

3. ERGEBNISSE

3.1. Yeast Two-Hybrid (YTH)-System

3.1.1. Klonierung der Köder-Konstrukte und Test auf Autoaktivierung

Die PDZ 3-Domäne des Pro-IL-16, die sich als extrazelluläre Domäne im sezernierten Zytokin befindet, hat möglicherweise auch eine Funktion im Vorläuferprotein. Zudem befindet sich ein SH3-Bindungsmotiv an Position AS 607-610. Deshalb sollten auch potentielle Bindungspartner für diese Domäne mit dem DupLex-A Yeast Two-Hybrid System gesucht werden. Als erster Köder („Bait“) wurde deshalb die PDZ 3-Region von Pro-IL-16 von AS 511-631 in den YTH-Screen eingesetzt. Dieser lag bereits in dem Vektor pEG202 des DupLEX-A Yeast Two-Hybrid Systems kloniert vor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. K. Vollhard). Das Fragment zeigte mit dem sensitiven Hefestamm EGY48 und dem Reporterplasmid pSH18-34 (EGY48/pSH18-34) keine Autoaktivierung, also weder ein Wachstum der Hefen auf galaktosehaltigem Medium ohne Leucin noch eine Blaufärbung mit X-Gal. Dies ist eine zwingende Voraussetzung für die Bait-Konstrukte, da sonst kein Nachweis einer Interaktion möglich ist.

Des Weiteren sollte aufgrund der zahlreichen Proteinbindungsmotive die Prolin-reiche Sequenz zusammen mit der ersten PDZ-Domäne des Pro-IL-16 im YTH-System auf Interaktionspartner hin untersucht werden (AS 1-422). Um diesen Bereich auf eine mögliche Autoaktivierung zu testen, wurde er in den Vektor pEG202 kloniert. Die PCR hierzu erfolgte mit spezifischen Primern (Tab. 10), sodass die DNA über die Restriktionsendonukleasen EcoR I bzw. BamH I und Not I in den Ködervektor pEG202 eingeführt werden konnte. Nach Transformation des Hefestammes EGY48, der bereits das Reporterplasmid pSH18-34 enthielt (EGY48/pSH18-34), wurde das Konstrukt auf Autoaktivierung getestet. Das Konstrukt Pro-IL-16 1-422 autoaktivierte das YTH-System. Es erfolgte eine N-terminale Verkürzung der Sequenz des Pro-IL-16 1-422 um 101 AS (Pro-IL-16 102-422) damit das erste PXXP-Motiv, welches evtl. zu einer Autoaktivierung führen könnte deletiert wird, sowie um 173 AS (Pro-IL-16 174-422), damit weitere

Prolin-reiche Regionen ausgeschlossen werden können. Ebenso wurde C-terminal auf AS 342 (Pro-IL-16 1-342) verkürzt, sodass nur der Prolin-reiche Bereich ohne PDZ 1-Domäne im Köderkonstrukt enthalten war (alle Primer siehe Tab. 10). Diese Sequenzen wurden ebenfalls in den Vektor pEG202 kloniert. Jedoch autoaktivierten weiterhin alle getesteten Konstrukte das System. Erst durch die Kombination von N-terminaler und C-terminaler Verkürzung konnte die Autoaktivierung ausgeschlossen werden. Die Sequenz Pro-IL-16 von AS 102-342 in pEG202 aktivierte nicht mehr das LexA YTH-System – es wurde kein Wachstum der Hefen ohne Leucin oder eine Blaufärbung mit X-Gal erzeugt. Da das längste mögliche Protein als Köder gewählt werden soll um einen möglichst großen Bereich auf Interaktionspartner hin zu untersuchen, fand wiederum eine N-terminale Verlängerung zu AS 51 (Pro-IL-16 51–342) bzw. AS 78 (Pro-IL-16 78-342) statt. Der Test auf Autoaktivierung war für beide Konstrukte negativ.

Tab. 10: Im Test auf Autoaktivierung verwendete Primer für die unterschiedlich langen Pro-IL-16-Konstrukte, die in den Vektor pEG202 kloniert wurden.

Fragment	Abkürzung	AS	Verwendete Primer
Prolin-reiche Region und PDZ 1-Domäne	Pro-IL-16 1-422	1-422	Pro-IL-16 forw PIL16-422_R
N-terminale Verkürzung	Pro-IL-16 102-422	102-422	PIL16-102_F PIL16-422_R
	Pro-IL-16 174-422	174-422	PIL16-174_F PIL16-422_R
C-terminale Verkürzung	Pro-IL-16 1-342	1-342	Pro-IL-16 forw PIL16-342_R
N-terminale und C-terminale Verkürzung	Pro-IL-16 102-342	102-342	PIL16-102_F PIL16-342_R
	Pro-IL-16 78-342	78-342	pIL16-78_F PIL16-342_R
	Pro-IL-16 51-342	51-342	pIL16-51_F PIL16-342_R

Die verschiedenen Konstrukte sind in Abb. 11 schematisch dargestellt.

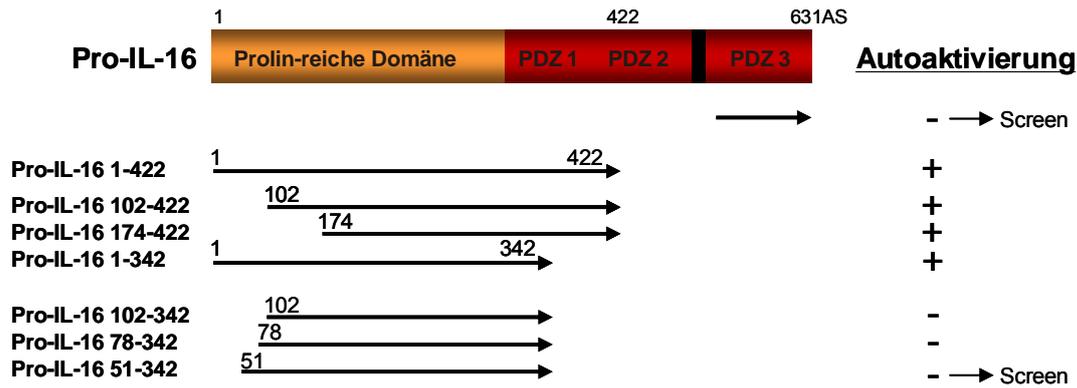


Abb. 11: Schematische Darstellung des Pro-IL-16 mit den auf Autoaktivierung getesteten Konstrukten (als Pfeile dargestellt).

Die Zahlen zeigen die erste und letzte AS des Klons, + = Autoaktivierung vorhanden, - = keine Autoaktivierung. Das längste Konstrukt ohne Autoaktivierung ist Pro-IL-16 AS 51-342. Mit diesem Konstrukt wurde der YTH-Screen durchgeführt.

Das längste Bait-Konstrukt der Prolin-reichen Domäne ohne Autoaktivierung war somit von AS 51–342 gegeben (Pro-IL-16 51–342). Dieses enthielt zwei SH3-Bindungsmotive (PXXP-Motive) der Klasse I (Feng *et al.*, 1994; Lim *et al.*, 1994; Mayer and Eck, 1995; Kay *et al.*, 2000) (Abb. 12, rot), die als potentielle Bindestellen für Proteine bekannt sind (Ren *et al.*, 1993; Janeway *et al.*; Immunologie, S. 206).

51
 GHPDGTPPKLDTANGTPKVYKSADSSTVKKGPPVAPKPAWFRQSLKGLRNRASDPRGLPDP
 ALSTQPAPASREHLGSHIRASSSSSSIRQRISSFETFGSSQLPDKGAQRSLQPSSGEAAK
 PLGKHEEGRFSGLLGRGAAPTLV**PQQPEQVLSSGSPAASEARDPGVSESPPPRRQPNQ**RTL****
PPGPDPLLRLLLSTQAEESQGPVLKMPQSQRARSFPLTRSQSCETKLLDEKTSKLYSISQVS
 SAVMKSLCLPSSISCAQTPCIPKEGASPTSSSNEDSAANGSAETS
 342

Abb. 12: Darstellung der Aminosäuren des für den YTH-Screen verwendeten Bait-Konstruktes Pro-IL-16 51-342.

Rot dargestellt sind die beiden PXXP-Motive der Klasse I (SH3-Bindungsmotive). Fett gedruckt ist ein weiteres PXXP-Motiv, welches jedoch keiner der beiden Klassen zugehörig ist.

3.1.2. Test auf Transport in den Zellkern

Eine weitere zwingende Voraussetzung für die Anwendbarkeit des YTH-Systems ist die Kerngängigkeit des Bait-Konstruktes. Vor dem eigentlichen YTH-Screen erfolgte deshalb eine Kotransformation des Hefestamms EGY48/pSH18–34 mit

dem jeweiligen Bait-Konstrukt (PDZ 3 bzw. Pro-IL-16 51–342 in pEG202) zusammen mit dem Vektor pJK101, um die Fusionsproteine im Zellkern nachzuweisen. Dieser Repressions Assay fiel für beide Köder-Konstrukte positiv aus. Es konnte ein Wachstum der Hefen auf glukosehaltigem Medium ohne Histidin und Uracil, jedoch keine Blaufärbung mit X-gal beobachtet werden, da das Köderfusionsprotein im Zellkern die Transkription des Reportergens hemmt bzw. vollständig unterdrückt. Dies zeigt eine Kerngängigkeit der Köder-Proteine.

3.2. YTH-Screens

3.2.1. YTH-Screen mit der PDZ 3-Domäne

Da eine deutliche IL-16 Expression in der Milz und in den Leukozyten stattfindet und sich folglich dort auch mögliche Interaktionspartner befinden, wurden cDNA-Bibliotheken aus diesen Zellen untersucht. Klone aus den Bibliotheken-Screens, die auf galaktosehaltigem Medium in Abwesenheit von Leucin gewachsen sind und mit X-Gal eine blaue Färbung zeigten, wurden anschließend im Interaktionstest eingesetzt. Nach Isolierung der Plasmide aus den positiven Hefeklonen (PCR-Screen mit spezifischen Primern), Elektroporation der Plasmide in KC8-Zellen und Selektion auf die Targetplasmide mittels M9Trp⁻-Medium, wurden diese erneut für die Prüfung auf Bindungsspezifität verwendet. Dieser Spezifitätstest, bei welchem der das Köderkonstrukt enthaltende Hefestamm EGY48/pSH18-34 retransformiert wurde, diente dazu sicherzustellen, dass das selektierte Targetplasmid für das positive Ergebnis verantwortlich war.

Die cDNA-Bibliotheken aus der Milz bzw. von Leukozyten konnten mit einer Effizienz von $2,3 \times 10^6$ bzw. $4,3 \times 10^6$ cfu/ μ g DNA in die Hefen transformiert werden. Die erzeugten Glycerolstocks wiesen einen Titer von $7,2 \times 10^8$ bzw. $8,7 \times 10^8$ cfu/ml auf.

Für den Milz-Bibliothek-Screen wurden 5×10^5 Ausgangsklone eingesetzt. Es wurden 49 selektiv gewachsene Klone im Interaktionstest getestet, wovon drei Klone positiv waren. Die Plasmide dieser Klone wurden aus den Hefen isoliert und KC8-Zellen damit transformiert. Nach Selektion auf das Targetplasmid mittels M9Trp⁻-Medium wurde dieses sequenziert und für den Spezifitätstest der

Hefestamm EGY48/18-34/PDZ 3 damit retransformiert. Keine dieser drei Sequenzen befand sich im Leserahmen und codierte somit für kein physiologisches Protein.

In den Screen der Leukozyten-Bibliothek wurden 6×10^7 Ausgangsklone eingesetzt. 12 der 39 selektiv gewachsenen Klone waren im Interaktionstest und nach Retransformation im Spezifitätstest positiv und wurden sequenziert. Nur eine Sequenz codierte für ein bekanntes Protein. Nach Abgleich mit der Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) wurde es als ATP-Synthase identifiziert. Dabei handelt es sich um ein mitochondriales Gen welches im YTH-System als häufig falsch positiv bekannt ist (http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapIn_Work.html, unter: „false positive“, Zusammenfassung der Ergebnisse siehe Tab. 11).

Die Yeast Two-Hybrid Screens mit der PDZ 3-Domäne des Pro-IL-16 (AS 511-631) ergaben trotz einer hohen Transformationseffizienz keine spezifische Interaktion mit zellulären Bindungspartnern.

3.2.2. YTH-Screen mit Pro-IL-16 AS 51-342

Für diesen Screen konnten die Hefen mit einer Effizienz von $2,6 \times 10^6$ bzw. $3,8 \times 10^6$ cfu/ μ g DNA mit den cDNA-Bibliotheken aus der Milz bzw. von Leukozyten transformiert werden. Die erzeugten Glycerolstocks wiesen bei beiden Bibliotheken einen Titer von 9×10^8 cfu/ml auf.

In den Milz-Bibliothek-Screen wurden $1,3 \times 10^7$ Klone eingesetzt. Davon wurden 41 selektiv gewachsene Klone im Interaktionstest getestet, von denen 36 positiv waren. Nach Isolierung der Plasmide aus den Hefen, Elektroporation der Plasmide in KC8-Zellen und Selektion auf die Targetplasmide mittels M9Trp⁻-Medium, wurden diese isoliert. Laut Restriktionsanalyse mit dem Enzym Alu I handelte es sich um 23 verschiedene Klone, welche anschließend sequenziert wurden. Für den Spezifitätstest wurde der kompetente Hefestamm EGY48/pSH18-34/Pro-IL-16 51-342 mit diesen Klonen retransformiert.

In den Screen der PBMC-Bibliothek wurden 1×10^8 Klone eingesetzt. Nach Interaktions- und Spezifitätstest waren 28 der 39 eingesetzten Klone positiv und wurden sequenziert (Zusammenfassung der Ergebnisse siehe Tab. 11).

Tab. 11: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Screen der Milz- und PBMC-Bibliothek.

Köder	cDNA-Quelle	Ausgangs-kclone	Selektiv gewachsen	Interaktions- u. Spezifitätstest positiv:	Codieren für Protein
PDZ 3 (511-631)	Milz	5×10^5	49	3	0
PDZ 3 (511-631)	PBMC	6×10^7	39	12	1
Pro-IL-16 51-342	Milz	$1,3 \times 10^7$	41	36/23	22
Pro-IL-16 51-342	PBMC	1×10^8	39	28	25

3.3. Detektierte Interaktionspartner für Pro-IL-16

Die Sequenzierung der positiven Klone zeigte, dass es sich um fünf verschiedene Proteine als mögliche Interaktionspartner für Pro-IL-16 51-342 handelte. Vier dieser Proteine sind eng verwandte F-Aktin Bindeproteine der Cortactin-Familie: Hematopoietic lineage cell specific protein 1 oder Lck binding protein 1 (HS1), Lim and SH3 protein 1 (Lasp1), F actin-binding protein 1 (Abp1) auch unter den Namen HIP-55 oder SH3P7 geführt und Cortactin, auch als EMS1 zu finden (Chen *et al.*, 2001). Bei dem fünften Interaktionspartner handelt es sich um das Protein Hook3 aus der Familie der Mikrotubuli-bindenden Proteine. Die verschiedenen Proteine wurden in unterschiedlicher Anzahl und unterschiedlicher Länge von Pro-IL-16 51-342 gebunden (Tab. 12).

Tab. 12: Ergebnisse aus den Bibliotheken-Screens mit Pro-IL-16 51-342 als Köder. Gesamtanzahl der gefundenen Klone/Anzahl der unterschiedlich langen Klone

cDNA-Quelle	Lasp1	HS1	Cortactin	Abp1	Hook3
Milz	16/6	1	1	2/1	2/1
PBMC	23/5	1	-	1	-

Eine Sequenzierung mit spezifischen Primern ergab, dass bei den vier Proteinen der Cortactin-Familie das C-terminale Ende, das eine SH3-Domäne enthält, gebunden wurde. SH3-Domänen sind für eine Bindung an PXXP-Motive bekannt

(Ren *et al.*, 1993). Die Proteindomänen von HS1, Cortactin, Abp1 und Lasp1 sind in Abb. 13 schematisch dargestellt.

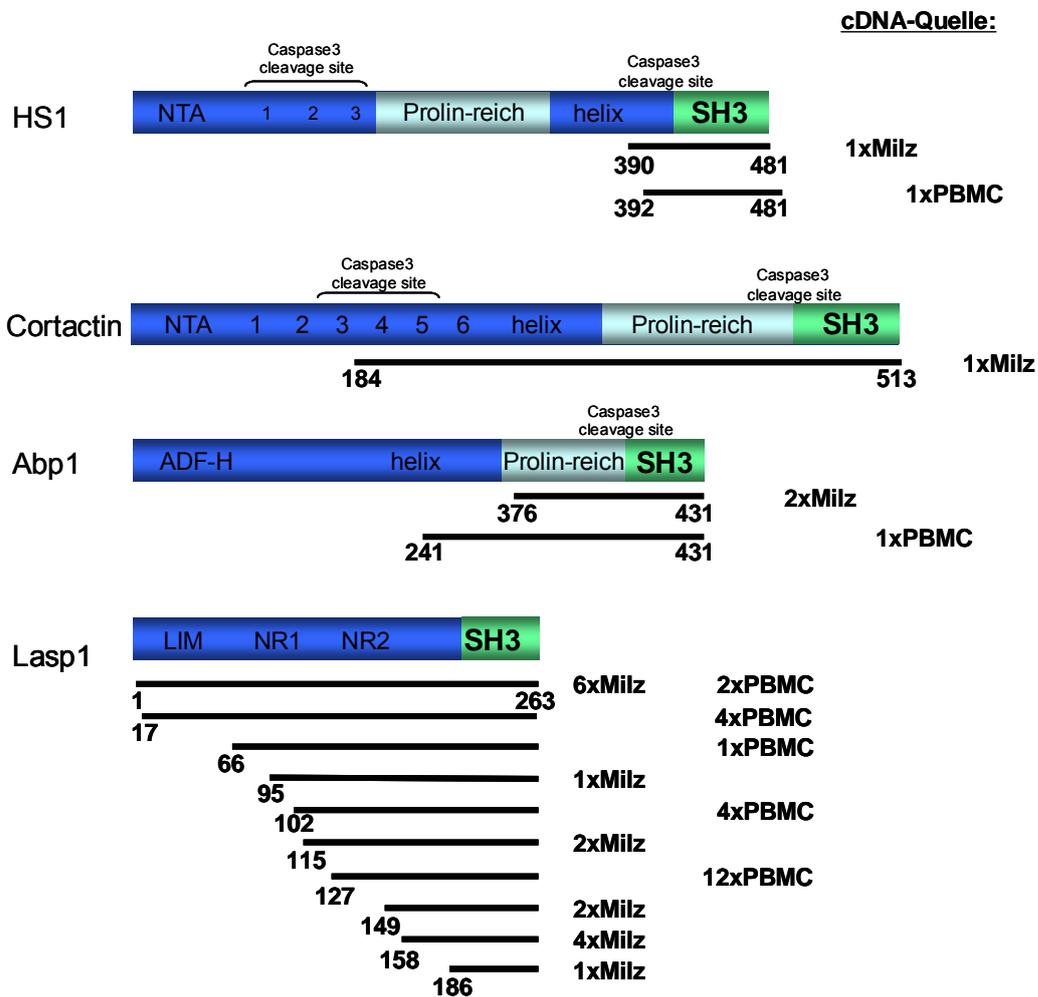


Abb. 13: Schematische Darstellung der im Yeast Two-Hybrid Screen detektierten Proteine der Cortactin-Familie.

Die Linien zeigen die Größe der tatsächlich gefundenen Klone. NTA: amino-terminale acidische Region; helix: erwartete α -helikale Region; SH3: Src Homologie-Domäne 3; ADF-H: Aktin-depolymerisierender Faktor homologe Domäne; LIM: cysteinreiche Domäne; NR: Aktin-ähnliche Nebulin bindende Wiederholungsdomänen; 1-6: Wiederholungsdomänen.

Zudem weisen die SH3-Domänen der vier Proteine eine hohe Homologie zueinander auf.

```

Abp1SH3      1-GLCA-----RALYDYQAADDTEISFDPENLITGIEVI
CortactinSH3 1-----ALYDYQAAGDDEISFDPDDIITNIEMI
HS1SH3      1LGISA-----VALYDYQEGESDELSFDPDDVITDIEMV
Lasp1SH3    1RSAPGGGGKRYRAVYDYSAADEDEVSFQDGTIIVNVQOI

          DEGWRRGYGPD-GHFGMFPANYVELI    58
          DDGWWRG-VCK-GRYGLFPANYVELRQ   52
          DEGWRRG-RCH-GHFGLFPANYVKLLE   58
          DGWMYGTVERTGDTGMLPANYVEAI    65

```

Abb. 14: Alignment der SH3-Domänen der Proteine aus der Cortactin-Familie.

Grau unterlegt sind die Aminosäuren, die keine Homologie zu anderen Aminosäuren aufweisen.

Bei dem Protein Hook3 waren die AS 103-272 im Targetprotein vorhanden. Eine schematische Darstellung der Proteindomäne erfolgt in Abb. 15 (nach Kaiser *et al.*, 2003). Hook3 gehört zu einer neuen Familie der Mikrotubuli-bindenden Proteine (Walenta *et al.*, 2001).

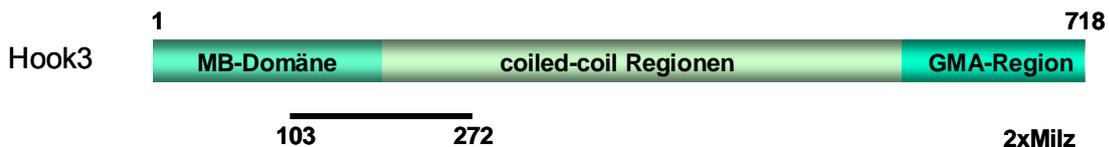


Abb. 15: Schematische Darstellung des im Yeast Two-Hybrid Screen detektierten Hook3 Protein nach Kaiser *et al.*

Die Linie zeigt die Größe der beiden tatsächlich gefundenen Klone. MB-Domäne: Mikrotubuli-bindende Domäne; GMA-Region: Golgi-Membran assoziierte Region.

3.4. Bestimmung der Interaktionsdomäne in Pro-IL-16 und den Targetproteinen

3.4.1. Bestimmung der Interaktionsdomäne in den Targetproteinen

Um die Ergebnisse des Screens zu verifizieren, wurden kompetente EGY48/pSH18-34 Hefezellen mit den gefundenen potenziellen Bindungspartnern (Target) zusammen mit dem Köder Pro-IL-16 51-342 kotransformiert. Eine Interaktion ermöglicht den Hefen Wachstum auf galaktosehaltigem Medium ohne Leucin und eine Blaufärbung mit X-Gal. Von den Targetproteinen wurde der längste detektierte Klon für dieses Experiment eingesetzt (HS1 Klon 17, AS 390-481; Lasp1 Klon 14, AS 1-263; Abp1 Klon 40, AS 376-431; Cortactin Klon 28,

AS 184-513 und Hook3 Klon 18, AS 103-272). Des Weiteren soll der Einfluss der SH3-Domänen der Proteine aus der Cortactin-Familie auf die Bindung an Pro-IL-16 überprüft werden. Diese SH3-Domänen sind für die Bindung an Prolin-reiche SH3-Bindungsdomänen, wie sie das eingesetzte Köder-Protein Pro-IL-16 51-342 darstellt, bekannt (Ren *et al.*, 1993; Kay *et al.*, 2000).

3.4.2. Bindung der SH3-Domäne an Pro-IL-16 51-342

Da bei allen potentiellen Bindungspartnern der Cortactin-Familie immer der C-terminale Bereich, welcher die SH3-Domäne enthält, im YTH-Screen gefunden wurde, soll die Funktion dieser Domäne bei einer Interaktion genauer untersucht werden. SH3-Domänen vermitteln häufig Protein-Protein Wechselwirkungen indem sie an Prolin-reiche Bereiche binden (Ren *et al.*, 1993; Janeway *et al.*; Immunologie, S. 206). Die Experimente zur Überprüfung des Einflusses der SH3-Domäne auf die Bindung an Pro-IL-16 51-342 wurden mit SH3-Deletionsmutanten durchgeführt. Ist die SH3-Domäne an der Interaktion mit Pro-IL-16 beteiligt muss es zu einem Ausbleiben der Wechselwirkung kommen. Umgekehrt muss eine Wechselwirkung stattfinden, wird der Hefestamm mit Pro-IL-16 51-342 und der SH3-Domäne kotransformiert. Hierfür wurden SH3-Deletionsmutanten von den Proteinen HS1 (HS1 Δ SH3; AS 1 bis 427; Primer: HS1_F - HS1DSH3_R), Lasp1 (Lasp1 Δ SH3; AS 1-208; Primer: Lasp1_for - LaspDSH3_R) und Abp1 (Abp1 Δ SH3; AS 1-380; Primer: Abp1_F - Abp1DSH3_R) und nur die SH3-Domänen HS1SH3 (AS 417-486; Primer: SH3HS1_F - pYes_R) Lasp1SH3 (AS 193-263; Primer: SH3Lasp1_F - pYes_R) und Abp1SH3 (AS 364-431; Primer: SH3Hip55_F - pYes_R) in den Vektor pYes kloniert. Von Cortactin konnte nur die SH3-Domäne (CortactinSH3, AS 451-513; Primer: SH3Cort_F - pYes_R) alleine hergestellt werden, da das Protein nur von AS 184-513 vorlag. HS1 wurde als Volllängeklon von Dr. Michael M. Kessels zur Verfügung gestellt. Lasp1 Klon 14 entspricht dem Volllängeklon von Lasp1. Abp1 konnte mit spezifischen Primern aus humaner DNA in voller Länge kloniert werden. Zusätzlich wurde eine Retransformation mit einem leeren Vektor, dem Kontroll-Bait (pBait) als Köder durchgeführt, welche als Negativkontrolle fungiert. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Tab. 13 und am Beispiel von HS1 in Abb. 16 und Abb. 19 dargestellt.

Tab. 13: YTH-Spezifitätstest mit Pro-IL-16 51-342 und den verschiedenen Targetkonstrukten.

Als Targetproteine wurden jeweils die kompletten Proteine und die Δ SH3-Mutanten sowie die SH3-Domänen alleine eingesetzt. Von Cortactin wurde nur die SH3-Domäne und der längste isolierte Klon (Klon 28, AS 184-513) eingesetzt.

Target:	Bait: Pro-IL-16 51-342
HS1	
Ganzes Protein	+
SH3-Domäne	+
Δ SH3	-
Lasp1	
Ganzes Protein	+
SH3-Domäne	+
Δ SH3	-
Abp1	
Ganzes Protein	+
SH3-Domäne	+
Δ SH3	-
Cortactin	
Klon 28	+
SH3-Domäne	+

+ = Interaktion; - = keine Interaktion;

Bei allen Proteinen der Cortactin-Familie kam es zu einer Interaktion wenn bei der Kotransformation mit Pro-IL-16 51-342 das ganze Protein oder die SH3-Domäne als Target eingesetzt wurden (am Beispiel von HS1 siehe Abb. 16 und Abb. 19, blaue Kolonien). Ein Ausbleiben der Interaktion wurde wie erwartet beobachtet, wurde das Δ SH3-Konstrukt als Target eingesetzt (Abb. 16, keine Kolonien). Im Falle von Cortactin konnte nur der detektierte Klon 28 (AS 184-513) und die SH3-Domäne eingesetzt werden.

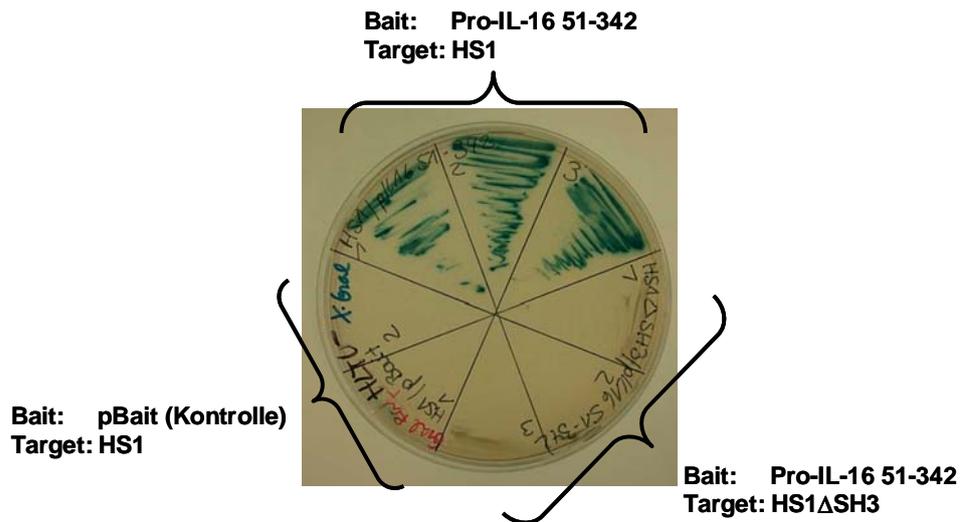


Abb. 16: Ergebnis des Plattentests am Beispiel der Interaktion zwischen Pro-IL-16 51-342 und HS1.

Auf galaktosehaltigen Platten mit X-Gal können in Abwesenheit von Leucin nur die Hefen blau wachsen, bei welchen mit Pro-IL-16 51-342 und HS1 kotransformiert wurde. Die Negativkontrolle mit dem leeren pBait-Vektor und HS1 ist negativ.

Die Annahme, dass die SH3-Domäne für die spezifische Wechselwirkung mit der N-terminalen Prolin-reichen Sequenz des Pro-IL-16 notwendig ist, konnte somit zusätzlich bestätigt werden.

3.4.3. Bestimmung des Bindungsortes in Pro-IL-16

SH3-Domänen binden an SH3-Bindungsmotive. Da es zwei SH3-Bindungsmotive in der Prolin-reichen Sequenz gibt, soll durch den Einsatz von unterschiedlich langen Pro-IL-16-Köderproteinen der Bindungsort in Pro-IL-16 eingegrenzt und damit genauer definiert werden. N-terminal wurde das Protein auf 61, 71, 78, 102, 174, 201, 241 und 271 AS verkürzt, C-terminal auf 195 und 300 AS. So wurden verschiedene Abfolgen von Prolinen deletiert. Als Targetproteine wurden die im YTH-Screen gefundenen jeweils längsten Proteinsequenzen eingesetzt. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tab. 14: YTH-Spezifitätstest mit unterschiedlich langen Pro-IL-16 Konstrukten

Pro-IL-16 AS von-bis	HS1 Klon 17 (390-481)	Lasp1 Klon 14 (1-263)	Abp1 Klon 40 (376-431)	Cortacin Klon 28 (184-513)	Hook3 Klon18 (103-272)
51-342	+	+	+	+	+
N-terminale Verkürzung					
61-342	+	+	+	+	+
71-342	+	+	+	+	ng
78-342	-	-	-	-	ng
102-342	-	-	-	-	+
174-342	-	-	-	-	+
201-342	ng	-	ng	ng	+
241-342	ng	-	ng	ng	+
271-342	ng	ng	ng	ng	-
C-terminale Verkürzung					
51-195	+	+	+	+	-
201-300	ng	ng	ng	ng	-
241-300	ng	ng	ng	ng	-

ng= nicht getestet, + = Interaktion, - = keine Interaktion

HS1 Klon 17, Lasp1 Klon 14, Abp1 Klon 40 und Cortactin Klon 28 binden an die Bait-Konstrukte Pro-IL-16 AS 61- und 71-342. Ab Pro-IL-16 AS 78 findet keine Bindung mehr statt. Die erste SH3-Bindungsdomäne im Pro-IL-16 ist AS 80 – 86. Somit konnte eine Beteiligung der SH3-Bindungsdomäne an der Interaktion mit den SH3-Domänen der Proteine der Cortactin-Familie bestätigt werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die AS vor der SH3-Bindungsdomäne an der Bindung beteiligt sind, da es bereits ab AS 78, also zwei AS vor der eigentlichen Bindungsdomäne zu einem Ausbleiben der Interaktion kommt. Hook3 Klon 18 bindet bis zu einer N-terminalen Verkürzung des Pro-IL-16-Konstruktes auf AS 241. Das Konstrukt 271-342 bindet nicht mehr an Hook3. Ebenso bleibt die Bindung bei einer C-terminalen Verkürzung auf AS 300 aus. Somit bindet Hook3 im Bereich der AS 241-342 an Pro-IL-16. Die Bereiche der Bindungen von Pro-IL-16 51-342 an die Targetproteine sind in Abb. 17 schematisch dargestellt.

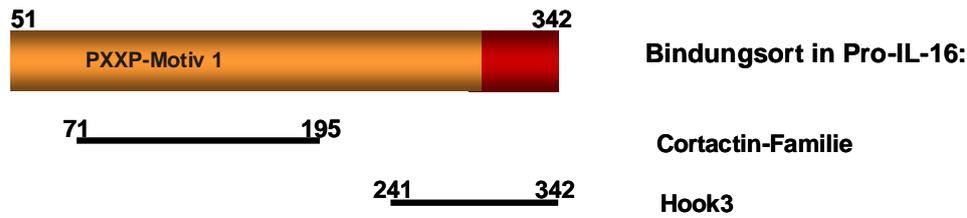


Abb. 17: Bindungsbereiche der Proteine der Cortactin-Familie und des Hook3-Proteins.

Die Proteine der Cortactin-Familie benötigen für eine Bindung an Pro-IL-16 die AS 71-195. Hook3 bindet im Bereich der AS 241-342.

3.4.4. Der Einfluss der ersten SH3-Bindungsdomäne im Pro-IL-16 auf die Interaktion mit HS1

Da die bisherigen Ergebnisse der Retransformationen mit unterschiedlich langen Pro-IL-16 Konstrukten darauf hindeuten, dass der Bereich in welchem sich die erste SH3-Bindungsdomäne (PXXP-Motiv) befindet an der Interaktion beteiligt ist, soll diese Beobachtung weiter verifiziert werden. Für nachfolgende Experimente wurde deshalb eine *in vitro*-Mutagenese durchgeführt. Mit dieser Methode wurden die Proline (AS 83 und 86) der ersten SH3-Bindungsdomäne (AS 80 - 86) gegen Alanine ausgetauscht (PXXP-mut1) (Abb. 18). Das PXXP-Motiv ist dadurch nicht mehr funktionsfähig. Ist dieses Motiv an einer Interaktion mit den Proteinen der Cortactin-Familie beteiligt, soll es zu einem Ausbleiben der Interaktion zwischen ihnen und der Pro-IL-16 PXXP-mut1 Mutanten kommen.

Pro-IL-16 SH3-Bindungsdomäne = PXXP-Motiv1: KGPPVAP
 PXXP-mut1: KGPAVAA

Abb. 18: Mutation der ersten SH3-Bindungsdomäne (PXXP-Motiv1) in Pro-IL-16.

Die beiden Proline AS 83 und 86 (P) wurden gegen Alanine (A) ausgetauscht.

3.4.5. Die Interaktion zwischen der SH3-Bindungsdomäne und HS1

Die weiteren Untersuchungen wurden nunmehr nur noch mit dem HS1-Protein durchgeführt, da seine Expression wie die von IL-16 auf Leukozyten beschränkt ist. Zudem weisen die bisherigen Ergebnisse sowie die Homologie der SH3-Domänen auf eine identische Bindungsdomäne für die anderen Proteine der

Cortactin-Familie hin. Der Hefestamm EGY38/pSH18-34 wurde ko-retransformiert mit HS1 bzw. HS1 SH3 zusammen mit dem Köder-Konstrukt Pro-IL-16 51-342 oder der PXXP-mut1-Mutante. Zusätzlich wurde eine Retransformation mit einem leeren Vektor, dem Kontroll-Bait (pBait) als Köder durchgeführt, welche als Negativkontrolle fungiert. Bei einer wirklichen Bindung zwischen Pro-IL-16 und den Targetproteinen kommt es zu einem Wachstum der Kolonien auf galaktosehaltigem Medium in Abwesenheit von Leucin und zu einer Blaufärbung durch X-Gal. Die Ergebnisse des Tests sind in Abb. 19 dargestellt.

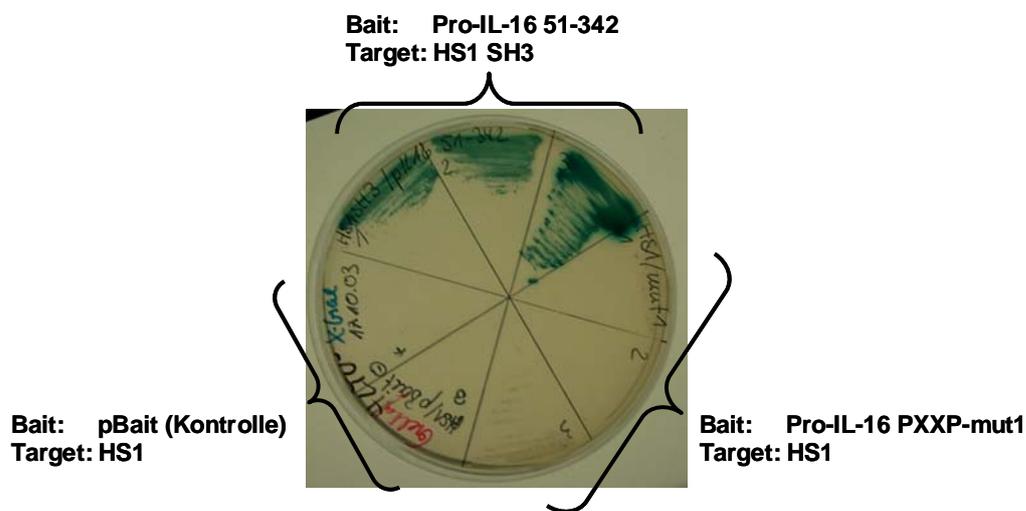


Abb. 19: Ergebnis des Plattentests am Beispiel der Interaktion zwischen Pro-IL-16 51-342 und HS1 SH3, sowie Pro-IL-16 PXXP-mut1 und HS1.

Ein Wachstum der Hefen (blau) findet hier nur bei einer Interaktion zwischen Pro-IL-16 51-342 und HS1 SH3 statt. Durch eine Mutation der ersten SH3-Bindungsdomäne (PXXP mut1) kommt es zum Ausbleiben der Interaktion. Die Negativkontrolle mit dem leeren pBait-Vektor und HS1 ist negativ.

Eine Interaktion zwischen Pro-IL-16 51-342 und der SH3-Domäne von HS1 (HS1 SH3) ist über die blauen Hefekolonien nachweisbar. Es ist keine Bindung zwischen dem Target HS1 und der Pro-IL-16 PXXP-Mutante zu detektieren. Die Negativkontrolle mit dem pBait-Plasmid als Bait und dem detektierten HS1 ist negativ (Abb. 19).

Anhand dieser und der bisher durchgeführten YTH-Experimente ergeben sich die in Abbildung 20 dargestellten Bindungsorte der detektierten Proteine: Die SH3-Domänen der Proteine der Cortactin-Familie HS1, Lasp1, Abp1 und Cortactin

interagieren mit der ersten SH3-Bindungsdomäne von Pro-IL-16 (AS 83-86). Hook3 interagiert im C-terminalen Bereich der Prolin-reichen Domäne.

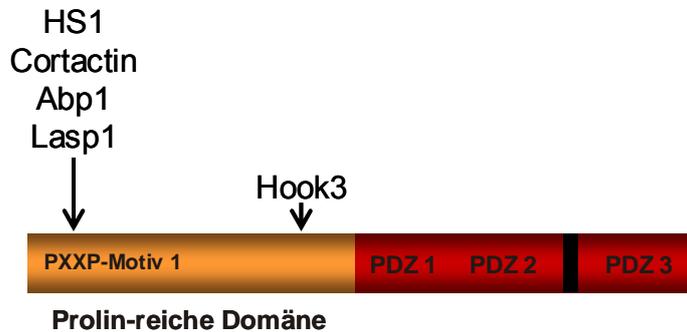


Abb. 20: Schematische Darstellung von Pro-IL-16 mit den theoretischen Bindungsstellen der detektierten Proteine.

3.5. *In vitro*-Bindungs Assay

Die bisherigen, mit dem YTH-System erzielten Ergebnisse einer Bindung zwischen der SH3-Bindungsdomäne in Pro-IL-16 und der SH3-Domäne von HS1 sollen in weiteren Experimenten verifiziert werden. Nach dem Hefesystem soll die Interaktion in eukaryontischen Zellen *in vitro* nachgewiesen werden. Bei diesem Bindungs Assay wird die *in vitro*-Bindung von unterschiedlichen Pro-IL-16-V5 Konstrukten mit der SH3-Domäne des HS1-Proteins nachgewiesen. Die SH3-Domäne liegt als GST-Fusionsprotein vor. Für dieses Experiment wurden 293T-Zellen mit je einem Pro-IL-16-V5 Konstrukt transfiziert. Eine mögliche Bindung findet erst nach der Transfektion in den Zelllysaten statt. Die Interaktionen werden über einen gegen V5-Tag gerichteten AK nachgewiesen.

3.5.1. Konstrukte für den *in vitro*-Bindungs Assay

Herstellung eines rekombinanten GST-Fusionsproteins

Für die Präzipitation wurde ein GST-HS1 SH3 Fusionsprotein in Bakterien hergestellt. Die SH3-Domäne von HS1 ist an das Gluthation S Transferase-Protein gekoppelt (GST-HS1 SH3). Als Kontrolle fungierte ein GST-Protein ohne HS1 SH3-Domäne.

Mutagenese des zweiten SH3-Bindungsmotivs

Um das erste SH3-Bindungsmotiv als Bindungsstelle für die SH3-Domäne von HS1 zu bestätigen und um zu klären, ob das zweite SH3-Bindungsmotiv Einfluss auf die Interaktion hat, wurde zu der Mutation des ersten SH3-Bindungsmotivs (PXXP-mut1) eine weitere *in vitro*-Mutagenese durchgeführt. Dabei wurde das zweite SH3-Bindungsmotiv mutiert (Pro-IL-16-PXXPmut2). Zusätzlich wurde ein Konstrukt hergestellt, bei welchem beide SH3-Bindungsmotive mutiert sind (Pro-IL-16-PXXPmut1+2). Wie bei PXXP-mut1 wurden auch hier die Proline gegen Alanine ausgetauscht (Abb. 21). Alle Pro-IL-16 Konstrukte enthalten C-terminal einen V5-Tag (Abb. 22).

Pro-IL-16 PXXP-Motiv1:	KGP <u>P</u> V <u>A</u> <u>P</u>	Pro-IL-16 PXXP-Motiv2:	KTL <u>P</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>P</u>
PXXP-mut1:	KGP <u>A</u> V <u>A</u> <u>A</u>		
PXXP-mut2:			KTL <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>A</u>
PXXP-mut1+2:	KGP <u>A</u> V <u>A</u> <u>A</u>		KTL <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>A</u>

Abb. 21: Mutation des ersten und zweiten SH3-Bindungsmotivs (PXXP-Motivs) in Pro-IL-16.

Bei PXXP-mut1 wurden die beiden Proline AS 83 und 86 (P) des ersten SH3-Bindungsmotivs in Alanine (A) mutiert. Bei PXXP-mut2 die Proline AS 243 und 237 des zweiten SH3-Bindungsmotivs und bei PXXP-mut1+2 die Proline beider PXXP-Motive.

Des Weiteren wurde zu dem vollständigen Pro-IL-16 Protein ein um 178 AS verkürztes Konstrukt eingesetzt, bei welchem das erste PXXP-Motiv fehlt (Pro-IL-16 Δ 179). Dieses Konstrukt dient als weitere Kontrolle für die Notwendigkeit des ersten SH3-Bindungsmotivs an der Interaktion. Der Nachweis der verschiedenen Pro-IL-16-Konstrukte erfolgte über einen C-terminalen V5-Tag (Abb. 22).

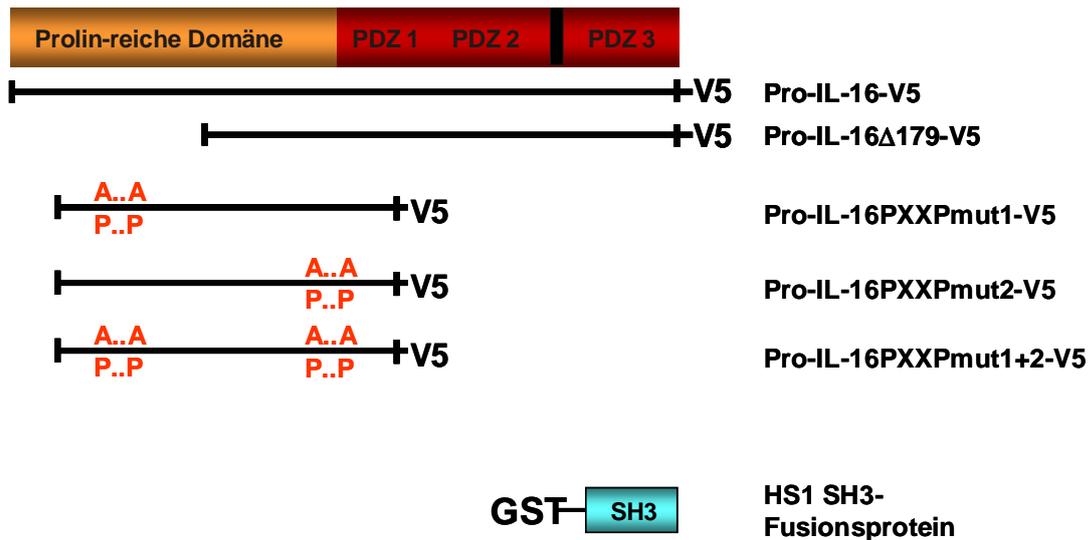


Abb. 22: Schematische Darstellung der für den *in vitro*-Bindungs Assay eingesetzten Pro-IL-16-Konstrukte und des HS1 SH3-Fusionsproteins.

Die Pro-IL-16 Klone tragen C-terminal einen V5-Tag über welchen sie im Western Blot mit einem V5-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden sollen.

3.5.2. Ergebnisse des *in vitro*-Bindungs Assays

Im Western Blot konnte mit entsprechenden Antikörpern der V5-Tag des präzipitierten Proteins Pro-IL-16 detektiert werden (Abb. 23 A). Eine Bande bei 80 kDa, was der Größe des Pro-IL-16 Proteins entspricht, ist in der ersten Probe nachweisbar (Bande 1), welche mit Pro-IL-16-V5 transfiziert wurde. Kein Pro-IL-16-V5 konnte in den nächsten beiden Proben nachgewiesen werden, bei welchen die Zellen mit Pro-IL-16 Δ 179-V5 und Pro-IL-16PXXPmut1-V5 transfiziert wurden. Eine Pro-IL-16 Bande bei 80 kDa ist wiederum bei den mit Pro-IL-16PXXPmut2-V5 transfizierten Zellen zu sehen. Die mit Pro-IL-16PXXPmut1+2-V5 transfizierten Zellen zeigen keine Bande. Die Negativkontrolle, ebenfalls transfiziert mit Pro-IL-16-V5, jedoch nur mit dem GST-Protein allein präzipitiert, zeigt ebenfalls keine Bande. Eine Präzipitation mit GST-HS1 SH3 findet statt, wenn sowohl bei Pro-IL-16 N-terminal das erste PXXP-Motiv als auch die SH3-Domäne des HS1-Proteins vorhanden bzw. funktionsfähig sind. Eine Veränderung des zweiten PXXP-Motivs hat keinen Einfluss auf die Präzipitation. In Abb. 23 B sind die Lysate der entsprechenden Proben aufgetragen. Die detektierten Banden bei 80 bzw. 65 kDa (Pro-IL-16 Δ 179-V5) zeigen, dass Pro-IL-16-V5 in allen Proben vorhanden ist.

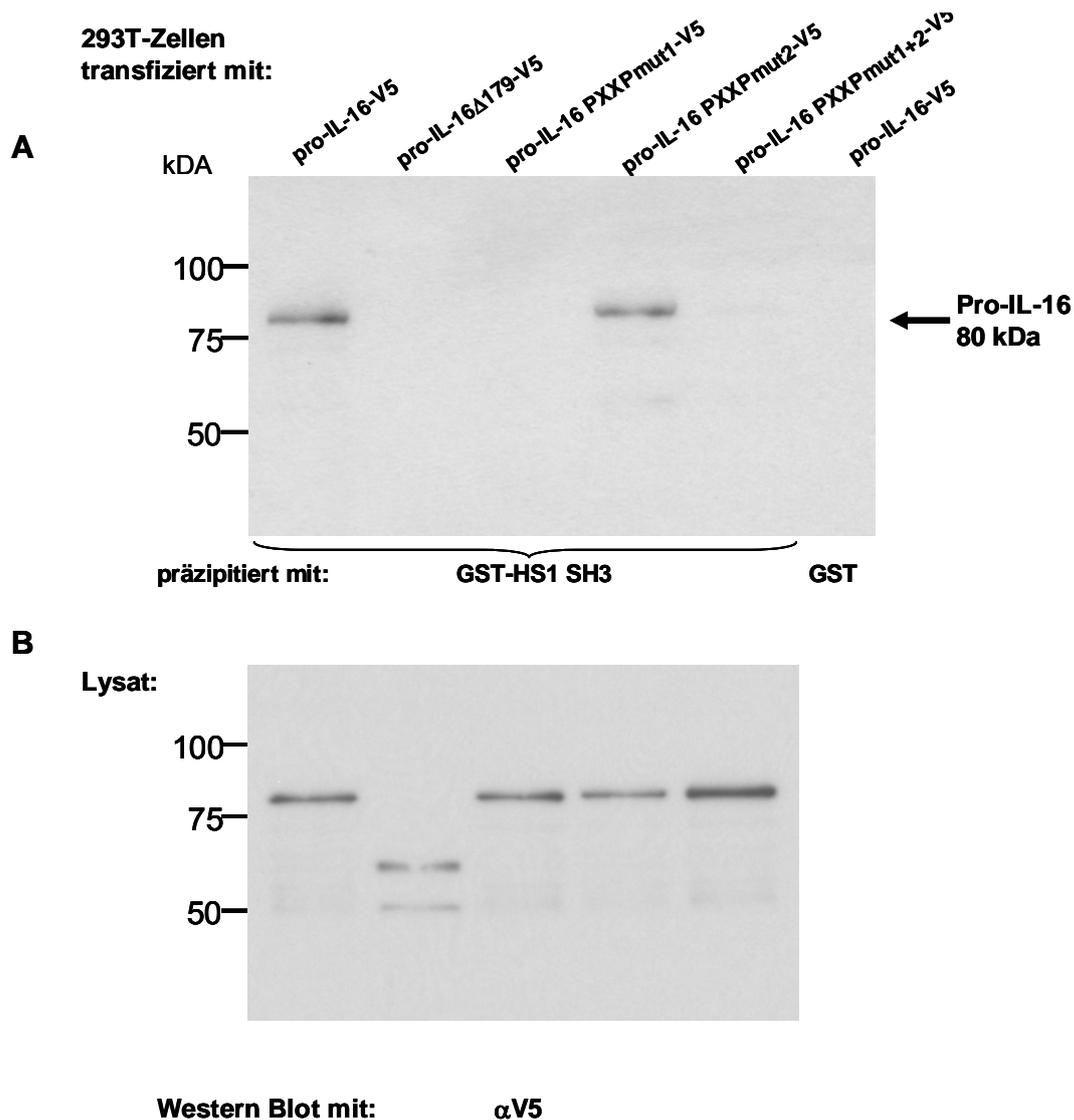


Abb. 23: *In vitro*-Bindungs Assay zum Nachweis der Bindung zwischen verschiedenen Pro-IL-16-Konstrukten und der SH3-Domäne von HS1.

A: 293T-Zellen wurden mit Pro-IL-16-V5, Pro-IL-16 Δ 179-V5, Pro-IL-16PXXPmut1-V5, -mut2-V5 und -mut1+2-V5 transfiziert. Mit dem GST-Fusionsprotein GST-HS1 SH3 wurden die Proteine präzipitiert und eine Bindung über den V5-Tag mit dem α V5-Antikörper visualisiert. Für die Negativkontrolle wurden Zellen mit Pro-IL-16-V5 transfiziert und mit dem GST-Protein präzipitiert. Es kann keine Bindung über den V5-Tag nachgewiesen werden.

B: Zur Kontrolle wurden die Lysate der transfizierten Zellen aufgetragen und mit dem α V5-Antikörper die an den V5-Tag gebundenen Proteine in allen Proben nachgewiesen. Die Bande bei 65 kDa entspricht der Größe von Pro-IL-16 Δ 179-V5, bei 80 kDa der Größe der schweren Kette des AK.

Die erzielten Ergebnisse mit dem *in vitro*-Bindungs Assay stimmen mit den bisherigen, mit dem YTH-System erzielten Ergebnissen überein. Das erste SH3-Bindungsmotiv ist an der Interaktion mit der SH3-Domäne von HS1 beteiligt. Das nachfolgende Experiment soll diese Interaktion in nativen Zellen nachweisen.

3.6. Ko-Immunopräzipitation

3.6.1. Konstrukte für die Ko-Immunopräzipitation

Mit Hilfe der Ko-Immunopräzipitation soll in HEK 293T-Zellen ein Nachweis der Bindung von HS1 bzw. seiner SH3-Domäne mit der Prolin-reichen Domäne von Pro-IL-16 durch transiente Transfektion entsprechender Plasmide nachgewiesen werden. Zu dem ganzen Pro-IL-16 Protein wurde ebenfalls das um 178 AS verkürzte Konstrukt eingesetzt, bei welchem das erste PXXP-Motiv fehlt (Pro-IL-16 Δ 179). Der Nachweis der verschiedenen Pro-IL-16-Konstrukte erfolgte über einen C-terminalen V5-Tag. Es wurde das gesamte HS1-Protein und die SH3-Deletionsmutante HS1 Δ SH3 eingesetzt. Beide Konstrukte wurden in den Vektor pCMV kloniert, der einen N-terminalen FLAG-Tag enthält. In Abbildung 24 sind die unterschiedlichen HS1 und Pro-IL-16 Konstrukte schematisch dargestellt.

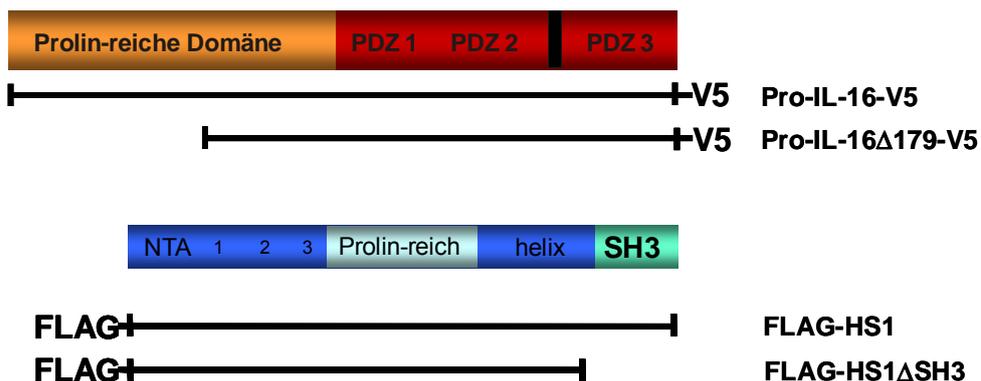


Abb. 24: Schematische Darstellung der für die Ko-Immunopräzipitation eingesetzten Klone von Pro-IL-16 und HS1.

3.6.2. Verifizierung der Bindung zwischen dem SH3-Bindungsmotiv in Pro-IL-16 und der SH3-Domäne von HS1 in transfizierten Zellen

Im Western Blot konnte mit dem α -FLAG AK das ko-immunopräzipitierte HS1 Protein in der Probe mit FLAG-HS1/Pro-IL-16-V5 transfizierten Zellen detektiert werden. Eine Bande bei 75 kDa entspricht der Größe des HS1-Proteins. Ein Nachweis des FLAG-Tags in den Proben der mit FLAG-HS1 Δ SH3/Pro-IL-16-V5 und FLAG-HS1/Pro-IL-16 Δ 179-V5 transfizierten Zellen war nicht möglich. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen eingesetzt (Abb. 25 A). Abbildung 25 C zeigt die Lysate der transfizierten Zellen, in welchen sich FLAG-HS1 mit

einer Bande bei 75 kDa bzw. 70 kDa bei dem um die SH3-Domäne verkürzten Konstrukt FLAG-HS1 Δ SH3 antikörperspezifisch nachweisen lässt. In Abb. 25 B ist die rehybridisierte Membran dargestellt. Hier fand als Gegenkontrolle eine Detektion des immunopräzipitierten Proteins Pro-IL-16 über den V5-Tag mit dem für den V5-Tag spezifischen Antikörper statt. Dieser ist in den drei Proben durch eine Bande bei 80 kDa, welches der Größe von Pro-IL-16 entspricht bzw. bei 65 kDa bei dem um 178 AS verkürzten Konstrukt Pro-IL-16 Δ 179-V5 nachweisbar. Auch hier zeigt sich keine Bande in der Negativkontrolle (rechte Spur). Eine Ko-Immunopräzipitation findet also statt, wenn sowohl bei Pro-IL-16 N-terminal das erste SH3-Bindungsmotiv als auch die SH3-Domäne des HS1 vorhanden sind.

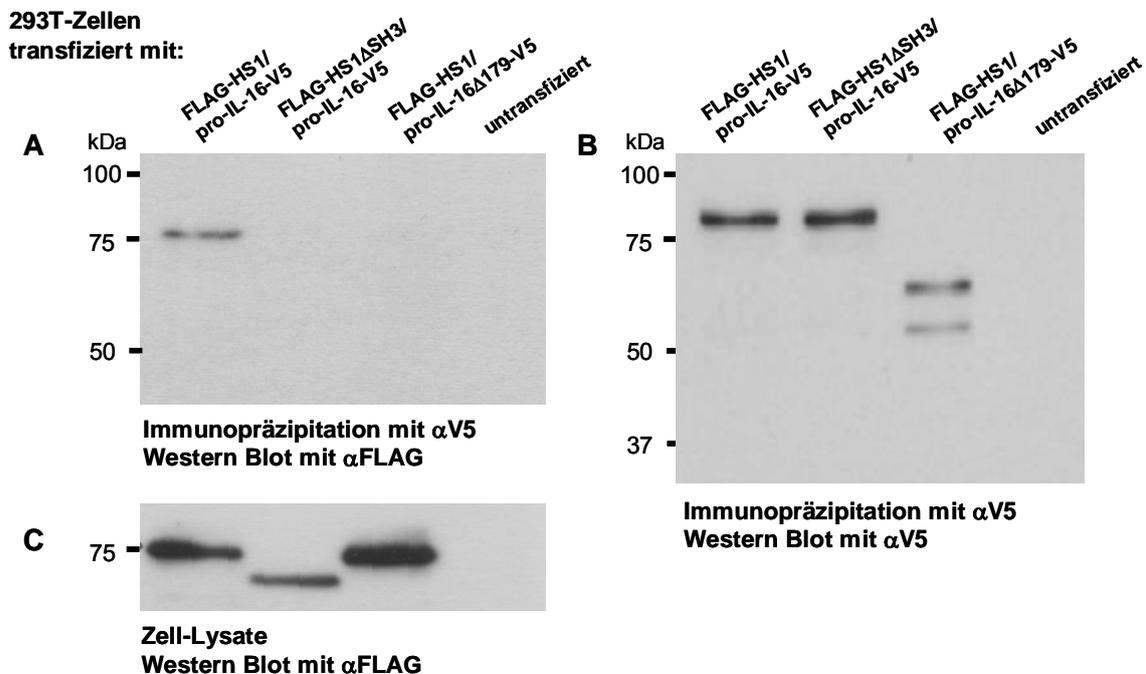


Abb. 25: Ko-Immunopräzipitation zum Nachweis der Bindung zwischen dem ersten PXXP-Motiv von Pro-IL-16 und der SH3-Domäne von HS1.

293T-Zellen wurden mit verschiedenen Pro-IL-16 und HS1-Konstrukten kotransfiziert.

A: Mit dem α V5-Antikörper wird über den V5-Tag am C-terminalen Ende der Pro-IL-16 Konstrukte präzipitiert. Kommt es zu einer Bindung zwischen Pro-IL-16 und HS1 bzw. den entsprechenden Konstrukten, ist im Präzipitat der FLAG-Tag des HS1 mit einem α Flag-Antikörper nachweisbar (Bande bei 75 kDa).

B: Mit dem V5-spezifischen Antikörper kann Pro-IL-16 über den V5-Tag in allen Proben nachgewiesen werden, bei welchen eine Transfektion mit einem Pro-IL-16-V5 Konstrukt vorgenommen wurde (Bande bei 80 bzw. für Pro-IL-16 Δ 179 bei 65 kDa). Die Negativkontrolle (rechte Spur), bei der es sich um untransfizierte Zellen handelt, weist keine Bande auf. Die Bande bei 55 kDa entspricht der schweren Kette des AK.

C: In den Zelllysaten der kotransfizierten Proben kann der FLAG-Tag des HS1 in allen Proben bis auf die untransfizierte Negativkontrolle mit dem α FLAG-Antikörper nachgewiesen werden (Bande bei 75 kDa für FLAG-HS1 bzw. 70 kDa für FLAG-HS1 Δ SH3).

3.7. Immunopräzipitation endogener Proteine aus T-Zellen

Alle bisher erzielten Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die SH3-Domäne von HS1 mit dem ersten SH3-Bindungsmotiv in Pro-IL-16 interagiert. Mit dem Nachweis endogener Proteine soll überprüft werden, ob sowohl das Protein von IL-16 als auch von HS1 in der selben Zelle exprimiert werden, eine Interaktion physiologisch also stattfindet. Hierfür wurde in Lysaten von C8166 T-Zellen mit IL-16- bzw. HS1-spezifischen Antikörpern (mouse α HS1 bzw. mouse α IL-16 14.1, BD Biosciences) die endogenen Proteine immunopräzipitiert. Das jeweils ko-immunopräzipitierte Protein wurde dann antikörperspezifisch nachgewiesen.

3.7.1. Nachweis endogener IL-16 und HS1 Proteine in C8166 Lysaten

Abbildung 26 A zeigt die Bande des Pro-IL-16 bei 80 kDa nach einer Präzipitation mit dem HS1-spezifischen Antikörper. Bei einer Präzipitation mit einem Isotypen-Kontrollantikörper (mouse IgG2a Isotype control, R&D) lässt sich kein Pro-IL-16 nachweisen (rechte Spur). Eine Bande bei 55 kDa zeigt das Vorhandensein der schweren Ketten des Antikörpers. In beiden Lysaten (Abb. 26 C) lässt sich Pro-IL-16 nachweisen (Bande bei 80 kDa). Die rechte Membran (Abb. 26 B) zeigt das reverse Experiment: Die Präzipitation des HS1-Proteins durch α -IL-16, nachweisbar durch eine Bande bei 75 kDa. Auch hier fehlt die Bande bei der Präzipitation durch den Isotypen-Kontrollantikörper. Die Lysate (Abb. 26 D) weisen das Vorhandensein von HS1 durch eine Bande bei 75 kDa nach.

Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass auch eine Interaktion der endogenen Proteine von IL-16 und HS1 ohne vorherige Transfektion stattfindet.

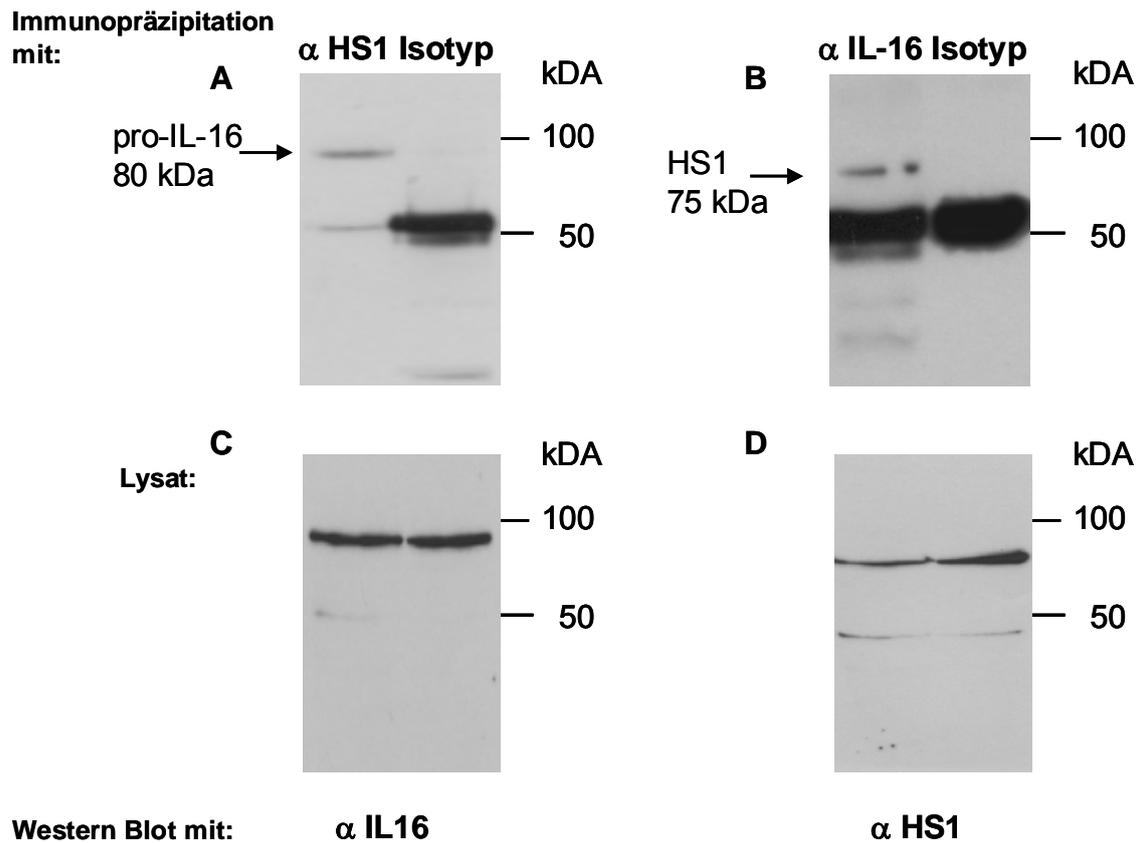


Abb. 26: Immunopräzipitation endogener Proteine in C8166 T-Zellen.

A: Immunopräzipitation mit α HS1-Antikörper (linke Spur) oder IgG-Kontrollantikörper (rechte Spur), Western Blot mit α IL-16 Antikörper zum Nachweis von ko-immunopräzipitiertem IL-16.

B: Das gleiche Experiment, jedoch immunopräzipitiert mit α IL-16 und Western Blot mit α HS1. Die Kontrolle (links) fand ebenfalls mit einem IgG-Antikörper statt.

C und D: Lysate von C8166 T-Zellen mit dem Nachweis von IL-16 (C) und HS1 (D). Die Bande bei 55 kDa zeigt die schweren Ketten des Antikörpers.

3.8. Nachweis der Assoziation von Pro-IL-16 und HS1 mit dem Aktin-Zytoskelett

Um weitere Aussagen über die Funktion von Pro-IL-16 machen zu können sollte geklärt werden, wo die Interaktion mit HS1 in der Zelle stattfindet. Proteine der Cortactin-Familie wechselwirken mit dem Arp 2/3-Komplex (Olazabal and Machesky, 2001; Uruno *et al.*, 2003; Chew *et al.*, 2002). Somit sollten diese Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert sein.

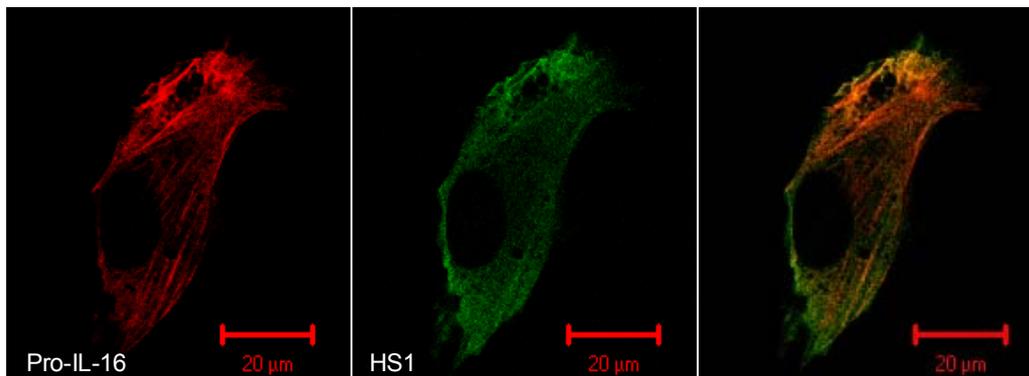
3.8.1. Konstrukte für die konfokale Laserscan-Mikroskopie

Mit Pro-IL-16-V5 und FLAG-HS1 (schematische Darstellung der Konstrukte Abb. 24) kotransfizierte Cos7- und 3T3-Zellen wurden mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop auf die Kolokalisation der beiden Proteine hin untersucht. Pro-IL-16 wurde über einen Cy3-Tag (rot), HS1 über einen FITC-Tag (grün) nachgewiesen.

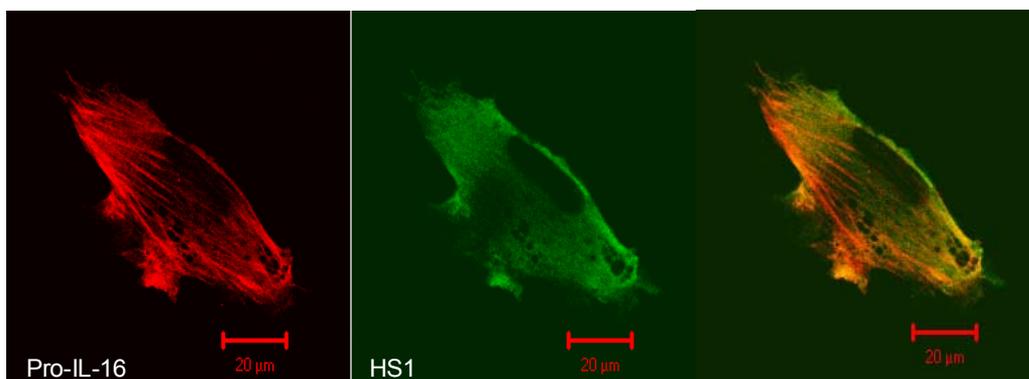
3.8.2. Pro-IL-16 und HS1 sind in den corticalen Regionen und am Zytoskelett kolokalisiert

Pro-IL-16 wurde vor allem in der corticalen Region der Zellen sowie am Aktin-Zytoskelett, insbesondere den Stress-Fibern, lokalisiert (Abb. 27). Ebenso wurde HS1 in der corticalen Region und mit den Aktin-Fasern assoziiert und somit mit Pro-IL-16 kolokalisiert nachgewiesen.

A



B



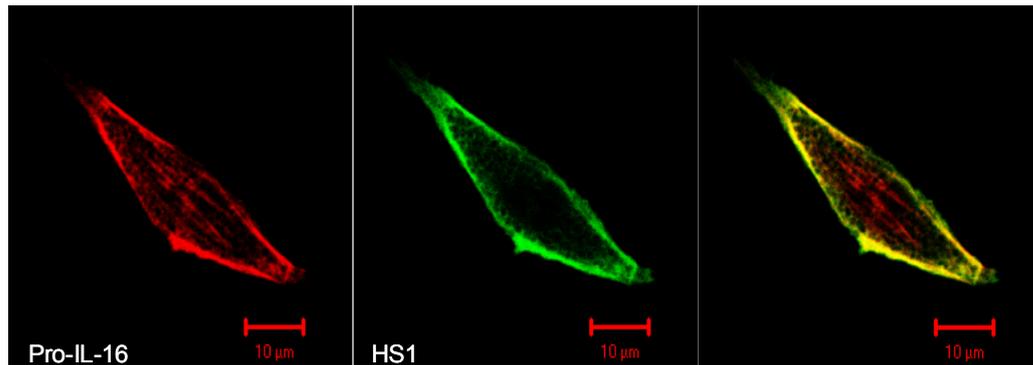
C

Abb. 27: Kolokalisation von Pro-IL-16 (rot) und HS1 (grün) mit der kortikalen Region und Aktinfilamenten.

Fluoreszenzmarkierte Cos7- (**A** und **B**) und 3T3-Zellen (**C**) wurden mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop analysiert. Gelbe Bereiche in der übereinander liegenden Abbildung (immer rechts) repräsentieren eine Kolokalisation. Die Cos7- bzw. 3T3-Zellen wurden mit Pro-IL-16-V5 und FLAG-HS1 transfiziert.