenn GAL4-DNA-BD und GAL4-AD in räumliche Nähe gebracht werden.

In das Genom der verwendeten Hefezellen (Y187 und AH109) sind DNA-Abschnitte integriert, bei denen hinter einer GAL4-Upstream-activating-Sequence (UAS-GAL4) bestimmte Reportergene lokalisiert sind. Da den Zellen der intakte GAL4-Transkriptionsfaktor fehlt, können die Reportergene ausschließlich durch eine Rekonstruktion des vollständigen GAL4-Moleküls aktiviert werden. Eine solche Rekonstruktion findet in der Regel nur dann statt, wenn *Bait* und *Prey* miteinander reagieren.

Im Falle des hier genutzten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems werden die Hefestämme AH109 und Y187 benutzt. Die vier Reportergene des Hefestammes AH109 sind *ADE2*, *HIS3*, *LacZ* und *MEL1*, Y187 besitzt *LacZ* (Abb.4). Das Genprodukt von *ADE2* ist ein Enzym des Adenin-Synthese-Wegs und *HIS3* eines der Histidin-Biosynthese. Bei Aktivierung dieser Reporter durch Interaktion von Köder- und Beuteprotein wird die Auxotrophie des Hefestammes AH109 für Adenin und Histidin komplementiert. *LacZ* ist eine β -Galaktosidase und *MEL1* eine α -Galaktosidase. Im Falle einer Interaktion sind sie in der Lage, X- β -Gal bzw. X- α -Gal durch Hydrolyse in einen blauen Farbstoff umzuwandeln.

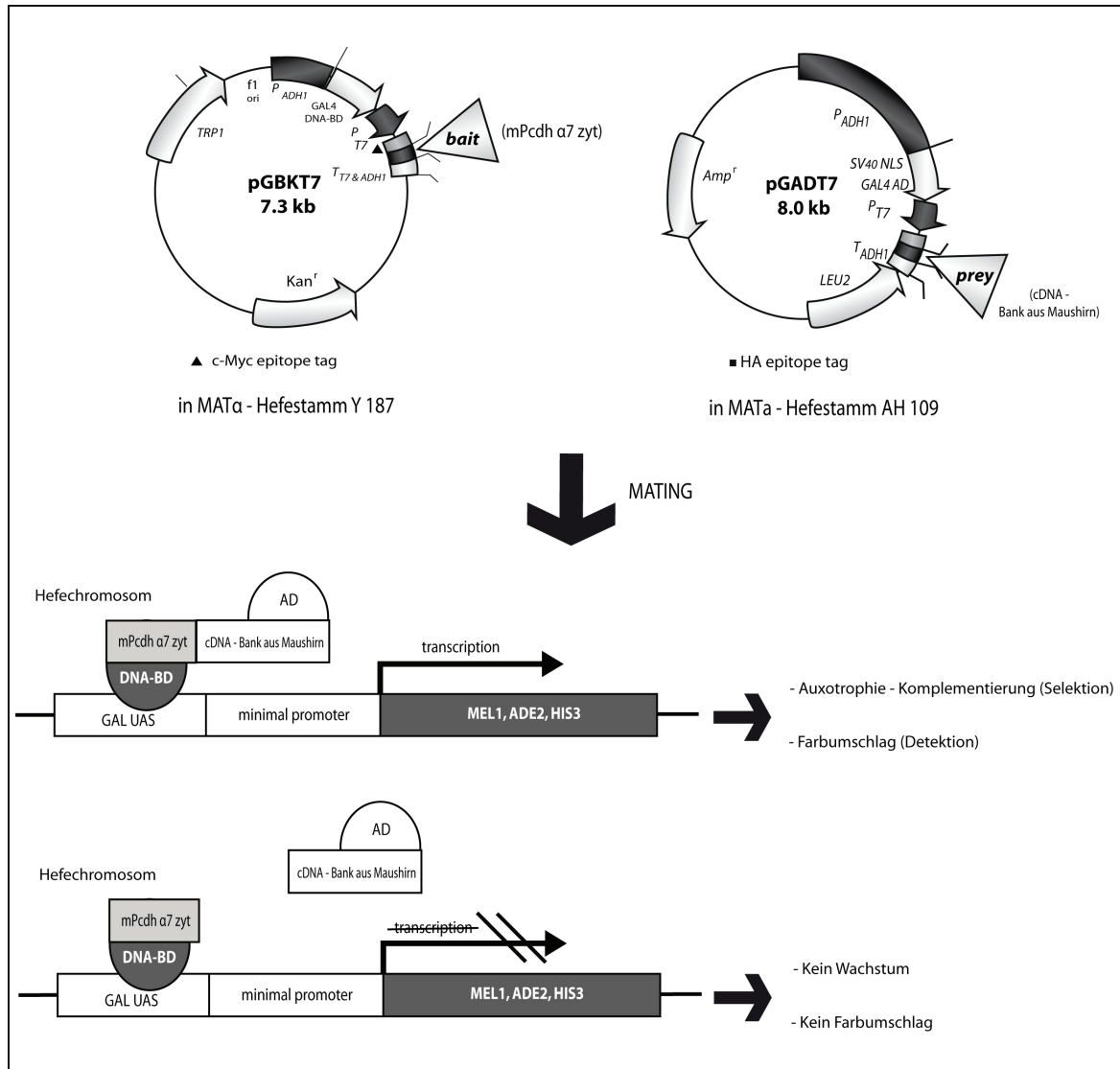


Abb. 9: Hefe-Zwei-Hybrid-System.

Das System besteht aus drei Komponenten in geeigneten Hefestämmen (AH109, Y187). Zwei Plasmide kodieren für Fusionsproteine mit der GAL4-DNA-bindenden Domäne (*Bait*) bzw. der GAL4-transaktivierenden Domäne (*Prey*). Im Falle einer Interaktion der Fusionsanteile wird im Zellkern ein Reportergen aktiviert, das im Hefegenom stabil integriert ist. Die Expression des/der Reportergene führt zu einer Komplementierung einer Auxotrophie und/oder zur Bildung eines kolorimetrisch messbaren Chromophors.

3.2.2 Subklonierung der mPcdh $\alpha 7$ -CP-Fragmente in den GAL4-BD-Vektor (pGBKT7)

Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner wurden die zu untersuchenden Proteine bzw. Proteindomänen (*Bait*-Proteine) C-terminal an die DNA-bindende Domäne (DNA-BD)

von GAL4 fusioniert. Dazu wurde der Vektor pGBKT7 (BD Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit, Clontech, Heidelberg) verwendet, der in Abb. 10 dargestellt ist.

Nach der Transformation werden die durch den ADH1-Promotor (PADH1) regulierten Fusionsproteine konstitutiv exprimiert. Die Transkription wird an den TT7- und ADH1-Stoppssignalen beendet (TT7&ADH1). Der Vektor kodiert außerdem für einen zwischen den beiden Fusionsanteilen gelegenen c-Myc-Tag, der eine leichte Detektion der Fusionsproteine durch α -Myc-Antikörper ermöglicht. pGBKT7 repliziert sich unabhängig in *E. coli* sowie in Hefezellen und enthält für die Selektion in *E. coli* ein Kanamycin-Resistenzgen und für die Selektion in Hefezellen ein *TRP1*-Gen.

Der Polylinker enthält singuläre Restriktionsschnittstellen, die genutzt werden können, um die *Bait*-DNA im gleichen Leserahmen zu insertieren. Zur Konstruktion der Fusionsproteine aus der GAL4-DNA-BD und der zytoplasmatischen Domäne des mPcdh $\alpha 7$ wurden die EcoRI und die PstI Restriktionsschnittstellen verwendet.

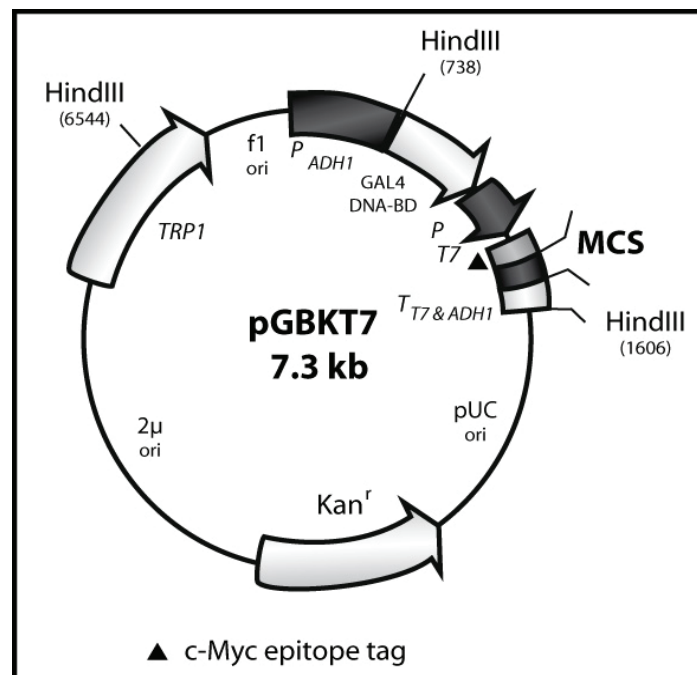


Abb. 10: Schematische Darstellung des *Bait*-Vektors pGBKT7.

MCS: Multiple Cloning Site, **Kan^r:** Kanamycin-Resistenzgen, **pUC ori:** Replikationsursprung, **PADH1:** trunkierter ADH1-Promoter, **PT7:** T7-RNA-Polymerase-Promoter, **TT7&ADH1:** Transkriptionsterminationssignale, **TRP1:** Tryptophan-Gen, **GAL4 DNA-BD:** GAL4-DNA-bindendes Polypeptid, **HindIII:** Schnittstelle des Restriktionsenzym HindIII.

Wie schon in Kapitel 1.4.1 erwähnt, besteht der zytoplasmatische Teil der Protocadherine aus einem konstanten und einem variablen Anteil. Ziel dieser Arbeit war es daher u.a., definierte Abschnitte der zytoplasmatischen Domäne des mPcdh $\alpha 7$ als *Bait*-Fusionskonstrukte für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen herzustellen. Dazu wurden spezifische Primer verwendet, die es ermöglichten, drei verschiedene Abschnitte mittels PCR aus dem zuerst klonierten mPcdh $\alpha 7$ (Kap. 3.1.4) zu amplifizieren. Diese drei Abschnitte repräsentieren also jeweils unterschiedliche Anteile der zytoplasmatischen Domäne. So repräsentiert CPv (AS 718–785) den variablen, CPc (AS 785-930) den konstanten und CPvc (AS 718-930) den gesamten zytoplasmatischen Anteil des mPcdh $\alpha 7$.

Abb. 11 verdeutlicht die Lage der Primer. Die Primer enthalten Restriktionsschnittstellen für EcoRI und PstI, die eine gerichtete Insertion des PCR-Produktes in die Multiple Cloning Site des Expressionsvektors pGBKT7 (GAL4-BD-Vektor) ermöglicht.

Abb. 12 zeigt schematisch die hergestellten Konstrukte, die als *Bait* in der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse verwendet wurden. Nach Optimierung der PCR-Bedingungen (Annealingtemperatur 58 °C) wurden die PCR-Produkte aus dem Gel isoliert, aufgereinigt, mit EcoRI und PstI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen verdauten und über eine Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigten Expressionsvektoren pGBKT7 ligiert. Die erhaltenen Vektoren wurden in *E. coli* kloniert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Von jedem Vektor wurden die Inserts und die flankierenden Regionen mehrerer Klone vollständig bidirektional sequenziert. Nur Klone ohne Mutationen und mit einem durchgängigen Leseraster wurden für die weiteren Arbeiten eingesetzt.

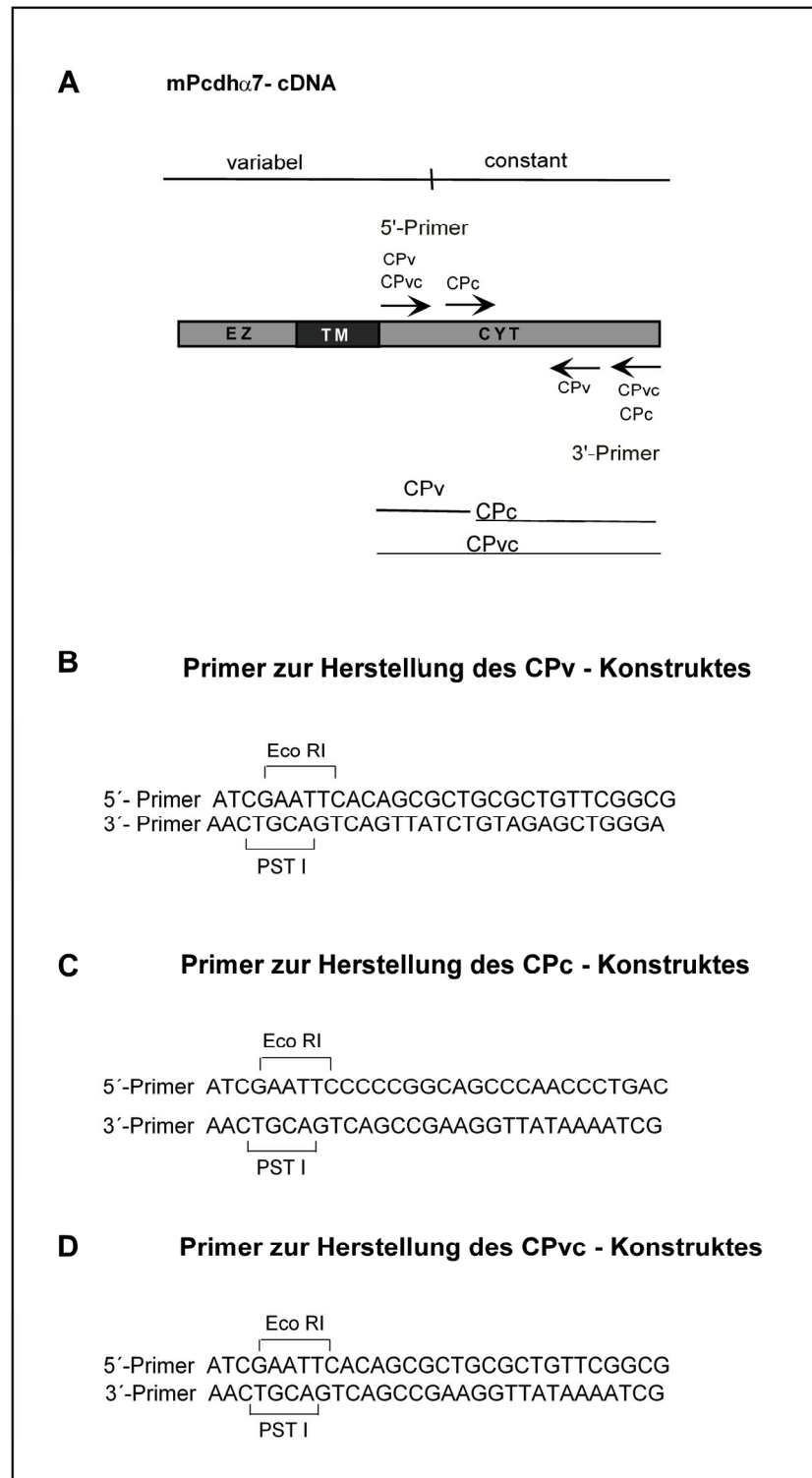


Abb. 11 A–D: Primer zur Herstellung der *Bait*-Konstrukte für einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen.

A: Schema zur PCR-gestützten Amplifikation von drei verschiedenen Abschnitten des cytoplasmatischen Anteils des mPcdh α 7 (**EZ**: extrazellulär, **TM**: transmembranös, **CYT**: zytoplasmatisch).

B: Primer zur Herstellung des CPv-Produktes.

C: Primer zur Herstellung des CPc-Produktes.

D: Primer zur Herstellung des CPvc-Produktes.

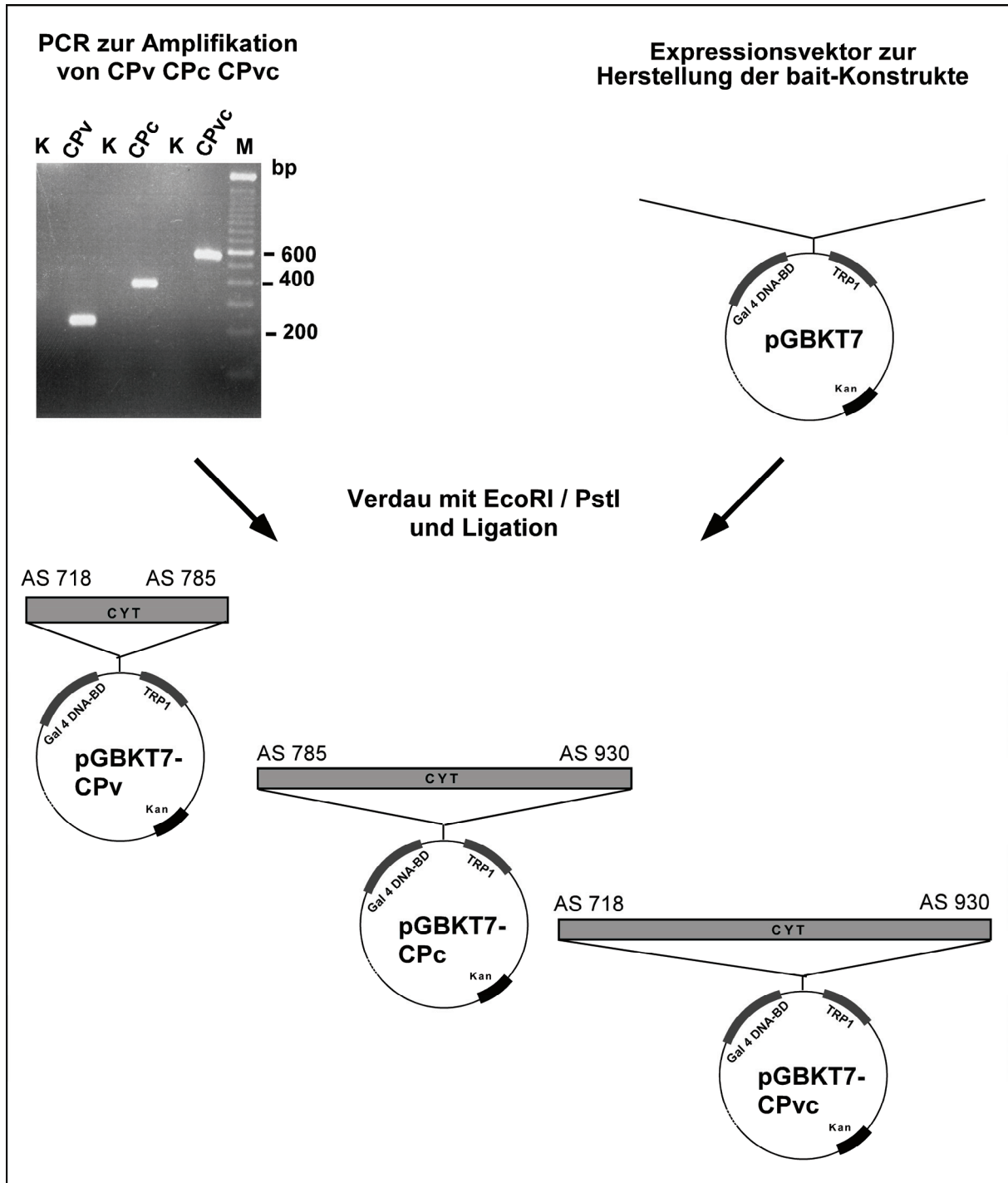


Abb. 12: Herstellung der *Bait*-Konstrukte.

Mittels PCR wurden drei verschiedene Anteile der zytoplasmatischen Domäne des mPcdh $\alpha 7$ amplifiziert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne cDNA-Templates (analytisches Agarosegel; **M**: DNA-Längenstandard; **K**: Kontrolle).

Die PCR-Produkte wurden mit EcoRI und PstI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Expressionsvektor pGBKT7 ligiert.

3.3 Vorversuche (Überprüfung der Hefestämme und der Fusionskonstrukte)

In Vorversuchen wurde nun das Verhalten der mPcdh α 7-cyt-Fusionsproteine (CPv; CPc; CPvc) in Hefezellen (Y187 und AH109) durch eine Serie von Kontrollexperimenten charakterisiert. Es musste gezeigt werden, dass die Fusionsproteine stabil exprimiert werden, dass sie fähig sind, in den Kern einzudringen, und dass sie an den GAL4-Operator binden können. Es durfte des Weiteren keine unspezifische oder vorzeitige Transkriptionsaktivierung der Reporterplasmide erfolgen (Ausubel et al. 1995).

3.3.1 Expression der Fusionsproteine in Hefe

Die stabile Expression des jeweiligen Fusionsproteins in Hefezellen wurde mittels Western Blot (Kap. 2.3) überprüft. Dazu wurden Hefezellen (Y187) mit den drei verschiedenen Konstrukten transformiert und unter Selektionsdruck (Tryptophanmangel) kultiviert.

Nach 3 Tagen wurden die Hefezellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Jeweils 20 μ g Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Durch Anfärbung der Proteine mit Ponceau-Lösung wurde der Transfer überprüft (Kap.2.3.3). Die aufgetrennten Proteine wurden im nachfolgend durchgeführten Western Blot mit Antikörpern gefärbt, die gegen die DNA-BD-Domäne des Hefe-GAL4-Transkriptionsfaktors (α GAL4-DNA-BD, Clontech, Heidelberg) gerichtet waren (Abb. 13).

Zur Kontrolle wurden zusätzlich Proteinextrakte des untransfizierten Hefestammes Y187 (Negativkontrolle = Spur 1) und des mit dem „leeren“ pGBKT7-Vektor transfizierten Hefestammes (Positivkontrolle = Spur 2) aufgetragen. Letzterer kodiert für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne und den Linkerbereich. Das Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 19 kDa. Entsprechend größer fallen die Signale bei den Fusionsproteinen aus. Man erkennt wie erwartet bei CPv eine Bande bei 31 kDa (Spur 3), bei CPc eine Bande bei 38 kDa (Spur 4) und bei CPvc eine Bande bei 41 kDa (Spur 5). Die Expression aller drei Fusionsproteine kann also bestätigt werden.

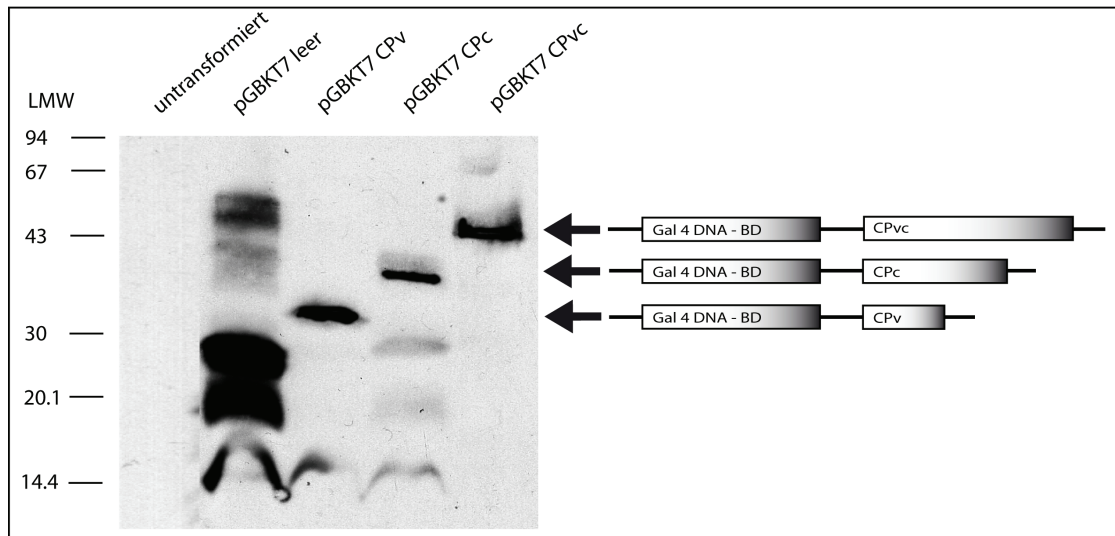


Abb. 13: Expression der *Bait*-Fusionsproteine aus CPv, CPc und CPvc und der DNA-bindenden Domäne von GAL4 in Hefezellen (Y187).

Der Nachweis des rekombinanten Proteins erfolgt im Western Blot mit einem GAL4-DNA-BD-Primärantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Rabbit Anti Mouse); pro Spur wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Spur 1: Negativkontrolle = untransformierte Hefe

Spur 2: Positivkontrolle = Hefe transformiert mit pGBKT7 leer

Spur 3: Fusionskonstrukt CPv

Spur 4: Fusionskonstrukt CPc

Spur 5: Fusionskonstrukt CPvc

LMW: Marker

3.3.2 Überprüfung der Hefestämme und Etablierung einer Positiv- und Negativkontrolle

Um sicherzugehen, dass es in den verwendeten Hefestämmen Y187 und AH109 zu keiner Mutation oder Verunreinigung durch andere Laborstämme oder Wildtyphefen gekommen ist, wurde in regelmäßigen Abständen deren Phänotyp überprüft.

Dazu wurden die Hefen auf diversen Mangelmedien ausplattiert und ihr Wachstum beobachtet.

Tab 4 beschreibt das beobachtete Wachstumsverhalten der beiden Hefestämme auf den verschiedenen Mangelmedien.

Tab. 4: Typisierung der verwendeten Hefestämme durch ihr Wachstum.

Stamm	Mangelmedium						Vollmedium
	– Ade	– Met	– Trp	– Leu	– His	– Ura	YPDA
AH109	–	+	–	–	–	+	+
Y187	–	–	–	–	–	+	+

(–) kein Wachstum, (+) Wachstum

Um das System des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nun zu kontrollieren, wurde auf die von der Firma Clontech (Heidelberg) mitgelieferten Positiv- und Negativkontrollen zurückgegriffen und diese in allen weiteren Versuchen nach einer ersten Überprüfung mitgeführt.

Dabei handelt es sich bei der Positivkontrolle zum einen um den pGBKT7-53-Vektor, der für ein Fusionsprotein aus dem GAL4-DNA-BD-Vektor und dem murinen p53 kodiert. Zum anderen wurde der pGADT7-T-Vektor verwendet, der für ein Fusionsprotein aus dem GAL4-AD-Vektor und dem SV40-Large-T-Antigen kodiert. Bekanntlich bindet das Tumor-Suppressor-Gen p53 an Produkte verschiedener Onkogene, einschließlich des hier verwendeten SV40-Large-T-Antigens und eignet sich damit als Positivkontrolle für das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Li and Fields 1993; Iwabuchi et al. 1993).

Bei der Negativkontrolle handelt es sich um das schon beschriebene pGADT7-T-Konstrukt sowie das pGBKT7-Lam-Konstrukt. Dieses kodiert für das Fusionsprotein aus der GAL4-DNA-BD und dem humanen Lamin C. Humanes Lamin C formt keine Komplexe und interagiert praktisch nicht mit anderen Proteinen, so auch nicht mit dem SV40-Large-T-Antigen. Es eignet sich somit als Negativkontrolle für das Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (Bartel et al. 1993b; Ye and Worman 1995).

Für die Vorversuche wurden die verschiedenen Konstrukte in dem Hefestamm AH109 koexprimiert. Dieser Hefestamm ist auxotroph für die Biosynthese von Trp (T), Leu (L), Ade (A) und His (H).

Zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation wurden die Hefezellen auf SD/-LT-Platten ausgestrichen. Nur doppelt transformierte Hefen konnten auf diesem Mangelmedien wachsen, da pGBKT7 den Selektionsmarker für die Tryptophansynthese und pGADT7 den Selektionsmarker für die Leucinsynthese trägt.

In einem weiteren Schritt wurden die Hefen auf SD/-HALT ausgestrichen. Durch die interagierenden Proteine p53 und SV40-Large-T wurde die DNA-BD in räumlicher Nähe zur DNA-AD gebracht, wodurch die Hefeklonen auf Histidin- bzw. Adenin-freien Nährböden wachsen konnten. Tab. 5 veranschaulicht die erwarteten und in diesem Kontrollexperiment nachgewiesenen Ergebnisse.

Tab. 5: Wachstumsverhalten von AH109 nach Transformation mit der Positiv- (pGBKT7 – 53 + pGADT7-SV40) und Negativkontrolle (pGBKT7-LAM C + pGADT7-SV40).

Transformation in Hefe (AH109)	Erwartetes/gemessenes Wachstum auf			
	SD/-T	SD/-L	SD/-LT	SD/-HALT
Hefe allein	-/-	-/-	-/-	-/-
Leervektor pGBKT7	+/+	-/-	-/-	-/-
pGBKT7-53	+/+	-/-	-/-	-/-
pGADT7-SV40	-/-	+/+	-/-	-/-
Positivkontrolle	+/+	+/+	+/+	+/+
pGBKT7-LAM C	+/+	-/-	-/-	-/-
Negativkontrolle	+/+	+/+	+/+	-/-

+ = Wachstum; - = kein Wachstum

3.3.3 Kontrolle der drei Pcdh-CP-Bait-Konstrukte auf direkte Transkriptionsaktivierung

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob die fusionierten *Bait*-Konstrukte nicht direkt aktivierend sind, d.h. die Transkription der Reportergene ohne eine an sie bindende GAL4-Aktivierungsdomäne initiieren.

Dafür wurden in einem ersten Experiment die drei in Kapitel 3.2.2 beschriebenen *Bait*-Konstrukte (CPv, CPc und CPvc) in einer Einfach-Transformation im Hefestamm AH109 exprimiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation wurden die Hefezellen auf SD/-T-Platten ausgestrichen. Nur Hefezellen, die erfolgreich mit dem pGBKT7-Vektor (Trp 1+) transformiert worden sind, konnten auf diesem Mangelmedien wachsen.

In einem weiteren Schritt wurden die Hefezellen auf SD/-HAT ausgestrichen. Tab. 6 zeigt das erwartete und gemessene Wachstumsverhalten. Keines der drei *Bait*-Konstrukte war also in der Lage, eine Transkription der Reportergene zu initiieren. Somit liegt keine Autoaktivität vor.

Tab. 6: Erwartetes Wachstumsverhalten von AH109 mit den *Bait*-Konstrukten CPv, CPc und CPvc zwecks Kontrolle einer Autoaktivität.

Transformation in Hefe (AH109)	Erwartetes/gemessenes Wachstum auf	
	SD/-T	SD/-HAT
pGBKT7-CPv	+/+	-/-
pGBKT7-CPc	+/+	-/-
pGBKT7-CPvc	+/+	-/-
Positivkontrolle	+/+	+/+
Negativkontrolle	+/+	-/-

+ = Wachstum; - = kein Wachstum

3.3.4 Ausschluss einer Dimerisierung der zytoplasmatischen Domäne des Pcdh $\alpha 7$

Herstellung von *Prey*-Konstrukten (AD-Vektor) mit der zytoplasmatischen Domäne der α -Pcdh

Zum Ausschluss einer möglichen Dimerisierung oder des Vorhandenseins von „Sticky Ends“ wurde in einem weiteren Versuch eine mögliche Interaktion der zytoplasmatischen Domäne der α -Pcdh mit sich selbst untersucht.

Dazu war es notwendig, neben den schon existierenden *Bait*-Konstrukten *Prey*-Konstrukte herzustellen, indem CPv, CPc und CPvc als C-terminale Fusion an die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) von GAL4 fusioniert wurden. Dazu wurde der Vektor pGAD424 (Bartel et al., 1993a) verwendet (Abb. 14).

Analog zum *Bait*-Vektor werden auch hier die Fusionsproteine von einem konstitutiven ADH-Promotor exprimiert. Ebenfalls enthält er einen Polylinker (Multiple Cloning Site [MCS]) mit singulären Restriktionsschnittstellen, die genutzt werden, um die *Prey*-DNA im gleichen Leserahmen zu insertieren. pGAD424 repliziert sich unabhängig in *E. coli* sowie in Hefezellen und enthält für die Selektion in *E. coli* ein Ampicillin-Resistenzgen bzw. für die Selektion in Hefezellen ein *LEU2*-Gen.

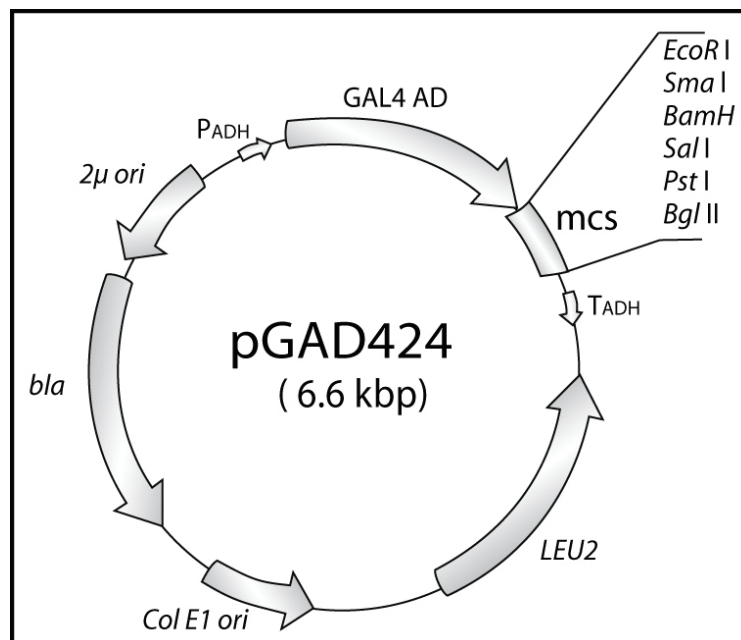


Abb. 14: Schematische Darstellung des *Prey*-Vektors pGAD424.

MCS: Multiple Cloning Site, bla: Ampicillin-Resistenzgen, 2μ ori: Replikationsursprung, PADH: trunkierter ADH-Promoter, LEU2: Leucin-Gen, GAL4-AD: GAL4-Aktivierungsdomäne.

Zur Herstellung der *Prey*-Konstrukte wurden analog zur Herstellung der *Bait*-Konstrukte (Kapitel 3.2) die PCR-Produkte der drei Anteile des zytoplasmatischen Teils mit dem pGAD424-Vektor ligiert. Die erhaltenen Vektoren wurden in *E. coli* kloniert, mittels Restriktionsanalysen überprüft und Mutationen durch bidirektionale Sequenzierung ausgeschlossen.

Messung der Interaktion von *Bait*- und *Prey*-Vektoren mit Anteilen der α -Pcdh-CP-Domäne

Zur Messung einer möglichen homotypischen Interaktion der α -Pcdh-CP-Domänen im Sinne einer Dimerisierung wurden Hefezellen (AH109) mit dem *Bait*- und dem *Prey*-Vektor kotransformiert (Tab. 7).

Analog zu den bereits beschriebenen Versuchen wurden sie zunächst zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation auf SD/-LT-Platten ausgestrichen. Nur Hefezellen, die den pGBKT7-Vektor (*TRP1*+) und den pGAD424 (*LEU2*+) enthielten, konnten auf diesem Mangelmedium wachsen.

Für das eigentliche Experiment wurden die Hefen nun auf SD/-HALT ausgestrichen. Im Falle einer Protein-Protein-Interaktion wären diese Hefezellen fähig, auf Adenin- und Histidin-freien Nährböden zu wachsen. Tab.7 zeigt das erwartete und das gemessene Wachstumsverhalten.

Überraschenderweise zeigte das CPc-Konstrukt im *Bait*-Vektor (pGBKT7-CPc) in allen Kombinationen mit den anderen *Prey*-Konstrukten Wachstum, auch gegen den *Prey*-Leervektor (Abb. 15). Da die vorangegangenen Experimente eine Autoaktivität ausgeschlossen haben, scheint es die Fähigkeit zu besitzen, direkt an die GAL-AD zu binden und somit die beiden Hälften von GAL4 zu verbrücken. Solche Proteine besitzen meist einen hydrophoben Bereich, mit dem sie entsprechende Domänen an sich binden können. Sie werden als „sticky“ bezeichnet. Es bleibt zu erwähnen, dass dieser Versuch mit verschiedenen CPc-Konstrukten durchgeführt wurde (Klon 1 und 2 in der Tabelle), die alle dasselbe Ergebnis zeigten.

Aufgrund dieser Eigenschaft wurde CPc für alle weiteren Experimente nicht verwendet, weitergearbeitet wurde ausschließlich mit den Konstrukten CPv und CPvc, für die kein Wachstum auf SD/-HALT-Platten beobachtet wurde (Tab. 7, Abb. 15).

Tab. 7: Erwartetes und gemessenes Wachstum von AH109 beim Test auf homotypische Interaktion. AH109 wird mit verschiedenen Konstrukten des *Bait*-Vektors pGBKT7 und des *Prey*-Vektors pGAD424 kotransformiert und auf verschiedenen Selektionsmedien ausplattiert.

Proben-Nr.	Transformation in Hefe (AH109)		Erwartetes/gemessenes Wachstum auf	
			SD/-LT	SD/-HALT
0	Negativkontrolle		+/+	-/-
1	Positivkontrolle		+/+	+/+
2	pGBKT7-leer	pGAD424-CPv	+/+	-/-
3	pGBKT-CPv	pGAD424-CPv	+/+	-/-
4	pGBKT7-CPvc	pGAD424-CPv	+/+	-/-
5	pGBKT7-leer	pGAD424-CPvc	+/+	-/-
6	pGBKT7-CPv	pGAD424-CPvc	+/+	-/-
7	pGBKT7-CPc (Klon 1)	pGAD424-CPvc	+/+	-/+
8	pGBKT7-CPc (Klon 1)	pGAD424-leer	+/+	-/+
9	pGBKT7-CPv	pGAD424-leer	+/+	-/-
10	pGBKT7-CPv	pGAD424-leer	+/+	-/-
11	pGBKT7-CPc (Klon 2)	pGBKT7-leer	+/+	-/+
12	pGBKT7-CPc (Klon 2)	pGBKT7-CPv	+/+	-/+
13	pGBKT7-CPc (Klon 2)	pGBKT7-CPc	+/+	-/+
14	pGBKT7-CPc (Klon 2)	pGBKT7-CPvc	+/+	-/+
16	pGAD424-leer	pGBKT7-CPvc	+/+	-/-

17	pGAD424-CPv	pGBKT7-CPvc	+/+	-/-
18	pGAD424-CPc	pGBKT7-leer	+/+	-/-
19	pGAD424-CPvc	pGBKT7-leer	+/+	-/-
20	pGAD4242-CPv	pGBKT7-CPv	+/+	-/-
21	pGAD424-CPc	pGBKT7-CPv	+/+	-/-
22	pGAD424-CPc	pGBKT7-CPvc	+/+	-/-
23	pGBKT7CPvc	pGAD424 leer	+/+	-/-
24	pGBKT7CPvc	pGAD424 CPv	+/+	-/-

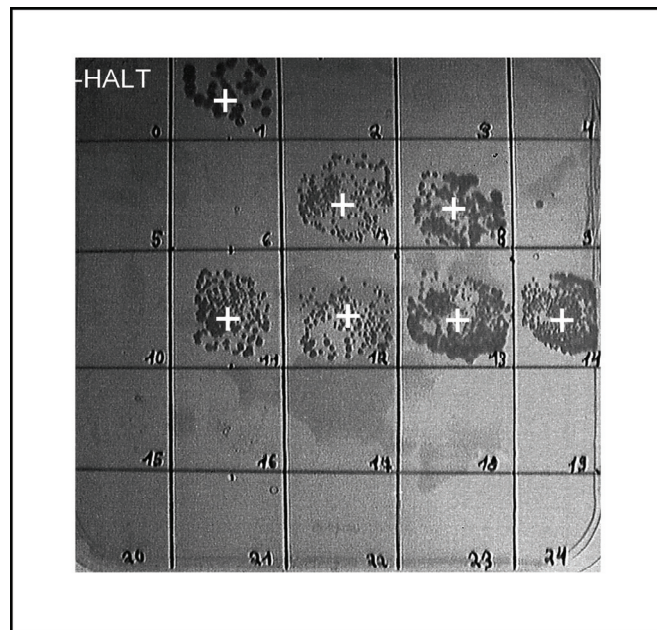


Abb. 15: Untersuchung auf homotypische Interaktion.

AH109 wurde mit verschiedenen Konstrukten des *Bait*-Vektors pGBKT7 und des *Prey*-Vektors pGAD424 (Tab. 7) kotransformiert und auf -HALT-Platten ausgestrichen. Die Klone 1 (= Positivkontrolle), 7, 8, 11, 12, 13 und 14 zeigen deutliches Wachstum (+).

3.3.5 Test auf Toxizität der DNA-BD-Konstrukte

Um einen möglichst aussagekräftigen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen durchführen zu können, wurden die DNA-BD-Konstrukte CPv und CPvc auf eine mögliche Toxizität hin überprüft. Auf eine weitere Überprüfung von CPc wurde verzichtet, da sich das Konstrukt im Vorfeld als ungeeignet für einen Screen herausgestellt hatte (Kap.3.3.4).

Hefezellen (Y187) wurden in drei verschiedenen Ansätzen mit den Konstrukten CPv, CPvc sowie mit dem pGBKT7-Leervektor transformiert. Stündlich wurde nun die Absorption bei 600 nm gemessen, wobei sich keine wesentlichen Unterschiede für die drei Ansätze ergaben.

Nach einer Über-Nacht-Inkubation ergab sich für den Leervektor eine A_{600} von 1,2, für CPv und CPvc eine A_{600} von 1,1.

Hieraus wurde geschlossen, dass die *Bait*-Konstrukte im Vergleich zum Leervektor das Wachstum der Y187-Hefezellen nicht hemmen. Gleiches wurde auch für den zweiten Hefestamm AH109 bestimmt.

3.4 Herstellung eines Fyn-Prey-Vektors als Positivkontrolle

3.4.1 Klonierung der Fyn-Tyrosinkinase

Wie in Kapitel 1.5 erwähnt wurde die Fyn-Tyrosinkinase bereits als ein Interaktionspartner der α -Protocadherine beschrieben

Deshalb sollte Fyn als Positivkontrolle für das Hefe-Zwei-Hybrid-System benutzt werden. Die Fyn-cDNA wurde mithilfe spezifischer Primer aus cDNA-Maushirn generiert. Die Primer-Adapter wurden mit Restriktionsschnittstellen für EcoRI und PstI konstruiert, die ein vereinfachtes Klonieren des PCR-Produktes in die Expressionsvektoren ermöglichen. Abb. 16 zeigt das gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkt bei verschiedenen Annealingtemperaturen. Die Größe des cDNA-Amplifikates lag wie erwartet bei 1,6 kb. Mit zunehmender Temperatur nahm die Spezifität zunächst zu. Die wenigsten Nebenprodukte entstanden bei einer Annealingtemperatur von 58,4–65,5 °C. Schon ab einer Temperatur von 67,9 °C wurde die Bande deutlich schwächer, und ab 70,1 °C war kein Produkt mehr zu erkennen. Das PCR-Produkt einer Amplifikation bei einer Annealingtemperatur von 58,4°C° wurde aufgereinigt und mit EcoRI und PstI verdaut. Hierbei wurde ein partieller Restriktionsverdau durchgeführt (Kapitel 2.2.2., Abb. 17), da PstI das Insert an drei Stellen schneidet.

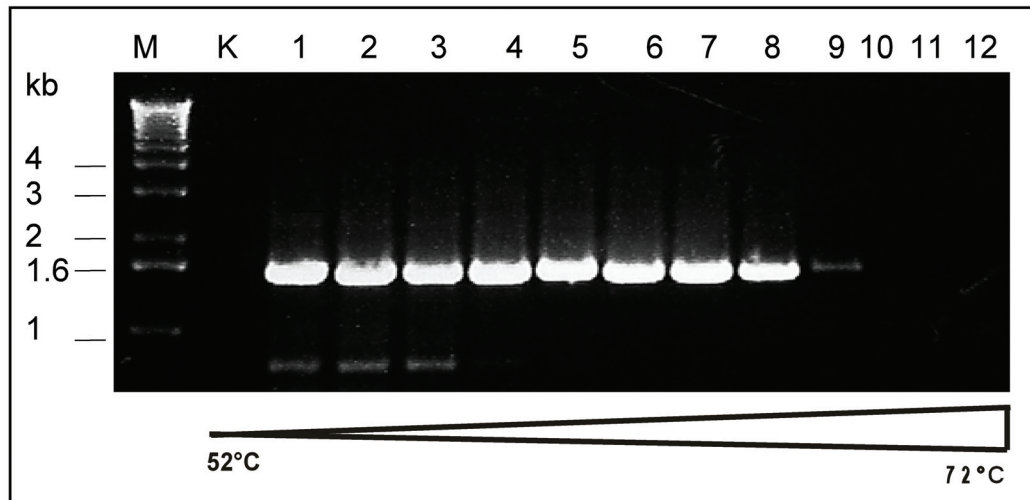


Abb. 16: PCR-Produkte von mFyn-Tyrosinkinase auf dem Gradientencycler.

Mittels PCR wurde die gesamte Fyn-Tyrosinkinase amplifiziert. Die PCR wurde bei 12 verschiedenen Annealingtemperaturen (50–72 °C, Probe 1–12) durchgeführt. Als Kontrolle wurde der Ansatz zur Amplifikation der Fyn-Tyrosinkinase ohne cDNA-Template verwendet. Das Bild zeigt ein 1,2%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel. Aufgetragen wurden der gesamte PCR-Ansatz (20 µl). **K**: Kontrolle, **M**: DNA-Längenstandard, **1–12**: PCR-Produkt der Fyn-Tyrosinkinase bei verschiedenen Annealingtemperaturen

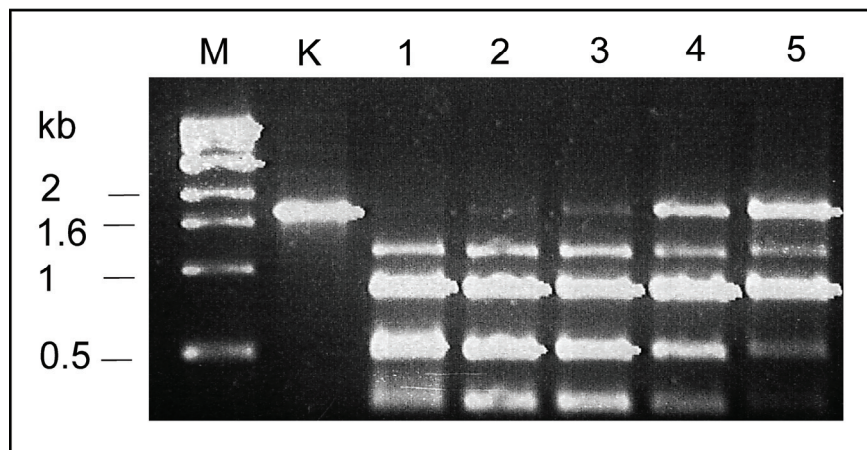


Abb. 17: Partieller Restriktionsverdau (mit EcoRI und PstI) des Fyn-cDNA-Amplifikates.

K: Kontrolle, **M**: DNA-Längenstandard, **1–5** Verdau mit EcoRI und PstI

Anschließend wurde das Produkt in die mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdauten und über Gelelektrophorese aufgereinigten Expressionsvektoren pGBKT7 und pGAD424 ligiert. Die erhaltenen Vektoren wurden in *E.coli* kloniert und mittels Restriktionsanalysen überprüft. Von jedem Vektor wurden die Inserts und die flankierenden Regionen mehrerer Klone vollständig sequenziert. Nur Klone ohne Mutationen und mit einem durchgängigen Leseraster wurden für weitere Arbeiten eingesetzt.

3.4.2 Western Blot

Die stabile Expression des jeweiligen Fusionsproteins in Hefezellen sollte mittels Western Blot (Kap. 2.3) überprüft werden. Dazu wurden Hefezellen (Y187) mit verschiedenen Konstrukten transformiert und unter Selektionsdruck (Tryptophanmangel für den pGBKT7-*Bait*-Vektor, Leucinmangel für den pGAD424-*Prey*-Vektor) kultiviert.

Nach 3 Tagen wurden die Hefezellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Es wurden 20 µg Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Trotz wiederholter Versuche einschließlich Modifikationen konnte kein Ergebnis erzielt werden. Technische Fehler konnten weitestgehend ausgeschlossen werden, da eine Färbung der Membran durch Ponceau-Rot deutlich einen Proteintransfer zeigte. Färbungen mit Coomassie-Blau bestätigten dieses Ergebnis. Auch das Zufügen von Proteinase-Inhibitor (PIC) zur Vermeidung der Degradation von Proteinen sowie von Natriumfluorid (NaF) zwecks Vermeidung von Dephosphorylierung zeigte keine Auswirkungen.

Somit konnte die Fyn-Tyrosinkinase nicht als Positivkontrolle benutzt werden.

3.4.3 Test auf Toxizität

Analog zur Prüfung der *Bait*-Konstrukte und besonders im Hinblick auf die Nicht-Expression der Fyn-Tyrosinkinase in Hefe wurde diese auf eine mögliche Toxizität hin überprüft. Es wurde vorgegangen wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Kompetente Y187- und AH109-Hefezellen wurden jeweils mit den leeren pGBKT7- und pGAD424-Expressionsvektoren sowie mit den Fyn-Konstrukten kotransformiert. Tab. 8 und 9 zeigen die gemessene A_{600} nach 1, 3 und 6 h sowie über Nacht. Obwohl Hefe, nachdem sie mit Fyn-Konstrukten transformiert worden ist, deutlich langsamer wächst als nur mit den jeweiligen Leervektoren transformierte Hefe, ist dies kein eindeutiger Hinweis auf Toxizität. Nach der Gebrauchsanweisung des MatchmakerTM Library Construction & Screening Kit (Clontech) besteht der Verdacht auf

eine Toxizität erst dann, wenn sich eine A_{600} über Nacht von weit unter 0,8 ergibt. Im vorliegenden Fall betrug sie jedoch im Minimum 0,9.

Tab. 8 Ergebnis der Absorptions-Messung nach verschiedenen Transformationen des *Saccharomyces-cerevisiae*-Stamms AH109.

Hefestamm AH109	pGBKT7-leer	pGBKT7-Fyn	pGAD424-leer	pGAD424-Fyn
A_{600} nach 1h	0,10	0,10	0,07	0,06
A_{600} nach 3 h	0,20	0,15	0,30	0,10
A_{600} nach 6 h	0,40	0,35	0,50	0,20
A_{600} über Nacht	1,20	0,90	1,30	0,90

Tab. 9 Ergebnis der OD-Messung nach verschiedenen Transformationen des *Saccharomyces-cerevisiae*-Stammes Y187.

Hefestamm Y187	pGBKT7-leer	pGBKT7-Fyn	pGAD424-leer	pGAD424-Fyn
A_{600} nach 1h	0,10	0,10	0,10	0,10
A_{600} nach 3 h	0,19	0,10	0,20	0,15
A_{600} nach 6 h	0,40	0,40	0,45	0,30
A_{600} über Nacht	1,30	0,80	1,10	0,90

3.5 Konstruktion einer murinen cDNA-Bank im pGADT7-Prey-Expressionsvektor

Zur Konstruktion der *Prey*-Plasmide wurde der linearisierte pGADT7-Rec-Vektor verwendet. Der in Abb. 18 dargestellte pGADT7-Rec-Vektor exprimiert das zu untersuchende Protein als eine Fusion mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD). Die Transkription wird von dem konstitutiven ADH1-Promotor (PADH1) initiiert und an dem ADH1-Stoppssignal (TADH1) beendet.

Die GAL4-Aktivierungsdomäne enthält das virale SV40-Nukleus-Lokalisierungssignal (SV40-NLS), das den Transport der Fusionsproteine in den Zellkern der Hefe gewährleistet. Durch das vorhandene Hämagglutinin (HA)-Tag können die GAL4-AD-Fusionsproteine mittels Antikörper detektiert werden. Durch den zusätzlichen T7-Promotor besteht die

Möglichkeit, die mit Hämagglutinin fusionierten Proteine *in vitro* zu transkribieren und translatieren.

pGADT7-Rec repliziert sich unabhängig in *E. coli* sowie in Hefezellen und enthält für die Selektion in *E. coli* ein Ampicillin-Resistenzgen bzw. für die Selektion in Hefezellen ein *LEU2*-Gen.

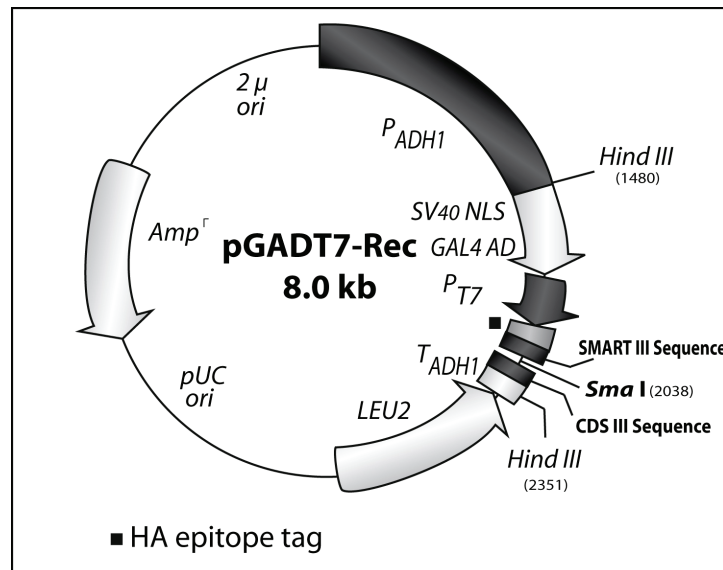


Abb. 18: Schematische Darstellung des Prey-Vektors pGADT7.

MCS: Multiple Cloning Site, **Amp^r:** Ampicillin-Resistenzgen, **pUCori:** Replikationsursprung, **PADH1:** ADH1-Promoter, **PT7:** T7-Promoter, **TADH1:** Terminierungssignal, **LEU2:** Leucin-Gen, **GAL4-AD:** Polypeptid mit SV40 Nukleus-Lokalisierungssignal (SV40-NLS), **HindIII:** Schnittstellen des Restriktionsenzym HindIII.

Eine cDNA wurde nach dem Protokoll des Matchmaker Library Construction & Screening Kit aus Maushirn hergestellt. Als Startmaterial diente die in Kapitel 3.1.1 gewonnene RNA. Mithilfe der Reversen Transkriptase (RT) wurde eine Erststrangsynthese durchgeführt. Dabei wurde ein Random-Primer (CDS III/6 der Firma Clontech, Heidelberg) benutzt. Der Random-Primer hat den Vorteil, dass dieser an vielen verschiedenen Stellen des Templates hybridisieren kann, sodass man in der Bibliothek eine gleich große Anzahl an 3'-und 5'-Sequenzen vorfindet.

Der Oligo-dT hybridisiert dagegen ausschließlich mit den 3'-Enden der Poly-A⁺-RNA, sodass die Gefahr besteht, dass Sequenzen, die sich nahe am 5'-Ende der RNA befinden, unterrepräsentiert sind.

Die von Chenchik (1998) entwickelte SMART-Methode bietet eine relativ unkomplizierte Möglichkeit der RNA-Amplifikation. Sie basiert auf der Tatsache, dass die PowerSkriptTM-RT am 5'-Ende der cDNA eine 3–5 bp lange dCTP-Sequenz anhängt, an der die SMART-IIITM-Oligonukleotide annealen. Das dadurch entstandene verlängerte Template weist nun am 5'-Ende eine komplementäre Sequenz zu den SMART-IIITM-Oligonukleotiden und am 3'-Ende eine dem Oligo-dT bzw. Random-Primer komplementäre Sequenz auf. In der darauf folgend durchgeführten LD-PCR dienen diese Sequenzen als Primerbindungsstellen. Abb. 19 verdeutlicht diese Technik.

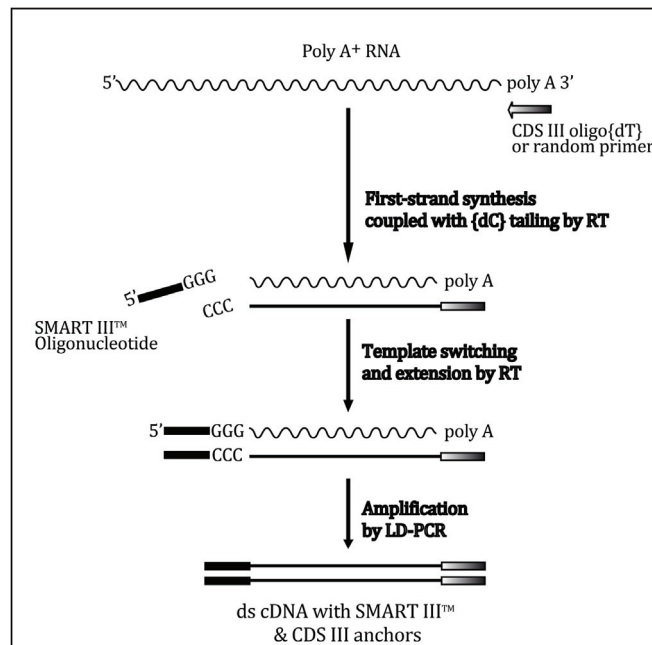


Abb. 19: Schematischer Ablauf der SMART-Methode modifiziert nach Clontech (Heidelberg) (Switched Mechanism at 5' end of RNA-Template).

Um eine möglichst heterogene cDNA-Population zu gewinnen, wurde zunächst die optimale Zyklenzahl für die Long-Distance-PCR anhand der Ausgangsmasse an mRNA berechnet. Dabei ist zu bedenken, dass eine geringere Zyklenzahl auch den Anteil an unspezifischen PCR-Produkten minimiert.

Ausgehend von der Ausbeute für die als Ausgangsmaterial verwendete Gesamt-RNA werden generell 15–30 Zyklen empfohlen. In der vorliegenden Arbeit ergab sich eine Ausbeute von 1,2 µg. Die empfohlene Zyklenzahl liegt bei 15–20 für humane Plazenta-RNA. Dies bestätigte sich auch für murine Hirn-RNA, für die eine optimale Zyklenzahl von 20 abgeleitet werden konnte (Kap. 2.2.4).

Abb. 20 zeigt jeweils ein Aliquot dieser beiden Ansätze nebst einer mitgeführten Kontrolle aus humaner Poly-A-Plazenta RNA, die zur Prüfung elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Größenbereich von 400 bp bis 3 kb abgedeckt werden konnte. Dies ist eine gute Voraussetzung für die Konstruktion einer qualitativ hochwertigen cDNA-Bank.

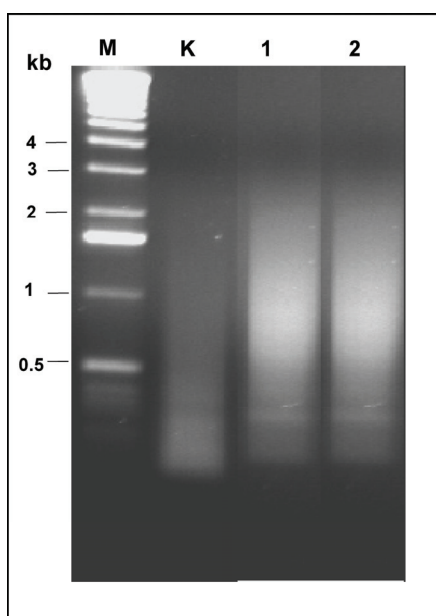


Abb. 20: Amplifikation der Genbank-Inserts durch eine Long-Distance-PCR.

Aufgetragen wurden jeweils 7 µl auf einem 1,2%igen Agarosegel. Kontinuierliches Signal zwischen 0,2 und 3 kb. **K**: Kontrolle, **M**: DNA-Längenstandard, **1–2**: LD-PCR-Produkt der Maushirn-cDNA

Die unter diesen Bedingungen hergestellte Doppelstrang-cDNA wurde im Anschluss über eine Gelchromatographie-Säule (Clontech, Heidelberg) aufgereinigt, durch die cDNA-Fragmente ≤ 200 bp entfernt wurden. Anschließend wurden je 20 µl aus beiden Ansätzen simultan mit dem zuvor SMA-I-linearisierten Vektor pGADT7-Rec in den Hefestamm transformiert und auf SD/-L Platten ausgestrichen. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt.

Die konstruierte Doppelstrang-cDNA rekombiniert *in vivo* mit dem linearisierten pGADT7-Rec-Vektor. Durch diesen Schritt werden die cDNA-Fragmente mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert. Die Rekombination wird durch die oben beschriebene SMART-Methode gewährleistet, da der pGADT7-Rec-Vektor die dazu homologen Sequenzen enthält (Abb. 21).

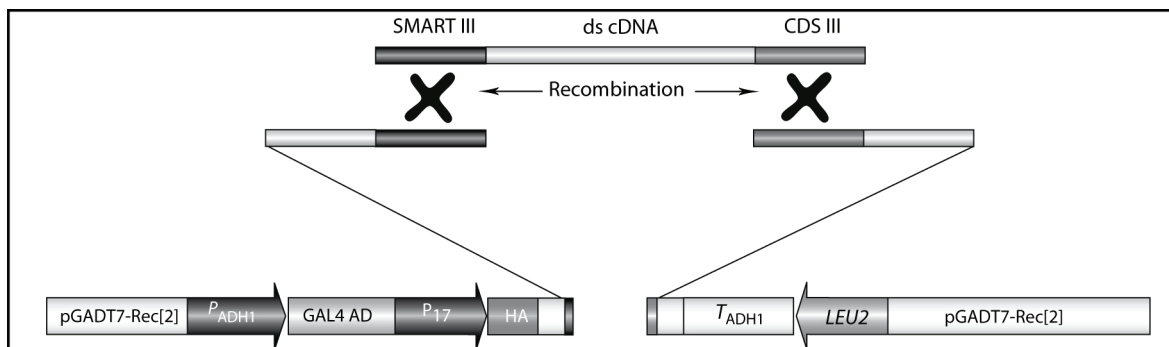


Abb. 21: Rekombination der cDNA in den SMA-linearisierten Vektor (AD-Vektor) (modifiziert nach Clontech, Heidelberg).

Nach der Transformation der Hefezellen wird das linearisierte Plasmid durch Rekombination in die zirkuläre Form gebracht. Die erfolgreiche Plasmid-Rekonstruktion resultiert in Zellen, die nicht auxotroph für Leucin sind.

Nach 6 Tagen waren mehr als 100.000 Klone gewachsen. Die Effizienz der Transformation lag bei $5,6 \times 10^8$, was den angegebenen Mindestwert von $1 \times 10^6/3\mu\text{g}$ pGADT7-Rec weit überschritt.

Zur weiteren Qualitätskontrolle der Bank sowie zur Bestimmung der durchschnittlichen Insertgröße wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (Abb. 22). Es sind deutlich verschieden große Fragmente zu erkennen, die sich in einem Größenbereich von 0,6–2 kb erstrecken.

Anschließend wurden sämtliche Hefekolonien in einer Suspension vereinigt, davon Aliquots erstellt und eingefroren. Die Cell Density (errechnet mit Hilfe eines Hämocytometers) betrug $1,3 \times 10^8$ Zellen/ml und liegt somit weit über dem geforderten Mindestwert von 2×10^7 Zellen/ml.

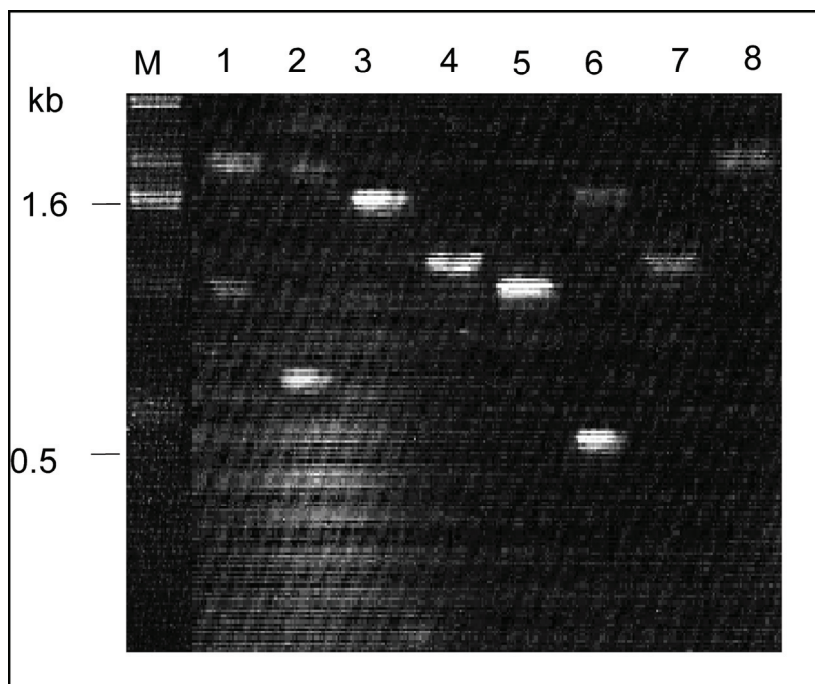


Abb. 22: Kolonie-PCR von zehn willkürlich ausgewählten Klonen der hergestellten Maushirn-cDNA-Bank.

Man erkennt verschieden große Inserts, wobei das kleinste detektierte Insert bei 0,6 kb (Spur 2) und das größte Insert bei 2 kb (Spuren 1 und 8) liegt.

M: DNA-Längenstandard, **1–10:** willkürlich ausgewählte Klone der Maushirn-cDNA-Bank

3.6 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

3.6.1 Mating

Der Hefe-Zwei-Hybrid-Screen wurde nun eingesetzt, um mögliche Interaktionspartner des zytoplasmatischen Anteils des mPcdh $\alpha 7$ zu identifizieren.

Im Prinzip gibt es zwei verschiedene Vorgehensweisen, um einen Screen durchzuführen: die Kotransformation oder das Mating. Bei der Kotransformation werden *Bait* und *Prey* in denselben Hefestamm transformiert, während beim Mating für *Bait* und *Prey* zwei verschiedene Stämme benutzt und miteinander gekreuzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Methode des Matings angewandt, da dadurch die Anzahl der gescreenten Klone nicht mehr von der Transformationseffizienz, sondern nur noch von der Kreuzungseffizienz abhängig ist und dies in der Regel leichter zu reproduzieren ist.

Es wurde ausschließlich mit CPv und CPvc gescreent, auf eine Durchmusterung mit CPc wurde verzichtet, da sich dieses Konstrukt in den Vorversuchen als ungeeignet erwiesen hatte (Kap. 3.3.4).

Für den eigentlichen Screen wurde nun die Hefe AH109, die das *Prey* in Form einer cDNA-Hirnbank enthält, mit der Hefe Y187 gepaart, die das *Bait* enthält (Kap. 2.4.5). Als Positivkontrolle diente die Konstruktion aus Y187, die mit pGBKT-53 transformiert waren und AH109, die den Vektor pGADT-SV40 trugen (Iwabuchi et al., 1993, Li & Fields, 1993). Als Negativkontrolle diente die Konstruktion aus Y187, die mit pGBKT7-Lam transformiert waren und AH109, die den Vektor pGADT-SV40 trugen (Bartel et al., 1993, Ye & Worman, 1995).

Nach 20 h wurde ein Aliquot der Mating-Kultur im Phasen-Kontrast-Mikroskop auf die Anwesenheit von Zygoten überprüft. Da noch Zygoten zu sehen waren, wurde entsprechend der Vorschrift (Matchmaker Library Construction and Screening Kit, Clontech, 2001) weitere 4 h inkubiert. Nach Ablauf von 24 h wurde die Mating-Kultur zum Test auf eine Aktivierung der Reportergene durch Interaktion zwischen *Bait*- und *Prey*-Fusionsproteine auf entsprechende Selektionsmedien ausplattiert. Das besondere an dem Hefestamm AH109 ist, dass dieser mit vier Reportergenen konzipiert wurde, um die Zahl der falsch positiven Ergebnisse zu reduzieren. Dementsprechend wurden verschiedene Selektionsschritte durchgeführt.

3.6.2 Initialer Screen auf Interaktionen der cDNA-Bank mit den beiden *Baits* CPv und CPvc

In einer ersten Selektionsphase wurde zunächst ein Test auf die Aktivierung des *HIS3*- und des *ADE2*-Reporters durchgeführt. Dazu wurde die Mating-Kultur auf 50 SD/-HALT- Platten ausplattiert. Da kein Hintergrundwachstum beobachtet wurde, wurde auf eine Unterdrückung einer unspezifischen *HIS3*-Expressionsaktivierung durch 3-AT verzichtet.

Um den positiven Verlauf der Kreuzung zu bestätigen, wurden die Kreuzungsansätze zusätzlich auf SD/-L, SD/-T und SD/-LT ausgestrichen. Gleichzeitig konnte so die Anzahl der gescreenten Klone mithilfe von Verdünnungsreihen bestimmt werden. Sie betrug $1,4 \times 10^6$ für den CPv- und $1,6 \times 10^6$ für den CPvc-Screen.

Nach 7 Tagen waren beim CPv-Screen insgesamt 162 Kolonien gewachsen, die einen Durchmesser von 2 mm besaßen, d.h. im Durchschnitt 3 Klone pro Platte (Abb. 23a). Beim CPvc-Screen waren es 283 Kolonien, d.h. im Durchschnitt 5 Kolonien pro Platte (Abb. 23b).

3.6.3 Eingrenzung der positiven Klone des initialen Screens durch Hinznahme eines weiteren Selektionsmarkers (*MEL1*)

Die Kolonien, die in Abwesenheit von Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin wachsen konnten, wurden in einem zweiten Selektionsschritt auf Aktivierung des *MEL1*-Reporters getestet.

Das *MEL1*-Genprodukt ist die α -Galaktosidase. Sie wird nach Induktion in den periplasmatischen Raum sezerniert, wo sie die Hydrolyse von Melibiose zu Galaktose und Glucose katalysiert. Diese Reaktion kann sichtbar gemacht werden, indem die Hefezellen auf SD/-HALT-Platten ausgestrichen wurden, denen zusätzlich X- α -Gal zugefügt wurde. Durch die sezernierte α -Galaktosidase wird das X- α -Gal zu einem leicht erkennbaren blauen Farbstoff hydrolysiert (Kap 2.4.4).

Diese hochstringente Selektion auf alle drei Reportergene reduziert die Zahl der falsch-positiven Klone (Aho et al, 1997), birgt aber das Risiko, schwache Interaktionen zu verlieren.

Vor diesem Hintergrund wurden alle 283 bei dem initialen CPvc-Screen und alle 162 bei dem initialen CPv-Screen identifizierten Klone einzeln auf SD/-HALT-Platten ausgestrichen, die X- α -Gal enthielten. Lediglich 20 Kolonien des CPvc-Screens und 11 Kolonien des CPv-Screens färbten sich nach 60 h leicht blau und zeigten damit eine starke Interaktion zwischen *Bait* und *Prey* an (Abb. 23c).

Diese 31 Klone, die in der Lage sind, alle drei Reportergene zu aktivieren, wurden als mögliche Interaktionspartner bezeichnet und weiter untersucht. Außerdem wurde von jedem positiven Klon zur Langzeitlagerung ein Glycerinstock angelegt.

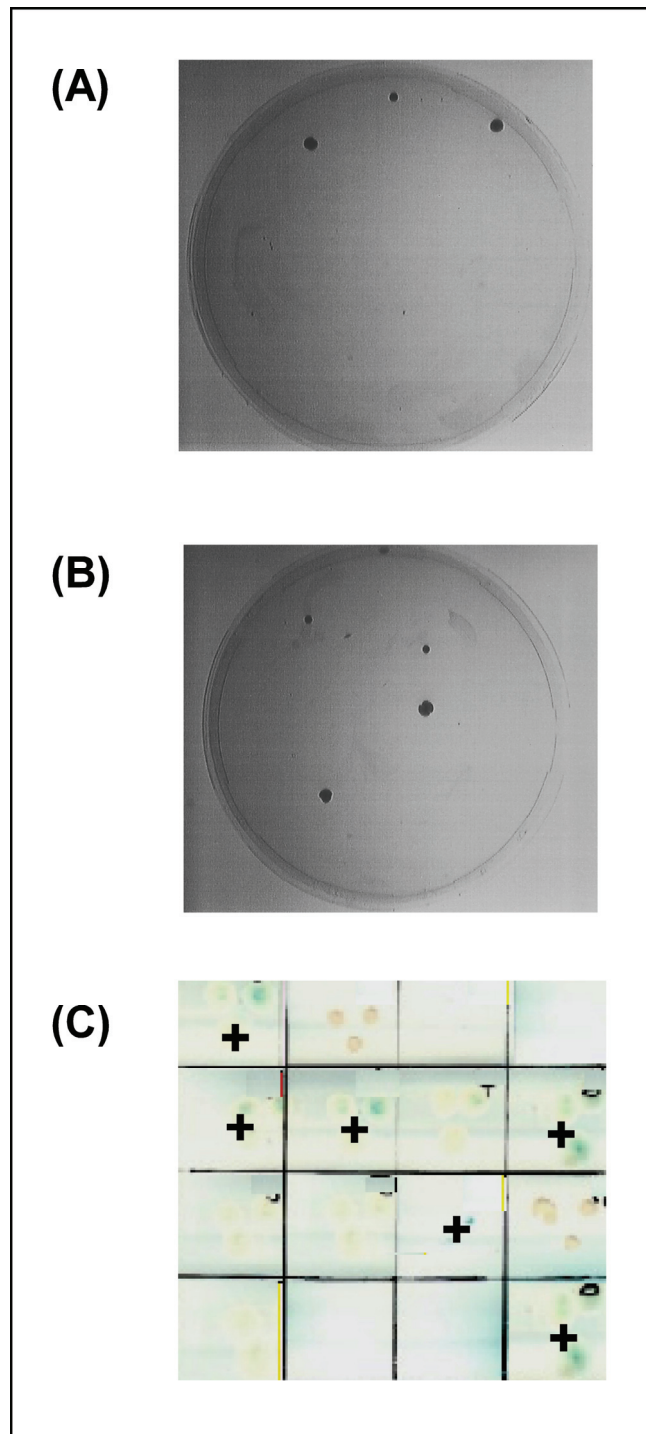


Abb. 23: Beispiele für Koloniewachstum nach Mating von pGBKT7-CPv bzw. pGBKT7-CPvc in Y187 mit pGADT7/cDNA-Bank in AH109.

A: Koloniewachstum des CPv-Screens nach Selektion auf SD/-HALT

B: Koloniewachstum des CPvc-Screens nach Selektion auf SD/-HALT

C: Koloniewachstum der unter (A) und (B) positiven Klone nach Selektion auf SD/-HALT X- α -Gal

3.6.4 Isolierung der *Prey*-DNA

Zur weiteren Charakterisierung der potenziellen Interaktionskandidaten wurde zunächst die Plasmid-DNA aus der Hefe isoliert (Kapitel 2.4.6) und in *E. coli* transformiert.

Da der *Bait*-Vektor pGBKT7 eine Kanamycin-Resistenz, der *Prey*-Vektor pGADT7 aber eine Ampicillin-Resistenz trägt, konnten alle identifizierten *Prey*-Vektoren durch Selektion der transformierten *E. coli* auf LB/Amp-Agarplatten isoliert werden. Zur Kontrolle wurde je ein Klon des CPvc- und des CPv-Screens auch auf einer LB/Kan-Platte ausgestrichen. Der reklonierte *Bait*-Vektor wurde isoliert und durch unidirektionale DNA-Sequenzierung von Mutationen ausgeschlossen.

Aus jedem der 31 in der *MEL1*-Selektion bestätigten positiven Hefeklone wurden exemplarisch aus zwei der Amp-selektionierten Bakterienklone die Plasmid-DNA isoliert und bidirektional unter Verwendung der T7-5'Seq- und AD-3'Seq-Primer sequenziert.

3.6.5 Datenbankanalyse mittels BLAST

Die erhaltenen DNA-Sequenzen der 20 Klone des CPvc-Screens und der 11 Klone des CPv-Screens wurden mittels BLAST-Analyse auf Ähnlichkeiten zu bekannten cDNAs untersucht.

Es wurde auch kontrolliert, ob der offene Leserahmen der GAL4-AD-Domäne in dem Fusionsprotein erhalten war. Das Ergebnis der Datenbankanalyse ist in Tab.10 und 11 und dargestellt.

Tab. 10: Auflistung und Gruppierung der *Prey*-DNAs des CPv-Screens.

Klon-Nr.	n	-HALT	-HALT/ x- α -Gal	Sequenzierung	Bewertung
1	3	+++	+	mRNA des Tollip-Proteins	falsche Orientierung
2	3	+++	+	cDNA aus dem sympathischen Ganglion eines 2d Embryos	Kandidat
3	3	+++	+	Keine signifikante Ähnlichkeit gefunden	
4	4	+++	+	Keine signifikante Ähnlichkeit gefunden	
5	4	+++	+	Expressed Sequence Tag aus einem 8d Embryo	Kandidat
6	5	+++	+	Identisch zu einem Bac-Klon des Chromosomes 1	typisch falsch positiv
7	5	+++	+	Ähnliche zu rRNA Promotor Bindingsprotein	typisch falsch positiv
8	5	++	+	Keine signifikante Ähnlichkeit gefunden	
9	5	++	+	cDNA aus dem sympathischen Ganglion eines 2d Embryos	Kandidat
10	6	++	+	Keine signifikante Ähnlichkeit gefunden	
11	7	+	+	10 Bac Rp	typisch falsch positiv

Wachstum nach (n) Tagen, Wachstum auf (-HALT), Blaufärbung auf (-HALT/X- α -Gal) und Ergebnis der Sequenzierung. + = Größe < 2 mm, ++ = Größe = 2 mm, +++ = Wachstum > 2 mm

Tab. 11: Auflistung und Gruppierung der *Prey*-DNAs des CPvc-Screens.

Klon-Nr.	n	-HALT	-HALT/ x- α -Gal	Sequenzierung	Bewertung
1	3	+++	+	Caseinkinase	falscher Leserahmen
2	3	+++	+	Ribosomales Protein L 26	typisch falsch positiv
3	3	+++	+	Neurofilament	Kandidat
4	3	+++	+	Keine signifikante Ähnlichkeit gefunden	
5	3	+++	+	Caseinkinase	Kandidat
6	3	+++	+	Uridinkinase-ähnliches Protein	typisch falsch positiv
7	4	+++	+	B6-derived CD11 ⁺ dendritic cells cDNA	falscher Leserahmen
8	4	++	+	Keine signifikante Ähnlichkeit gefunden	
9	4	++	+	Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase	typisch falsch positiv
10	4	+++	+	Unbekannte Maus DNA-Sequenz	Kandidat
11	4	+++	+	Gleiche cDNA wie Nr. 10	Kandidat
12	4	+++	+	Caseinkinase	Kandidat
13	4	+++	+	Gleiche cDNA wie Nr. 10	Kandidat
14	4	+++	+	Gleiche cDNA wie Nr. 10	Kandidat
15	5	+++	+	Neurofilament	Kandidat
16	5	+++	+	Caseinkinase	Kandidat
17	5	++	+	Ribosomales Protein L 54	typisch falsch positiv
18	5	++	+	Keine signifikante Ähnlichkeit gefunden	
19	6	++	+	Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase	typisch falsch positiv
20	7	+	+	Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase	falscher Leserahmen

Wachstum nach (n) Tagen, Wachstum auf (-HALT), Blaufärbung auf (-HALT/X- α -Gal) und Ergebnis der Sequenzierung. + = Größe < 2 mm, ++ = Größe = 2 mm, +++ = Wachstum > 2 mm

Weitergearbeitet wurde mit Klonen, deren cDNA eine richtige Orientierung und den korrekten Leserahmen aufwies. Ebenfalls für weitere Versuche ausgeschlossen wurden die aus der Literatur bekannten falsch-positiven Klone.

3.6.6 Verifizierung der Interaktionen durch einen Rescreen

Ein einschränkender Faktor beim Einsatz des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens zur Identifizierung von Proteininteraktionen stellt das Isolieren von falsch positiven Klonen dar (Bartel et al., 1993 a). Diese können unspezifisch z.B. mit promotorassoziierten Proteinen oder mit nahe an der GAL4-Bindungsstelle gelegenen Sequenzen interagieren und zur Aktivierung der Reporter führen.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass eine Hefezelle simultan mit mehreren verschiedenen Bankplasmiden transformiert wird. Das wiederum kann dazu führen, dass in einer als positiv ermittelten Hefekolonie die Bankplasmide A und B vorhanden sind, Plasmid A ausschließlich die Interaktion mit dem *Bait* eingeht, aber nur Plasmid B isoliert wird. In diesem Fall ist Plasmid B ein falsch positiver Klon.

Um solche Artefakte auszuschließen, wurde jeder der 31 in der *MEL1*-Selektion bestätigten Klone nochmals getestet. Damit konnte gleichzeitig geprüft werden, ob sich die Aktivierung der Reportergene in einem haploiden Hefestamm (AH109) reproduzieren lässt.

Zur Durchführung wurde der Hefestamm AH109 mit den in *E.coli* amplifizierten *Prey*-Plasmiden (pGADT7-cDNA) und dem jeweiligen *Bait*-Vektor (pKBKT7-CPv bzw. -CPvc) kotransformiert. Als Kontrolle wurde der *Bait*-Vektor einmal ohne Insert und einmal mit Lamin C verwendet (Abb. 24).

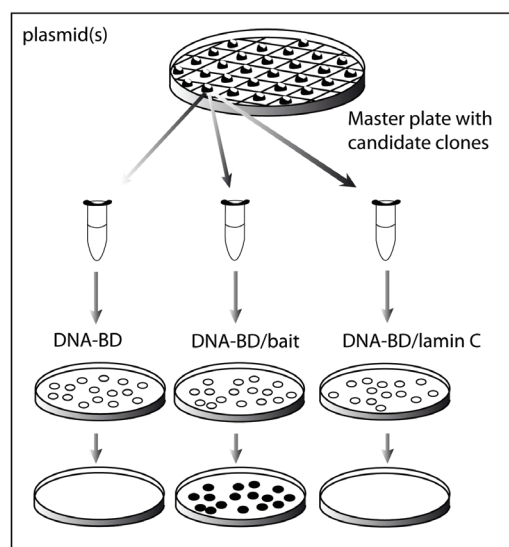


Abb. 24: Schema zur Durchführung des Rescreens (modifiziert nach Clontech, Heidelberg).

Kotransformation mit verschiedenen Kontrollkonstrukten.

Ein positives Wachstum der Hefe-Kulturen auf SD/–LT bewies die erfolgreiche Aufnahme beider Plasmide.

Zum Test auf Aktivierung der Reporter wurden die kotransformierten Hefezellen auf SD/–HALT-Platten ausgestrichen. Mit Ausnahme der Positivkontrolle (pGBKT7-p53 + pGADT7-SV40) konnte weder eine Reporteraktivität in Gegenwart des „leeren“ pGBKT7-Vektors noch in Gegenwart von Lamin C festgestellt werden. Dies galt sowohl für den CPv als auch für den CPvc-Screen. Eine weitere Kontrolle erfolgte durch die alleinige Transformation der *Prey*-Plasmide mit Ausstrich auf SD/–HAL-Medien. Ein Wachstum auf diesem Medium deutet auf eine Autoaktivierung hin, konnte aber ausgeschlossen werden. Folglich besitzt keines der gefundenen potenziellen Interaktionspartner Autoaktivität noch bindet es unspezifisch an andere Proteine.

Für vier der Interaktionskandidaten des CPvc-Screens konnte eine für das *Bait*-Plasmid spezifische Aktivierung der Reporter gezeigt werden. Allerdings gelang dies bei keinem der Kandidaten des CPv-Screens. Nach drei Selektionsrunden konnten also insgesamt 4 potenzielle Interaktionspartner des mPcdh α 7-cyt selektiert werden (Tab. 12).

Tab. 12 Zusammenfassung der Zwischenschritte des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens.

Anzahl der gescreenten Kolonien im Verhältnis zur Anzahl der Klone, die nach der jeweiligen Selektionsrunde positives Wachstumsverhalten zeigten.

Selektion I: Wachstum auf SD/–HALT; **Selektion II:** Blaufärbung auf SD/–HALT/X- α -Gal; **Selektion III:** Rescreen.

	Anzahl Klone	Selektion I	Selektion II	Selektion III
CPv-Screen	1,4 x 10 ⁶	162	11	–
CPvc-Screen	1,6 x 10 ⁶	283	20	4

3.6.7 mPcdh α 7-cyt interagiert mit einer unbekanntem Sequenz

Die vier identifizierten Klone konnten nach einer Sequenzierung als identisch identifiziert werden. Er ergaben sich cDNA-Längen von 730, 1024, 543 und 667 bp. Die Sequenzen enthalten einen offenen Leserahmen, der für ein Protein mit 720 Aminosäuren codiert.

Die computergestützte DNA- und Proteinbank-Durchmusterungen mit dem Programm BLAST (Altschul et al., 1997) ließen keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinen oder DNA-Sequenzen aus *Mus musculus* oder anderen Organismen erkennen.

4 Diskussion

Die Superfamilie der Cadherine umfasst mehrere Familien membranständiger Glykoproteine, die eine Ca^{2+} -abhängige Zelladhäsion vermitteln. Ihr extrazellulärer Bereich ist durch eine Wiederholung von Cadherin-typischen Domänen, sogenannten Cadherin-Repeats, gekennzeichnet (Angst et al. 2001).

Neben ihrer Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion sind Cadherine an diversen Prozessen beteiligt. Hierzu gehören die Morphogenese vielzelliger Organismen (Übersichten in Ranscht 1994; Takeichi 1995), die Zelldifferenzierung und Entstehung der Zellpolarität (Übersicht in Näthke et al. 1993) sowie die Signaltransduktion (Übersicht in Gumbiner 1995).

Die Protocadherine sind mit weit über 50 Mitgliedern die mit Abstand größte Cadherin-Familie und grenzen sich strukturell klar von den anderen Cadherin-Familien ab. Ihre Funktion ist bisher noch unzureichend charakterisiert. Bisherige Studien führten zu teils widersprüchlichen Ergebnissen.

Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob ein einziges Neuron eine feste Kombination von α -Protocadherinen (α -Pcdh) und/oder γ -Protocadherinen (γ -Pcdh) exprimiert (Esumi et al. 2005) oder ob es mehrere Protocadherine exprimiert (Kohmura 1998). Ebenso ist unklar, ob die geclusterten Protocadherine eine primäre Aufgabe als Zelladhäsionsmoleküle oder als Signaltransduktionsmoleküle haben (Senzaki et al. 1999) und ob sie homotypisch (Sano et al. 1993) oder heterotypisch (Mutoh et al. 2004) interagieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Domäne der α -Protocadherine im Hinblick auf ihre mögliche Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen untersucht, um hierdurch Hinweise auf ihre Beteiligung an der Regulierung zellulärer Funktionen erlangen zu können.

Besonders im Hinblick auf die Embryogenese sind konservierte Signaltransduktionswege und die Prozesse der Zelladhäsion von fundamentaler Bedeutung. Die hohe Diversität und die Expressionsprofile der Protocadherine weisen darauf hin, dass sie eine wichtige Funktion bei der Entwicklung neuronaler Netzwerke haben könnten (Philipps et al. 2003).

Zur Realisierung dieses Vorhabens wurde zunächst die cDNA mehrerer α -Protocadherine der Maus kloniert. Die zytoplasmatische Domäne des $\alpha 7$ -Protocadherins (Pcdh $\alpha 7$) wurde im nächsten Schritt eingesetzt, um drei Hefe-Zwei-Hybrid-*Bait*-Vektoren herzustellen, die den variablen Bereich, den konstanten Bereich oder die gesamte zytoplasmatische Domäne beinhalten.

Aus der cDNA des Gehirns einer knapp 2 Wochen alten Maus wurde eine cDNA-Bank in dem Hefe-Zwei-Hybrid-*Prey*-Vektor (pGADT7-Rec) hergestellt und diese nach Durchführung der erforderlichen Kontrollen zur Suche nach Interaktionspartnern der zytoplasmatischen Domäne des murinen $\alpha 7$ -Protocadherins (mPcdh $\alpha 7$) eingesetzt.

Aus $1,6 \times 10^6$ Klonen wurden initial durch eine erste Selektion (*HIS3+*, *ADE2+*) insgesamt 283 Klone identifiziert, die mit der gesamten zytoplasmatischen Domäne des Pcdh $\alpha 7$ interagieren (CPvc-Screen), und 162 Klone aus $1,4 \times 10^6$, die selektiv mit dem variablen Bereich der zytoplasmatischen Domäne interagieren (CPv-Screen). Die primär identifizierten Klone wurden im nächsten Schritt im Hinblick auf die Aktivierung eines weiteren Reportergens (MEL1) untersucht. Hierdurch konnte die Anzahl der positiven Klone auf 20 (CPvc-Screen) sowie 11 (CPv-Screen) eingeschränkt werden. Diese Klone wurden sequenziert, mit bekannten mRNA-Sequenzen der Maus verglichen und einem Rescreen unterzogen. Schlussendlich bestätigte sich ein positiver Klon des CPvc-Screen.

4.1 Klonierung der murinen Protocadherine des α -Clusters

Die cDNA-Klonierung der mPcdh des α -Clusters war Gegenstand dieser Arbeit, um dadurch das Ausgangsmaterial für die Konstruktion der *Bait*-Vektoren für die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse zu gewinnen.

Mithilfe von RT-PCR und spezifisch generierten Primern wurde zunächst die gesamte cDNA-Sequenz von mPcdh $\alpha 7$ und den restlichen α -Protocadherinen kloniert. Komplett durch Sequenzierung bestätigt wurden neben der cDNA des mPcdh $\alpha 7$ die Protocadherine $\alpha 8$, $\alpha 11$, $\alpha 12$, $\alpha 13$ und $\alpha 14$. Diese wurden bereits in einer weiteren Arbeit zur Expression von Partiaalsequenzen und Induktion von Antikörpern verwendet (Crolow 2008).

Die restlichen Protocadherine des α -Clusters ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 6$) konnten auch durch mehrfache Versuche entweder gar nicht amplifiziert werden oder es gelang keine Full-Length-Klonierung. Da noch keine genauen Daten zur Expression der α -Protocadherine vorliegen, kann es durchaus sein, dass nicht alle α -Protocadherine in einer 14 Tage alten Maus exprimiert werden und daher keine Klonierung möglich ist. Ebenso kann hypothetisch angenommen werden, dass bestimmte Protocadherine nur in sehr wenigen Neuronen exprimiert werden und daher eine Amplifikation aus Gesamt-Hirn nicht möglich ist.

Eine Amplifikation aus genomischer DNA wäre sicherlich einfacher gewesen, die Isolierung von mRNA aus Gewebe ist sehr aufwendig, gleichzeitig treten häufiger Mutationen auf, die

aber für die klonierten Protocadherine durch eine bidirektionale Sequenzierung ausgeschlossen wurden.

Die starke Bande von Pcdh $\alpha 7$ sowie einiger anderer α -Pcdh bei der PCR weist auf eine hohe Expression hin. Die Beobachtung, dass alle analysierten Pcdh $\alpha 7$ -Klone identische CP-Domänen aufwiesen, bestätigt, dass das Prinzip der Prozessierung für Pcdh $\alpha 7$ gilt (Wu & Maniatis 1999). Dies scheint aber nicht immer so zu sein. Untersuchungen weisen auf differenzielle Splice-Produkte für andere α -Pcdh hin (Triana-Baltzer et al. 2006).

Für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen ist mPcdh $\alpha 7$ daher ein idealer Kandidat, um nach zytoplasmatischen Bindungspartnern zu suchen. Es weist keine Mutationen auf, wird hoch exprimiert und stark prozessiert in einer 14 Tage alten Maus.

4.2 Konstruktion der Hefe-Zwei-Hybrid-Bait-Vektoren

Da bisher keine genaueren Daten über funktionelle Bereiche der zytoplasmatischen Domäne einzelner Protocadherine vorliegen, wurde die zytoplasmatische Domäne des Pcdh $\alpha 7$ in Anlehnung an ihre genomische Anordnung in zwei Bereiche (siehe Kap. 1.4.1) untergliedert:

1. Die variable Region (AS 718–785), die gemeinsam mit der EC- und TM-Domäne von einem einzigen Exon kodiert wird und in jedem α -Protocadherin verschieden ist.
2. Die konstante Region (AS 785–930), die durch 3 Exons kodiert wird und gruppenspezifisch ist.

Für jede dieser beiden Regionen und für die gesamte zytoplasmatische Domäne wurden spezifische *Bait*-Vektoren konstruiert, um über die variable Region spezifische Interaktionspartner für mPcdh $\alpha 7$ und für die konstante Region gruppenspezifische Interaktionspartner aller α -Pcdh zu finden. Die Summe der gefundenen Interaktionspartner der beiden Regionen dürfte kleiner sein als die der gesamten zytoplasmatischen Domäne. Durch die Konstruktion von Fusionsproteinen für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen besteht die Gefahr der inkorrekten Faltung und der Maskierung von potenziellen Proteinbindungsstellen umso mehr, je stärker das zu untersuchende Protein verkürzt ist. Deshalb war es sinnvoll, neben den *Bait*-Vektoren für die variable (CPv) und die konstante Region (Cpc) auch noch einen *Bait*-Vektor mit der gesamten zytoplasmatischen Domäne (CPvc) zu konstruieren, in dem alle Bereiche vorhanden sind und der mit großer Wahrscheinlichkeit eine korrekte Faltung (Tertiärstruktur) aufweist.

Zur Konstruktion der drei *Bait*-Vektoren wurden Primer-Adapter benutzt, die Restriktionsschnittstellen enthalten. Mit diesen Primern konnten alle drei Fragmente aus dem zuvor klonierten *Pcdh α7* amplifiziert werden: die gesamte CP-Domäne (CPvc), die variable zytoplasmatische Domäne (CPv) und die konstante zytoplasmatische Domäne (CPc). Dabei wurde zur Vermeidung von Mutationen eine geringe Zyklenzahl gewählt. Die korrekte „in-frame“-Insertion in den *Bait*-Vektor pGBKT7 sowie der Ausschluss von Mutationen wurde durch eine bidirektionale Sequenzierung bestätigt.

Der *Bait*-Sequenz sind N-terminal die GAL4-DNA-BD, eine Myc-Erkennungssequenz sowie eine Kernlokalisierungssequenz vorgeschaltet. In einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen können theoretisch *Preys* gefischt werden, die an eine andere Sequenz als die *Bait*-Sequenz binden, z.B. an die Myc-Erkennungssequenz. Solche falsch positiven Klone werden durch einen Rescreen ausgeschlossen, indem die gefischten *Preys* nochmal gegen einen *Bait*-Leervektor geprüft werden.

Das klassische E-Cadherin besitzt mit 150 AS eine zu den Protocadherinen vergleichbare Länge der zytoplasmatische Domäne. Insgesamt wurden bisher drei zytosolische Bindungspartner der E-Cadherine identifiziert: β -Catenin, Plakoglobin und das membrannah bindende p120^{ctn} (Kemler et al. 1993, Anastasiadis & Reynolds 2001). Mit 212 AS ist die zytoplasmatische Domäne der α -Protocadherine noch etwas länger als die des E-Cadherins, in Analogie könnten zwei oder sogar drei zytoplasmatische Bindungspartner vorhanden sein.

4.3 Überprüfung der Hefe-Zwei-Hybrid-*Bait*-Konstrukte

Um ein *Bait*-Protein möglichst erfolgreich in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen einsetzen zu können, muss es die folgenden Anforderungen erfüllen:

- Es muss stabil exprimiert werden.
- Es darf nicht von sich aus die Transkription der Reportergene aktivieren.
- Es darf nicht toxisch für die Hefezellen sein.

Eine stabile Expression der drei *Bait*-Fusionsproteine in Hefezellen wurde erfolgreich mittels Western Blot (Kap. 3.3.1) nachgewiesen. Hierbei fiel auf, dass bei dem pGBKT7-Leervektor (Positivkontrolle) oberhalb der erwarteten sehr intensiven Bande des isolierten N-terminalen Fusionsanteils mehrere schwächere Banden zu sehen waren. Erklärt werden kann dies damit, dass die GAL4-BD sehr stark exprimiert wird, weil sie primär aus einem endogenen Hefeprotein besteht und unter der Kontrolle eines starken Promotors steht. Die große Menge an

Protein kann dazu führen, dass auch ein geringer Anteil des Proteins, der kovalente Bindungen, z.B. durch Oxidationsprozesse im Zellslysat, eingegangen ist, sichtbar wird. Bei sehr starken Proteinbanden werden oft zusätzliche schwache Banden im höheren Molekulargewichtsbereich beobachtet. Als Fusionsprotein ging die Expression deutlich um das 10–100-fache zurück.

Weiterhin ist es vor dem eigentlichen Screen notwendig, jedes *Bait*-Konstrukt auf Auto- und auf Transaktivierung hin zu überprüfen. (Bartel et al. 1993, Ausubel et al. 1995). Sollten die zu untersuchenden Proteine interne Transaktivierungsdomänen besitzen und somit in der Lage sein, für sich alleine bereits die Transkription der Reportergene zu aktivieren, würden bei einem Screen falsch positive Klone isoliert werden.

Die Autoaktivierung und somit das Isolieren von falsch positiven Interaktionspartnern stellt einen der gravierenden Nachteile des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems dar. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass sowohl *Bait* als auch *Prey* intrinsische Aktivität aufweisen können. Etwa 5 % aller Proteine besitzen latente Autoaktivität, wobei randomisierte Fragmente, wie man sie in cDNA-Banken findet, noch häufiger autoaktivieren (Cricking et al. 1999).

In den eigenen Untersuchungen zur Eignung der *Bait*-Konstrukte für einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen stellte sich heraus, dass das *Bait*-Konstrukt CPc eine Transaktivierung besitzt. Reporterogenaktivität wurde beobachtet, sobald CPc mit einem *Prey*-Vektor, der die AD-Domäne enthielt, cotransformiert wurde. Reporterogenaktivität wurde auch gegen die Negativkontrolle, den *Prey*-Leervektor, beobachtet. Aufgrund dieser Transaktivierung wurde CPc von dem nachfolgenden Hefe-Zwei-Hybrid-Screen ausgeschlossen.

Hinweise auf mögliche Bindungspartner von CPc können aber trotzdem mithilfe der beiden anderen Konstrukte CPv und CPvc gewonnen werden, die weder autoaktivierend noch transaktivierend sind. CPc beschreibt wie oben erwähnt, den konstanten Bereich der zytoplasmatischen Domäne von Pcdh $\alpha 7$ und ist dementsprechend im *Bait*-Konstrukt CPvc, das für die gesamte zytoplasmatische Domäne kodiert, enthalten. Werden jetzt Bindungspartner im CPvc-Screen gefunden, die sich nicht im CPv-Screen bestätigen, kann vermutet werden, dass der mögliche Interaktionspartner an den konstanten Bereich bindet.

In den Vorversuchen konnte somit für die zwei *Bait*-Konstrukte CPv und CPvc eine stabile Expression bestätigt und Autoaktivität sowie Transaktivierung ausgeschlossen werden. Es bleibt zu erwähnen, dass auch eine für Fusionsproteine beschriebene Toxizität (Allen et al. 1995) ausgeschlossen wurde, indem das Wachstumsverhalten von transformierten Hefezellen

mit dem *Bait*-Leervektor (pGBKT7-leer) und pGBKT7-CPv sowie pGBKT7-CPvc verglichen wurde. Damit waren alle Voraussetzungen für einen erfolgreichen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen für CPv und CPvc erfüllt.

4.4 Ausschluss einer homotypischen Dimerisierung der zytoplasmatischen Domäne von Pcdh $\alpha 7$

Eine heute gängige Hypothese besagt, dass Cadherine zunächst Cis-Dimere bilden. Sie binden im nächsten Schritt in „trans“ an gleiche Cadherine der Nachbarzelle und vermitteln so eine Zell-Zell-Adhäsion. Nachgewiesen wurde diese Art der Zelladhäsion bisher jedoch nur für klassische Cadherine (Boggon et al. 2002).

Für Protocadherine sind bisher noch keine solcher Untersuchungen bekannt. Da es möglich sein kann, dass eine Cis-Dimerisierung über die zytoplasmatische Domäne vermittelt wird, war es naheliegend, mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System das mPcdh $\alpha 7$ auf homotypische Interaktion in Form einer Dimerisierung zu untersuchen.

Dazu wurden analoge *Prey*-Vektoren konstruiert, indem die drei genannten Abschnitte des zytoplasmatischen Anteils von Pcdh $\alpha 7$ in den pGAD424-Vektor (*Prey*-Vektor) ligiert wurden. Eine Überprüfung der Konstrukte durch bidirektionale Sequenzierung schloss Mutationen aus und bestätigte den richtigen Leserahmen.

Anschließend wurden Cotransformationen mit allen Kombinationen von *Bait*- und *Prey*-Vektoren in AH109 Hefezellen durchgeführt. Mit Ausnahme von CPc konnte keine Reporter-genaktivierung festgestellt werden. Die Reporter-genaktivität von CPc war jedoch nicht weiter überraschend, da sie bereits in den vorangegangenen Experimenten festgestellt wurde und so als Artefakt gewertet werden kann (siehe Kap. 4.4).

Das Fehlen einer Aktivierung bei der Kombination der anderen Konstrukte zeigt, dass die zytoplasmatische Domäne des mPcdh $\alpha 7$ keine homotypische Dimerisierung induziert.

4.5 Fyn-Tyrosinkinase als bekannter Interaktionspartner

Bei der Suche nach molekularen Interaktionspartnern der Fyn-Tyrosinkinase im Maushirn entdeckten Kohmura und Kollegen (1998) zunächst CNR1 und CNR2, die sich später als Mitglieder des Protocadherin- α -Clusters herausstellten. Dafür wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-Screen durchgeführt und als Köder (*Bait*) die N-terminale Hälfte von Fyn-Tyrosinkinase einschließlich der SH3-SH2-Domäne eingesetzt.

Deswegen lag es nahe, die Fyn-Tyrosinkinase als *Prey*-Positivkontrolle zu benutzen. Dazu wurde eine Full-Length-Klonierung ihrer cDNA durchgeführt und diese dann in den *Bait*-Vektor pGBKT7 sowie in den *Prey*-Vektor pGAD424 kloniert. Weitergearbeitet wurde nur mit Klonen, bei denen Mutationen ausgeschlossen und die Lage im richtigen Leserahmen gezeigt wurde.

Bei den ersten Kontrollen wurde jedoch festgestellt, dass die Fusionsproteine sowohl aus der GAL4-DNA-BD und der Fyn-Tyrosinkinase als auch der GAL4-AD und der Fyn-Tyrosinkinase in den transformierten Hefen nicht exprimiert wurden. Trotz mehrfacher Wiederholung konnte keine Expression im Western Blot nachgewiesen werden. Technische Fehler beim Herstellen des Blots wurden durch eine Anfärbung der Blotmembran mit Ponceau-Rot und des Gels mit Coomassie-Blau ausgeschlossen. Da die transformierten Hefezellen jedoch auf dem Selektivmedium SD/-T bzw. SD/-L gewachsen sind und die Vektoren mittels DNA-Sequenzierung erfolgreich überprüft worden waren, muss davon ausgegangen werden, dass das GAL4-Fusionsprotein direkt nach der Translation proteosomal abgebaut wurde. Alternativ könnte die Transkription durch verschiedene Mechanismen inhibiert werden. Grund dafür könnte sein, dass die starke Expression einer intakten Protein-Tyrosin-Kinase für Hefezellen letal ist und nur solche Zellen überleben, die in der Lage sind, die Expression der Kinase selektiv zu unterdrücken.

Um dies zu überprüfen, könnte in Analogie zu Kohmura und Kollegen (1998) ein *Prey*-Vektor konstruiert werden, der lediglich den N-terminalen Teil von Fyn einschließlich der SH2/SH3-Domänen, nicht aber der Kinasedomäne enthält.

Da jedoch bis zum Abschluss der verschiedenen Kontrollen der Fyn-Expression die Bank bereits erfolgreich gescreent war, wurde auch in Anbetracht des Umfangs einer medizinischen Doktorarbeit auf die Herstellung einer optimierten Positivkontrolle verzichtet.

4.6 Herstellung und Validierung einer cDNA-Bank im Hefe-Zwei-Hybrid-*Prey*-Vektor

Eine cDNA-Bank repräsentiert im Idealfall die Gesamtheit aller exprimierten Gene des zu untersuchenden Gewebes. Um mit möglichst optimalen Bedingungen bei der Konstruktion einer cDNA-Bank zu arbeiten, erfolgte die RNA-Präparation aus Maushirn und die anschließende mRNA-Isolierung unter größter Sorgfalt und unter besonderen Vorkehrungen (Kap. 2.2.1). Durchgeführte Qualitätskontrollen bestätigten eine gute Ausbeute und die Reinheit der RNA.

Für die Erstrangsynthese hat man die Möglichkeit, einen modifizierten Oligo (dT)-Primer oder einen Random-Primer (bestehend aus sechs Nucleotiden mit einer randomisierten Sequenz aller vier Basen) zu benutzen. Der Oligo(dT)-Primer hybridisiert ausschließlich mit den 3'-Enden der Poly-A⁺-RNA. Hierbei kann es zu Problemen kommen, wenn der für die Bindungsstelle des gesuchten *Prey*-Moleküls kodierende Abschnitt im 5'-Bereich des Gens liegt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der cDNA-Synthese die Wahrscheinlichkeit für einen vorzeitigen Kettenabbruch der reversen Transkription zunimmt, je länger die mRNA ist. Daher wären cDNA-Populationen, die potentielle Bindungsstellen im N-terminalen Bereich eines Proteins repräsentieren, umso weniger in einer Bank vertreten, je weiter N-terminal die Bindungsstelle liegt und je länger die kodierende Sequenz des Proteins ist.

Aus diesem Grund wurde für die Erststrangsynthese ein modifizierter Random-Primer (CDSIII/6) verwendet. Er sollte an alle Bereiche des Templates mit gleicher Affinität binden, sodass erwartet werden kann, in der Bank auch eine große Anzahl an 5'-Sequenzen vorzufinden.

Für die anschließend durchgeführte LD-PCR erfolgte eine Bestimmung der optimalen Zyklenzahl. Zum einen soll die Zyklenzahl groß sein, um eine genügende Amplifikationen zu erhalten, zum anderen gering genug, um möglichst wenige Mutationen zu erzeugen. Bei der Menge an eingesetztem Template (Erststrang-cDNA) war bereits eine Zyklenzahl von 20 ausreichend. In einer anschließenden Gelelektrophorese konnte nachgewiesen werden, dass die amplifizierten cDNA-Fragmente hauptsächlich im Längenbereich von 400 bp bis 3 kb lagen. Sie war deutlich höher als die zur Kontrolle mitgeführten LD-PCR aus Plazenta (Abb.20).

Nach Transformation in Hefezellen (AH109), in denen die mit den SMART-Primerlinkern amplifizierte Doppelstrang-cDNA in den *Prey*-Vektor pGADT7 nach rekombiniert wurde, erfolgte eine Berechnung der Transformationseffizienz durch Ausstrich auf SD/-L Verdünnungsplatten (*Prey*-Vektor vermittelt Leucinprototrophie). Die Anzahl der primären Klone lag bei $5,6 \times 10^8$ und war somit 5,6-fach höher als vom Hersteller gefordert (Clontech, Heidelberg).

Wie bereits erwähnt, zeichnet sich die Qualität einer cDNA-Bank vor allem durch die Anzahl an unabhängigen Klonen, d.h. durch die Vielfalt der in dieser Bank kodierenden cDNAs aus. Durchschnittlich sollte die Anzahl unabhängiger Klone bei 1×10^6 liegen, damit jedes in einer Zelle exprimierte Gen mindestens einmal in der cDNA-Bank enthalten ist. Hierbei ist zu bedenken, dass die Gesamtheit der amplifizierten cDNA-Sequenzen bei der Verwendung von

Randomprimern zur Erststrang cDNA-Synthese nur zu 1/6 den korrekten Leserahmen bezüglich der GAL4-AD besitzt (Fields & Sternglanz 1994).

Um zusätzliche Informationen über den Größenbereich der Bank zu erhalten und sicherzugehen, dass es durch die Technik der Rekombination zu keiner artifiziellen Verkürzung der cDNAs gekommen ist, wurde eine Kolonie-PCR mit 10 exemplarisch gepickten Klonen durchgeführt. Dabei wurde ein Größenbereich von 600 bp bis 2kb abgedeckt, der dem Ergebnis der Elektrophorese der amplifizierten cDNA entsprach. Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, dass bei der Konstruktion der Bank cDNA-Fragmente mit einer Länge von weniger als 200 bp Länge durch eine Chromatographie aussortiert wurden.

Aufgrund dieser Kontrollen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der cDNA-Bank um eine qualitativ wertvolle Bank handelt. Dies bewiesen auch die beiden mit dieser Bank durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Screens, mit denen unterschiedliche cDNA-Sequenzen isoliert werden konnten.

4.7 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen der cDNA-Bank mit den beiden *Bait*-Vektoren

Der Hefe-Zwei-Hybrid-Screen wurde für die *Bait*-Konstrukte CPvc und CPv getrennt durchgeführt. Der Hefestamm Y187 wurde mit der in den Hefestamm AH109 eingebrachten cDNA-Bank gematet. Eine Selektion erfolgte zunächst auf SD/-HALT-Platten. Beim CPvc-Screen wurden 283 positive Klone, beim CPv-Screen 162 positive Klone gefunden. Diese Klone, die in der Lage sind, die Reportergene *HIS3* und *ADE2* zu exprimieren, wurden als mögliche Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domäne von Pcdh $\alpha 7$ angesehen und in einer Glycerolkultur für weitere Untersuchungen aufgehoben.

Um die bei diesem Screen gewonnenen Daten zu beurteilen, wurde die Gesamtzahl der auf Interaktion überprüften gescreenten *Prey*-Klone berechnet. Dafür wurden parallel zur Ausplattierung auf SD/-HALT Verdünnungsreihen auf SD/-T, SD/-L und SD/-LT angefertigt. Damit konnte die Anzahl der diploiden Klone und die Mating-Effizienz bestimmt werden. Sie betrug beim CPv-Screen 5,6 % und beim CPvc-Screen 6,3 %. Im CPv-Screen wurden $1,4 \times 10^6$ und im CPvc-Screen $1,6 \times 10^6$ auf eine Interaktion mit den *Baits* geprüft, wovon in einer ersten Selektionsrunde 283 bzw. 162 Klone Reportergenexpression zeigten. Eine ähnliche Anzahl primär identifizierter Klone wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Suzuki et al. 2006; Letteboer & Roepman 2008).

Es bleibt zu erwähnen, dass in sehr geringem Maße *HIS3* im Hefestamm AH109 basal synthetisiert werden kann, da dessen Expression weniger stringent kontrolliert ist als die von *ADE2* (Fields & Sternglanz 1994). Der kompetitive Inhibitor des *HIS3*-Proteins, 3-AT, kann verwendet werden, um das Wachstum auf Histidin-freien Medien zu minimieren (Durfee et al. 1993).

Da jedoch sowohl im CPvc-Screen als auch im CPc-Screen sofort keine Transaktivierung zu erkennen war, war keine Zugabe von 3-AT erforderlich.

4.8 Eingrenzung der gefundenen Klone durch Hinzunahme eines dritten Reporters

Die möglichen Interaktionspartner wurden auf die Untersuchung der Aktivierung eines weiteren Reportergens (*MEL1*) weiter eingeschränkt. Der verwendete Hefestamm AH109 ist zusätzlich mit den Reportergenen *LacZ* und *MEL1* ausgestattet, die eine X-Gal-Selektion erlauben. Die von *MEL1* kodierte α -Galaktosidase wird im Unterschied zur β -Galaktosidase (durch *LacZ* rekonstituiert) sezerniert. Die *MEL1*-Selektion ist daher auf X- α -Gal beschichteten Platten leicht möglich und erfordert im Gegensatz zur *LacZ*-Selektion keine Zelllyse (Aho et al., 1997). Bei einer Interaktion von *Bait* und *Prey* wird *MEL1* exprimiert und X- α -Gal in einen blauen Farbstoff gespalten. Blaufärbung zeigten 20 Klone des CPvc-Screen und 11 Klone des CPv-Screen.

Schließlich resultierten aus über 1,4 Millionen Klonen für den CPv-Screen und aus 1,6 Millionen Klonen für den CPvc-Screen, die auf eine mögliche Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von Pcdh $\alpha 7$ überprüft wurden, insgesamt lediglich 31 potenzielle *Prey*-Kandidaten. Eine ähnliche Ausbeute wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Kaiser et al. 2003).

4.9 Identifizierung der positiven Klone mittels Sequenzierung

Insgesamt 31 Klone exprimieren somit die drei Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *MEL1*. Von all diesen wurde das Insert des *Prey*-Vektor isoliert, mit spezifischen PCR-Primern amplifiziert und schließlich sequenziert.

Die in diesen beiden Hefe-Zwei-Hybrid-Screens identifizierten *Prey*-cDNA-Sequenzen wurden einer Datenbank-Analyse (Blast-Search) unterzogen (Tab. 10 und 11). Irrelevante Sequenzen und die auch von anderen Arbeitsgruppen identifizierten typischen "Falsch-Positiven" wie ribosomale Proteine oder das Uridinkinase-ähnliche Protein (Farrell et al. 1991) wurden verworfen. Ebenso blieben Sequenzen unberücksichtigt, deren Leserahmen nicht mit der GAL4-Domäne übereinstimmte.

Die am häufigsten isolierten cDNAs waren cDNA aus dem sympathischen Ganglion eines 2d Embryos (zwei Treffer im CPv-Screen), die Caseinkinase (drei Treffer im CPvc-Screen), Neurofilament (zwei Treffer im CPvc-Screen) und die cDNA-Sequenz eines bisher unbekanntes Proteins (vier Treffer im CPvc-Screen). Zu diskutieren wären hier besonders :

Caseinkinase

Schon lange ist bekannt, dass die reversible Proteinphosphorylierung eine entscheidende Rolle für die Signaltransduktion spielt. Caseinkinasen (CK) stellen eine Gruppe konservierter, monomerer Serin-Threonin-Proteinkinasen dar, die in fast allen eukaryontischen Spezies vorkommen. Sie übertragen die terminale Phosphatgruppe aus dem ATP auf die Hydroxyl-Seitenkette der Aminosäuren Serin und Threonin und sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie DNA-Reparatur (Hoekstra et al. 1991; Dhillon & Hoekstra 1994), Zellzykluskontrolle (Gross et al. 1997) und Vesikeltransport (Panek et al. 1997) beteiligt. In Säugetieren können sieben CK-Untergruppen unterschieden werden.

Alle Mitglieder der CK-Familie besitzen eine hoch konservierte N-terminale katalytische Domäne, die etwa 300 Aminosäurereste lang ist (Rowles et al. 1991). Die C-terminalen Domänen sind hingegen variabel und an der subzellulären Zielsteuerung (Vancura et al. 1994) und der Aktivitätsregulierung (Carmel et al. 1994; Graves & Roach 1995) beteiligt.

Die Isolierung einer Proteinkinase in der vorliegenden Arbeit deutet darauf hin, dass möglicherweise α -Pcdh an der Regulierung einer Signalkaskade beteiligt sind.

Neurofilament

Es ist bekannt, dass Proteine, die eine Rolle im Aufbau oder der Aufrechterhaltung des Zytoskeletts haben, auch bei der Modulierung von Signaltransduktionswegen beteiligt sein können. Interessant ist die Identifizierung des Neurofilament als möglicher α -Pcdh – Bindungspartner vor allem dadurch, dass Triana-Baltzer und Kollegen (2006) erst kürzlich das Neurofilament als möglichen Interaktionspartner der Protocadherine des α -Clusters beschrieben haben.

Unbekanntes Protein

Die viermalige Isolierung einer unbekanntenen Maus cDNA-Sequenz deutet auf eine starke Interaktion mit den α -Protocadherinen hin. Dieses hypothetische Protein wird derzeit in der Arbeitsgruppe näher untersucht.

4.10 Rescreen der identifizierten cDNA-Klone

Ein einschränkender Faktor beim Einsatz des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens zur Identifizierung von Proteininteraktionen stellt das Isolieren von falsch positiven Klonen dar (Bartel et al. 1993a). Diese können unspezifisch z.B. mit promotorassoziierten Proteinen oder mit nahe an der GAL4-DNA-Bindungsstelle des Bait-Fusionsproteins gelegenen Sequenzen interagieren und zur Aktivierung der Reporter führen. Ebenso können sie autoaktivierend sein; insbesondere randomisierte cDNA-*Prey*-Sequenzen (d.h. Sequenzen in falscher Orientierung oder falschem Leserahmen) sind in der Lage, ohne eine GAL4-DNA-BD eine Reporterexpression zu aktivieren. (Criekinge et al, 2003).

Um solche Artefakte auszuschließen, wurde jeder der 31 in der *MEL1*-Selektion bestätigten Klone nochmals mit dem *Bait*-Leervektor, mit der Negativkontrolle und mit dem entsprechenden *Bait* getestet. So konnte gleichzeitig geprüft werden, ob sich die Aktivierung der Reportergene in einem haploiden Hefestamm (AH109) reproduzieren lässt.

Keines der 31 *Prey*-Konstrukte besaß Autoaktivität oder Transaktivierung. Erstaunlicherweise konnten jedoch nur 4 der 31 Klone im Rescreen bestätigt werden. Erklärungsansätze für diese geringe Ausbeute liegen in der Möglichkeit des Verlusts des Bank-Plasmids oder in einer geringen Expressionsstärke des *Preys* in Hefe. Dieses könnte eine Detektion im Rescreen verhindern. Es bleibt zu erwähnen, dass auch andere Arbeitsgruppen solche Ergebnisse beschreiben (Kaiser et al., 2003).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass eine Hefezelle simultan mit mehreren verschiedenen Bankplasmiden transformiert wird. Das wiederum kann dazu führen, dass in einer als positiv ermittelten Hefekolonie die Bankplasmide A und B vorhanden sind, Plasmid A ausschließlich die Interaktion mit dem *Bait* eingeht, aber nur Plasmid B isoliert wird. In diesem Fall ist Plasmid B ein falsch positiver Klon.

Bei den 4 im Rescreen als wahre Interaktionspartner identifizierten Klonen handelt es sich ausschließlich um Klone des CPvc-Screens. Da aber CPv den „variablen“ Anteil der zytoplasmatischen Domäne der Protocadherine darstellt, ist es durchaus möglich, dass in diesem Bereich keine Bindungsstelle für einen potenziellen Interaktionspartner liegt und somit auch keine Interaktion stattfinden kann.

Überraschenderweise sind alle 4 cDNAs identisch und codieren für unterschiedlich lange Fragmente einer bisher unbekannt Sequenz. Dieses hypothetische Protein wird zurzeit in der Arbeitsgruppe untersucht und die mögliche Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne des Pcdh $\alpha 7$ mit unabhängigen Methoden verifiziert.

4.11 Bewertung der Resultate des Hefe-2-Hybrid-Screens

Eine der grundlegenden Voraussetzungen ist die uneingeschränkte Proliferation der gematen Hefezellen, damit sie als positive Kandidaten detektiert werden können. Ein Test auf Toxizität der *Bait*-Proteine erwies sich in den Vorversuchen als negativ. Unter Umständen wirkt sich jedoch die konstitutive Expression heterologer *Prey*-Proteine in Hefen schädlich auf das Wachstum der Zellen aus, da eine Wechselwirkung des Fusionsproteins mit zellulären Vorgängen in der Hefe eintreten kann (Allen et al. 1995). Für *Prey*-Proteine, die von sich aus toxisch auf die Hefezellen wirken, besteht also im Hefe-Zwei-Hybrid-System von vornherein keine Möglichkeit, als Interaktionspartner eines *Bait*-Proteins identifiziert zu werden.

Es ist ebenfalls möglich, dass in dem *Bait*- oder *Prey*-Fusionsprotein die entsprechende Interaktionsdomäne verdeckt oder es in der Ausbildung einer für die Interaktion notwendigen Sekundärstruktur beeinträchtigt ist (Van Aelst et al. 1993).

Obwohl in der Hefe generell posttranslationale Modifikationen möglich sind, kann es vorkommen, dass genau die für eine Interaktion notwendigen posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung, Disulfidbrückenbindung, Acetylierung und Phosphorylierung in den Hefezellen nicht erfolgen (Fields & Sternglanz 1994).

Zum anderen ist für das Zustandekommen vieler Interaktionen die unmittelbare Umgebung der beteiligten Bindungspartner essenziell. So entscheiden der pH-Wert, die Calcium- und andere Ionenkonzentrationen sowie nicht zuletzt die Anwesenheit dritter modulatorischer Proteine über die Ausbildung einer Bindung (Colas & Brent 1998).

Problematisch ist beim Hefe-Zwei-Hybrid-System auch, dass die Interaktion der zu untersuchenden Proteine im Zellkern der Hefe stattfinden muss, da die Transkription nur dort stattfindet. Zum einen kann es Probleme beim Transport der Fusionsproteine in den Zellkern geben, zum anderen können sich Proteine im Milieu des Zellkerns anders falten als in dem Bereich der Zelle, in dem sie üblicherweise auftreten. Diese veränderte Faltung, aber auch die unnatürliche Überexpression der Proteine in der Hefe, beeinflussen eventuell die Struktur und die Oberflächeneigenschaften der Proteine, wodurch es zu falschen Versuchsergebnissen kommen kann.

Trotzdem soll an dieser Stelle nochmals erwähnt werden, dass das Hefe-Zwei-Hybrid-System als in-vivo-System gegenüber anderen biochemischen Methoden zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen wie Koimmunpräzipitation, chemische Quervernetzung und Affinitätschromatographie deutlich sensitiver ist (Yang et al., 1995). Mit diesem System konnten schon unzählige Protein-Protein-Interaktionen aufgedeckt werden und es wird inzwischen auch für die genomweite Analyse von Interaktionen aller Proteine der Hefe eingesetzt (Uetz et al. 2000).

Vor diesem Hintergrund muss davon ausgegangen werden, dass zum einem reale Interaktionspartner im Hefe-Zwei-Hybrid-System übersehen und zum anderen Interaktionen gefunden werden können, die physiologischerweise nicht auftreten. Inwieweit dies auf die identifizierten Klone zutrifft, kann erst durch aufwendige biochemische und zellbiologische Folgeuntersuchungen geklärt werden.

4.12 Zusammenfassung und Ausblick

Die α -Protocadherine gehören zu der Familie der geclusterten Protocadherine, die sich aufgrund auffälliger Strukturmerkmale klar von anderen Cadherin-Familien abgrenzen. Im Gegensatz zu klassischen Cadherinen besitzen sie sechs anstelle von fünf Cadherin-Homologdomänen, eine transmembranäre Domäne und einen zytoplasmatischen Bereich, der keine Homologien zu dem anderer Cadherine aufweist.

Die ungewöhnliche Anordnung der α -, β - und γ -Protocadherine in Form von Genclustern erinnert an die genomische Organisation der Immunglobuline bzw. T-Zell-Rezeptoren. Es wird davon ausgegangen, daß sich durch alternative Promotorwahl im Falle des α -Clusters 14 verschiedene primäre Transkripte aus den hintereinander aufgereihten „variablen“ Exons ergeben, die durch cis-Spleißen mit den drei am Ende des Clusters gelegenen „konstanten“ Exons verbunden werden (Kemler, 2001).

Diese Anordnung sowie die große Vielfalt der geclusterten Pcdh mit weit über 50 Mitglieder und ihre Expression im zentralen Nervensystem lassen eine wichtige Funktion bei der Entwicklung des Gehirns und der Ausbildung neuronaler Verschaltungen vermuten. Die geclusterten Pcdh sind jedoch funktionell noch unzureichend charakterisiert; bisherige Studien führten teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen. Um genauere Erkenntnisse über die Funktionsweise der Protocadherine zu gewinnen, ist die Identifizierung ihrer zellulären Interaktionspartner enorm wichtig.

In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Domäne der α -Protocadherine im Hinblick auf ihre mögliche Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen untersucht, um daraus Hinweise auf die Beteiligung der α -Protocadherine an der Regulierung zellulärer Funktionen ableiten zu können. Besonders im Hinblick auf die Embryogenese sind konservierte Signaltransduktionswege und die Prozesse der Zelladhäsion von fundamentaler Bedeutung.

Zur Realisierung dieses Vorhabens wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System angewendet. Es wurden zunächst die cDNAs mehrerer α -Protocadherine der Maus kloniert. Die zytoplasmatische Domäne eines spezifischen Protocadherins, Pcdh $\alpha 7$, wurde im nächsten Schritt dafür eingesetzt, drei Hefe-Zwei-Hybrid-Bait-Vektoren herzustellen, die den variablen Bereich, den konstanten Bereich oder die gesamte zytoplasmatische Domäne beinhalten.

Aus der cDNA des Gehirns einer knapp 2 Wochen alten Maus wurde eine cDNA-Bank in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Prey-Vektor hergestellt und diese nach Durchführung der erforderlichen Kontrollen zur Suche nach Interaktionspartnern des murinen $\alpha 7$ -Protocadherin eingesetzt. Aus $1,6 \times 10^6$ Klonen wurden initial durch eine erste Selektion (*HIS3+*, *ADE2+*) insgesamt 283 Klone identifiziert, die mit der gesamten zytoplasmatischen Domäne des Pcdh $\alpha 7$ interagieren (CPvc-Screen), und 162 Klone aus $1,4 \times 10^6$, die speziell mit dem variablen Bereich der zytoplasmatischen Domäne interagieren (CPv-Screen). Die möglichen Interaktionspartner wurden durch die Untersuchung der Aktivierung eines weiteren Reportergenes (*MEL1*) auf 20 Klone des CPvc-Screen und 11 Klone des CPv-Screen

eingeschränkt. Diese Klone wurden sequenziert, mit bekannten mRNA-Sequenzen der Maus verglichen und einem Rescreen unterzogen. Letztlich bestätigten sich vier positive Klone des CPvc-Screen, die jedoch alle Abschnitte der gleichen, bislang unbekanntes cDNA enthielten.

Das in dieser Arbeit gefundene hypothetische Protein wird derzeit in Anschlussarbeiten weiter charakterisiert, wobei verschiedene Methoden (Co-Lokalisation in der Immunfluoreszenzmikroskopie, Co-Immunpräzipitation, Bindungsassays, etc.) zur Anwendung kommen werden.

Ebenfalls weiter gearbeitet werden kann mit der in dieser Arbeit vollständig klonierten Protocadherinen $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ und $\alpha 12$.

4.13 Summary

The alpha-Protocadherins, the members of the clustered protocadherins, exhibit distinct structural features which make them unique within the cadherin superfamily. In contrast to classical cadherins, they have six instead of five extracellular cadherin repeats and a cytoplasmic domain which no homologie to the cytoplasmic domain of other cadherins.

The clustered Protocadherins are arranged in three neighboring gene clusters. The most striking feature of these clusters is a highly specific arrangement of variable and constant regions resembling distantly to the immunoglobulin and T-cell gene clusters. However, genomic recombination has been ruled out and it appears that every neuron expresses just one variable region that is spliced – in case of α - and γ -Pcdh – to the constant region made from three exons.

Due to this organization and to their highly specific expression in the central nervous system, protocadherins are believed to play an important role in CNS differentiation and neural circuitry programming. They are thought to perform their function by recognizing appropriate partners on opposing surfaces and transmitting this information either through a cytoskeletal link or through a signal transduction cascade. However, still little is known about their cellular function and their cytoplasmic binding partners.

In this thesis the cytoplasmic domain of α -Protocadherins has been chosen to find potential intracellular binding partners by using the Yeast-Two-Hybrid-System. A number of murine Pcdh α cDNAs were cloned and Pcdh $\alpha 7$ was chosen to construct three different Yeast Two-Hybrid *bait* vectors encompassing either the variable part of the cytoplasmic domain (CPv), or the constant domain (CPc), or both (CPvc).

Whole brain mRNA of a 2 week old mouse was used to build a *prey* library. Whereas the CPc bait was interacting with all *prey* constructs, including the empty vector, without being truly autoactivating, the other CPv and CPvc baits yielded in the initial screen 162 (out of 1.4×10^6 successfully mated cells) and 283 (out of 1.6×10^6 successfully mated cells) interacting clones, respectively (*HIS3+*, *ADE2+*).

All 162 positive clones of the initial CPv and 283 of the CPvc screen were analyzed individually for the expression of the third selection marker *Mel1*, encoding α -galactosidase. Under this more stringent selection only 11 clones stained positive of the CPv and 20 of the

CPvc screen. From those 31 yeast clones, the cDNA inserts were bidirectionally sequenced and submitted to a BLAST analysis.

Four sequences referred to known proteins but were in the wrong reading frame or reverse orientation, eight sequences corresponded to typical false positive matches, like ribosomal proteins, seven exhibited no similarity to any listed transcript and 12 yielded matches to a total of 6 different promising candidate proteins that are further analysed.

5 Literaturverzeichnis

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215:403–10.
2. Altschul SF, Madden TL, Schäffer, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389–402.
3. Aho S, Arffman A, Pummi T, and Uitto J. A novel reporter gene MEL1 for the yeast two-hybrid system. *Anal Biochem* 1997; 253: 270–72.
4. Allen JB, Wallberg MW, Edwards MC, and Elledge SJ. Finding prospective partners in the library: the yeast two-hybrid system and phage display find a match. *TIBS* 1995; 20: 511–6.
5. Anastasiadis PZ and Reynolds AB. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 604–10.
6. Angres B, Kim L, Jung R, Geßner R, and Tauber R. LI-cadherin gene expression during mouse intestinal development. *Dev Dyn* 2001; 221: 182–93.
7. Angst BD, Marcozzi C, and Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 2001; 114: 629–41.
8. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, and Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules and selectins. *Pharmacol Rev* 1998; 50:197–263.
9. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Oxford: John Wiley & Sons, 1995.
10. Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R, and Fields S. Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In: Hartley DA ed. *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 1993a. 153–79.
11. Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R, and Fields S. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques* 1993b; 14: 920–24.

12. Berndorff D, Gessner R, Kreft B, et al. Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca(2+)-dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. *J. Cell Biol.* 1994; 125: 1353–1369.
13. Birchmeier W and Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 11–26.
14. Birnboim HC and Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513-23.
15. Bixby JL and Jhabvala P. Tyrosine phosphorylation in embryonic growth cones. *J Neurosci* 1993; 13: 3421–32.
16. Blank M, Triana-Baltzer GB, Richards CS, and Berg DK. Alpha-protocadherins are presynaptic and axonal in nicotinic pathways. *Mol Cell Neurosci* 2004; 26: 530–43.
17. Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, and Shapiro L.
18. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 2002. 296 : 1308-13.
19. Brent R and Ptashne M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 1985; 43: 729–36.
20. Brown MT and Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1287: 121–49.
21. Carmel G, Leichus B, Cheng X, et al. Expression, purification, crystallization, and preliminary x-ray analysis of casein kinase-1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 1994; 269: 7304–9.
22. Chenchik A, Zhu YY, Diatchenko L, Li R, Hill J, and Siebert PD. Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In: *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*. MA BioTechniques Books, 1998: 305–19.
23. Chien CT, Bartel PL, Sternglanz P, and Fields S. The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 9578–82.
24. Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–9.

-
25. Chothia C and Jones EY. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 823–62.
 26. Christofori G and Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumoursuppressorgene. *Trends Biochem Sci* 1999; 24:73–6.
 27. Clontech. Matchmaker Construction and Screening Kit User Manual 2001. 1- 42
 28. Colas P and Brent R. The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology. *Trends Biotechnol* 1998; 16:355–63.
 29. Cowin P, Rowlands TM, and Htasell SJ. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2005. 17(5):499-508.
 30. Crolow C. Expression und Isolierung von Protocadherin-Partialsequenzen. [Dissertation] Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin 2008.
 31. Cunningham BA. Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 628–33.
 32. Dhillon N and Hoekstra MF. Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *EMBO J* 1994; 13: 2777–88.
 33. Doherty P, Williams G, and Williams EJ. CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade. *Mol Cell Neurosci* 2000; 16: 283–95.
 34. Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge S.J. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 1993 7(4): 555-69.
 35. Edelman GM. Expression of cell adhesion molecules during embryogenesis and regeneration. *Exp Cell Res* 1985; 161: 1–16.
 36. Emsley JG and Hagg T. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp Neurol* 2003; 183: 298–310.
 37. Esumi S, Kakazu N, Taguchi Y, et al. Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the protocadherin-alpha gene cluster in single neurons. *Nat Genet* 2005; 37: 171–6.

38. Farrel Jr RE. RNA Methodologies A Lab Guide for Isolation and Characterization. San Diego: Academic Press, 1993.
39. Fields S and Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989; 340: 245–6.
40. Fields S and Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 1994; 10: 286–92.
41. Frank M and Kemler R. Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 557–62.
42. Frank M, Ebert M, Shan W, et al. Differential expression of individual gamma-protocadherins during mouse brain development. *Mol Cell Neurosci* 2005; 29: 603–16.
43. Garrod DR, Merritt AJ, and Nie Z. Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 537–45.
44. Geiger B and Ayalon O. Cadherins. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8: 307–32.
45. Geourjan C and Deléage G. ANTHEPROT 2.0: a three-dimensional module fully coupled with protein sequence analysis methods. *J Mol Graph.* 1995; 13: 209–12.
46. Gessner R and Tauber R. Intestinal Cell Adhesion Molecules: Liver-Intestine Cadherin. *Ann NY Acad Sci* 2000; 915: 136–43.
47. Gietz D, St. Jean A, Woods RA, and Schiestl RH. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 1425.
48. Gilmore EC and Herrup K. Cortical development: receiving reelin. *Curr Biol* 2000; 10: R162–6.
49. Grant SG, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, and Kandel ER. Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice. *Science* 1992; 258: 1903–10.
50. Graves PR and Roach PJ. Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. *J Biol Chem* 1995; 270: 21689–94.
51. Gross SD, Simerly C, Schatten G, and Anderson RA. A casein kinase I isoform is required for proper cell cycle progression in the fertilized mouse oocyte. *J Cell Sci* 1997. 110: 3083–90.
52. Gumbiner BM. Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* 1993; 11: 551–64.

-
53. Gumbiner BM. Regulation of Cadherin Adhesive Activity. *J Cell Biol* 2000; 148: 399–404.
 54. Gumbiner BM. Signal transduction of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 634–40.
 55. Guthrie C and Fink GR. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol* 1991; 194: 1-932.
 56. Hamada S and Yagi T. The cadherin-related neuronal receptor family: a novel diversified cadherin family at the synapse. *Neuroscience Research* 2001; 41: 207–15.
 57. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166: 557–80.
 58. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, and Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potential inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805–16.
 59. Hattori D, Demir E, Kim HW, Viragh E, Zipursky SL, and Dickson BJ. Dscam diversity is essential for neuronal wiring and self recognition. *Nature* 2007; 449: 223–7.
 60. Hoekstra MF, Liskay RM, Ou AC, et al. HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA. *Science* 1991. 253: 1031–4.
 61. Hunter T. Signaling-2000 and beyond review. *Cell* 2000; 100: 113–27.
 62. Hynes RO. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol* 1999; 9: M33–7.
 63. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673–87.
 64. Iwabuchi K, Li B, Bartel P, and Fields S. Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 1993; 8: 1693–6.
 65. James P, Haliaday J, and Craig EA. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 1996; 144: 1425–36.
 66. Jung R, Struktur- und Funktionsanalyse muriner 7D-Cadherin Gene [Dissertation] Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin 2001.

67. Kaiser FJ, Möröy T, Chang GT, Horsthemke B, and Lüdecke HJ. The RING finger protein RNF4, a co-regulator of transcription, interacts with the TRPS1 transcription factor. *J Biol Chem* 2003. 278:38780–5.
68. Kallenbach S, Khantane S, Carroll P, et al. Changes in Subcellular Distribution of Protocadherin Gamma Proteins Accompany Maturation of Spinal Neurons. *J Neurosci Res* 2003; 72: 549–56.
69. Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 1993; 9: 317–21.
70. Kim SY, Chung HS, Sun W, and Kim H. Spatiotemporal expression pattern of non-clustered protocadherin family members in the developing rat brain. *Neuroscience* 2007; 147: 996–1021.
71. Kimura Y, Matsunami H, Inoue T, et al. Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos. *Dev Biol* 1995; 169: 347–58.
72. Koch PJ, Franke WW, Aberle H, Schwartz H, and Kemler R. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 682–7.
73. Kohmura N, Senzaki K, Hamada S, et al. Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron* 1998; 6: 1137–51.
74. Kojima N, Wang J, Mansuy IM, Grant SG, Mayford M and Kandel ER. Rescuing impairment of long-term potentiation in fyn-deficient mice by introducing Fyn transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4761–5.
75. Laemmli UK. Cleavage of structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–5.
76. Letteboer SR and Roepman R. Versatile screening for binary protein-protein interactions by yeast two-hybrid mating. *Methods Mol Biol.* 2008. 484 :145-59.
77. Letunic I, Copley RR, Schmidt S, et al. SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* 2004; Database issue: D142–4.
78. Li B and Fields S. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T-antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J* 1993; 7: 957–63.

-
79. Ma J and Ptashne M. Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating Segments. *Cell* 1987; 48: 847–53.
 80. Marcozzi C, Burdett I, Buxton R, and Magee A. Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. *J Cell Sci* 1998; 111: 495–509.
 81. McEver RP. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 581–6.
 82. Mutoh T, Hamada S, Senzaki K, Murata Y, and Yagi T. Cadherin-related neuronal receptor 1 (CNR1) has cell adhesion activity with beta1 integrin mediated through the RGD site of CNR1. *Exp Cell Res* 2004; 294: 494–508.
 83. Näthke IS, Hink LE, and Nelson WJ. Epithelial cell adhesion and development of cell surface polarity: possible mechanisms for modulation of cadherin function, organization and distribution. *J Cell Sci Suppl* 1993; 17: 139–45.
 84. Nagafuchi A and Takeichi M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *Embo J* 1988; 7: 3679–84.
 85. Nagar B, Overduin M, Ikura M, and Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 1996; 380: 360–4.
 86. Nakagawa S and Takeichi M. Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development* 1995; 121: 1321–32.
 87. Nelson WJ. Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science* 1992; 258: 948–55.
 88. Nollet F, Kools P, and van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 2000; 299: 551–72.
 89. Noonan JP, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, and Myers RM. Gene conversion and the evolution of protocadherin gene cluster diversity. *Genome Res* 2004; 14: 354–66.
 90. Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, and Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci* 1999; 112: 1237–45.

91. Osterhout DJ, Wolven A, Resh MD and Chao MV. Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. *J Cell Biol* 1999; 145: 1209–18.
92. Ozawa M and Kemler R. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-catenin from the E-cadherin.catenin complex. *J Biol Chem* 1998; 273: 6166–70.
93. Ozawa M, Baribault H, and Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 1989; 8: 1711–7.
94. Panek HR, Stepp JD, Engle HM et al. Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *EMBO J* 1997; 16: 4194–204.
95. Pertz O, Bozic D, Koch AW, et al. A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J* 1999; 18: 1738–47.
96. Phillips GR, Tanaka H, Frank M, et al. Gamma-protocadherins are targeted to subsets of synapses and intracellular organelles in neurons. *J Neurosci* 2003. 23(12): 5096-104.
97. Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, and Engel J. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* 1994; 223: 1019–26.
98. Ranscht B and Dours-Zimmermann MT. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron* 1991; 7: 391–402.
99. Rice DS and Curran T. Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 1005–39.
100. Ringwald M, Schuh R, Vestweber D., et al. The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *EMBO J* 1991; 6: 3647–53.
101. Roche S, Fumagalli ST, and Courtneidge SA. Requirement for Src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division. *Science* 1995; 269: 1567–9.

-
102. Rosen SD and Bertozzi CR. The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 663–73.
 103. Rowles J, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, and Cobb MH. Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9548–52.
 104. Ruoslahti E and Öbrink B. Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res* 1996; 227: 1–11.
 105. Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, and Ptashne M. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 1988; 335: 563–4.
 106. Sano K, Tanihara H, Heimark RL, et al. Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J* 1993; 6: 2249–56.
 107. Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463–7.
 108. Scheiffele P. Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26: 485–508.
 109. Schneider S, Buchert M, and Hovens CM. An in vitro assay of b-galactosidase from yeast. *BioTechniques* 1996; 20: 960–2.
 110. Schuh R, Vestweber D, Riede I, et al. Molecular cloning of the mouse cell adhesion Molecule uvomorulin: cDNA contains a B1-related sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1364–8.
 111. Schultz J, Milpetz F, Bork P, and Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 1998; 95: 5857–64.
 112. SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, PochartP, Fields S and Wickens M. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 94: 8496–8501.
 113. Senzaki K, Ogawa M, and Yagi T. Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell* 1999; 99: 635–47.

114. Smith CL, Mittraud P, Prescott ED, Fuhrer C, Burden SJ. Src, Fyn, and Yes are not required for neuromuscular synapse formation but are necessary for stabilization of agrin-induced clusters of acetylcholine receptors. *J Neurosci* 2001; 21: 3151–3160.
115. Sperry RW. Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963; 50: 703–10.
116. Steinberg MS and Takeichi M. Experimental specification of cell sorting, tissue spreading and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 206–9.
117. Sugino H, Hamada S, Yasuda R, et al. Genomic organization of the family of CNR cadherin genes in mice and humans. *Genomics* 2000; 63: 75–87.
118. Sugino H, Yanase H, Hamada S, et al. Distinct genomic sequence of the CNR/Pcdh alpha genes in chicken. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 437–45.
119. Suzuki H, Arakawa Y, Ito M et al. Cloning of a newly identified heart-specific troponin I isoform, which lacks the troponin T binding portion, using the yeast hybrid system. *Exp Clin Cardiol*.2006. 11(1) :4-7.
120. Takeichi M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 1977; 75: 464–74.
121. Tanihara H, Sano K, Heimark RL, et al. Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. *Cell Adhes Commun* 1994; 2: 15–26.
122. Tasic B, Nabholz CE, Baldwin KK, et al. Promoter choice determines splice site selection in protocadherin alpha and gamma pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2002; 10: 21–33.
123. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, and Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995; 9: 866–73.
124. Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, and Peifer M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 91–100.
125. Thomas SM, Soriano P, and Imamoto A. Specific and redundant roles of Src and Fyn in organizing the cytoskeleton. *Nature* 1995; 376: 267–71.

126. Thomson RB, Igarashi P, Biemesderfer D, et al. Isolation and cDNA cloning of Ksp-cadherin, a novel kidney-specific member of the cadherin multigene family. *J Biol Chem* 1995; 270: 17594–17601.
127. Uetz P and Hughes RE. Systematic and large-scale two-hybrid screens. *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 303–8.
128. Van Aelst L, Barr M, Marcus S, Polverino A, and Wigler M. Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6213–7.
129. Vancura A, Sessler A, Leichus B, and Kuret J. A prenylation motif is required for plasma membrane localization and biochemical function of casein kinase I in budding yeast. *J Biol Chem* 1994; 269: 19271–8.
130. Vanhalst K, Kools P, Staes K, van Roy F, and Redies C. Delta-protocadherins: a gene family expressed differentially in the mouse brain. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1247–59.
131. Vanhalst K, Kools P, Vanden Eynde E, et al. The human and murine protocadherin-beta one-exon gene families show high evolutionary conservation, despite the difference in gene number. *FEBS Lett* 2000; 495: 120–5.
132. Verras M and Sun Z. Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer. *Cancer Lett.* 2006. 8;237(1):22-32. Review.
133. Vestweber D and Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999; 79: 181–213.
134. Walsh FS and Doherty P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13: 425–56.
135. Wang X, Su H, and Bradley A. Molecular mechanisms governing Pcdh-gamma gene expression: evidence for a multiple promoter and cis-alternative splicing model. *Genes Dev* 2002a; 16: 1890–905.
136. Wang X, Weiner JA, Levi S, Craig AM, Bradley A and Sanes JR. Gamma protocadherins are required for survival of spinal interneurons. *Neuron* 2002; 36: 843–54.

-
137. Wang X, Weiner JA, Levi S, et al. Gamma protocadherins are required for survival of spinal interneurons. *Neuron* 2002b; 36: 843–854.
 138. Washbourne P, Dityatev A, Scheiffele P, et al. Cell adhesion molecules in synapse formation. *J Neurosci* 2004; 24: 9244–9.
 139. Wendeler MW, Jung R, Hecking M, Metzsig C, and Geßner R. Ksp-cadherin is a functional cell-cell adhesion molecule related to LI-cadherin. *Exp Cell Res* 2004; 294: 345–355.
 140. Wheelock MJ and Johnson KR. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 509–14.
 141. Williams EJ, Williams G, Howell FV, Skaper, SD, Walsh FS, and Doherty P. Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *J Biol Chem* 2001; 276: 43879–86.
 142. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, and Milbrandt J. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 1991; 252: 1296–1300.
 143. Wu Q and Maniatis T. A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell* 1999; 97: 779–790.
 144. Wu Q, Zhang T, Cheng JF, et al. Comparative DNA Sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters. *Genome Res* 2001; 11: 389–404.
 145. Yagi T and Takeichi M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 2000; 14: 1169–80.
 146. Yanase H, Sugino H, and Yagi T. Genomic sequence and organization of the family of CNR/Pcdhalph genes in rat. *Genomics* 2004; 83: 717–26.
 147. Ye Q and Worman HJ. Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Experimental Cell Res* 1995; 219: 292–8.
 148. Zamoyska R, Basson A, Filby A, Legname G, Lovatt M, and Seddon B. The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. *Immunol Rev* 2003; 191: 107–18.
 149. Zitt, A. Klonierung und Charakterisierung des humanen LI-Cadherins. [Dissertation] Freie Universität Berlin; Fachbereich Chemie 1997.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Cadherin-Superfamilie (modifiziert nach Geßner & Tauber 2000).....	4
Abb. 2: Organisation des 900 kb umfassenden murinen Pcdh-Genclusters nach Wu & Maniatis (1999).	9
Abb. 3: Das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (modifiziert nach Clontech, Heidelberg).	14
Abb. 4: Reportergenkonstrukte in <i>S. cerevisiae</i> AH109 und Y187 (nach MATCHMAKER Library Construction and Screening Kit User Manual).....	51
Abb. 5: Qualitätskontrolle der RNA-Präparation.....	60
Abb. 6: PCR-Produkte des mPcdh $\alpha 7$	61
Abb. 7: Restriktionsanalysen mit EcoRI einzelner Klone des mPcdh $\alpha 7$ im TOPO [®] -BLUNT-Vektor.....	62
Abb. 8: PCR-Amplifikation der cDNAs der mPcdh $\alpha 1-12$ (Ausnahme mPcdh $\alpha 7$).	63
Abb. 9: Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	65
Abb. 10: Schematische Darstellung des <i>Bait</i> -Vektors pGBKT7.....	66
Abb. 11 A–D: Primer zur Herstellung der <i>Bait</i> -Konstrukte für einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen.	68
Abb. 12: Herstellung der <i>Bait</i> -Konstrukte.	69
Abb. 13: Expression der <i>Bait</i> -Fusionsproteine aus CPv, CPc und CPvc und der DNA-bindenden Domäne von GAL4 in Hefezellen (Y187).	71
Abb. 14: Schematische Darstellung des <i>Prey</i> -Vektors pGAD424.....	75
Abb. 15: Untersuchung auf homotypische Interaktion.	78
Abb. 16: PCR-Produkte von mFyn-Tyrosinkinase auf dem Gradientencycler.....	80
Abb. 17: Partieller Restriktionsverdau (mit EcoRI und PstI) des Fyn-cDNA-Amplifikates.	80
Abb. 18: Schematische Darstellung des <i>Prey</i> -Vektors pGADT7.	83
Abb. 19: Schematischer Ablauf der SMART-Methode modifiziert nach Clontech (Heidelberg) (Switched Mechanism at 5' end of RNA-Template).	84
Abb. 20: Amplifikation der Genbank-Inserts durch eine Long-Distance-PCR.....	85
Abb. 21: Rekombination der cDNA in den SMA-linearisierten Vektor (AD-Vektor) (modifiziert nach Clontech, Heidelberg).....	86
Abb. 22: Kolonie-PCR von zehn willkürlich ausgewählten Klonen der hergestellten Maushirn-cDNA- Bank.....	87
Abb. 23: Beispiele für Koloniewachstum nach Mating von pGBKT7-CPv bzw. pGBKT7-CPvc in Y187 mit pGADT7/cDNA-Bank in AH109.....	90
Abb. 24: Schema zur Durchführung des Rescreens (modifiziert nach Clontech, Heidelberg).	94

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Standardansatz für die PCR.	34
Tab. 2: Standard-Sequenzieransatz.	40
Tab. 3: Pipettierschema zur Herstellung eines SDS-PAGE-Gels.	48
Tab. 4: Typisierung der verwendeten Hefestämme durch ihr Wachstum.	72
Tab. 5: Wachstumsverhalten von AH109 nach Transformation mit der Positiv- (pGBKT7-53 + pGADT7-SV40) und Negativkontrolle (pGBKT7-LAM C+ pGADT-SV40).	73
Tab. 6: Erwartetes Wachstumsverhalten von AH109 mit den <i>Bait</i> -Konstrukten CPv, CPc und CPvc zwecks Kontrolle einer Autoaktivität.	74
Tab. 7: Erwartetes und gemessenes Wachstum von AH109 beim Test auf homotypische Interaktion. AH109 wird mit verschiedenen Konstrukten des <i>Bait</i> -Vektors pGBKT7 und des <i>Prey</i> -Vektors pGAD424 kotransformiert und auf verschiedenen Selektionsmedien ausplattiert.	77
Tab. 8 Ergebnis der Absorptions-Messung nach verschiedenen Transformationen des <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stamms AH109.	82
Tab. 9 Ergebnis der OD-Messung nach verschiedenen Transformationen des <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stammes Y187.	82
Tab. 10: Auflistung und Gruppierung der <i>Prey</i> -DNAs des CPv-Screens.	92
Tab. 11: Auflistung und Gruppierung der <i>Prey</i> -DNAs des CPvc-Screens.	93
Tab. 12 Zusammenfassung der Zwischenschritte des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens.	95

6.3 Danksagung

Der experimentelle Teil der hier vorliegenden Arbeit entstand von August 2001 bis Juli 2004 in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Reinhard Geßner am Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Allen, die meine naturwissenschaftliche Seite gefördert und mir während dieser Zeit zur Seite gestanden haben, gilt mein persönlicher Dank.

Zunächst möchte ich Herrn PD Dr. Reinhard Geßner für die Überlassung des Dissertationsthemas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine ständige Zuversicht und Unterstützung sowie die außergewöhnlich gute Betreuung während meiner Promotion danken. Die optimistischen Diskussionen waren unverzichtbar und haben einen maßgeblichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Speziell möchte ich mich bei allen zeitweiligen und ständigen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe für die Erzeugung einer kreativen und anspornenden Arbeitsatmosphäre bedanken. Zu diesen zählen Irka Wiedenhaupt, Dr. Eva Suhren, Marion Bebenroth, Petra Krienke, Karin May, Elke Dyrks, Dr. Corinna Dietel, Dr. Wiebke Wetzel, Dr. Michael Praus, Dr. Matthias Prager und Catharina Crolow.

Besonders hervorheben möchte ich Dr. Markus Wendeler für seine immerwährende Bereitschaft, einem Mediziner die Molekularbiologie theoretisch und praktisch nahezubringen und Dr. Andreas Weimann für die geduldige Einführung in die Laborarbeit sowie in die Einarbeitung in das Thema der Cadherine und des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.

Allen meinen Freunden und hier besonders Bianca Wolny, Valérie Aman und Théodore Galanis danke ich für ihr Verständnis und die Aufmunterung an schlechten Tagen.

Bertrand Hamelin danke ich für die Tipps bei Schemazeichnungen.

Sébastien Gaudel danke ich für sein Verständnis, seine Geduld und seine Unterstützung auf den letzten 10 Metern.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihr unerschütterliches Vertrauen und ihre beständige Unterstützung in allen Bereichen. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

6.4 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Alexandra Goischke, erkläre an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Etablierung eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems zur Suche nach zytoplasmatischen Interaktionspartnern der α -Protocadherine“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum: 14.04.2009

Unterschrift: Alexandra Goischke

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.