

ZUSAMMENFASSUNG

Proteinpaare bzw. größere funktionelle Proteinkomplexe sind an den meisten wenn nicht sogar an allen biologischen Vorgängen beteiligt. Aus diesem Grund ist die Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) essentiell für die Aufklärung von biologischen Prozessen und zellulären Netzwerken. Eine sehr leistungsstarke und häufig verwendete Methode für die Analyse von PPI ist hierbei das Zwei-Hybrid-System (two-hybrid system). Bisher werden Hochdurchsatzanalysen (high-throughput analysis) mit diesem Verfahren aber fast ausschließlich in Hefe durchgeführt, sogar für die Erforschung von Säugerproteinen. Potentielle Interaktionen werden dann anschließend Gen für Gen mit Säuger-Zwei-Hybrid-Untersuchungen überprüft.

Die hier beschriebene Arbeit hatte die Etablierung einer neuen, kosteneffektiven Methode für die Hochdurchsatzanalyse von PPI direkt in Säugerzellen zum Ziel. Hierfür wurde das Säuger-Zwei-Hybrid-System mit transfizierten Zell-Microanordnungen (cell microarrays) zu einem neuen Verfahren, genannt CAPPIA (cell array based protein-protein-interaction assay), kombiniert. Entsprechend der Methode von PCR- oder Oligonucleotid-Microanordnungen wurden hierbei Proben in definiertem Muster auf Objektträgern aufgetragen und dabei auf der Oberfläche fixiert. Die Proben enthielten vergleichbar anderen Säuger-Zwei-Hybrid-Systemen sogenannte Köder- (bait) und Opfer- (prey) Expressionsplasmide zusammen mit einem Reporterplasmid, das im vorliegenden Fall für ein autofluoreszierendes Protein codierte. Nach dem Auftragen der vektor-konstruierten Proben auf den Objektträgern wurden diese mit menschlichen, adherenten Zellen bedeckt. Diese setzten sich einschichtig auf der gesamten Oberfläche fest, aber nur die Zellen, die direkt auf den aufgetragenen DNA-Punkten (DNA spots) wuchsen, wurden durch die Proben transfiziert. Im Falle einer Interaktion der chimären Köder- und Opfer-Proteine hatte das die Expression des Reporterproteins zur Folge. Diese aus einer PPI resultierenden Signale wurden anschließend mit Hilfe von Fluoreszenznachweisen analysiert, ohne das es einer weiteren Bearbeitung der Objektträger wie Immunfluoreszenzfärbung oder Nachweisen auf enzymatischer Basis bedurfte.

Zunächst wurden die Produktion der Zellanordnungs-Objektträger und die entsprechenden Transfektionsbedingungen optimiert. Anschließend konnte nachgewiesen werden, dass CAPPIA Protein-Protein-Interaktionen in unterschiedlichen Säugerzellen spezifisch und quantitativ ermitteln kann. Darüber hinaus bestätigte das Durchsuchen einer kleinen Bibliothek von Opfer-Plasmiden, die in Beziehung zum menschlichen Androgenrezeptor standen, dass CAPPIA gut geeignet ist für den Nachweis von hormonabhängigen Protein-Protein-Interaktionen. Das wurde noch bekräftigt durch die Darstellung der Dosisabhängigkeit dieser Interaktionen - sowohl auf androgene als auch auf antiandrogene Reagenzien. Schließlich wurde demonstriert, dass die Kombinationsmöglichkeiten und damit die Effektivität des Durchsuchens gesteigert durch werden kann durch die Verwendung von Objektträgern, auf denen kein Köder-Plasmid aufgetragen ist. Jeder DNA-Fleck besteht hier nur jeweils aus einem Plasmid aus einer Opfer-Bibliothek zusammen mit dem Reporterplasmid. Diese Objektträger wurden dann mit Zellen analysiert, die stabil oder transient mit einem Köder-Plasmid transfiziert waren.

Die hohe Kapazität von Proben auf den Zellananordnungen und der geringe Verbrauch an Reagenzien machen CAPPIA zurzeit zum ökonomischsten Hochdurchsatzverfahren für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in Säugerzellen. Damit kann sich CAPPIA zu einem wichtigen Werkzeug im Bereich der menschlichen Interakteom- und funktionellen Genomforschung entwickeln.