

Für meinen Opa

# Interaktionspartner von Pro-Interleukin-16

## Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium

vorgelegt von:

Marion Haag

September 2006

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der  
Freien Universität Berlin

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin.

Erster Gutachter : Prof. Dr. Reinhard Kurth, Robert Koch-Institut, Berlin  
Zweiter Gutachter : Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 18. Dezember 2006

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>6</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
1.1. <u>DEFINITION UND EINTEILUNG DER ZYTKINE</u> .....	8
1.1.1. <u>Entdeckung und Nomenklatur</u> .....	9
1.2. <u>INTERLEUKIN 16</u> .....	10
1.2.1. <u>Expression von IL-16</u> .....	11
1.3. <u>BIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON IL-16</u> .....	12
1.3.1. <u>CD4-Interaktion</u> .....	12
1.3.2. <u>Immunmodulation</u> .....	15
1.3.3. <u>Anti-retrovirale Aktivität</u> .....	16
1.4. <u>DAS VORLÄUFERPROTEIN PRO-INTERLEUKIN 16</u> .....	17
1.4.1. <u>Sequenzanalyse und Genlokalisierung</u> .....	17
1.4.2. <u>Die Spaltung des Pro-IL-16 und die neuronale Form</u> .....	18
1.4.3. <u>Die Prolin-reiche Domäne von Pro-IL-16</u> .....	19
1.4.4. <u>Die drei PDZ-Domänen im Vorläuferprotein</u> .....	20
1.4.5. <u>Funktionen von Pro-IL-16</u> .....	21
1.5. <u>DAS YTH-HEFESYSTEM ZUR DETEKTION VON PROTEIN-PROTEIN-WECHSELWIRKUNGEN</u> .....	25
1.6. <u>ZIELSETZUNG</u> .....	27
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>28</b>
2.1. <u>MEDIEN, LÖSUNGEN, BAKTERIENSTÄMME UND VEKTOREN</u> .....	28
2.2. <u>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</u> .....	30
2.2.1. <u>Zellkultur und Medien für eukaryontische Zelllinien</u> .....	30
2.3. <u>PROTEINCHEMISCHE METHODEN</u> .....	31
2.3.1. <u>Western Blot</u> .....	31
2.3.2. <u>Herstellung von rekombinanten Proteinen in E. coli</u> .....	32
2.3.3. <u>Ko-Immunopräzipitation</u> .....	33
2.3.4. <u>Nachweis endogener Proteine mittels Immunopräzipitation</u> .....	34
2.3.5. <u>In vitro-Bindungs Assay</u> .....	35
2.4. <u>IMMUNOFLUORESCENZ MIKROSKOPIE</u> .....	35
2.5. <u>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</u> .....	36
2.5.1. <u>Oligonukleotide</u> .....	36
2.5.2. <u>DNA-Sequenzierung nach Sanger</u> .....	37
2.5.3. <u>Sequenzauswertung</u> .....	38
2.5.4. <u>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</u> .....	38
2.5.5. <u>In vitro-Mutagenese</u> .....	39
2.5.6. <u>Restriktion mit Endonukleasen</u> .....	40
2.5.7. <u>Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten</u> .....	40
2.5.8. <u>Ligation und Transformation</u> .....	41
2.5.9. <u>Transfektion</u> .....	42
2.5.10. <u>Plasmidisolierung</u> .....	42
2.6. <u>YEAST TWO-HYBRID-SYSTEM</u> .....	43
2.6.1. <u>Yeast Two-Hybrid Assays</u> .....	43
2.6.2. <u>Yeast Two-Hybrid Analyse</u> .....	45
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>46</b>
3.1. <u>YEAST TWO-HYBRID (YTH)-SYSTEM</u> .....	46
3.1.1. <u>Klonierung der Köder-Konstrukte und Test auf Autoaktivierung</u> .....	46
3.1.2. <u>Test auf Transport in den Zellkern</u> .....	48
3.2. <u>YTH-SCREENS</u> .....	49
3.2.1. <u>YTH-Screen mit der PDZ 3-Domäne</u> .....	49
3.2.2. <u>YTH-Screen mit Pro-IL-16 AS 51-342</u> .....	50
3.3. <u>DETEKTIERTE INTERAKTIONSPARTNER FÜR PRO-IL-16</u> .....	51
3.4. <u>BESTIMMUNG DER INTERAKTIONSDOMÄNE IN PRO-IL-16 UND DEN TARGETPROTEINEN</u> .....	53
3.4.1. <u>Bestimmung der Interaktionsdomäne in den Targetproteinen</u> .....	53
3.4.2. <u>Bindung der SH3-Domäne an Pro-IL-16 51-342</u> .....	54
3.4.3. <u>Bestimmung des Bindungsortes in Pro-IL-16</u> .....	56
3.4.4. <u>Der Einfluss der ersten SH3-Bindungsdomäne im Pro-IL-16 auf die Interaktion mit HSI</u> .....	58
3.4.5. <u>Die Interaktion zwischen der SH3-Bindungsdomäne und HSI</u> .....	58

---

<u>3.5.</u>	<u><i>IN VITRO</i>-BINDUNGS ASSAY</u> .....	60
<u>3.5.1.</u>	<u><i>Konstrukte für den in vitro-Bindungs Assay</i></u> .....	60
<u>3.5.2.</u>	<u><i>Ergebnisse des in vitro-Bindungs Assays</i></u> .....	62
<u>3.6.</u>	<u>KO-IMMUNOPRÄZIPITATION</u> .....	64
<u>3.6.1.</u>	<u><i>Konstrukte für die Ko-Immunopräzipitation</i></u> .....	64
<u>3.6.2.</u>	<u><i>Verifizierung der Bindung zwischen dem SH3-Bindungsmotiv in Pro-IL-16 und der SH3-Domäne von HSI in transfizierten Zellen</i></u> .....	64
<u>3.7.</u>	<u>IMMUNOPRÄZIPITATION ENDOGENER PROTEINE AUS T-ZELLEN</u> .....	66
<u>3.7.1.</u>	<u><i>Nachweis endogener IL-16 und HSI Proteine in C8166 Lysaten</i></u> .....	66
<u>3.8.</u>	<u>NACHWEIS DER ASSOZIATION VON PRO-IL-16 UND HSI MIT DEM AKTIN-ZYTOSKELETT</u> .....	67
<u>3.8.1.</u>	<u><i>Konstrukte für die konfokale Laserscan-Mikroskopie</i></u> .....	68
<u>3.8.2.</u>	<u><i>Pro-IL-16 und HSI sind in den corticalen Regionen und am Zytoskelett kolokalisiert</i></u> .....	68
<u>4.</u>	<u>DISKUSSION</u> .....	70
<u>4.1.</u>	<u>PDZ 3-DOMÄNE</u> .....	71
<u>4.2.</u>	<u>PROLIN-REICHE REGION</u> .....	72
<u>4.3.</u>	<u>POTENTIELLE INTERAKTIONSPARTNER VON PRO-IL-16 51-342</u> .....	72
<u>4.3.1.</u>	<u><i>Die Interaktion mit Hook3</i></u> .....	73
<u>4.3.2.</u>	<u><i>Die Interaktion mit HSI, Lasp1, Cortactin und Abp1</i></u> .....	73
<u>4.4.</u>	<u>MODULATION DES ZYTOSKELETT</u> .....	76
<u>4.4.1.</u>	<u><i>Die Interaktion von Pro-IL-16 mit HSI</i></u> .....	77
<u>4.5.</u>	<u>IMMUNOLOGISCHE SYNAPSE</u> .....	78
<u>4.6.</u>	<u>AUSBLICK</u> .....	82
<u>5.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u> .....	84
<u>6.</u>	<u>SUMMARY</u> .....	85
<u>7.</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u> .....	86
<u>8.</u>	<u>ANHANG</u> .....	97
<u>8.1.</u>	<u>DANKSAGUNG</u> .....	97
<u>8.2.</u>	<u>LEBENS LAUF</u> .....	98
<u>8.3.</u>	<u>PUPLIKATIONS LISTE</u> .....	100