

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzanalyse des Klons 2.1

Bei dem Expressions-*Screening* einer Rattennieren-cDNA-Bibliothek mittels der RII-*overlay*-Methode wurde der Klon 2.1 isoliert (Edemir, Diplomarbeit 1999). Für die Sequenzierung des *inserts* von Klon 2.1 wurde eine größere Menge DNA durch eine Plasmid-Midipräparation isoliert und anschließend die Sequenzierung am 5'-Ende mit dem Primer T3 und am 3'-Ende mit dem Primer T7 begonnen. Nach Erhalt der ersten Sequenzen wurden sukzessive Primer für die weitere Sequenzierung in beiden Richtungen festgelegt. Pro Ansatz konnten 500-700 Basen sequenziert werden, wobei die ersten 50 und die letzten 100-150 Basen oft nicht eindeutig lesbar waren. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung wurden die nachfolgenden Primer 150 bp vor der letzten, eindeutig lesbaren Base der vorherigen Sequenz gelegt. Jede Sequenz wurde durch Wiederholung der Sequenzierung mit dem gleichen Primer bestätigt und zudem mit der komplementären Sequenz des Gegenstranges verglichen, so daß jeder DNA-Strang des *inserts* auf diese Weise zweimal sequenziert wurde. Die einzelnen Sequenzen wurden anhand der Überlappungen zusammengefügt. Die Primersequenzen sind unter 2.1.5.3.1 aufgeführt.

Das *insert* von Klon 2.1 hat eine Länge von 1747 bp (s. Anhang). Mittels im Internet verfügbarer Programme des *Human Genome Center, Baylor College of Medicine (BCM Search Launcher)* wurde die Sequenz translatiert (Abb. 3.1). Der offene Leserahmen beginnt mit dem zweiten Basenpaar und geht bis zum Ende des Klons. Das *insert* von Klon 2.1 kodiert daher für ein Protein mit einer Länge von 582 Aminosäuren. Da weder ein potentieller Translationsstartpunkt (fehlende Kozak-Konsensussequenz (Kozak 1996)) noch das Translationsende (kein Stopkodon in der Sequenz) bestimmt werden konnten, handelt es sich um einen Partialklon. Das kodierte Protein weist eine Vielzahl potentieller Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen auf, u.a. für die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMII), die Proteinkinase C (PKC) und die Proteinkinase A (PKA).

```

ARETTQPPARDLPTETGLSAINDYGPQADMKHVTQASVPGEESNVTTVLGMVSTQAADGPPGADSIIEET
ATRIVEAVIKQIKASNTLRTQVEIQNPPLSSSEIKEIENTGSESARVFLPGEPLQMENTQKETTGHCSV
ETEAPDKIILAVHRPEPAPEMPDKTKTGGVEVDLLSKRSAASEEEAIGNGAATPKMKQAPGTQAINRESWC
AIEPCPEAASLLASKQSSECRSFIDVGLGTECATKEGVLQRESGSDSDLFHSPSDEMDSIIFSKPEEEQ
LLCDDTTGSSSSTDDTASLDRHSSHGSDVSLPQTSKLNRSRNHQSSNGFFSHGVDPESEGESEPAAGSGE
MEEEEEMDSITEVPANRSFLRNSMRSLSLSPFRRHSSWGP GKNAASDAEMNQRSMSWCPSGVQYSAALNADFN
IRSFSLEGLTGGGGVGNKPSSSLEISSANSSELRNPFSGEEQRSSLMSLSEEHLEPDQRQHHRMFDQQT
CYRSKQQGFNYCTSAISSPLTKSISLMTISHPGLDNARPFHSASANLTESITEDNCNFLPPSPSKKSFE
EKSGTKVSRTFSYIRNKMSSSKSKKKKKKK

```

Abb. 3.1: Aminosäuresequenz des inserts von Klon 2.1. Das insert von Klon 2.1 kodiert für ein 582 Aminosäuren langes Protein mit unbekanntem Translationsanfang und -ende. Die der RII-Bindungsdomäne des humanen AKAP Ht31 homologe Region ist fett hervorgehoben und unterstrichen (Aminosäuren 65-78). Serin- bzw. Threoninreste, die potentiell durch die PKA phosphoryliert werden können, sind fett hervorgehoben.

Datenbankrecherchen in den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* und des *BCM Search Launcher* ergaben Homologien für das von Klon 2.1 kodierte Protein zu dem C-Terminus des humanen AKAP Ht31 (Aminosäuren 436-1015, Carr et al. 1992a). Die Homologie zu Ht31 beginnt mit der sechsten Aminosäure des von Klon 2.1 kodierten Proteins und bei Aminosäure 436 des AKAP Ht31 und reicht bis zum Ende des Klons 2.1 und zur letzten bekannten Aminosäure von Ht31. Die publizierte Sequenz von Ht31 in der Datenbank ist ebenfalls unvollständig, weder der Translationsanfang (fehlende Kozak-Konsensussequenz (Kozak 1996)) noch das Translationsende (kein Stopkodon in der Sequenz) sind bekannt.

Der Grad der Übereinstimmung zwischen beiden Proteinen ist in den einzelnen Sequenzabschnitten unterschiedlich. Die Identität im Bereich der ersten 200 Aminosäuren des von Klon 2.1 kodierten Proteins mit den Aminosäuren 430-634 des AKAP Ht31 beträgt 46,8 %, im Bereich der letzten 382 Aminosäuren beider Proteine ist sie mit 78,8 % wesentlich höher. Im Bereich der RII-Bindungsdomäne von Ht31 (Aminosäuren 494-507) stimmen 10 von 14 Aminosäuren (71,4 % Identität) mit der entsprechenden Region des von Klon 2.1 kodierten Proteins (Aminosäuren 65-78) überein. Die Identität beider Proteine auf die gesamte Proteinelänge bezogen, beträgt 67,7 %. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß es sich bei dem von Klon 2.1 kodierten Protein um das Rattenorthologe des humanen AKAP Ht31 handelt. Es wird im weiteren Verlauf im Unterschied zu dem AKAP h(human)Ht31 als r(rat)Ht31 bezeichnet.

Sowohl das AKAP hHt31 als auch das Rattenorthologe rHt31 sind einem weiteren humanen Protein homolog. Das *breast cancer nuclear receptor-binding auxillary protein*, Brx (Rubino et al. 1998) ist in der N-terminalen Sequenz (Aminosäuren 1-384) nahezu identisch mit der C-terminalen Sequenz des AKAP hHt31 (Aminosäuren 632-1015) (Abb. 3.2). Unterschiede bestehen lediglich im Bereich der ersten drei Aminosäuren von Brx und der drei letzten der bisher bekannten Aminosäuren von hHt31. Aufgrund der hohen Aminosäureidentität (98,7 %) ist davon auszugehen, daß es sich bei Brx und hHt31 um Spleißvarianten handelt. Zur Verdeutlichung der humanen Abstammung wird Brx in der vorliegenden Arbeit als h(human)Brx bezeichnet. Zwischen rHt31 (Aminosäuren 198-582) und hBrx (Aminosäuren 1-384) besteht eine Identität von 78,2 %. Ein *alignment* der drei Proteine ist in Abb. 3.2 dargestellt.

rHt31	1	-----ARETTQPPARDLPTETGLSAINDYGPQADMKHVTQASVPGEEESNVT
hHt31	421	AEEAQIDDEAHPVLLQPVAKELPTDMELSA-HDDGAPAGVREVMRAPPSSGRERSTP
hBrx	0	-----
rHt31	47	TVLGMVSTQAADGPPGAD <u>SI</u> EETATRIVEAVIKQIKASNTLRTQVEIQNPPLSSSE
hHt31	476	PSLCMVSAQDAPLPKGAD <u>LIEEAA</u> SRIVDAVIEQVKAAGALLTEGEACHMSSLSSPE
hBrx	0	-----
rHt31	103	I----KEIENTGSESARVFLPGEPLQMENTQKETTGH---CSVETEAPEKIIILAVH
hHt31	532	LGPLTKGLESAPTEKVVSTFPFGESLPMGSTPEEATGSLAGCFAGREEPEKIIILPVQ
hBrx	0	-----
rHt31	152	RPEPAPEMPDTKTGGGEVDLLSKRSAASEEEAIGNGAATPKMKQAPGTQAINRESWC
hHt31	586	GPEPAAEMPDKAEDEVDF--RASSISEEVAVGSIAATLKMKGPMPTQAINRENWC
hBrx	1	-----MLYINRENWC
rHt31	208	AIEPCPEAASLLASKQSSECRSFIDVGLGTECATKEGVLQRESGSDSDLFHSPSDE
hHt31	642	TIEPCPDAASLLASKQSPECENFLDVGLGRECTSKQGVLKRESGSDSDLFHSPSDD
hBrx	11	TIEPCPDAASLLASKQSPECENFLDVGLGRECTSKQGVLKRESGSDSDLFHSPSDD
rHt31	264	MDSIIFSKPEEEQLLCDTTGSSSSSTDDTASLDRHSSHGSDVSLPQTSKLNRSRHHQ
hHt31	698	MDSIIFPKPEEEHLACDITGSSSSSTDDTASLDRHSSHGSDVSLSQLKPNRSRDRQ
hBrx	67	MDSIIFPKPEEEHLACDITGSSSSSTDDTASLDRHSSHGSDVSLSQLKPNRSRDRQ
rHt31	320	SSNGFFSHGVDPESEGESEEPAGSGEMEEEEEMDSITEVPANRSFLRNSMRSLSPFR
hHt31	754	SLDGFYSHGMGAEGRESESEPADPGDVEEEEEMDSITEVPANCSVLRSSMRSLSPFR
hBrx	123	SLDGFYSHGMGAEGRESESEPADPGDVEEEEEMDSITEVPANCSVLRSSMRSLSPFR
rHt31	376	RHSWGP GKNAASDAEMNQSRMSWCPSGVQYSAALNADFNIRSFSLGLELTGGGGVGN
hHt31	810	RHSWGP GKNAASDAEMNHRSSMRVLGDVVRPPIHR----RSFSLEGLTGGAGVGN
hBrx	197	RHSWGP GKNAASDAEMNHRSSMRVLGDVVRPPIHR----RSFSLEGLTGGAGVGN
rHt31	432	KPSSSLEISSANSSELRNPFSGEEQRSSLSLSEEHLEPDQRQHHRMFDQQTTCYRS
hHt31	862	KPSSSLEVSSANAEEELRHPFSGEERVDSLVSLSLEEDLESQREH-RMFDQQICHRS
hBrx	231	KPSSSLEVSSANAEEELRHPFSGEERVDSLVSLSLEEDLESQREH-RMFDQQICHRS
rHt31	488	KQQGFNYCTSAISSPLTKSISLMTISHPGLDNSRPFHSA----SANLTESITEENC
hHt31	917	KQQGFNYCTSAISSPLTKSISLMTISHPGLDNSRPFHSTFHNTSANLTESITEENY
hBrx	286	KQQGFNYCTSAISSPLTKSISLMTISHPGLDNSRPFHSTFHNTSANLTESITEENY
rHt31	540	NFLPPSPSKKSFEKSGTKVSRTFYSYIRNKMSSSKSKSKKKKKK-----
hHt31	973	NFLPHSPSKKDSEWKSGTKVSRTFYSYIKNKMSSSKKSKEKKKK-----
hBrx	342	NFLPHSPSKKDSEWKSGTKVSRTFYSYIKNKMSSSKKSKEKEKEKDKIKEKEKDSKD

Abb. 3.2: Alignment der Aminosäuresequenz des von Klon 2.1 kodierten Proteins (rHt31) mit den Aminosäuresequenzen des humanen AKAP hHt31 (hHt31) und des humanen *breast cancer nuclear receptor-binding auxillary protein* (hBrx). Das alignment veranschaulicht die Homologien zwischen den Proteinen. Die RII-Bindungsdomäne von hHt31 (Aminosäuren 494-507) und die homologe Region von rHt31 (Aminosäuren 65-78) sind fett hervorgehoben und unterstrichen. Potentielle weitere RII-Bindungsdomänen in rHt31 sind unterstrichen. Das Epitop, gegen das der im Verlauf dieser Arbeit hergestellte Antikörper 1965 gerichtet ist, ist in allen drei Proteinen fett hervorgehoben. Übersichtshalber sind die Aminosäuren 1-420 von hHt31 und die Aminosäuren 398-1429 von hBrx nicht aufgeführt.

3.2 Untersuchung der gewebespezifischen Expression der mRNA von rHt31

In einem früheren Northern Blot-Experiment mit Gesamt-RNA aus dem Nierengewebe wurde die Expression von rHt31 in der Niere untersucht (Edemir, Diplomarbeit 1999). In der inneren Medulla und im restlichen Nierengewebe (ohne innere Medulla) wurden jeweils ein Signal von ca. 9 kb und ein Signal größer als 9,5 kb detektiert. Die Intensität beider Signale war in der inneren Medulla der Niere stärker als im restlichen Nierengewebe.

Zur Überprüfung der Expression von rHt31 außerhalb des Nierengewebes wurde eine kommerziell erhältliche Nylonmembran mit poly-A⁺-mRNA aus verschiedenen Geweben der Ratte (Herzmuskel, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden (*Multiple tissue Northern Blot*, Clontech, Heidelberg)) mit dem *insert* von Klon 2.1 (rHt31 1-1747 bp) hybridisiert. Dazu wurde das *insert* zunächst durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pBluescript herausgeschnitten und nach Auftrennung in einem TAE-Agarosegel mittels der *GeneClean*-Methode aufgereinigt. Die radioaktive Markierung des cDNA-Fragmentes erfolgte mit dem *Megaprime DNA labeling Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Zur Beurteilung der Qualität und Quantität der aufgetragenen poly-A⁺-mRNA wurde die Membran anschließend mit einer GAPDH-cDNA-Sonde hybridisiert (Abb. 3.3).

Bei der Hybridisierung mit der rHt31-cDNA-Sonde zeigten sich im Herzmuskel zwei Signale bei ca. 9 kb und größer 9,5 kb und im Skelettmuskel ein Signal von ca. 9 kb. In der Niere wie auch in den übrigen Geweben wurden keine Signale detektiert. Wie die Hybridisierung mit der GAPDH-Sonde zeigt, wurden in den verschiedenen Spuren unterschiedliche Mengen an mRNA aufgetragen. Besonders starke GAPDH-Hybridisierungssignale sind im Herzmuskel, Skelettmuskel, Leber und Hirn zu beobachten. In der Niere wurde deutlich weniger mRNA aufgetragen, das schwächere Signal wird durch das starke Signal der Nachbarspur (Skelettmuskel) überlagert. Die aufgetragenen RNA-Mengen von Milz, Lunge, Niere und Hoden sind möglicherweise für die Detektion spezifischer rHt31-Hybridisierungssignale nicht ausreichend. Für die Niere ist zusätzlich zu berücksichtigen, daß bei dem früheren Northern Blot-Experiment die stärkeren Signale in der inneren Medulla, die nur einen geringen Teil des renalen Gewebes repräsentiert, detektiert wurden.

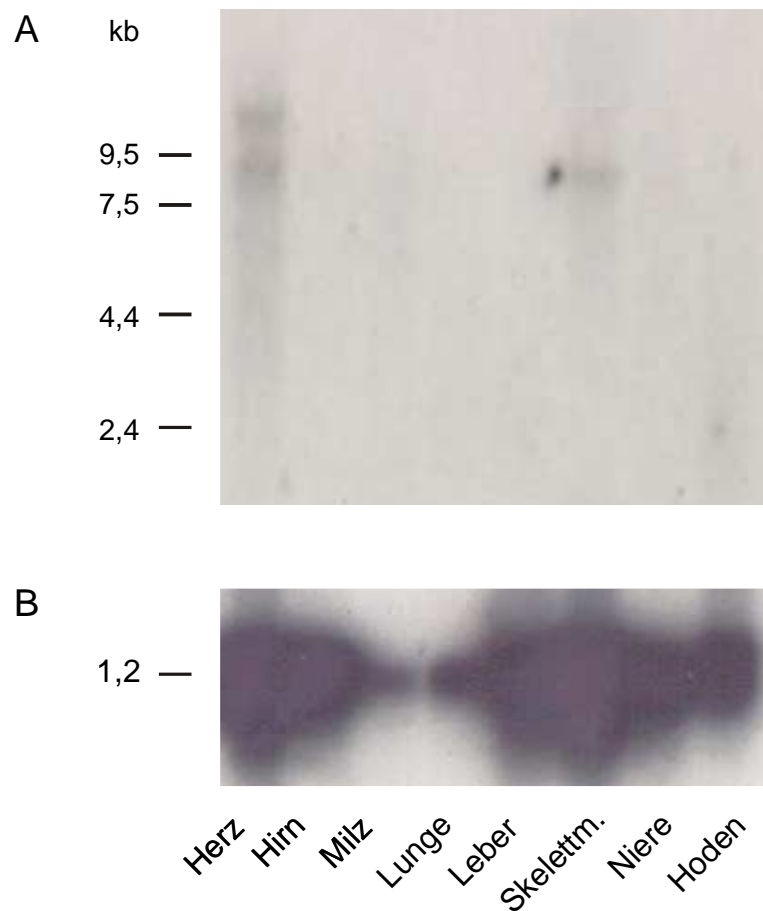


Abb. 3.3: Northern Blot zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression von rHt31. Auf diese kommerziell erhältliche Nylonmembran (Clontech, Freiburg) wurde poly-A⁺-mRNA aus verschiedenen Geweben der Ratte (Herz, Hirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden) transferiert. A: Die Hybridisierung der RNA erfolgte mit einer ³²P-markierten cDNA-Sonde (rHt31 1-1747 bp). Die Signale wurden nach 10tägiger Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm erhalten. B: Hybridisierung der RNA mit einer ³²P-markierten GAPDH-cDNA-Sonde. Die Signale wurden nach vier Stunden Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm erhalten.

3.3 Kartierung der RII-Bindungsdomäne

Die Aminosäuren 65-78 von rHt31 sind der RII-Bindungsdomäne des AKAP hHt31 (Aminosäuren 494-507) homolog und in 10 von 14 Aminosäuren identisch (Abb. 3.2). Zur Kartierung der potentiellen RII-Bindungsdomäne in rHt31 wurden mittels PCR Deletionsmutanten dieser Region hergestellt und als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine exprimiert. Anschließend wurden sie im RII-*overlay* hinsichtlich ihrer RII-Bindungsfähigkeit untersucht.

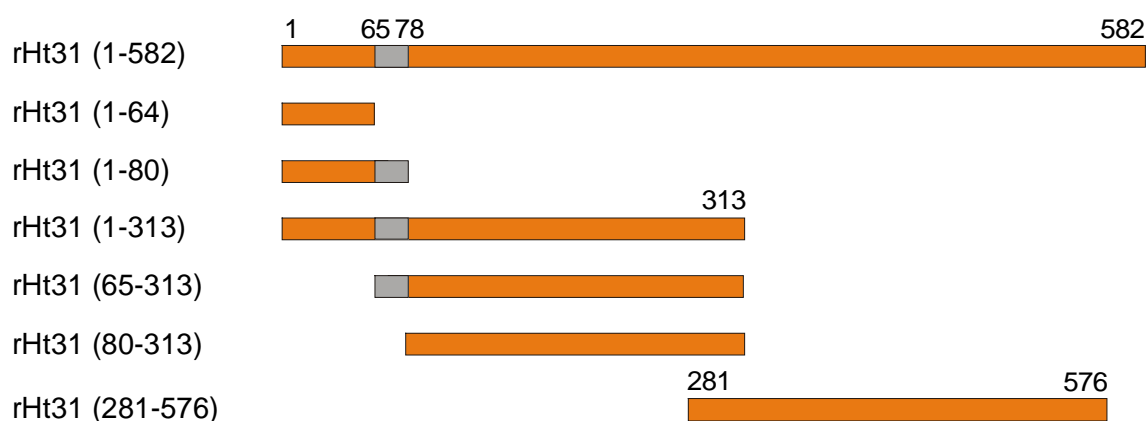
3.3.1 Herstellung von Deletionsmutanten durch PCR

Ausgehend von den Angaben über die minimale Region in der hHt31-Sequenz, welche für die Bindung der RII-Untereinheiten der PKA notwendig ist (Carr et al. 1992a), wurden die Deletionsmutanten von rHt31 so konstruiert, daß sie einerseits die Aminosäuren 65-78 bei fehlendem N- bzw. C-Terminus oder andererseits nur die C- bzw. N-terminal flankierenden Aminosäuren (Aminosäuren 1-64 und 80-313) enthielten. Die 296 C-terminalen Aminosäuren wurden als separates Fusionsprotein exprimiert. Eine schematische Darstellung der Konstrukte ist in Abb. 3.4 zu sehen.

Für die Klonierung der mittels PCR amplifizierten rHt31-DNA-Fragmente in den Vektor pGEX-4T-3 war es notwendig, daß diese Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende aufwiesen. Es wurden *forward* (5')-Primer mit einer *EcoRI*-Schnittstelle am 5'-Ende und *reverse* (3')-Primer mit mit einer *XhoI*-Schnittstelle am 5'-Ende verwendet (s. 2.1.9.3.3). Als Matrize für die PCR diente das *insert* von Klon 2.1. Die Bezeichnung der Deletionsmutanten, die Länge der einzelnen Proteine und die verwendeten Primer sind in Abb. 3.4 angegeben.

Die PCR-Amplifikate wurden in einem TAE-Agarosegel aufgetrennt, mit dem *Gene-clean-Kit* (DNA-Fragmente größer 250 bp) oder dem *QIAEX II Kit* (DNA-Fragmente kleiner 250 bp) aus dem Gel isoliert und mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* verdaut. Anschließend wurden sie, ebenso wie der durch Restriktionsverdau mit den gleichen Enzymen linearisierte Vektor pGEX-4T-3, nach elektrophoretischer Auftrennung erneut aus dem Agarosegel gereinigt.

A



B

Deletionsmutante	5'-Primer	3'-Primer	Fragmentgröße (bp)
rHt31 1-64	1Fo.Ht31anf.	5Re.Ht31oh.R2	192
rHt31 1-80	1Fo.Ht31anf.	6Re.Ht31	240
rHt31 1-313	1Fo.Ht31anf.	9Ht31mitte.rev	939
rHt31 65-313	2Fo.Ht31vo.R2	9Ht31mitte.rev	747
rHt31 80-313	3Fo.Ht31na.R2	9Ht31mitte.rev	702
rHt31 281-576	8Fo.Ht31mit.Rho	4Re.Ht31ende	888

Abb. 3.4: Kartierung der RII-Bindungsdomäne in rHt31. A: Schematische Darstellung der für die Kartierung der RII-Bindungsdomäne in rHt31 hergestellten Deletionsmutanten. Die Zahlen beziehen sich auf die Position der Aminosäuren in der rHt31-Sequenz, die von Klon 2.1 kodiert wird. Die potentielle RII-Bindungsdomäne ist grau gekennzeichnet (Aminosäuren 65-78). B: In der Tabelle sind die verwendeten Primer und die Fragmentgrößen der PCR-Produkte aufgeführt.

Nach Ligation der einzelnen DNA-Fragmente mit dem linearisierten Vektor wurden die verschiedenen Ligationsprodukte in kompetente BL21 *E. coli*-Bakterien transformiert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Plasmid-DNA-Isolierung aus einzelnen Bakterienkolonien und anschließendem Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XhoI* überprüft. Zudem wurden die *inserts* nach der Klonierung in den Vektor pGEX-4T-3 mit vektorspezifischen Primern (GST-Primer, *sense* und *antisense*) vollständig sequenziert. Dadurch konnten mögliche Fehler bei der Amplifikation ausgeschlossen und der Leserahmen überprüft werden.

3.3.2 Expression der Deletionsmutanten als GST-Fusionsproteine

Die erfolgreich ohne Mutationen und im korrekten Leserahmen in den Vektor pGEX-4T-3 klonierten DNA-Fragmente wurden wie unter 2.2.9.1 beschrieben als GST-Fusionsproteine exprimiert, gereinigt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteinbanden durch eine Coomassie Blau-Färbung des Gels dargestellt (Abb. 3.5).

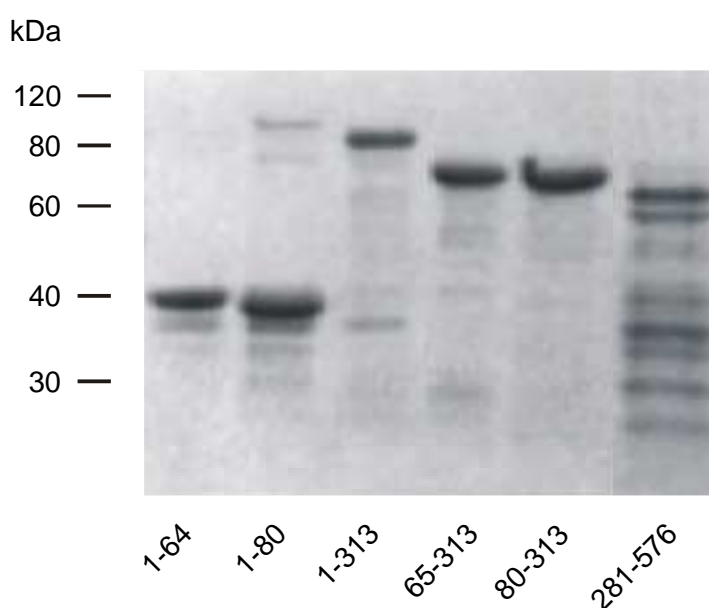


Abb. 3.5: Auftrennung der gereinigten GST-Fusionsproteine in einer SDS-PAGE (Coomassie Blau-Färbung). Nach Klonierung der DNA-Fragmente in den Vektor pGEX-4T-3 und Transformation der Plasmide in kompetente BL21 *E. coli*-Bakterien wurde die Biosynthese der Fusionsproteine mit IPTG induziert und diese anschließend wie unter 2.2.9.1 beschrieben gereinigt. Die Fusionsproteine (5 µg pro Spur) wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Coomassie Blau-Färbung dargestellt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die 10 kDa Proteinleiter (Gibco) aufgetragen. Die Bezeichnung der Spuren bezieht sich auf die Aminosäuren der Deletionsmutanten von rHt31 (s. Abb. 3.4).

Die Berechnung des Molekulargewichts der Deletionsmutanten erfolgte mit dem Programm von *ExPASy/Proteomics tools*. Es wurde anschließend zu dem Molekulargewicht der Glutathion-S-Transferase (26 kDa) addiert. Das errechnete und das apparente Molekulargewicht der einzelnen Fusionsproteine in einer SDS-PAGE sind in Tab. 3.1 gegenübergestellt. Alle Fusionsproteine migrierten in der SDS-PAGE langsamer als es ihr errechnetes Molekulargewicht erwarten ließ.

Vergleich von errechnetem und apparentem Molekulargewicht der GST-Fusionsproteine

Deletionsmutante	Aminosäuren	errechnetes MG des Fusionsproteins (kDa)	apparentes MG in einer SDS-PAGE (kDa)	Instabilitätsindex
rHt31 1-64	64	32,6	40	28,4
rHt31 1-80	80	34,3	39	35,3
rHt31 1-313	313	59,2	85	57,2
rHt31 65-313	249	50,8	70	64,4
rHt31 80-313	234	53,5	70	64,6
rHt31 281-576	296	59	65	75,2

Tab. 3.1: Die Berechnung des Molekulargewichts (MG) und des Instabilitätsindex erfolgte mit den Programmen von *ExPASy/Proteomics tools*. Das errechnete MG der Fusionsproteine setzt sich aus dem errechneten MG der Deletionsmutanten und dem MG der Glutathion-S-Transferase (26 kDa) zusammen. Ein Instabilitätsindex < 40 klassifiziert das Protein als potentiell stabil, ein Index > 40 als potentiell instabil (Guruprasad et al. 1990).

Trotz Optimierung der Methode und unter Anwendung verschiedenster Proteaseinhibitoren konnte die Deletionsmutante rHt31 281-576 nicht ohne das Auftreten von Spaltprodukten gereinigt werden (Abb. 3.5). Die starke Proteolyse während der Aufreinigung ist auf eine Vielzahl potentieller Protease-Schnittstellen im C-terminalen Bereich des Proteins zurückzuführen. Mittels im Internet verfügbarer Programme wurden für rHt31 und die verschiedenen Deletionsmutanten Instabilitätsindices berechnet, die eine Vorhersage über die metabolische Stabilität der Proteine in Abhängigkeit von ihrer Aminosäuresequenz erlauben. Als stabile Proteine mit einem Index kleiner als 40 (Guruprasad et al. 1990) wurden dabei nur die beiden N-terminalen Deletionsmutanten (rHt31 1-64 und rHt31 1-80) klassifiziert.

3.3.3 RII-overlay mit den GST-Fusionsproteinen

3.3.3.1 Die GST-Fusionsproteine rHt31 1-64, 1-80, 1-313, 65-313 und 80-313

Zur Überprüfung der RII-Bindungsfähigkeit wurden die GST-Fusionsproteine der Deletionsmutanten rHt31 1-64, 1-80, 1-313, 65-313 und 80-313 nach elektrophoretischer Auftrennung in einer SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend wie unter 2.2.1.13 beschrieben mit den ^{32}P -markierten RII-Untereinheiten hybridisiert (Abb. 3.6). Die Spezifität der RII-Bindung wurde durch Präinkubation der radioaktiv markierten RII-Untereinheiten mit dem Peptid Ht31 (Aminosäuren 493-515 von hHt31), welches die RII-Bindung inhibiert bzw. mit dem Kontrollpeptid Ht31-P, welches aufgrund von Prolinresten an Aminosäurepositionen 502 und 507 nicht mehr inhibitorisch wirken kann (s. 2.1.3), überprüft. Der RII-overlay des Fusionsproteins rHt31 281-576 ist unter 3.3.3.2 beschrieben.

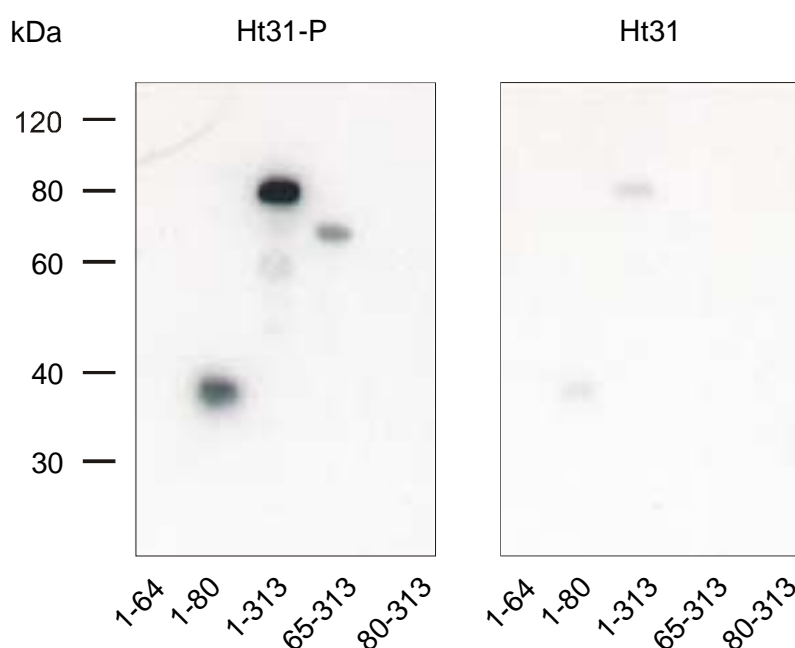


Abb. 3.6: RII-overlay zur Bestimmung der RII-Bindungsdomäne in rHt31. Die GST-Fusionsproteine rHt31 1-64, 1-80, 1-313, 65-313 und 80-313 (0,75 μg pro Spur) wurden nach Auftrennung in einer 12 %igen SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit ^{32}P -markierten RII-Untereinheiten hybridisiert. Die RII-Untereinheiten wurden zuvor mit dem Kontrollpeptid Ht31-P (10 μM) oder mit dem inhibitorischen Peptid Ht31 (10 μM) 30 min präinkubiert. Die Signale wurden nach Exposition der Membran ü. N. auf einen Röntgenfilm erhalten. Die Bezeichnung der Spuren bezieht sich auf die Aminosäuren der Deletionsmutanten.

Die Fusionsproteine, welche die der RII-Bindungsdomäne von hHt31 homologe Region enthalten (rHt31 1-80, 1-313 und 65-313), zeigen im RII-*overlay* nach Präinkubation der RII-Untereinheiten mit dem Peptid Ht31-P ein Signal (Abb. 3.6, Ht31-P). Die Signalintensitäten sind dabei unterschiedlich, das stärkste Signal zeigt die Deletionsmutante, welche auch die an die RII-Bindungsdomäne angrenzenden Aminosäuren enthält (rHt31 1-313). Die beiden Fusionsproteine, welche die Aminosäuren 65-79 C- bzw. N-terminal flankieren, sie aber nicht enthalten, binden die RII-Untereinheiten nicht (rHt31 1-64 und 80-313). Nach Präinkubation der RII-Untereinheiten mit dem Peptid Ht31 sind die Signale deutlich schwächer bzw. nicht mehr detektierbar (Abb. 3.6, Ht31). Daraus kann geschlußfolgert werden, daß diese Signale spezifisch sind und es sich bei rHt31 um ein AKAP handelt. Die RII-Bindungsdomäne von rHt31 befindet sich im Bereich der Aminosäuren 65-78 (Pepperle et al. 2000).

3.3.3.2 RII-*overlay* mit dem GST-Fusionsprotein rHt31 281-576

Das Fusionsprotein der Deletionsmutante rHt31 281-576 sollte als Negativkontrolle im RII-*overlay* dienen, da für diese Region keine RII-Bindungsdomäne beschrieben ist. Bei diesem Versuch wurden neben dem gereinigten Fusionsprotein (Abb. 3.7 A, Spur E) auch die Bakterien vor und nach Induktion mit IPTG (Abb. 3.7 A, Spuren B – und B +) aufgetragen. Überraschenderweise zeigte auch dieses Fusionsprotein nach Präinkubation der RII-Untereinheiten mit dem Peptid Ht31-P eine Bindung der RII-Untereinheiten (Abb. 3.7 A, Ht31-P). Das Signal erscheint erst nach Induktion der Bakterien mit IPTG (B +) und ist beim gereinigten Fusionsprotein noch stärker vorhanden (E). Durch Präinkubation der RII-Untereinheiten mit dem Peptid Ht31 sind die Signale spezifisch inhibierbar (Abb. 3.7 A, Ht31). Es ist zu beachten, daß gegenüber dem unter 3.3.3.1 beschriebenen Versuch die 10fache Proteinmenge aufgetragen und die Signale erst nach 10 Tagen Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm erhalten wurden. Zum Vergleich der Signalintensitäten ist in Abb. 3.7 B der RII-*overlay* mit dem Fusionsprotein rHt31 1-80 nach 2 Tagen Exposition der Membran dargestellt (vgl. Abb. 3.6). Es befindet sich also eine zweite RII-Bindungsdomäne in der C-terminalen Region des Proteins. Diese ist möglicherweise weniger affin als die bisher bekannte „klassische“ RII-Bindungsdomäne und wird im weiteren Verlauf als „atypische“ Bindungsdomäne bezeichnet (Pepperle et al. 2000).

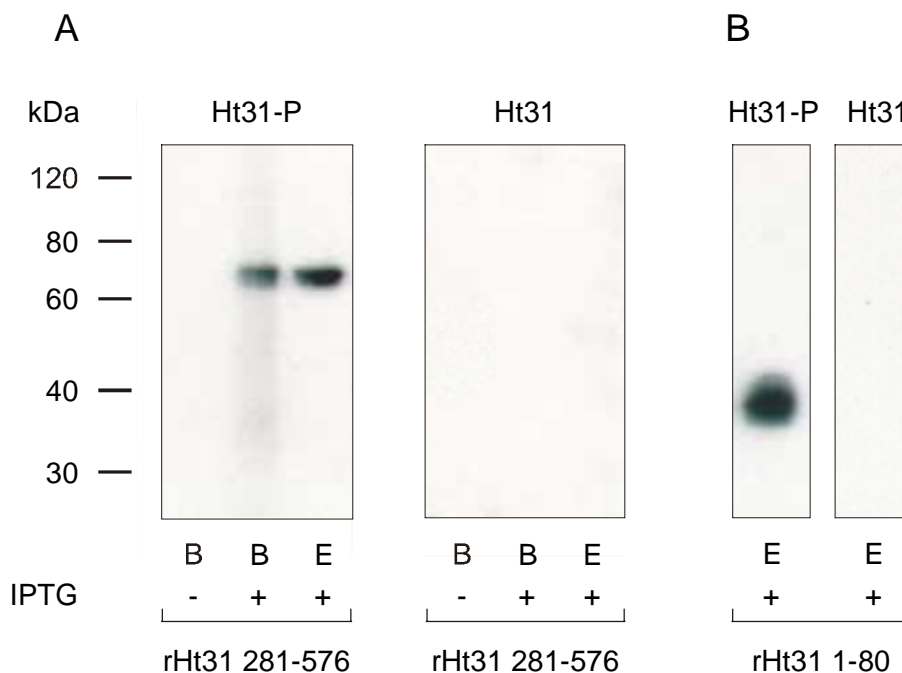


Abb. 3.7: RII-overlay mit den GST-Fusionsproteinen rHt31 281-576 und rHt31 1-80. A: RII-overlay mit dem GST-Fusionsprotein rHt31 281-576. Bakteriensuspensionen vor und nach Induktion mit IPTG (B – und B +, jeweils 30 µl pro Spur) und gereinigtes Fusionsprotein (E, 7,5 µg pro Spur) wurden nach Auftrennung in einer 12 %igen SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit ^{32}P -markierten RII-Untereinheiten hybridisiert. Die RII-Untereinheiten wurden zuvor mit dem Kontrollpeptid Ht31-P (10 µM) oder mit dem inhibitorischen Peptid Ht31 (10 µM) 30 min präinkubiert (vgl. Abb. 3.6). Die Signale wurden nach 10 Tagen Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm erhalten. B: RII-overlay mit dem GST-Fusionsprotein rHt31 1-80 (E, 0,75 µg pro Spur, vgl. Abb. 3.6). Das Signal wurde nach zwei Tagen Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm erhalten. Bezeichnung der Spuren: B: Bakteriensuspension, E: Eluat (gereinigtes Fusionsprotein).

3.4 Charakterisierung einer zweiten RII-Bindungsdomäne in rHt31

3.4.1 Sequenzanalyse des C-Terminus

Wie in Punkt 1.1.3 beschrieben, ist das entscheidende Kriterium für die Bindung der RII-Untereinheiten die amphipatische Helixstruktur der Bindungsdomäne. Die RII-Bindungsdomänen aller bisher bekannten AKAPs weisen mitunter große Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz auf, zeigen jedoch ein typisches Muster von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren in der Sequenz und bilden eine amphipatische Helixstruktur aus (Carr et al. 1991). In Zusammenarbeit mit G. Krause aus der Abteilung NMR-unterstützte Strukturforchung des FMP wurde mittels eines *alignment* des C-Terminus

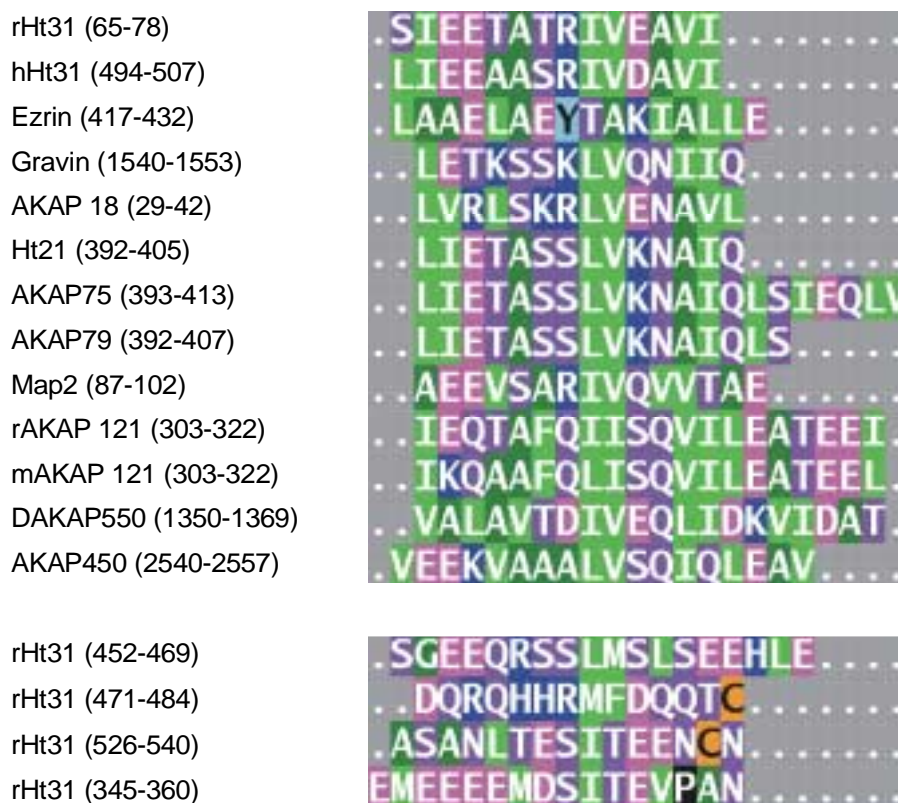


Abb. 3.8: Alignment der RII-Bindungsdomänen verschiedener AKAPs mit potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31. Die RII-Bindungsdomänen folgender AKAPs wurden mit der klassischen RII-Bindungsdomäne von rHt31 (Aminosäuren 65-78) und vier weiteren Regionen in rHt31, die mittels Strukturvorhersagen bestimmt wurden (s. Text), verglichen: hHt31 (Carr et al. 1992a), Ezrin (Dransfield et al. 1997), Gravin (AKAP 250, Nauert et al. 1997), AKAP18 (Fraser et al. 1998), Ht21 (Carr et al. 1991), AKAP75 (Glantz et al. 1993), AKAP79 (Carr et al. 1992b), Map2 (Theurkauf und Vallee 1981), rAKAP121, mAKAP121 (Felicello et al. 1998), DAKAP550 (Han et al. 1997), AKAP450 (Witczak et al. 1999). In Klammern ist die Aminosäureposition angegeben. Farbunterlegung der Aminosäuren: hellgrün: hydrophob, violett: hydrophil, pink: negativ geladen, blau: positiv geladen, dunkelgrün: Alanin, gelb: Cystein, schwarz: Prolin.

von rHt31 (Aminosäuren 281-576) mit den RII-Bindungsdomänen verschiedener AKAPs in Kombination mit Strukturvorhersagen (*helical wheel projektion*) in der C-terminalen Sequenz nach potentiellen RII-Bindungsdomänen mit einer amphipatischen Helixstruktur gesucht. Dabei wurde berücksichtigt, daß möglicherweise auch eine hydrophobe Kernregion in der Bindungsdomäne mit angrenzenden helixbildenden Aminosäuren eine RII-Bindung vermitteln könnte. Es konnten vier verschiedene Regionen in der Sequenz bestimmt werden, die potentiell eine amphipatische Helix oder eine der amphipatischen Helix ähnliche Struktur ausbilden können. Ein *alignment* der

RII-Bindungsdomänen verschiedener AKAPs mit den vier potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31 ist in Abb. 3.8 dargestellt. Eine potentielle RII-Bindung dieser Domänen wurde im weiteren experimentell untersucht.

3.4.2 Kartierung der potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31 mittels RII-overlay

3.4.2.1 Herstellung von Deletionsmutanten durch PCR

Zur Kartierung der potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31 (Aminosäuren 281-576) wurden wie unter 3.3.1 für die Kartierung der klassischen RII-Bindungsdomäne beschrieben, mittels PCR DNA-Fragmente hergestellt, welche jeweils ein oder zwei der vier potentiellen Domänen beinhalten. Es wurden *forward* (5′)-Primer mit einer *EcoRI*-Schnittstelle am 5′-Ende und *reverse* (3′)-Primer mit mit einer *XhoI*-Schnittstelle am 5′-Ende verwendet. Als Matrize für die PCR diente das *insert* von Klon 2.1. Eine schematische Darstellung dieser Deletionsmutanten ist in Abb 3.9 zu sehen. In Tab. 3.2 sind die Bezeichnung der Deletionsmutanten, die verwendeten Primer und die Fragmentgrößen aufgeführt. Die Primersequenzen sind unter 2.1.9.3.3 zu finden. In Tab. 3.3 ist aufgeführt, in welchen Deletionsmutanten die vier potentiellen RII-Bindungsdomänen enthalten sind.

Die PCR-Produkte (Abb. 3.10) wurden wie unter 3.3.1 beschrieben in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert. Nach der DNA-Plasmidisolierung von positiven Klonen und Sequenzierung der *inserts* zur Überprüfung der Sequenz und des Leserahmens wurden die DNA-Fragmente in den Vektor pGEX-4T-3 umkloniert. Das Ergebnis der Umklonierung wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

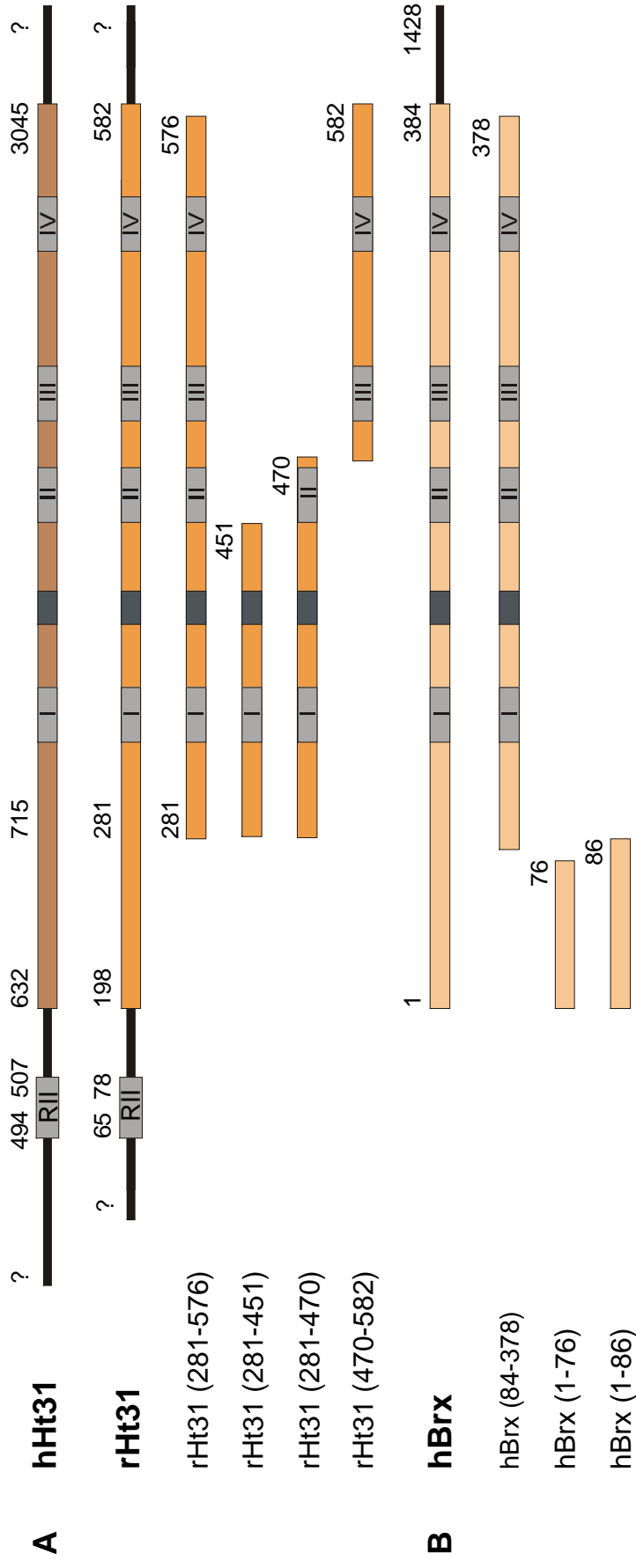


Abb. 3.9: Schematische Darstellung von hHt31, rHt31, hBrx sowie verschiedener Deletionsmutanten. A: Schematische, nicht maßstabgerechte Darstellung von hHt31, rHt31 und der für die Kartierung der potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31 (I-IV) aufgrund von Strukturvorhersagen hergestellten Deletionsmutanten. Die arabischen Zahlen beziehen sich auf die Position der Aminosäuren in der hHt31- bzw. rHt31-Sequenz. Die Fragezeichen verdeutlichen die Unvollständigkeit der Sequenzen. Die klassische RII-Bindungsdomäne (RII) ist in beiden Sequenzen gekennzeichnet (hHt31: Aminosäuren 494-507, rHt31: Aminosäuren 65-78). Die potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31 sind mit römischen Ziffern bezeichnet: I (rHt31 345-360), II (rHt31 452-469), III (rHt31 471-484) und IV (rHt31 526-540). Die homologen Sequenzabschnitte in hHt31 sind ebenfalls gekennzeichnet. B: Schematische Darstellung von hBrx sowie von drei hBrx-Deletionsmutanten. Die Mutante hBrx 84-378 wurde zum Nachweis einer potentiellen RII-Bindungsdomäne in hBrx hergestellt, die beiden N-terminalen Mutanten (hBrx 1-76 und 1-86) exprimieren ein potentielles Zinkfingermotiv im N-Terminus von hBrx. Dunkelgrau hervorgehoben ist das Epitop, gegen das der im Verlauf dieser Arbeit hergestellte Antikörper 1965 gerichtet ist (hHt31: Aminosäuren 803-817, rHt31: Aminosäuren 369-383, hBrx: Aminosäuren 172-186), die Sequenz ist in allen drei Proteinen konserviert.

Primer und Fragmentgrößen der PCR-Produkte für die Herstellung der Deletionsmutanten rHt31 281-450, 281-470 und 470-582

Deletionsmutante	5'-Primer	3'-Primer	Fragmentgröße (bp)
rHt31 281-450	8Fo.Ht31mit.Rho	Ht31-20rev	513
rHt31 281-470	8Fo.Ht31mit.Rho	Ht31-30rev	570
rHt31 470-582	Ht31-40forw	Ht31-50rev.ende	339

Tab 3.2: In der Tabelle sind die Primer und Fragmentgrößen der PCR-Produkte für die Herstellung der Deletionsmutanten zur Kartierung der potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31 (Aminosäuren 281-576) aufgeführt.

Potentielle RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31

RII-Bindungsdomäne	Deletionsmutante		
	rHt31 (281-451)	rHt31 (281-470)	rHt31 (470-582)
I (rHt31 345-360)	+	+	-
II (rHt31 452-469)	-	+	-
III (rHt31 471-484)	-	-	+
IV (rHt31 526-540)	-	-	+

Tab. 3.3: In der Tabelle sind die potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31 (I - IV) und die Deletionsmutanten, die sie enthalten (rHt31 281-451, 281-470 und 470-582), aufgeführt.

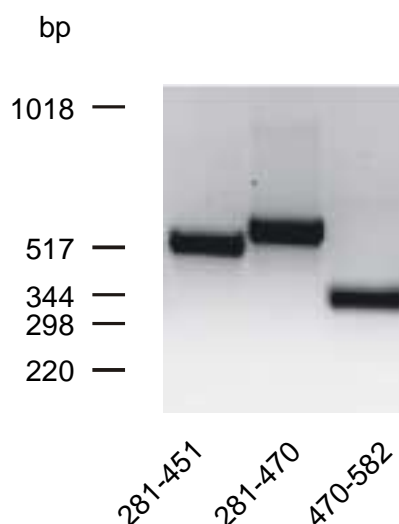


Abb. 3.10: Amplifikation von DNA-Fragmenten aus dem C-Terminus von rHt31. Für die PCR wurden die in Tab. 3.2 angegebenen Primer eingesetzt, als Matrize diente das *insert* von Klon 2.1. Die PCR-Produkte (10 µl pro Spur) wurden in einem 1 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Bezeichnung der Spuren bezieht sich auf die Aminosäuren der durch die DNA-Fragmente kodierten Deletionsmutanten. Als Molekulargewichtsstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter (Life Technologies) aufgetragen.

3.4.2.2 Expression der Deletionsmutanten als GST-Fusionsproteine und RII-overlay

Die in den Vektor pGEX-4T-3 klonierten DNA-Fragmente wurden nach Transformation der Plasmide in kompetente BL21 *E. coli*-Bakterien als GST-Fusionsproteine exprimiert, gereinigt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 3.3.2). In Abb. 3.11 ist eine Coomassie Blau-Färbung des Gels zu sehen. Die errechneten und apparenten Molekulargewichte der Fusionsproteine in einer SDS-PAGE und die Instabilitätsindices (vgl. 3.3.2) sind in Tab 3.4 aufgeführt.

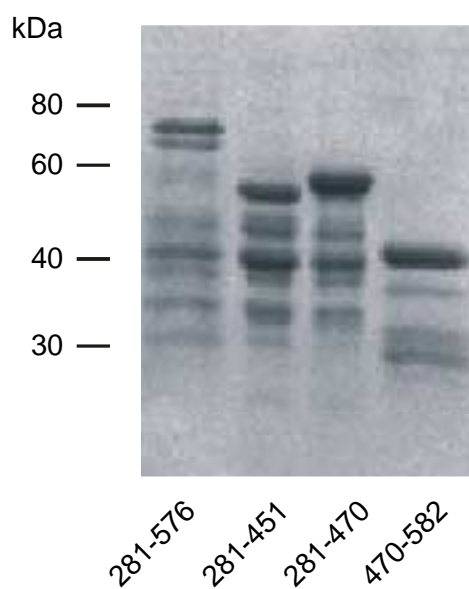


Abb. 3.11: Auftrennung der gereinigten GST-Fusionsproteine rHt31 281-576, 281-451, 281-470 und 470-582 in einer SDS-PAGE (Coomassie Blau-Färbung). Nach Klonierung der PCR-Fragmente in den Vektor pGEX-4T-3 und Transformation der Plasmide in kompetente BL21 *E. coli*-Bakterien wurde die Biosynthese der Fusionsproteine mit IPTG induziert und diese anschließend wie unter 2.2.9.1 beschrieben gereinigt. Die Fusionsproteine (10 µg pro Spur) wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Coomassie Blau-Färbung dargestellt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die 10 kDa Proteinleiter aufgetragen. Die Bezeichnung der Spuren bezieht sich auf die Aminosäuren der Deletionsmutanten von rHt31 (vgl. Tab. 3.4).

Vergleich von errechnetem und apparentem Molekulargewicht der GST-Fusionsproteine und Angabe des Instabilitätsindex der Deletionsmutanten

Deletionsmutante	Aminosäuren	errechnetes MG des Fusionsproteins (kDa)	apparentes MG in einer SDS-PAGE (kDa)	Instabilitätsindex
rHt31 281-451	171	44,2	52	74,4
rHt31 281-470	190	46,4	55	79,3
rHt31 470-582	113	38,8	40	68,8

Tab. 3.4: Die Berechnung des Molekulargewichts (MG) und des Instabilitätsindex erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben. Das errechnete MG der GST-Fusionsproteine setzt sich aus dem errechneten MG der Deletionsmutanten und dem MG der Glutathion-S-Transferase (26 kDa) zusammen. Der Instabilitätsindex bezieht sich nur auf die Deletionsmutanten, nicht auf die Fusionsproteine (vgl. 3.3.2).

Die RII-Bindung der Fusionsproteine rHt31 281-451, rHt31 281-470 und rHt31 470-582 wurde wie unter 3.3.3 beschrieben, im RII-*overlay* untersucht (Abb. 3.12). In der ersten Spur wurde das GST-Fusionsprotein rHt31 281-576 als Positivkontrolle aufgetragen (Abb. 3.12 A). Das in Gegenwart des Kontrollpeptids Ht31-P erhaltene Signal ist spezifisch, da es durch Präinkubation der RII-Untereinheiten mit dem Peptid Ht31 vollständig inhibierbar ist. Das Ergebnis des früheren RII-*overlay* (vgl. Abb. 3.7) wurde bestätigt.

Die GST-Fusionsproteine rHt31 281-451 und rHt31 281-470 zeigen in Gegenwart des Kontrollpeptids Ht31-P ein schwaches Signal (Abb. 3.12 A, Ht31-P). Ob es sich hierbei um eine spezifische Bindung der RII-Untereinheiten handelt, kann aufgrund der geringen Signalintensitäten nicht eindeutig beurteilt werden. In der letzten Spur ist das GST-Fusionsprotein rHt31 470-582 aufgetragen. In Gegenwart des Kontrollpeptids Ht31-P ist ein Signal zu beobachten, welches nach Präinkubation der RII-Untereinheiten mit dem Peptid Ht31 deutlich schwächer wird (Abb. 3.12 A). Daher könnte sich eine zweite RII-Bindungsdomäne in dieser Region befinden (Aminosäuren 470-576). Die unvollständige Inhibition der RII-Bindung nach Präinkubation der RII-Untereinheiten mit dem Peptid Ht31 könnte aus der Struktur dieser Bindungsdomäne, die nicht genau der amphipatischen Helix der klassischen RII-Bindungsdomäne von hHt31 entspricht, resultieren (vgl. Abb. 3.8). Daher ist das Peptid Ht31, welches nach der Sequenz der Bindungsdomäne von hHt31 synthetisiert wurde, möglicherweise nicht in der Lage, die RII-Bindung vollständig zu inhibieren. Der Vergleich der schwächeren Signale der

Fusionsproteine rHt31 281-576 und rHt31 470-582 (Abb. 3.12 A) mit dem starken Signal des Fusionsproteins rHt31 1-313, welches die klassische RII-Bindungsdomäne enthält (Abb. 3.12 B), deutet an, daß die potentiellen Bindungsdomäne(n) im C-Terminus von rHt31 weniger affin ist (sind). Dabei ist bei der Beurteilung der Signalintensitäten zu berücksichtigen, daß bei den erstgenannten Fusionsproteinen die 10fache Proteinmenge aufgetragen und die Signale erst nach längerer Exposition der Membran (10 Tage versus ü. N.) erhalten wurden.

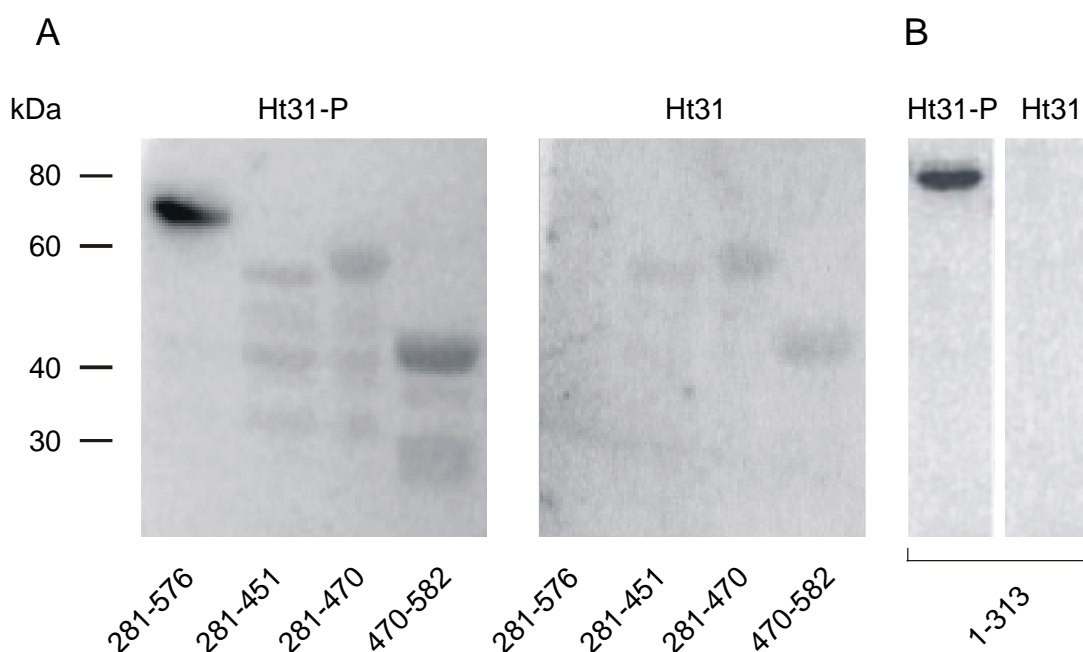


Abb. 3.12: RII-overlay zur Bestimmung der potentiellen RII-Bindungsdomäne im C-Terminus von rHt31. A: RII-overlay mit den GST-Fusionsproteinen rHt31 281-576, 281-451, 281-470 und 470-582, welche die potentiellen RII-Bindungsdomänen im C-Terminus von rHt31 enthalten. B: RII-overlay mit dem GST-Fusionsprotein rHt31 1-313, welches die klassische RII-Bindungsdomäne enthält (vgl. Abb. 3.6). Die GST-Fusionsproteine rHt31 281-576, 281-451, 281-470 und 470-582 (7,5 µg pro Spur) und das Fusionsprotein rHt31 1-313 (0,75 µg pro Spur) wurden nach Auftrennung in einer 12 %igen SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit 32 P-markierten RII-Untereinheiten hybridisiert. Die RII-Untereinheiten wurden zuvor mit dem Kontrollpeptid Ht31-P (10 µM) oder mit dem inhibitorischen Peptid Ht31 (10 µM) 30 min präinkubiert. Die Signale wurden nach Exposition der Membran auf eine Phosphoimagerplatte für 10 Tage (A) bzw. ü. N. (B) erhalten. Die Bezeichnung der Spuren bezieht sich auf die Aminosäuren der Deletionsmutanten.

3.5 Nachweis einer potentiellen RII-Bindungsdomäne in hBrx

Aufgrund der relativ hohen Aminosäureidentität zwischen rHt31 (Aminosäuren 281-576) und hBrx (Aminosäuren 84-378) von 78,2 % wurde die Hypothese aufgestellt, daß hBrx in diesem Sequenzbereich möglicherweise RII-Untereinheiten bindet und es sich bei dem Protein somit auch um ein AKAP handelt. Zur experimentellen Überprüfung dieser Hypothese wurde ein DNA-Fragment aus hBrx amplifiziert (Basenpaare 250-1134), welches den homologen Sequenzabschnitt zur Deletionsmutante rHt31 281-576 enthält (hBrx 84-378). In diesem Fragment sind alle vier potentiellen RII-Bindungsdomänen von rHt31 enthalten (Abb. 3.9).

3.5.1 cDNA-Synthese aus ZR-75-1-RNA und Klonierung eines hBrx-Fragmentes

Für die Amplifikation des DNA-Fragmentes aus hBrx (Basenpaare 250-1134), welches für die Aminosäuren 84-378 von hBrx kodiert, mußte zuerst eine cDNA-Matrize hergestellt werden. Da die cDNA von hBrx aus einer cDNA-Bibliothek der Brustkrebszelllinie ZR-75-1 isoliert wurde (Rubino et al. 1998), wurde Gesamt-RNA dieser Zelllinie gewonnen (s. 2.2.2). Zum Ausschluß von Kontamination mit genomischer DNA wurde ein DNase-Verdau vor der cDNA-Synthese mit dem Primer RT-PCRrev.2 durchgeführt (s. 2.2.3.1 und 2.2.3.2). Die so hergestellte cDNA diente anschließend als Matrize für die PCR. Bei dieser wurde als 5'-Primer der Primer Bx.301fo mit einer *EcoRI*-Schnittstelle am 5'-Ende eingesetzt. Als 3'-Primer konnte der nach der rHt31-Sequenz synthetisierte Primer 4Re.Ht31ende mit einer *XhoI*-Schnittstelle am 5'-Ende verwendet werden, da an dieser Stelle die Abweichung einer Base von der hBrx-Sequenz keine Konsequenzen für die Primerbindung und auch keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz hatte. (Primersequenzen s. 2.1.9.3.4 und 2.1.9.3.3).

Nach Klonierung des amplifizierten DNA-Fragmentes in den Vektor pGEM[®]-T Easy, Transformation kompetenter BL21 *E. coli*-Bakterien und anschließender Plasmid-DNA-Isolierung von ausgewählten Klonen wurden die *inserts* sequenziert. Dabei ergab sich bei allen Sequenzen im Bereich der Basenpaare 595-642 von hBrx eine Abweichung zur publizierten Sequenz in der Datenbank. Die von der publizierten Sequenz von hBrx abweichenden Basenpaare in der hBrx*-Sequenz kodieren für 20 Aminosäuren, von denen nur eine Aminosäure in der publizierten Sequenz von hBrx enthalten ist und 17

Aminosäuren in der homologen rHt31-Sequenz vorkommen. Drei Aminosäuren sind weder in der hBrx noch in der rHt31-Sequenz enthalten (s. 3.13). Dieser Befund deutet darauf hin, daß möglicherweise mehrere Spleißvarianten von hBrx existieren.

hBrx 192-224	AEMNHRSSMRVLGDVVRPPI----HRRSFSLEGLTG
hBrx* 192-228	AEMNHR <u>SMSWCPSGVQYSA</u> GL SADFN Y RSFSLEGLTG
rHt31 389-425	AEMNQRSMSWCPSGVQYSAALNADFNIRSFLEGLTG

Abb. 3.13: Alignment des neuen Sequenzabschnittes von hBrx* (Aminosäuren 192-228 von hBrx*) mit der publizierten Sequenz von hBrx in der Datenbank (Aminosäuren 192-224) und der rHt31-Sequenz (Aminosäuren 389-425). Der von der publizierten Sequenz von hBrx abweichende Sequenzbereich von hBrx* ist unterstrichen. Von den 20 Aminosäuren ist nur V²⁰⁶ in der publizierten Sequenz von hBrx enthalten. Die Aminosäuren 199-210, 214-217 und L²¹² in hBrx* sind in der homologen rHt31-Sequenz vorhanden. Die Aminosäuren G²¹¹, S²¹³ und Y²¹⁸ (fett hervorgehoben) sind weder in der hBrx noch in der rHt31-Sequenz enthalten.

3.5.2 Expression der Deletionsmutante hBrx 84-378 als GST-Fusionsprotein und RII-overlay

Das DNA-Fragment (hBrx 84-378) wurde wie unter 3.3.1 beschrieben in den Vektor pGEX-4T-3 kloniert und nach Transformation der Plasmide in kompetente BL21 *E. coli*-Bakterien als GST-Fusionsprotein exprimiert. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte wie unter 2.2.9.1 beschrieben. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Fusionsproteins in einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blaufärbung des Gels wurde deutlich, daß auch dieses Protein während der Reinigung einer starken Degradation unterliegt (Abb. 3.14 A). Ebenso wird eine Abweichung des apparenten Molekulargewichts in einer SDS-PAGE (70 kDa mit GST) vom errechneten Molekulargewicht (59,3 kDa mit GST) beobachtet. Der Instabilitätsindex beträgt 73,7 (vgl. 3.3.2). Das Fusionsprotein wurde anschließend im RII-overlay auf eine RII-Bindung untersucht (Abb. 3.14 B). Als Positivkontrolle im Experiment diente das GST-Fusionsprotein rHt31 1-313, welches die klassische RII-Bindungsdomäne (Aminosäuren 65-78) enthält (Abb. 3.14 C).

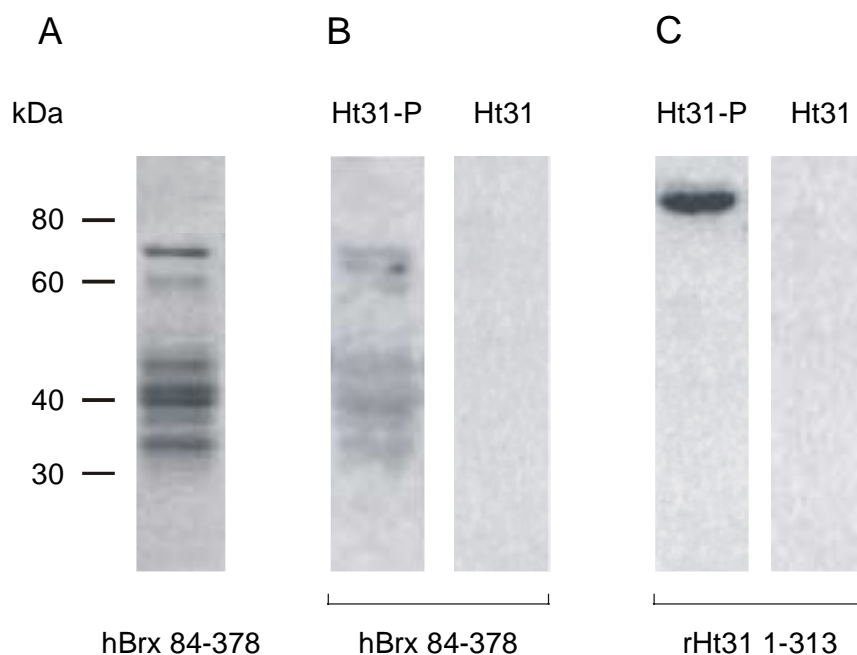


Abb. 3.14: Nachweis einer potentiellen RII-Bindungsdomäne in hBrx. A: Nach der Klonierung des cDNA-Fragmentes hBrx 84-378 in den Vektor pGEX-4T-3 und Transformation des Plasmids in kompetente BL21 *E. coli*-Bakterien wurde die Biosynthese des Fusionsproteins mit IPTG induziert und dieses anschließend wie unter 2.2.9.1 beschrieben gereinigt. Das Fusionsprotein (5 μ g) wurde in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Coomassie Blau-Färbung dargestellt. B und C: RII-*overlay* mit den Fusionsproteinen hBrx 84-378 (B) und rHt31 1-313 (enthält die klassische RII-Bindungsdomäne (Aminosäuren 65-78)) (C). Die Fusionsproteine hBrx 84-378 (7,5 μ g pro Spur) und rHt31 1-313 (0,75 μ g pro Spur) wurden nach Auftrennung in einer 12 %igen SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit 32 P-markierten RII-Untereinheiten hybridisiert. Die RII-Untereinheiten wurden zuvor mit dem Kontrollpeptid Ht31-P (10 μ M) oder mit dem inhibitorischen Peptid Ht31 (10 μ M) 30 min präinkubiert. Die Signale wurden nach Exposition der Membran für 10 Tage (B) bzw. ü. N. (C) auf eine Phosphoimagerplatte erhalten.

Nach der Auftrennung des gereinigten GST-Fusionsproteins hBrx 84-378 in einer SDS-PAGE sind im Gel diverse Spaltprodukte zu sehen (Abb. 3.14 A), die auch im RII-*overlay* in Gegenwart des Kontrollpeptids Ht31-P teilweise die RII-Untereinheiten binden (Abb. 3.14 B, Ht31-P). Die detektierten Signale werden nach Präinkubation der RII-Untereinheiten mit dem Peptid Ht31 vollständig inhibiert (Abb. 3.14 B, Ht31). Daher könnte sich eine RII-Bindungsdomäne im Bereich der Aminosäuren hBrx 84-378 befinden, die eine ähnliche geringe Affinität zu den RII-Untereinheiten der PKA aufweist wie die „atypische“ RII-Bindungsdomäne von rHt31 (Aminosäuren 470-576).

3.6 Herstellung von hBrx-Deletionsmutanten für Strukturanalysen

Das Protein hBrx bindet an den Estrogenrezeptor, einen Transkriptionsfaktor, moduliert dessen Aktivität und transloziert mit ihm in den Kern (Rubino et al. 1998). Bei der Sequenzanalyse von hBrx wurden Homologien zu einigen der bisher bekannten Zinkfinger motive, welche eine DNA-Bindung vermitteln, festgestellt. Es könnte sich also möglicherweise bei hBrx und auch bei hHt31 und rHt31 um DNA-bindende Proteine handeln. Im N-terminalen Sequenzabschnitt (Aminosäuren 1-86) finden sich 5 Cysteine und ein Histidin, welche potentiell an der Ausbildung eines Zinkfinger motives beteiligt sein könnten (C¹⁰, C¹⁵, C³⁰, C⁴², H⁶¹ und C⁸², Abb. 3.15, A). Ein zweites Zinkfinger motiv könnte im Bereich der Aminosäuren 274-322 vorhanden sein (H²⁷⁴, C²⁸², H²⁸³, C²⁹³, H³¹² und H³²², Abb. 3.15, B). Alle Cysteine bzw. Histidine sind bis auf H²⁸³ in der hHt31- und rHt31-Sequenz vorhanden, sie scheinen also konserviert zu sein.

A

rHt31	206-257	W <u>C</u> AIEP <u>C</u> PEAASLLASKQSSE <u>C</u> RSFIDVGLGTE <u>C</u> ATKEGVLQRESGSDSDL
hBrx	9-60	W <u>C</u> TIEP <u>C</u> PDAAASLLASKQSPE <u>C</u> ENFLDVGLGRE <u>C</u> TSKQGVLKRESGSDSDL
rHt31	258-280	F <u>H</u> SPSDEMDSIIFSKPEEEQLL <u>C</u> D
hBrx	61-83	F <u>H</u> SPSDDMDSIIFPKPEEEHL <u>C</u> D

B

rHt31	474-524	Q <u>H</u> HRMFDQQT <u>C</u> YRSKQQGFNY <u>C</u> TSAISSPLTKSISLMTIS <u>H</u> PGLDNSRPF <u>H</u>
hBrx	273-322	E <u>H</u> -RMFDQQI <u>C</u> HRSKQQGFNY <u>C</u> TSAISSPLTKSISLMTIS <u>H</u> PGLDNSRPF <u>H</u>

Abb. 3.15: Darstellung von zwei potentiellen Zinkfinger motiven in der Sequenz von rHt31 und hBrx. A: Zinkfinger motiv im Bereich der Aminosäuren rHt31 206-280 und hBrx 9-83. B: Zinkfinger motiv im Bereich der Aminosäuren rHt31 474-524 und hBrx 273-322. Die potentiell beteiligten Aminosäuren sind fett hervorgehoben und unterstrichen. Da hHt31 und hBrx in diesen Bereichen identisch sind, wurde die hHt31-Sequenz (Aminosäuren hHt31 640-714 und 904-953) nicht mit aufgeführt.

Für die Untersuchung der Raumstruktur des N-Terminus von hBrx wurden GST-Fusionsproteine hergestellt. Dazu wurden zwei cDNA-Fragmente amplifiziert (Basenpaare 1-228 und 1-258), die für die Aminosäuren 1-76 und 1-86 von hBrx kodieren (schematische Darstellung s. Abb. 3.9). Die PCR-Produkte wurden in den Vektor

pGEX-4T-3 kloniert und nach Transformation der Plasmide in kompetente BL21 *E. coli*-Bakterien als GST-Fusionsproteine exprimiert. Die in der PCR eingesetzten Primer und die Länge der DNA-Fragmente sind in Tab. 3.5 aufgeführt, die Sequenzen der Primer sind unter 2.1.9.3.3 angegeben.

Primer für die Herstellung von zwei Deletionsmutanten für Strukturanalysen des N-Terminus von hBrx

Deletionsmutante	5'-Primer	3'-Primer	Fragmentgröße (bp)
hBrx 1-76	Bxzn.fo.1	Bxzn.rev.1	228
hBrx 1-86	Bxzn.fo.1	Bxzn.rev.2	258

Tab. 3.5: Neben den Primern für die Amplifikation von zwei DNA-Fragmenten aus hBrx (Basenpaare 1-228 und 1-258), welche für Aminosäuren 1-76 und 1-86 kodieren, sind die Fragmentgrößen der Amplifikate in bp angegeben.

Molekulargewicht der GST-Fusionsproteine und der Deletionsmutanten hBrx 1-76 und 1-86 nach Abspaltung des GST

Deletionsmutante	Aminosäuren	errechnetes MG des Fusionsproteins (kDa)	errechnetes MG der Deletionsmutante(kDa)
hBrx 1-76	76	34,5	8,5
hBrx 1-86	86	35,5	9,5

Tab. 3.6: In der Tabelle ist das Molekulargewicht der GST-Fusionsproteine und der Deletionsmutanten hBrx 1-76 und 1-86 nach Abspaltung des GST angegeben (vgl. Abb. 3.16).

Da die Unterschiede zwischen Ratten- und humaner Sequenz für die Strukturanalyse von untergeordneter Bedeutung sind, wurde für die Untersuchung des zweiten Zinkfingermotivs (Aminosäuren 274-322) das Fusionsprotein der Deletionsmutante rHt31 470-582 (vgl. 3.5) verwendet. Für die Strukturanalysen mittels der NMR-Technik wurde die Glutathion-S-Transferase von den Fusionsproteinen mit der Protease Thrombin abgespalten. In Abb. 3.16 wurden die GST-Fusionsproteine hBrx 1-76 und 1-86 vor und nach Thrombinspaltung in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden anschließend durch eine Coomassie Blau-Färbung des Gels dargestellt. Sowohl die Fusionsproteine als auch die Deletionsmutanten nach Abspaltung des GST migrierten in der SDS-PAGE langsamer als es ihr errechnetes Molekulargewicht

erwarten ließ (Abb. 3.16). Eine Coomassie Blau-Färbung des Fusionsproteins rHt31 470-582 wurde bereits in Abb. 3.11 gezeigt. Die NMR-Strukturanalysen werden am FMP durchgeführt und sind z. Z. noch nicht abgeschlossen.

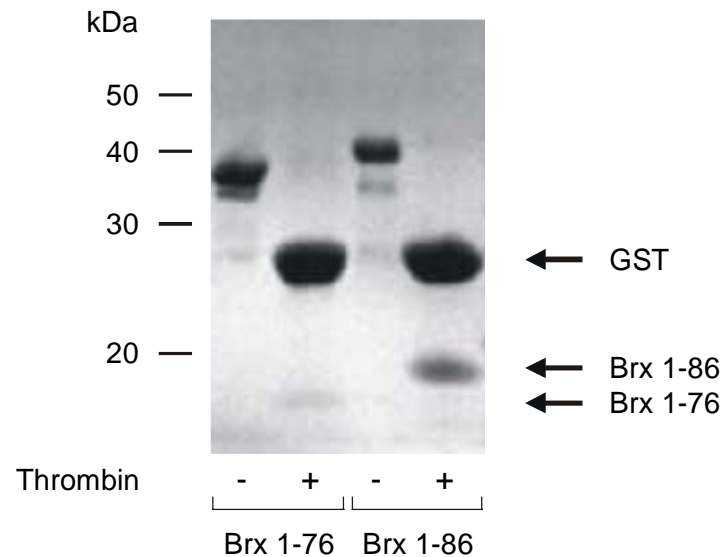


Abb. 3.16: Coomassie Blau-Färbung der GST-Fusionsproteine hBrx 1-76 und 1-86. Die Fusionsproteine (5 µg pro Spur) wurden vor und nach Abspaltung der Glutathion-S-Transferase (GST) mit Thrombin in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden durch eine Coomassie Blau-Färbung dargestellt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die 10 kDa Proteinleiter aufgetragen.

3.7 Expressions-Screening einer Rattennieren-cDNA-Bibliothek mit rHt31

Da es sich bei dem Klon 2.1 (rHt31), welcher beim *Screening* einer Rattennieren-cDNA-Bibliothek isoliert wurde, um einen Partialklon handelt (vgl. 3.1), wurde unter der Zielstellung der Isolierung eines vollständigen Klons ein erneutes Expressions-*Screening* dieser Bibliothek mit dem *insert* von Klon 2.1 durchgeführt. Da das *insert* von Klon 2.1 mit einer Länge von 1747 bp deutlich kürzer ist als die mit diesem DNA-Fragment als Sonde im Northern Blot detektierten mRNAs (9 kb und größer 9,5 kb, vgl. 3.2), fehlen vermutlich mehr als 7500 bp in der Sequenz.

Das *Screening* wurde wie unter 2.2.8 beschrieben durchgeführt. Als Sonde wurde das radioaktiv markierte rHt31-cDNA-Fragment (1-1747 bp) verwendet, welches bereits im Northern Blot eingesetzt wurde (vgl. 3.2). Bei dem primären *Screening* wurden bei einer Verdünnung der λ -Phagen von 1/7500 ca. 5000 Klone pro Agarplatte und 40 Platten, insgesamt also ca. 2×10^5 Klone untersucht. Es konnten 26 positive Klone identifiziert werden, mit denen anschließend ein sekundäres *Screening* durchgeführt wurde. Die eingesetzte Verdünnung der Phagensuspension betrug dabei 1/750. Es wuchsen ca. 300 Plaques pro Agarplatte. Von den nach dem sekundären *Screening* erhaltenen positiven Phagenplaques wurden vier pro Agarplatte ausgestochen. Die pBluescript-Plasmide, die die cDNA-*inserts* enthielten, wurden aus dem Vektor Uni-ZAP[®]XR *in vivo* exzisiert. Anschließend wurden die Plasmide in einer Plasmid-Mini-präparation isoliert. Die Größen der *inserts* wurden durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XhoI* und anschließender TAE-Agarosegelelektrophorese bestimmt. Alle *inserts* der 26 positiven Klone wurden mit den vektorspezifischen Primern T3 (5'-Primer) und T7 (3'-Primer) sequenziert und die Sequenzen anschließend in den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* und des *BCM Search Launcher* (vgl. 3.1) auf das Vorhandensein von Homologien zu anderen Sequenzen überprüft. Nur die Sequenz eines *inserts* zeigte eine Homologie zu der eingesetzten cDNA-Sonde. In Abb. 3.17 sind die Ergebnisse des primären und sekundären *Screening* dieses Klons, der im weiteren mit 3.1 bezeichnet wird, als Autoradiographien dargestellt. In Abb. 3.18 ist der Klon 3.1 nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XhoI* und Auftrennung in einem TAE-Agarosegel dargestellt.

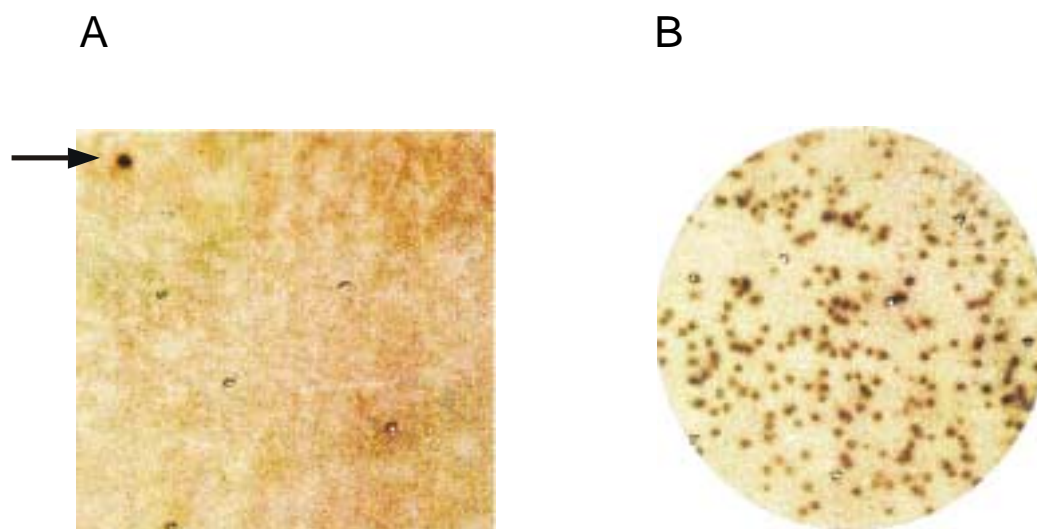


Abb. 3.17: Expressions-Screening einer Rattennieren-cDNA-Bibliothek mit dem ^{32}P -dCTP markierten *insert* von Klon 2.1 (rHt31, 1747 bp). Darstellung der Autoradiographien des Klons 3.1 nach dem primären und sekundären *Screening*. Die Durchführung des *Screening* ist unter 2.2.8 beschrieben. Die Nitrozellulosefilter wurden nach der Hybridisierung 2 Tage auf einen Röntgenfilm exponiert A: Primäres *Screening*. Die dem positiven Signal in der linken oberen Ecke (s. Pfeil) zugehörigen Phagenplaques wurden ausgestochen und in einem sekundären *Screening* weiter untersucht. B: Positive Signale nach dem sekundären *Screening* des positiven Plaques von A (Klon 3.1).

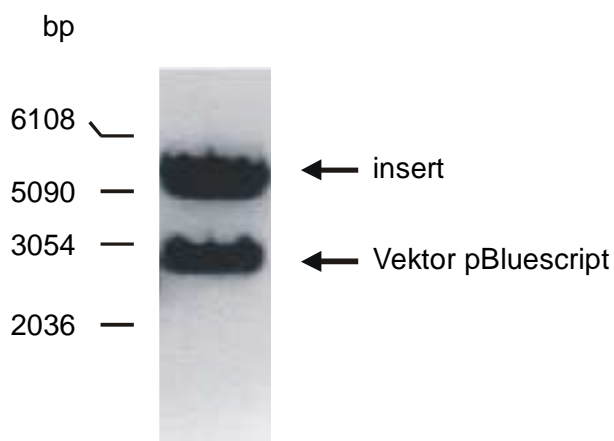


Abb. 3.18: Restriktionsverdau des Klons 3.1 und Bestimmung der Größe des *inserts* in einer TAE-Agarosegelelektrophorese. Das *insert* von Klon 3.1 wurde mit *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pBluescript (2961 bp) herausgeschnitten. Das DNA-Fragment wurde in einem 1 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Größe des *inserts* im Gel beträgt ca. 5400 bp. Als Molekulargewichtsstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter aufgetragen.

3.7.1 Sequenzanalyse des *inserts* von Klon 3.1

Jeder Strang des *inserts* von Klon 3.1 wurde, wie unter Punkt 3.1 für das *insert* von Klon 2.1 beschrieben, zweimal sequenziert. Die dafür notwendige DNA-Menge wurde durch eine Plasmid-Midipräparation gewonnen. Die Primer wurden wie unter 3.1 beschrieben gelegt. Die Sequenzen der Primer sind unter 2.1.5.3.2 aufgeführt. Jede neue Sequenz wurde durch Wiederholung der Sequenzierung bestätigt und mit der komplementären Sequenz des Gegenstranges verglichen. Die einzelnen Sequenzen wurden anhand der Überlappungen zusammengefügt. Die vollständige Sequenz ist im Anhang aufgeführt.

Das *insert* von Klon 3.1 ist 5439 bp lang (Abb. 3.18) und besitzt keinen durchgehenden Leserahmen. In der Sequenz gibt es zwei dem rHt31 homologe Sequenzabschnitte. Die Basenpaare 1883-1958 von Klon 3.1 sind mit den Basenpaaren 602-677 von rHt31 (602-677 bp) identisch. Eine weitere Übereinstimmung beider Klone findet sich in den Sequenzabschnitten Klon 3.1 (4894-5030 bp) und rHt31 (678-814 bp). Intron/Exon-Analysen der Sequenz mit den Programmen des *BCM Search Launcher* ergaben für die Nukleotidsequenzen (1883-1958 bp) und (4894-5030 bp) von Klon 3.1 Exonvorhersagen. Die bei Vertebraten benutzten Konsensussequenzen zum RNA-Spleißen sind sowohl an der Spleiß-Donatorstelle am 5'-Ende (AGGTAAGT) als auch an der Spleiß-Akzeptorstelle am 3'-Ende (10 xT/C-N-CAG, wobei N jede beliebige Base ist) bei beiden Introns vorhanden (Tab. 3.7).

Sequenzen der Intron/Exon-Übergänge von zwei für rHt31 kodierende Exons des *inserts* von Klon 3.1

Exon und bp im Klon 3.1	Bp in der rHt31-cDNA	5'-Intronsequenz	Exonsequenz	3'-Intronsequenz
I (1883-1958)	602-677	TGTCTTCCAG	ATCAACCGAG.....CAGAGCTCAG	GTATGCATGT
II (4894-5030)	678-814	TCTTTTTCAG	AATGCAGAAG.....CTTCTCAAAG	GTATTGGATG

Tab. 3.7: Die beiden Exons des *inserts* von Klon 3.1, die für zwei Sequenzbereiche in der rHt31-cDNA-Sequenz (Klon 2.1) kodieren, sind mit römischen Ziffern bezeichnet. Die Basenpaare an Konsensuspositionen der Spleißdonator- und -Akzeptorstellen sind fett hervorgehoben.

Die beiden Exons kodieren somit für 71 Aminosäuren, die identisch mit den Aminosäuren 201-271 von rHt31 sind (Abb. 3.19). Diese Daten deuten darauf hin, daß es sich bei Klon 3.1 entweder um einen genomischen Klon mit zwei Exons, flankiert von Introns, um eine unvollständig gespleißte mRNA oder um ein transkribiertes Pseudogen handelt. Interessanterweise beginnt mit dem ersten Exon auch die Homologie zwischen rHt31, hHt31 und hBrx.

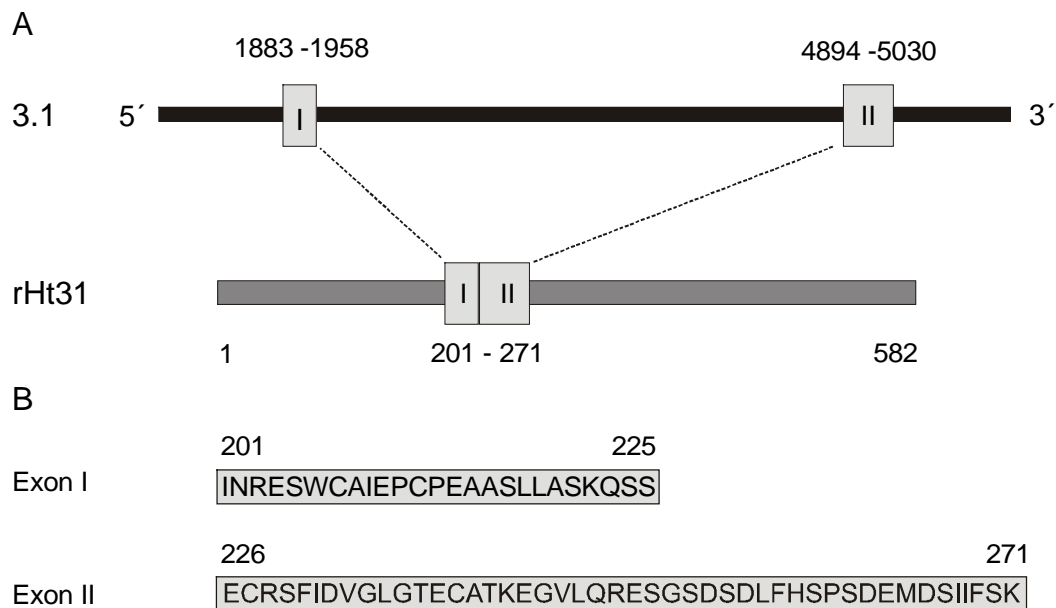


Abb. 3.19: Schematische Darstellung der beiden für rHt31 kodierenden Exons (I und II) in der Sequenz des *inserts* von Klon 3.1. A: Exonposition in der Nukleotidsequenz des *inserts* von Klon 3.1 und in der Aminosäuresequenz von rHt31. Die beiden Exons sind mit römischen Ziffern bezeichnet. Exon I (Klon 3.1, 1883-1958 bp), Exon II (Klon 3.1, 4894-5030 bp). B: Aminosäuren, die von Exon I und II kodiert werden. Die Zahlen beziehen sich auf die Position der Aminosäuren in der rHt31-Sequenz. Exon I kodiert für die Aminosäuren 201-225, Exon II für die Aminosäuren 226-271 in rHt31.

3.8 Untersuchung der zell- und gewebespezifischen Expression von rHt31, hHt31 und hBrx

Zur Untersuchung der zell- und gewebespezifischen Expression von rHt31, hHt31 und hBrx wurde ein polyklonales Antiserum durch Immunisierung von Kaninchen mit einem synthetischen Peptid (Peptid 1965), welches einer Sequenz von rHt31 entspricht (Aminosäuren 369-383), gewonnen. Diese Peptidsequenz ist identisch mit den Aminosäuren 803-817 von hHt31 und Aminosäuren 172-186 von hBrx (vgl. Abb. 3.2).

3.8.1 Charakterisierung des gegen rHt31/hHt31 und hBrx gerichteten affinitäts-gereinigten Antikörpers 1965

Vor Beginn der Untersuchungen zur Proteinexpression von rHt31 und hHt31 wurde das Antiserum 1965 über eine mit dem Peptid 1965 gekoppelte Thiopropyl-Sepharose 6B-Säule affinitätsgereinigt (s. 2.2.10). In dieser Arbeit wurde nur der affinitätsgereinigte Antikörper (1965) eingesetzt.

In einem Western Blot mit den GST-Fusionsproteinen rHt31 281-576 (Abb. 3.20 A) und rHt31 1-313 (Abb. 3.20 B) wurde die Spezifität des Antikörpers getestet. Nur das Fusionsprotein rHt31 281-576 enthält das Epitop des Antikörpers (Aminosäuren 369-383). Neben den gereinigten Fusionsproteinen wurden auch die Proteine aus Bakterien-suspensionen vor und nach Induktion mit IPTG in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran der Immundetektion mit dem Antikörper 1965 und einem POD-konjugierten Sekundärantikörper unterzogen (s. 2.2.9.4.4). Als Negativkontrolle wurde die Immundetektion mit dem vom gleichen Tier stammenden Präimmunserum des Antikörpers 1965 durchgeführt. Die immunreaktiven Banden wurden mittels Chemilumineszenz am *Lumi-Imager F1* detektiert (Abb. 3.20).

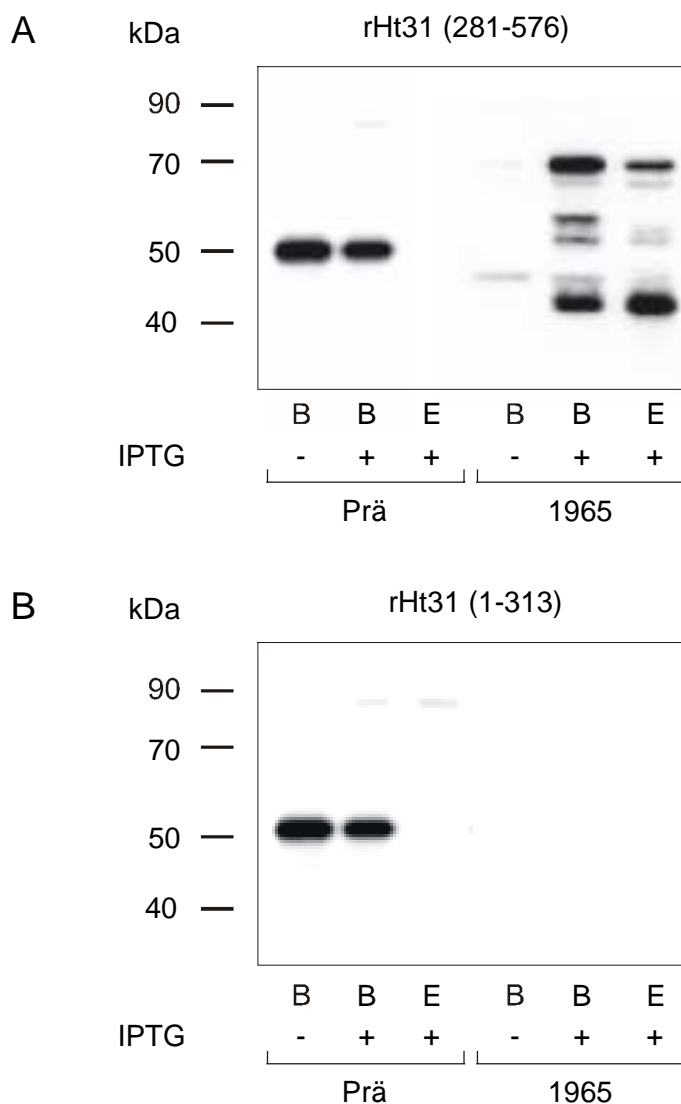


Abb. 3.20: Untersuchung der Spezifität des affinitätsgereinigten Antikörpers 1965 an zwei GST-Fusionsproteinen. A: Immunoblot mit dem GST-Fusionsprotein rHt31 281-576, welches das vom Antikörper 1965 erkannte Epitop (Aminosäuren 369-383 von rHt31) enthält. B: Immunoblot mit dem GST-Fusionsprotein rHt31 1-313, welches dieses Epitop nicht enthält. Proteine aus Bakteriensuspensionen vor (B -) und nach (B +) Induktion der Biosynthese der Fusionsproteine mit IPTG (30 μ l pro Spur) und gereinigte Fusionsproteine (E, 1 μ g pro Spur) wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und nacheinander mit dem Präimmunsereum des Antikörpers 1965 (Prä, 1:1000) oder dem affinitätsgereinigten Antikörper 1965 (1965, 1:5000) und einem Meerrettichperoxidase (POD)-konjugierten Esel-anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert (1:1500). Die Signale wurden durch *enhanced chemiluminescence* (ECL) am *Lumi-Imager F1* detektiert. Bezeichnung der Spuren: B: Bakteriensuspension, E: Eluat (gereinigtes Fusionsprotein).

Das Präimmunserum (Prä) erkennt in den Bakteriensuspensionen beider Deletionsmutanten vor und nach Induktion der Biosynthese der Fusionsproteine mit IPTG eine ca. 50 kDa große Bande (Abb. 3.20 A und B, Spuren B – und B +), jedoch nicht die gereinigten Fusionsproteine (Abb. 3.20 A und B, Spur E). Der Antikörper 1965 detektiert in der Spur der induzierten Bakteriensuspension sowie in der des gereinigten Fusionsproteins der Deletionsmutante rHt31 281-576, welches das Epitop enthält, mehrere Banden. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um kürzere Spaltprodukte des Fusionsproteins rHt31 281-576 (Abb. 3.20 A, Spuren B + und E). Das obere Signal bei ca. 70 kDa entspricht der obersten Bande des Fusionsproteins in einem Coomassie Blau-gefärbten Gel und wahrscheinlich dem intakten Fusionsprotein (vgl. 3.3.2). Das Fusionsprotein rHt31 1-313, welches das Epitop des Antikörpers nicht enthält, wird vom Antikörper 1965 nicht erkannt (Abb. 3.20 B, Spur E).

3.8.2 Detektion von immunreaktiven Proteinen in zwei Brustkrebszelllinien

3.8.2.1 Detektion von immunreaktiven Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 170-300 kDa in ZR-75-1- und MCF-7-Zellen

Da das Epitop des Antikörpers 1965 nicht nur in rHt31 sondern auch in hHt31 (Aminosäuren 803-817) und hBrx (Aminosäuren 172-186) enthalten ist, sollten mit diesem Antikörper beide Proteine in subzellulären Fraktionen humaner Zelllinien detektiert werden. Die Expression von hBrx im humanen Brustdrüsengewebe und in der Brustkrebszelllinie ZR-75-1 ist bekannt (Rubino et al. 1998). Das Protein hat ein Molekulargewicht von 170 kDa und kommt sowohl im Zytosol als auch im Zellkern vor. ZR-75-1-Zellen wurden daher als Positivkontrolle zur Detektion von hBrx eingesetzt. Desweiteren wurde die Expression von hBrx in einer zweiten Brustkrebszelllinie (MCF-7) untersucht.

Nukleäre, lösliche und partikuläre Fraktionen beider Zelllinien wurden wie unter 2.2.11.1 und 2.2.11.2 beschrieben hergestellt und die Expression von hBrx in einem Immunoblot mit dem Antikörper 1965 untersucht. Die Proteine dieser Zellfraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels *Semi-dry-Transfer* auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Immundetektion mit dem Antikörper 1965 und einem Peroxidase (POD)-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper erfolgte

wie unter 2.2.9.4.4 angegeben (Abb. 3.21 A). Zur Beurteilung der Spezifität der detektierten Banden wurde in diesem wie auch in allen weiteren Versuchen der Antikörper in einem zweiten Immunoblot mit dem Peptid 1965, gegen das immunisiert wurde (Aminosäurereste 369-383 von rHt31), präinkubiert und erst anschließend im Experiment eingesetzt (Abb. 3.21 B).

In allen Zellfraktionen wurden bei ca. 170-180 kDa immunreaktive Proteine detektiert, wobei die Größe der Banden in den einzelnen Fraktionen unterschiedlich ist. Die Intensität dieser Banden ist in allen Zellfraktionen der ZR-75-1-Zellen stärker als in den Zellfraktionen der MCF-7-Zellen (Abb. 3.21 A). In den nukleären Fraktionen (N) wurde eine schmale ca. 175 kDa große Bande und in den löslichen Fraktionen (L) eine breite ca. 175-180 kDa große Bande detektiert. Die stärkste Bande ist bei beiden Zelllinien in der partikulären Fraktion (P) bei ca. 170 kDa zu beobachten. Desweiteren wurde ebenfalls in allen Zellfraktionen beider Zelllinien ein Protein mit einem Molekulargewicht deutlich größer als 205 kDa detektiert. Die Bande, wahrscheinlich 300-400 kDa groß, ist in den löslichen und nukleären Fraktionen etwas stärker als in den partikulären Fraktionen vorhanden. Dieses Protein scheint in den MCF-7-Zellen stärker exprimiert zu werden als in den ZR-75-1-Zellen. Zwischen diesem sehr großen Protein und der 205 kDa-Markerbande wurde von dem Antikörper in der löslichen Fraktion der ZR-75-1-Zellen und sowohl in der löslichen als auch schwächer in der partikulären Fraktion der MCF-7-Zellen eine Bande detektiert. Die Kontrolle zeigt, daß die hier beschriebenen Banden spezifisch sind (Abb. 3.21 B).

Zusammenfassend zeigt dieser Immunoblot, daß der Antikörper 1965 in ZR-75-1- und MCF-7-Zellen in allen Fraktionen spezifisch mehrere Proteine mit einer Größe von ca. 170-180 kDa detektiert, die hBrx entsprechen könnten. Bei den anderen detektierten Proteinen handelt es sich möglicherweise um hHt31 und Spleißvarianten von hHt31 und/oder hBrx. Da die cDNA von hHt31 nur partiell kloniert wurde, ist die Größe des Proteins bisher unbekannt. Im Northern Blot wurden mit einer rHt31-spezifischen cDNA-Sonde zwei mRNAs in der Größenordnung von ca. 9-11 kb detektiert (vgl. 3.2), die für ca. 300-400 kDa große Proteine kodieren könnten.

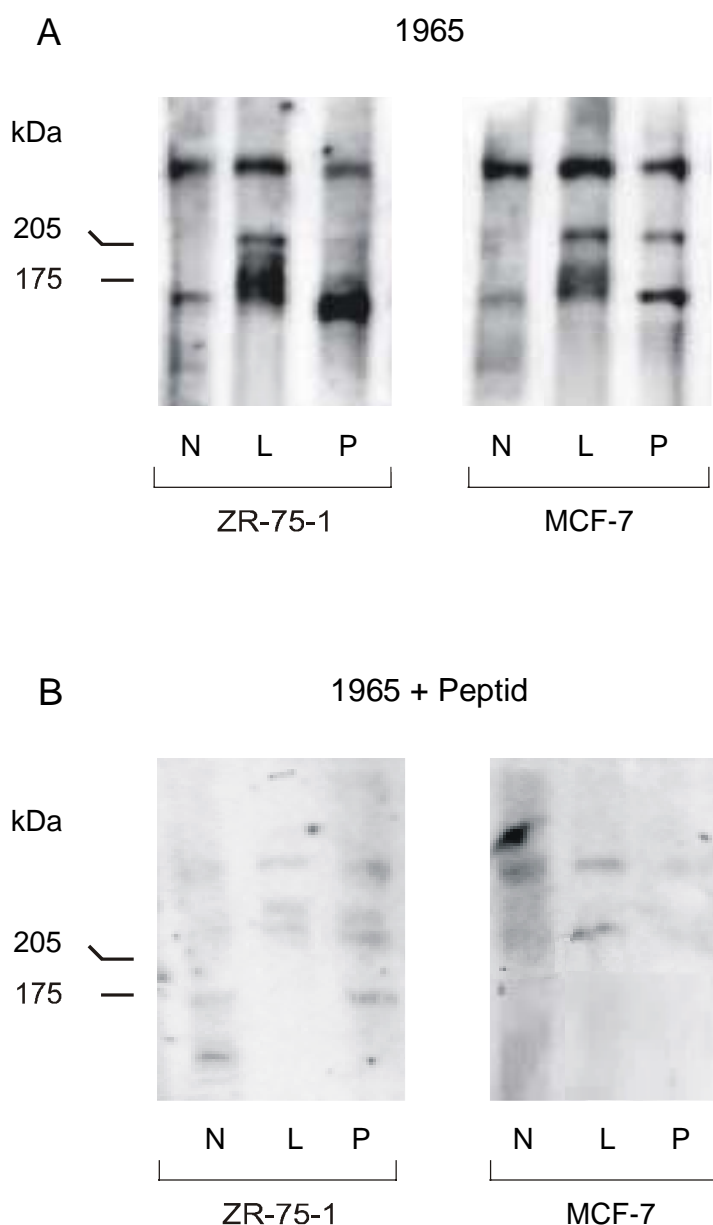


Abb. 3.21: Detektion von immunreaktiven Proteinen in verschiedenen subzellulären Fraktionen von ZR-75-1- und MCF-7-Zellen mit dem gegen ein Epitop in der Sequenz von rHt31, hHt31 und hBrx gerichteten Antikörper 1965. A: Proteine aus nukleärer (N), löslicher (L) und partikulärer (P) Fraktion (60 µg pro Spur) wurden in einer 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem Antikörper 1965 (1:500) inkubiert. B: Zur Kontrolle wurde in einem zweiten Immunoblot der Antikörper 1965 (1:500) mit dem Peptid 1965 1 h in Blotto präinkubiert und anschließend im Versuch eingesetzt (1965 + Peptid). Die Konzentration des Peptids betrug 0,02 µg/µl (dies entspricht einem 1000fachen molaren Überschuß gegenüber dem Antikörper). Die Signale wurden durch ECL mit einem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (1:1500) detektiert. Als Molekulargewichtsstandard wurden die *high molecular weight* (SIGMA) und die *prestained* Proteinleiter, *broad range* (NEB) aufgetragen.

3.8.2.2 Detektion von immunreaktiven Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 35-120 kDa in MCF-7- und ZR-75-1-Zellen

Neben den unter 3.8.2.1 beschriebenen Proteinen wurden durch den Antikörper 1965 weitere immunreaktive Proteine in verschiedenen subzellulären Fraktionen von MCF-7- und ZR-75-1-Zellen detektiert. Proteine der nukleären, löslichen und partikulären Fraktion dieser Zellen wurden in einem höherprozentigen Polyacrylamidgel (10 %) aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit dem Antikörper 1965 und einem POD-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Kontrolle zur Überprüfung der Spezifität der detektierten Banden wurde wie unter 3.8.2.1 beschrieben mit dem Antikörper 1965 nach Präinkubation mit dem Peptid 1965 durchgeführt (vgl. Abb. 3.21). Die Detektion der Banden erfolgte wie unter 3.8.2.1 beschrieben (Abb. 3.22).

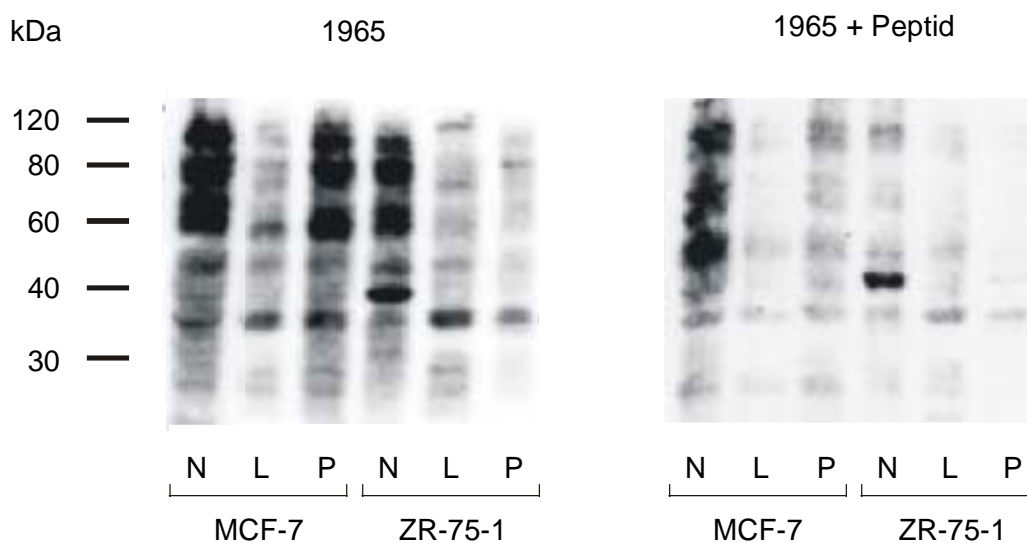


Abb. 3.22: Detektion von immunreaktiven Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 35-120 kDa in verschiedenen subzellulären Fraktionen von MCF-7- und ZR-75-1-Zellen mit dem gegen ein Epitop von rHt31, hHt31 und hBrx gerichteten Antikörper 1965. Proteine der nukleären (N), löslichen (L) und partikulären Fraktion (P) (45 µg pro Spur) wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem Antikörper 1965 (1:500) oder mit dem, mit Peptid 1965 präinkubierten Antikörper (1965 + Peptid, vgl. Abb. 3.21) inkubiert. Die Signale wurden durch ECL mit einem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (1:1500) detektiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde die 10 kDa Proteinleiter aufgetragen.

In allen Fraktionen beider Zelllinien wurde eine ca. 35 kDa große immunreaktive Bande detektiert. Die Intensität dieser Bande ist in den löslichen (L) und partikulären Fraktionen (P) stärker als in den nukleären Fraktionen (N) (Abb. 3.22, 1965). Desweiteren wurden bei beiden Zelllinien in der nukleären Fraktion (N) und in der partikulären Fraktion (P) der MCF-7-Zellen mehrere Banden im Molekulargewichtsbereich von ca. 60 kDa bis größer 120 kDa detektiert (Abb. 3.22, 1965). Die Kontrolle mit dem präinkubierten Antikörper 1965 (nach Inkubation mit dem Peptid 1965) bestätigt die Spezifität der beschriebenen Banden, nur die ca. 40 kDa-Bande in der nukleären Fraktion (N) der ZR-75-1-Zellen ist unspezifisch (Abb. 3.22, 1965 + Peptid). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß der Antikörper 1965 nicht nur im hochmolekularen Bereich bei ca. 170 kDa sondern auch im Molekulargewichtsbereich von ca. 35 kDa bis größer 120 kDa Proteine detektiert. Es könnte sich bei diesen Proteinen sowohl um Spleißvarianten von hHt31 und/oder hBrx oder proteolytische Abbauprodukte dieser Proteine handeln.

3.8.3 Detektion von immunreaktiven Proteinen mit dem Antikörper 1965 in verschiedenen Nierenzelllinien (COS.M6, HEK293 und IMCD-Zellen)

Da rHt31 aus einer Nieren-cDNA-Bibliothek isoliert wurde, sollte die Expression dieses Proteins in verschiedenen Nierenzelllinien untersucht werden. Es wurden partikuläre und lösliche Fraktionen von COS.M6 (Affennierenzellen) und HEK293 (humane embryonale Nierenzellen) sowie Homogenat (partikuläre und lösliche Fraktion) von IMCD-Zellen (Primärkultur von Sammelrohrzellen aus der inneren Medulla der Rattenniere; Maric et al. 1998) hergestellt (s. 2.2.11.1) und in einem Immunoblot mit dem Antikörper 1965 untersucht (Abb. 3.22). Als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidase (POD)-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper verwendet (Abb. 3.23, vgl. 3.8.2). Zur Beurteilung der Spezifität der detektierten Banden wurde der Antikörper 1965 mit dem Peptid 1965, gegen das immunisiert wurde (Aminosäurereste 369-383 von rHt31), präinkubiert (Abb. 3.23, 1965 + Peptid).

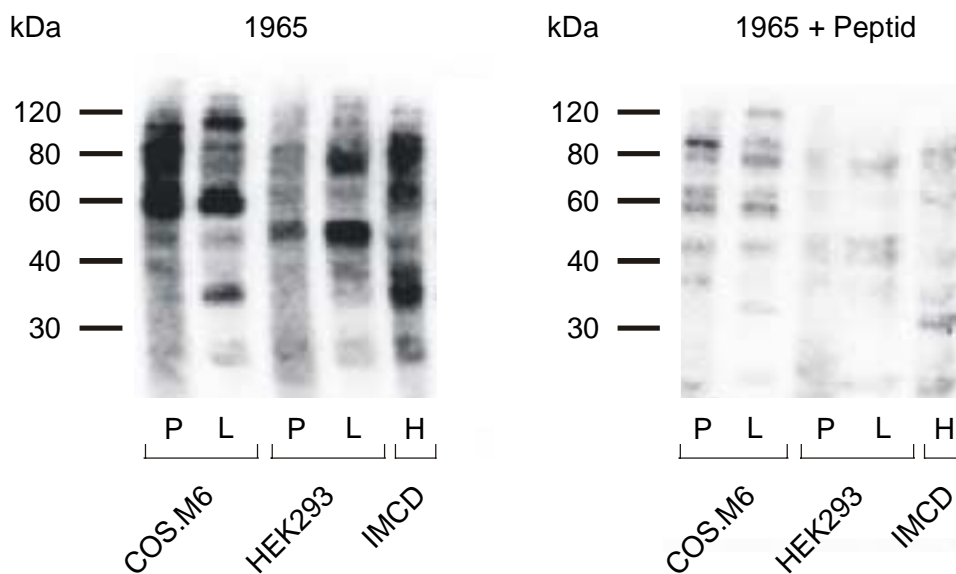


Abb. 3.23: Detektion von immunreaktiven Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 35-120 kDa in subzellulären Fraktionen von COS.M6, HEK293 und IMCD-Zellen mit dem Antikörper 1965. Proteine (45 µg pro Spur) der partikulären (P) und löslichen (L) Fraktion von COS.M6- und HEK293-Zellen sowie des IMCD-Zellhomogenates (H, partikuläre und lösliche Fraktion) wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Diese wurde anschließend mit dem Antikörper 1965 (1:500) inkubiert. Zur Kontrolle wurde in einem zweiten Immunoblot der Antikörper 1965 (1:500) mit dem Peptid 1965 1 h in Blotto präinkubiert und anschließend im Versuch eingesetzt (1965 + Peptid). Die Konzentration des Peptids betrug 0,02 µg/µl (dies entspricht einem 1000fachen molaren Überschuß gegenüber dem Antikörper). Die Signale wurden durch ECL mit einem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (1:1500) detektiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde die 10 kDa Proteinleiter aufgetragen.

In allen drei untersuchten Zelllinien wurden immunreaktive Proteine unterschiedlicher Größe detektiert (Abb. 3.23, 1965). In beiden Zellfraktionen (P und L) der COS.M6-Zellen wurde eine ca. 60 kDa große Bande detektiert. Weiterhin wurden in der partikulären Fraktion (P) dieser Zelllinie bei ca. 80 kDa und 90 kDa zwei immunreaktive Proteine detektiert. In der löslichen Fraktion (L) der COS.M6-Zellen sind neben der 60 kDa-Bande zwei Banden bei ca. 35 kDa und 110 kDa vorhanden. In beiden Fraktionen der HEK293-Zellen wurde ein ca. 50 kDa großes Protein detektiert, weiterhin ist in der löslichen Fraktion (L) eine ca. 80 kDa-Bande vorhanden. Die im IMCD-Zellhomogenat detektierten Banden befinden sich bei ca. 35 kDa, 60 kDa und bei 80-90 kDa. Die Kontrolle mit dem präinkubierten Antikörper 1965 (nach Inkubation mit dem Peptid 1965) bestätigt die Spezifität der beschriebenen Banden (Abb. 3.23, 1965 + Peptid). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß der Antikörper 1965 in

COS.M6, HEK293 und IMCD-Zellen spezifisch verschiedene Proteine von ca. 35-120 kDa detektiert. Auch bei diesen Proteinen könnte es sich um Spleißvarianten von hHt31 und/oder hBrx handeln.

3.8.4 Detektion von immunreaktiven Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht in subzellulären Fraktionen verschiedener Rattengewebe

Zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression von rHt31 wurden subzelluläre Fraktionen von verschiedenen Geweben der Ratte hergestellt (s. 2.2.12) und in einem Immunoblot mit dem Antikörper 1965 untersucht. Es werden hier nur die Ergebnisse von Herz, Hoden und Leber dargestellt (Abb. 3.24). In den anderen untersuchten Geweben (Niere, Lunge, Milz und Gehirn) konnten immunreaktive Proteine mit dem Antikörper 1965 nicht eindeutig identifiziert werden.

Proteine der nukleären Fraktion (N) und des Zellhomogenats (H, partikuläre und lösliche Fraktion) von Hoden, Herz und Leber wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion immunreaktiver Proteine mit dem Antikörper 1965 wie beschrieben (Abb. 3.24, 1965). Zur Beurteilung der Spezifität der detektierten Banden wurde der Antikörper mit dem Peptid 1965 präinkubiert (Abb. 3.24, 1965 + Peptid).

In der nukleären Fraktion (N) des Hodens und schwächer auch im Hodenhomogenat (H) wurde ein ca. 45 kDa großes Protein erkannt (Abb. 3.24, 1965). In beiden Herz- und Leberfraktionen wurde ein ca. 35 kDa großes Protein detektiert. In den Leberfraktionen ist das Signal besonders intensiv und konnte nur teilweise inhibiert werden. Außerdem sind im Homogenat (H) der Leber zwei Banden im Größenbereich von ca. 65 kDa und 70 kDa vorhanden. Die Kontrolle mit dem mit Peptid 1965 präinkubierten Antikörper bestätigt die Spezifität der beschriebenen Banden (Abb. 3.24, 1965 + Peptid).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß der Antikörper 1965 in verschiedenen Geweben der Ratte immunreaktive Proteine unterschiedlicher Größe detektiert, bei denen es sich um Spleißvarianten von rHt31 handeln könnte.

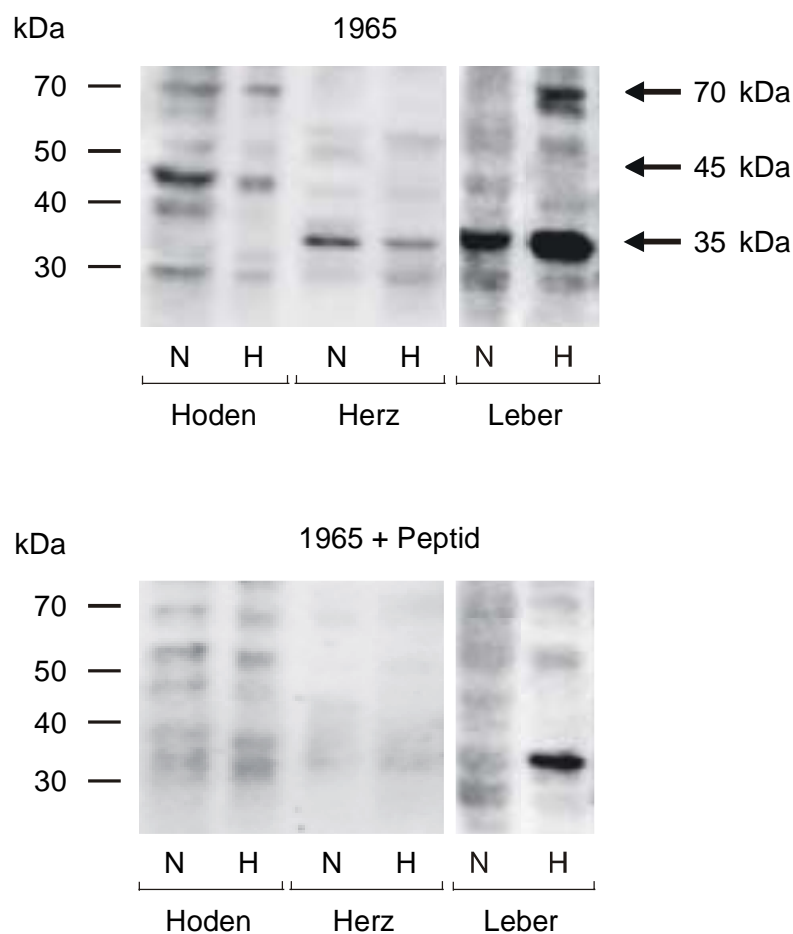


Abb. 3.24: Detektion von immunreaktiven Proteinen in subzellulären Fraktionen von Hoden, Herz und Leber der Ratte mit dem Antikörper 1965. Proteine (45 µg pro Spur) der nukleären Fraktion (N) und des Zellhomogenats (H) von Hoden, Herz und Leber wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem Antikörper 1965 (1:500) oder mit dem mit Peptid 1965 präinkubierten Antikörper (1965 + Peptid, vgl. Abb. 3.21) inkubiert. Die Signale wurden durch ECL mit einem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (1:1500) detektiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde die 10 kDa Proteinleiter aufgetragen.

3.9 Immunoblot und RII-overlay mit subzellulären Fraktionen von ZR-75-1-Zellen

Es sollte untersucht werden, ob die von dem Antikörper 1965 detektierten Proteine die regulatorischen Untereinheiten der PKA binden und es sich somit um AKAPs handelt. Dabei interessierten besonders die immunreaktiven Proteine mit einer Größe von ca. 170-180 kDa (vgl. Abb. 3.21), die in subzellulären Fraktionen der ZR-75-1- und MCF-7-Zellen detektiert wurden und bei denen es sich um hBrx handeln könnte.

Proteine der löslichen und partikulären Fraktion der ZR-75-1-Zellen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurden die einzelnen Spuren der Membran mit dem Skalpell längs durchgeschnitten. Eine Hälfte wurde in einem Immunoblot mit dem Antikörper 1965 inkubiert (Abb. 3.25 A). Als Kontrolle wurde der Antikörper 1965 mit dem Peptid Ht31 präinkubiert (Abb. 3.25 B). Die andere Hälfte der Spuren wurde in einem RII-overlay mit den ^{32}P -markierten RII-Untereinheiten hybridisiert, die entweder mit dem Kontrollpeptid Ht31-P (Abb. 3.25 A) oder dem inhibitorischen Peptid Ht31 (Abb. 3.25 B) präinkubiert wurden. In Abb. 3.25 sind die zusammengehörigen Spuren nebeneinander dargestellt.

In der löslichen und partikulären Fraktion wurden mit dem Antikörper 1965 Proteine mit einer Größe von ca. 170-180 kDa detektiert. In der löslichen Fraktion (L) ist eine schwache Bande bei ca. 175 kDa und in der partikulären Fraktion (P) eine intensive Bande bei ca. 170 kDa vorhanden (Abb. 3.25 A, Spuren 1 und 3). Weiterhin wurde in beiden Fraktionen ein Protein deutlich größer als 205 kDa detektiert. Zwischen diesem Protein und der 205 kDa-Markerbande ist in der löslichen und nur sehr schwach in der partikulären Fraktion eine weitere Bande vorhanden (A, Spuren 1 und 3). Diese Befunde entsprechen den unter 3.8.2.1 beschriebenen (vgl. Abb. 3.21). Im RII-overlay wurde in der partikulären Fraktion ein deutliches Signal bei ca. 170 kDa und ein schwaches Signal im hochmolekularen Bereich (deutlich größer als 205 kDa) detektiert (A, Spur 4). Weiterhin wurde in der löslichen Fraktion von dem Antikörper 1965 ein ca. 116 kDa großes immunreaktives Protein detektiert. In dieser Größenordnung ist auch ein Signal im RII-overlay vorhanden (A, Spuren 1 und 2). In der partikulären Fraktion ist eine Bande bei ca. 120 kDa vorhanden, im RII-overlay wurde keine Bande dieser Größe detektiert (A, Spur 4). Nach Präinkubation des Antikörpers 1965 mit dem Peptid 1965 bzw. der RII-Untereinheiten mit dem inhibitorischen Peptid Ht31 wurden

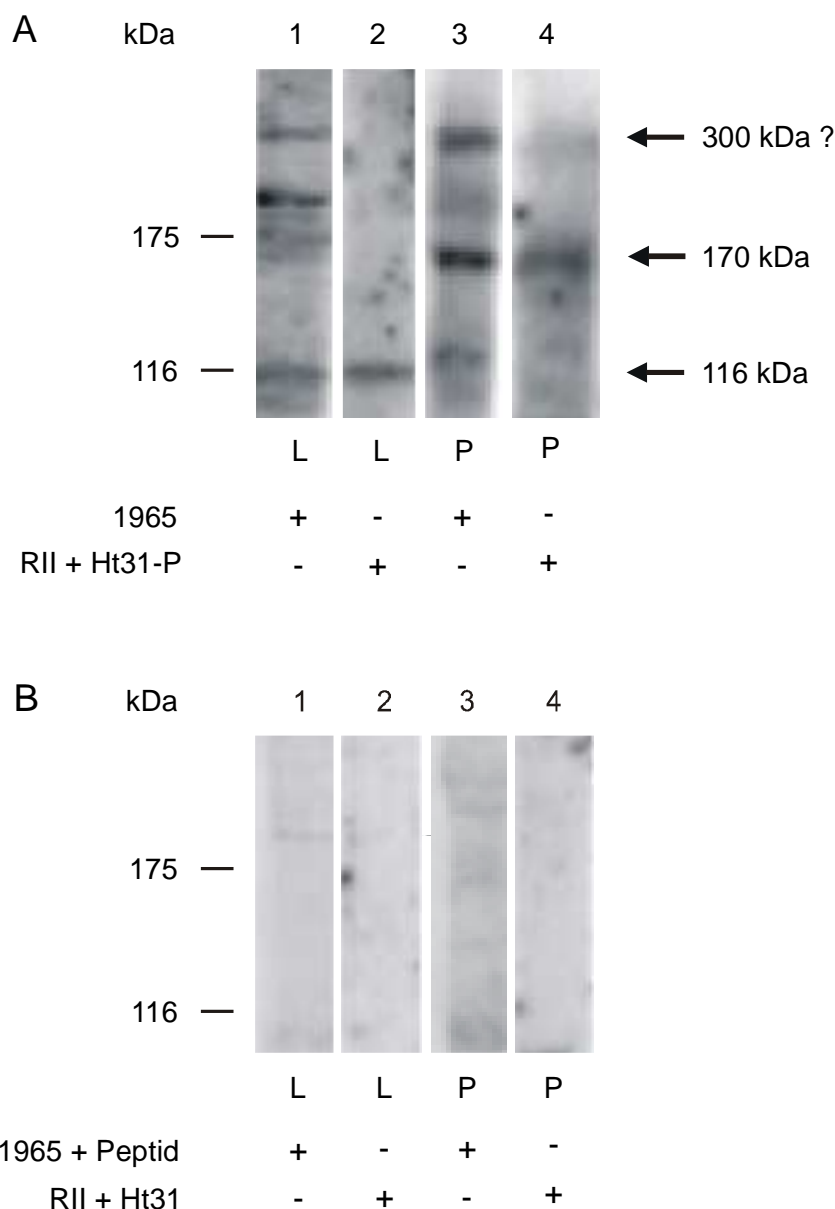


Abb. 3.25: Immunoblot und RII-overlay mit Fraktionen von ZR-75-1-Zellen. Proteine der löslichen (L) und partikulären (P) Fraktion (80 µg pro Spur) wurden in einer 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. A: Die Spuren der Membran wurden mit einem Skalpell längs voneinander getrennt, die linke Hälfte wurde in einem Immunoblot mit dem Antikörper 1965 inkubiert, die rechte Hälfte wurde im RII-overlay mit den ³²P-markierten RII-Untereinheiten hybridisiert. Im Immunoblot wurde der Antikörper 1965 (1:500, Spuren 1 und 3) eingesetzt. Im RII-overlay wurden die radioaktiv markierten regulatorischen Untereinheiten zuvor mit dem Kontrollpeptid Ht31-P (10 µM, Spuren 2 und 4) präinkubiert (vgl. 3.3.3 und 2.2.15) B: Die Durchführung erfolgte wie in A, der Antikörper 1965 wurde mit dem Peptid 1965 (0,02 µg/µl) präinkubiert (1:500, 1965 + Peptid), die RII-Untereinheiten wurden mit dem inhibitorischen Peptid Ht31 (10 µM) präinkubiert. Die Signale wurden durch ECL mit einem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper am *Lumi-Imager FI* bzw. durch Exposition der Membran auf eine Phosphoimagerplatte (3 Tage) detektiert.

die beschriebenen Banden nicht mehr detektiert (Abb. 3.25 B). Daraus kann geschlossen werden, daß die Banden spezifisch detektiert wurden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse folgendes: In der partikulären Fraktion der ZR-75-1-Zellen wurde bei ca. 170 kDa ein immunreaktives Protein detektiert und in dieser Größenordnung ist auch im RII-*overlay* ein Signal vorhanden. Ebenso wurde in der löslichen Fraktion der ZR-75-1-Zellen bei ca. 116 kDa sowohl im Immunoblot als auch im RII-*overlay* ein Signal detektiert. Bei diesen immunreaktiven Proteinen könnte es sich daher um AKAPs handeln. In beiden Zellfraktionen wurde im hochmolekularen Bereich vom Antikörper 1965 ein immunreaktives Protein detektiert. Ein Signal dieser Größe ist im RII-*overlay* nicht eindeutig nachzuweisen.

3.10 Analyse der genomischen Struktur von rHt31/hHt31, hBrx und Proto-Lbc

3.10.1 Konstruktion einer hypothetischen cDNA von hHt31

Wie bereits unter 3.1 erwähnt, ist sowohl die rHt31 als auch die in der Datenbank publizierte Sequenz von hHt31 unvollständig. Mit einer Marathon-cDNA aus humanem Brustdrüsengewebe (Clontech, Heidelberg) als Matrize wurden durch 5'-RACE (s. 2.2.1.8) weitere Sequenzen am 5'-Ende von hHt31 bestimmt und so die bisher bekannte Sequenz von 3045 bp zunächst um ca. 1200 bp verlängert (Klußmann et al. 2001a). Mittels dieses RACE-Produktes und verschiedener überlappender cDNA-Sequenzen aus der EGAD-Datenbank (*expressed gene anatomy database*) des *Institute for Genomic Research* (TIGR) konnte anschließend eine hypothetische cDNA von ca. 9,3 kb konstruiert werden (Abb. 3.26). Das 5'-Ende der Sequenz entspricht hHt31, das 3'-Ende hBrx. In dieser hypothetischen cDNA ist auch die cDNA-Sequenz des *lbc* (*lymphoid blast crisis*)-Proto-Onkogens enthalten (Sterpetti et al. 1999). Die Sequenz von Proto-Lbc entspricht der C-terminalen Sequenz von hBrx (Aminosäuren 534-1429), die erste kodierte Aminosäure von Proto-Lbc ist Methionin⁵³⁴ von hBrx.

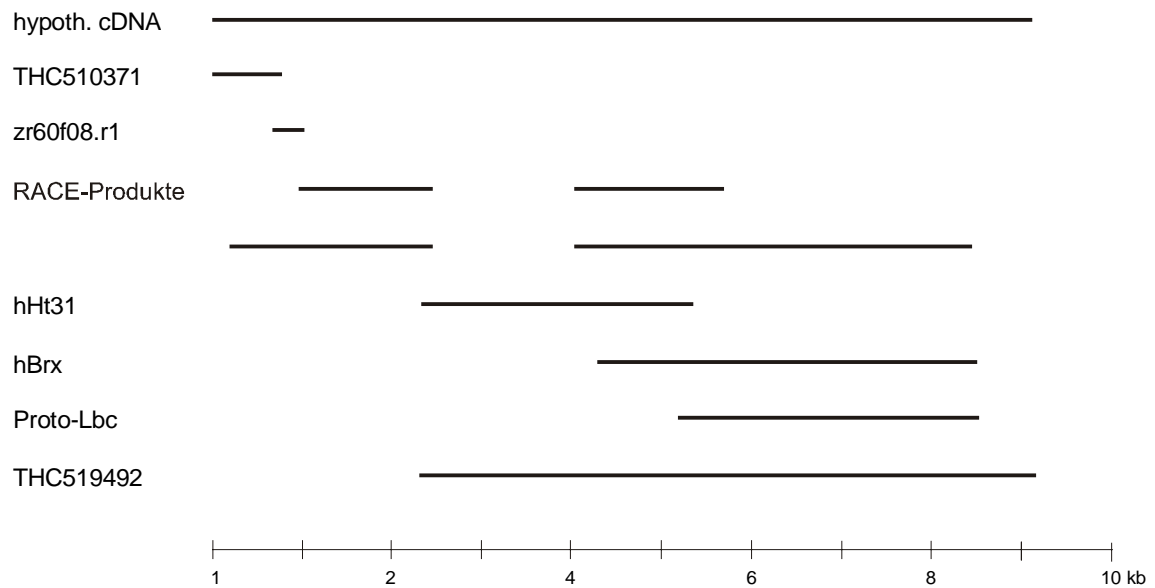


Abb. 3.26: Schematische Darstellung der hypothetischen cDNA von hHt31. Die überlappenden Sequenzen von hHt31 (Carr et al. 1992a), hBrx (Rubino et al. 1998) und Proto-Lbc (Sterpetti et al. 1999) sowie drei weiterer Sequenzen aus der EGAD-Datenbank (*expressed gene anatomy database*) des *Institute for Genomic Research* (TIGR) und vier RACE-Produkten ergaben eine hypothetische cDNA von ca. 9,3 kb. Bei den beiden THC-Sequenzen THC510371 und THC519492 (auch TC, *Tentative Consensus sequences*) handelt es sich um virtuelle Transkripte, die durch die Aneinanderreihung verschiedener überlappender EST-Klone (*Expressed Sequence Tags*) gebildet wurden, zr60f08.r1 ist ein EST-Klon.

In den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* konnten vier verschiedene genomische Klone auf Chromosom 15 identifiziert werden, die für insgesamt 36 potentielle Exons des hHt31/hBrx/Proto-Lbc-Gens kodieren (Abb. 3.27).¹ Das Startkodon von hBrx wird von einem zusätzlichen Exon (Exon 8a) kodiert, dessen chromosomale Lokalisation bisher nicht bekannt ist (Klon RP11-10K16).

¹ Inzwischen konnten alle Exons der hypothetischen cDNA von hHt31 dem genomischen Klon ref/NT_101343.4/Hs15_10500 (Chromosom 15) zugeordnet werden.

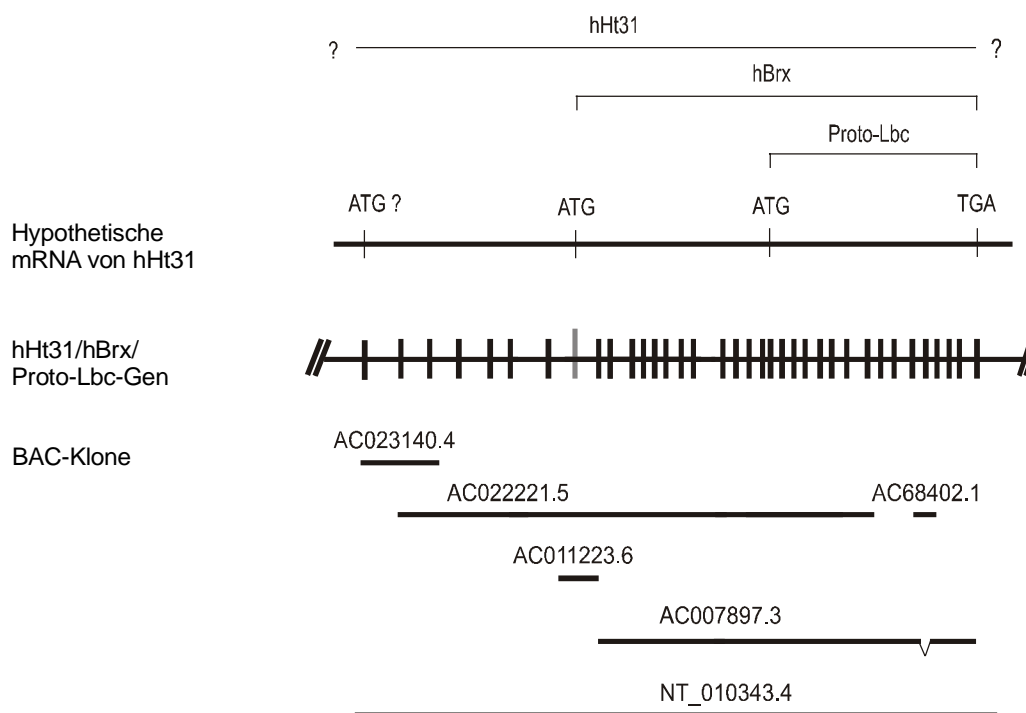


Abb. 3.27: Schematische Darstellung der Organisation des humanen hHt31/hBrx/Proto-Lbc-Gens auf Chromosom 15. Insgesamt 36 Exons kodieren für eine ca. 9,3 kb lange hypothetische cDNA von hHt31, in der auch die cDNAs der potentiellen Spleißvarianten hBrx und Proto-Lbc enthalten sind. Die Sequenzen der insgesamt 36 Exons sind in 4 verschiedenen genomischen (BAC) Klonen enthalten sowie in dem erst nach Abschluß der experimentellen Arbeiten ermittelten Klon ref/NT_010343.4. Die genomischen Klone sind durch horizontale schwarze Linien dargestellt, fehlende genomische Sequenzen sind durch ein ∇ symbolisiert. Die Exons sind als senkrechte Linien dargestellt, die unterschiedliche Länge der einzelnen Exons und Introns wurde nicht berücksichtigt (vgl. Tab. 1 im Anhang). Die ersten drei Aminosäuren von hBrx werden durch ein zusätzliches Exon kodiert, dieses ist in der Grafik durch einen längeren grauen Strich dargestellt. AC023140.4 (Klon RP11-535P8, 194575 bp); AC022221.5 (Klon RP11-100A1, 192338 bp); AC011223.6 (Klon RP11-10K16, 154040 bp), enthält Exon 8a, welches den N-Terminus von hBrx kodiert; AC007897.3 (Klon RP11-100A1, 162395 bp); AC68402.1 (Klon RP11-509N23, 66747 bp); Ref/NT_010343.4/Hs15_10500, 523439 bp. Die hypothetische cDNA wurde aus überlappenden cDNA-Klonen zusammengesetzt (s. Abb. 3.26).

In der Tab. 1 im Anhang sind die Sequenzen der 5'- und 3'-Intron/Exonübergänge aufgeführt. Die Exons 6-15 kodieren für die bisher bekannte hHt31-Sequenz, die Exons 8a-36 für hBrx und die Exons 20-36 für Proto-Lbc. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß diese drei Proteine Spleißvarianten eines Gens auf Chromosom 15 sind. Dabei unterscheiden sich hBrx und hHt31 nur in den ersten drei Aminosäuren von hBrx (Aminosäuren 632-634 von hHt31), die Sequenz von Proto-Lbc (Aminosäuren 1-895) ist mit der von hBrx (Aminosäuren 534-1429) identisch.

3.10.2 Experimentelle Bestätigung der hypothetischen cDNA von hHt31 mittels 5'- und 3'-RACE

Mittels 5'-RACE und einer Marathon-cDNA aus humanem Brustdrüsengewebe als Matrize konnte die Sequenz von hHt31 am 5'-Ende um insgesamt 2149 bp verlängert werden. In der Abb. 3.26 findet sich eine schematische Darstellung der RACE-Produkte. In der PCR wurde dabei der nach dem 5'-Ende der hypothetischen cDNA gelegte *forward* (5')-Primer A1 (THC510371 (*reverse* Sequenz) 189-214 bp) und der hHt31-spezifische *reverse* (3')-Primer GSP1 hHt31 (hHt31 126-102 bp) eingesetzt. Die Sequenzen der Primer sind unter 2.1.9.3.5.1 aufgeführt. Das RACE-Produkt wurde in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert und das Plasmid anschließend in kompetente DH10 β *E. coli*-Bakterien transformiert. Nach der Plasmidisolierung von ausgewählten Klonen wurden die *inserts* mit den vektorspezifischen Primern T7 und SP6 sequenziert. Die Sequenzierung ergab, daß sich die cDNA von hHt31 5'-terminal um 2148 Basenpaare fortsetzt und 5'-terminal im Exon 2 der hypothetischen cDNA endet (vgl. Abb. 3.26 und 3.27). Der Translationsstart von hHt31 konnte im Rahmen dieser Arbeit noch nicht ermittelt werden.

Die Hypothese, daß hBrx eine kürzere Spleißvariante von hHt31 ist, wurde in zwei Schritten mittels 3'-RACE und der bereits erwähnten Marathon-cDNA weiter untersucht. Der *forward* (5')-Primer (3'THCbfo1) wurde nach der Sequenz von hHt31 vor dem Start-Methionin von hBrx gelegt (hHt31 1679-1704 bp), der *reverse* (3')-Primer (3'THCbrev1) nach der hBrx-Sequenz (hBrx 1477-1501 bp) nach dem Ende der bisher bekannten hHt31-Sequenz. Die Sequenzen der Primer sind unter 2.1.9.3.5.2 aufgeführt. Das RACE-Produkt (ca. 1700 bp) wurde anschließend in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert und das Plasmid in kompetente DH10 β *E. coli*-Bakterien transformiert. Nach der Plasmidisolierung von ausgewählten Klonen wurden die *inserts* mit den vektorspezifischen Primern T7 und SP6 sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, daß sich die Sequenz des 3'-RACE-Produktes 3'-terminal des bisher bekannten Endes von hHt31 um ca. 330 bp als hBrx-Sequenz fortsetzt (s. auch Abb. 3.26).

In einem zweiten 3'-RACE-Experiment wurden mittels des gleichen *forward*-Primers und eines *reverse*-Primers, der mit dem Stopkodon von hBrx am 3'-Ende endet (hBrx 4313-4288 bp) insgesamt ca. 4,5 kb amplifiziert (vgl. Abb. 3.26). Das RACE-Produkt wurde in den Vektor TOPO[®]XL kloniert und das Plasmid in kompetente DH10 β

E. coli-Bakterien transformiert. Die Sequenzierung von fünf ausgewählten Klonen erfolgte anschließend mit den vektorspezifischen Primern M13 *forward* und M13 *reverse*. Durch die Sequenzierung konnte gezeigt werden, daß sich die Sequenz von hHt31 3'-terminal um 3138 bp als hBrx-Sequenz bis zum Translationsende von hBrx fortsetzt. Bei einem der untersuchten Klone fand sich außerdem eine Insertion von 60 bp zwischen Exon 11 und 13 der hypothetischen cDNA von hHt31, was auf die Existenz von weiteren Spleißvarianten von hHt31 hindeutet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß im Rahmen der vorliegenden Arbeit die bisher bekannte Sequenz von hHt31 um insgesamt 5287 bp verlängert werden konnte, der Translationsstart aber noch nicht erreicht wurde. Die Sequenz dieser 8332 bp langen, noch immer unvollständigen hHt31-cDNA, ist im Anhang aufgeführt.

3.11 Immunoblot mit dem anti-hHt31-Antikörper 3060

Ein zweites polyklonales Antiserum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit einem synthetischen Peptid, welches einer Sequenz des neuen, bisher nicht publizierten N-Terminus von hHt31 entspricht (Peptid 3060), gewonnen. Die Aminosäuresequenz des Peptids beginnt 66 Aminosäuren vor dem bisher bekannten N-Terminus von hHt31 (Aminosäuren (-66) - (-46) von hHt31). Das Antiserum wurde über eine mit dem Peptid 3060 gekoppelte Thiopropyl Sepharose 6B-Säule affinitätsgereinigt (s. 2.2.10).

Von verschiedenen Geweben der Ratte (hier gezeigt Herz, Hoden und Skelettmuskel) wurden das Homogenat (H) sowie lösliche (L) und partikuläre (P) Fraktionen hergestellt (s. 2.2.11.1). Die Proteine aus den Zellfraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion immunreaktiver Proteine mit dem Antikörper 3060 und einem Peroxidase (POD)-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (Abb. 3.28, 3060). Zur Beurteilung der Spezifität der detektierten Banden wurde der Antikörper mit dem Peptid 3060 präinkubiert (Abb. 3.28, 3060 + Peptid).

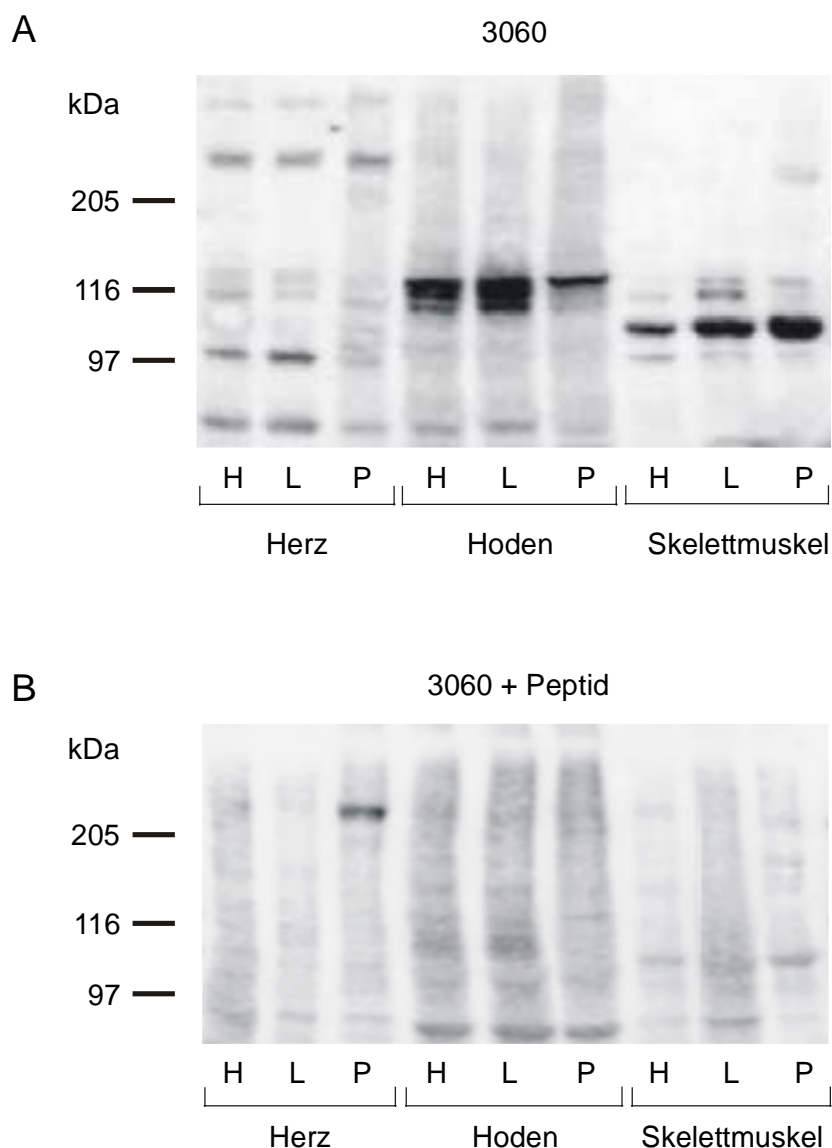


Abb. 3.28: Detektion von immunreaktiven Proteinen in subzellulären Fraktionen von Herz, Hoden und Skelettmuskel der Ratte mit dem anti-hHt31-Antikörper 3060. Proteine (45 µg pro Spur) des Zellhomogenats (H) sowie der löslichen (L) und partikulären (P) Fraktion von Herz, Hoden und Skelettmuskel wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem Antikörper 3060 (1:250) inkubiert. Zur Kontrolle wurde in einem zweiten Immunoblot der Antikörper 3060 (1:250) mit dem Peptid 3060 1 h in Blotto präinkubiert und anschließend im Versuch eingesetzt (3060 + Peptid). Die Konzentration des Peptids betrug 0,1 µg/µl (dies entspricht einem 1000fachen molaren Überschuß gegenüber dem Antikörper, vgl. Abb. 3.21). Die Signale wurden durch ECL mit einem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (1:1500) detektiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde die *prestained* Proteinleiter, *broad range* (NEB) aufgetragen.

Im Homogenat (H) des Herzens wurde ein immunreaktives Protein im hochmolekularen Bereich (größer 205 kDa) detektiert, welches sowohl in der löslichen (L) als auch in der partikulären (P) Fraktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.28, 3060). Weiterhin ist

im Homogenat und in der löslichen Fraktion des Herzens eine immunreaktive Bande bei ca. 97 kDa vorhanden. In allen Zellfraktionen des Hodens wurden bei ca. 116 kDa mehrere immunreaktive Proteine detektiert. Im Homogenat und sowohl in der löslichen als auch in der partikulären Fraktion des Skelettmuskels wurde ein ca. 110 kDa großes Protein detektiert. Die Kontrolle zeigt, daß die hier beschriebenen Banden spezifisch sind (Abb. 3.28, 3060 + Peptid).

Bei den beschriebenen Proteinen, die von dem anti-hHt31-Antikörper 3060 spezifisch in verschiedenen Geweben der Ratte detektiert wurden, handelt es sich wahrscheinlich um Spleißvarianten von rHt31.