

Ergebnisse

I. Identifizierung intrazellulärer Interaktionspartner

Es sollten mithilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems Proteine identifiziert werden, die mit der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1-4L aus der Ratte (CC1-zyto) interagieren. Die CC1-zyto-cDNA wurde im richtigen Leserahmen in den Vektor pGBKT7 kloniert, so dass die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-4L als Fusionsprotein mit der DNA-bindenden Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors exprimiert wurde (*Bait*). Eine cDNA-Bank aus Rattenleber lag in den Vektor pACT2 kloniert vor und die einzelnen Klone wurden somit als Fusionsproteine mit der Transkriptions-aktivierenden Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors exprimiert (*Prey*). *Bait*- und *Prey*-Plasmide wurden sequentiell in den Hefestamm AH109 kotransformiert. Der Hefestamm besitzt mehrere Reportergene unter dem Einfluss des GAL-4-Promotors, die eine Selektion auf Interaktion von CC1-zyto mit Proteinen der Rattenleber-cDNA-Bank erlauben. Eine schematische Darstellung der Funktion des Yeast-Two-Hybrid-Systems ist in Abb. 10A wiedergegeben.

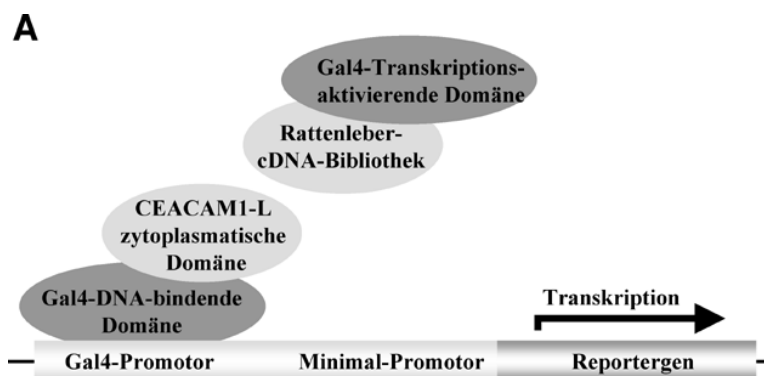
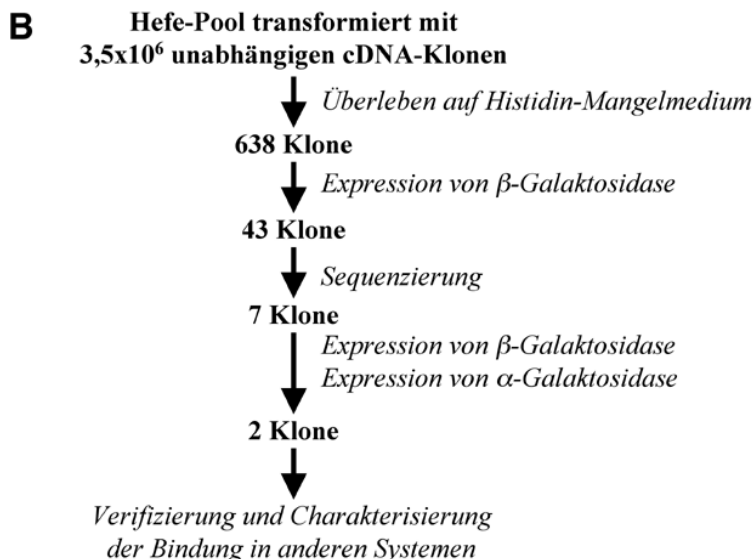


Abb. 10: Der Yeast-Two-Hybrid-Screen.

(A) Schematische Darstellung des Prinzips der Yeast-Two-Hybrid-Technik.

(B) Selektionsstufen während eines Yeast-Two-Hybrid-Screens.



Nur wenn eine Interaktion vorliegt, werden die DNA-bindende Domäne und die Transkriptions-aktivierende Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors so nahe zusammengebracht, dass die Reportergene abgelesen werden können. Zur Selektion dienen drei Reportergene: HIS3, welches der Hefe ein Überleben auf Histidin-Mangelmedium ermöglicht, sowie *lacZ* und MEL1, welche für β - bzw. α -Galaktosidase kodieren, die in Tests mittels des Umsatzes der Substrate β - bzw. α -GAL nachgewiesen werden können. In Abb. 10B sind die einzelnen, im Folgenden beschriebenen Selektionsschritte zur Ermittlung von "echt" positiven Klonen gezeigt. Die durch die Kotransformation erhaltenen Klone, welche auf Histidin-Mangelmedium wuchsen, wurden β -Galaktosidase-Assays unterzogen und selektiert. 43 Klone, welche die stärkste Blaufärbung im β -Galaktosidase-Assays zeigten, und somit die stärksten Interaktionen aufwiesen, wurden sequenziert und sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Durch Sequenzierung identifizierte Klone (nkB: nicht kodierender Bereich)

Klon-Nr.	Proteinbezeichnung	Klon-Nr.	Proteinbezeichnung
14.	Phosphoglucomutase 1 (nkB)	234.	Phosphoglucomutase 1 (nkB)
15.	Spot-14 Protein (nkB)	235.	Phosphodiesterase (nkB)
18.	Ribosomales Protein S6 + Albumin	246.	Fetuin
20.	Phosphoglucomutase 1 (nkB)	247.	human SIN1
47.	cdp-Diacylglycerol-Synthase	250.	human SIN1
52.	Ornithinaminotransferase	251.	Ornithinaminotransferase
61.	Ubiquitin-konjugierendes Enzym	252.	Ribosomales Protein 23
68.	Dihydroliipoamiddehydrogenase (nkB)	273.	Hematopoietisch Expr.-Homeobox-Protein
73.	Filamin A	279.	mitoch. Cytochrom-C-Oxidaseuntereinheit II
93.	Hematopoietisch Expr.-Homeobox-Protein	328.	Ribosomales Protein S20
120.	Ornithinaminotransferase	344.	ähnlich Maus-Chromosom 16
129.	Dynein	350.	Ribosomales Protein S23
198.	alpha 2-HS-Glykoprotein alpha 2	362.	Heterogenes Ribonucleoprotein D
199.	Phosphodiesterase (nkB)	365.	ähnl. Maus RIKEN cDNA Klon 2310065K06
201.	Proteinaseinhibitor-alpha	367.	alpha 2-HS-Glykoprotein alpha 2
202.	Fetuin	380.	alpha 2-HS-Glykoprotein alpha 2
211.	Komplement-Komponente 1	415.	ähnlich human-Kelch-like-2
213.	Proteinaseinhibitor-alpha	528.	Poldip2 (murin/human)
219.	Proteininhib.-of-Activated-STAT (PIAS1)	529.	Cytochrom-C-Oxidaseuntereinheit I
220.	Proteinaseinhibitor-alpha	533.	Phosphoglucomutase 1 (nkB)
229.	Proteinaseinhibitor-alpha	537.	Ornithinaminotransferase
231.	Bromodomain-Containing-Protein 4 (long)		

Von den identifizierten Proteinen sind viele als im Yeast-Two-Hybrid-System falsch positiv reagierend bekannt und wurden daher nicht weiter untersucht. Dazu gehören alle ribosomalen

Proteine, die cdp-Diacylglycerolsynthase, das Ubiquitin-konjugierende Enzym, der Proteinaseinhibitor-alpha, die Komplement-Komponente 1, das alpha 2-HS-Glykoprotein und die Untereinheiten der Cytochrom-C-Oxidase. Lag der Klon in einem nicht translatierten Bereich einer mRNA, war dies ebenfalls ein Ausschlusskriterium. Dies gilt für Phosphoglucomutase-1, Spot-14-Protein, Dihydrolipoamiddehydrogenase und die Phosphodiesterase. Ausserdem wurden BRD4-long und das heterogene Ribonucleoprotein D aussortiert, da diese ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind und somit nicht mit einem membranständigen Protein in direkten Kontakt treten können. Weitere Klone (Ornithinaminotransferase, Kelch-2, Dynein und RIKEN-cDNA-Klon 2310065K06) sind erst sehr spät identifiziert worden, so dass sie nicht in die Versuche einbezogen wurden.

Die folgenden Klone wurden als potentielle Interaktionspartner für die zytoplasmatische Domäne von Ratten-CEACAM1-4L weiter untersucht: (1) Klon **#73** Filamin A; (2) Klon **#93** (#273) Hematopoietisch Exprimiertes Homeobox-Protein; (3) Klon **#202** (#246) Fetuin; (4) **#219** PIAS1 (Proteininhibitor-of-Activatet-STAT); (5) Klon **#247** (#250) SIN1 (Sty1/Spc1-Interacting-Protein); (6) Klon **#344** Sequenz ähnlich einem Abschnitt des murinen Chromosom 16, (7) **#528** Poldip2 (Polymerase- δ interacting protein 2). Bei allen hier genannten Klonen lagen jeweils nur C-terminale Fragmente der cDNA vor. Komplette cDNAs wurden nicht gefunden.

Bei den drei doppelt vorhandenen Klonen ergab ein Vergleich der Sequenzen, dass sie jeweils für die gleiche Region im Protein kodieren. Daher wurde immer nur einer der beiden Klone weiter getestet. Die sieben oben fett gedruckten Klone sollten in Hefen durch Eins-zu-Eins-Transformationen mit verschiedenen Kontrollvektoren auf falsch positive Signale getestet werden. Es wurden zwei verschiedene Hefestämme, AH109 und CG1945, verwendet, da die Stärke der Interaktionen von Stamm zu Stamm stark variieren kann.

Das Prinzip der Kontrolle auf falsch positive Interaktionen durch Eins-zu-Eins-Transformationen besteht darin, den gefundenen Klon sowohl gegen die ursprünglich für den Screen verwendete zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-4L (CC1-zyto) zu testen als auch gegen das Kernprotein Lamin C, welches eine unspezifische Negativkontrolle darstellt. Sollte im Vergleich zu CC1-zyto bei Lamin C eine gleichstarke oder sogar stärkere Reporter-gen-Expression auftreten, kann von einer unspezifischen Aktivierung der Reporter gene ausgegangen werden. Es wurden zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Stärke der Interaktion angewandt: der β -Galaktosidase-Assay und der α -Galaktosidase-Assay. Beide basieren wie oben beschrieben auf der Expression von Reporter genen: lacZ codiert für die β -Galaktosidase, es kann also β -GAL umgesetzt werden; MEL1 codiert für die α -Galaktosidase, es kann α -GAL umgesetzt werden. Beide Reporter gene sind in beiden Hefestämmen vorhanden. Der β -Galaktosidase-Assay ist der sensitivere Test, jedoch erlaubt

er lediglich eine qualitative Aussage. Der α -Galaktosidase-Assay ist zwar weniger empfindlich, ermöglicht aber eine quantitative Bestimmung der Stärke der Bindung. Zunächst wurde ein β -Galaktosidase-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die Stärke der Protein-Protein-Interaktionen fiel in den verschiedenen Hefestämmen unterschiedlich aus. Die Vergleiche CC1-zyto/Negativkontrolle der einzelnen Klone weisen jedoch immer die gleiche Tendenz auf. Der Filamin-Klon #73 und der Poldip2-Klon #528 sind die einzigen Klone, mit denen CC1-zyto in beiden Hefen eine deutlich stärkere Interaktion zeigt als die Negativkontrolle Lamin C. Es ist also wahrscheinlich, dass diese Bindungen spezifisch sind. Alle anderen Klone (#93, #202, #219, #247, #344) zeigen mit CC1-zyto und Lamin C in beiden Hefestämmen eine jeweils gleich starke, also unspezifische, Aktivierung der Reportergene.

Tabelle 2: β -Galaktosidase-Assay. Die Hefestämme AH109 und CG1945 wurden jeweils mit den Konstrukten "CC1-zyto" (zytoplasmatische Domäne von Ratten-CEACAM1 in Vektor pGBKT7) oder "Lamin C" (in Vektor pGBKT7) und den Klonen 73, 93, 202, 219, 247, 344 und 528 (jeweils in Vektor pACT2) kotransformiert. Es wurde ein Filter-Lift-Assay durchgeführt und die Aktivität der β -Galaktosidase durch einen Farbumschlag des Substrates β -GAL von durchsichtig nach blau gezeigt. Die Auswertung erfolgte visuell.

AH109		CG1945		
CC1-zyto	Lamin C	CC1-zyto	Lamin C	
+++	(+)	+++	(+)	Filamin A (#73)
+	+	-	-	HHEX (#93)
+	(+)	-	-	Fetuin (#202)
+++	+++	+	(+)	PIAS1 (#219)
+	+	(+)	(+)	SIN1 (#247)
++	++	-	-	Chromosom 16 (#344)
++	(+)	+	-	Poldip2 (#528)

Die Ergebnisse der β -Galaktosidase-Assays wurden durch α -Galaktosidase-Assays überprüft. Wie bereits erwähnt, ermöglicht der α -Galaktosidase-Assay eine Quantifizierung der Bindungsstärke zwischen den untersuchten Fusionsproteinen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst und bestätigen die Aussagen der vorangegangenen β -Galaktosidase-Assays. Nur die Klone #73 (Filamin) und #528 (Poldip2) zeigen eine deutlich stärkere Interaktion mit CC1-zyto im Vergleich zur Negativkontrolle Lamin C. Im Hefestamm AH109 fallen die besonders hohen Werte dieser beiden Klone auf, die deutlich über dem Wert der Positivkontrolle liegen. Im Hefestamm CG1945 sind die Unterschiede zwar nicht so ausgeprägt, jedoch immer noch signifikant. Die anderen fünf Klone zeigen in beiden

Hefestämmen insgesamt nur sehr niedrige Werte, die teilweise unter der Hintergrundreaktion liegen und keine großen Differenzen zwischen CC1-zyto und Lamin C aufweisen. Auch im α -Galaktosidase-Assay liegt für diese Klone also eine unspezifische Aktivierung der Reportergene vor.

Tabelle 3: α -Galaktosidase-Assay. Die Hefestämme AH109 und CG1945 wurden jeweils mit den Konstrukten "CC1-zyto" (pGBKT7) oder "Lamin C" (pGBKT7) und den Klonen 73, 93, 202, 219, 247, 344 und 528 (pACT2) kotransformiert. Es wurde die Aktivität der α -Galaktosidase durch einen Farbumschlag bei der Hydrolyse von p-nitrophenyl- α -D-Galaktosid bei 410 nm nachgewiesen. Alle in der Tabelle angegebenen Werte sind in Millieinheiten/(ml x Zelle) angegeben (1 Einheit α -Galaktosidase = Enzymmenge, die 1 μ Mol p-Nitrophenyl- α -D-Galaktosid in 1 min bei 30°C in Acetatpuffer pH 4,5 zu p-Nitrophenol und D-Galaktose hydrolysiert). Die Werte der Doppeltransformationen sind abzüglich des Mittelwertes der Negativkontrollen angegeben.

AH109		CG1945		
CC1-zyto	Lamin C	CC1-zyto	Lamin C	
325,37	124,33	34,17	22,58	Filamin A (#73)
-8,97	-4,81	-13,90	1,12	HHEX (#93)
13,26	2,34	-9,10	2,00	Fetuin (#202)
31,99	22,96	6,86	6,11	PIAS1 (#219)
19,85	12,75	1,31	7,34	SIN1 (#247)
31,46	50,18	-0,20	10,33	Chromosom 16 (#344)
550,93	111,18	17,11	7,11	Poldip2 (#528)
151,56	pos T/53	167,46	pos T/53	
28,33	neg CC1	19,96	neg CC1	
29,55	neg lam	16,36	neg lam	

Die genaue Beschreibung des Filamin A- und des Poldip2-Klons sowie alle weiteren Experimente Filamin A und Poldip2 betreffend sind im Folgenden in zwei separaten Abschnitten dargestellt.