

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Isolation und Charakterisierung möglicher intrazellulärer Interaktionspartner
muriner Protocadherine*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karin Weimann

aus Córdoba (Argentinien)

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. E. Köttgen
 2. Priv.-Doz. Dr. D. Hentschel
 3. Priv.-Doz. Dr. rer. Nat. H. Schulze

Datum der Promotion: 16. Mai 2010

Inhaltsverzeichnis

TITEL

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	Zelladhäsionsmoleküle.....	7
1.1.1	Integrine.....	8
1.1.2	Selectine.....	9
1.1.3	IgCAM Superfamilie.....	9
1.2	Cadherine.....	10
1.2.1	Klassische Cadherine.....	11
1.3	Protocadherine.....	12
1.4	Das Hefe-2-Hybriden System.....	15
1.4.1	Grundlagen.....	16
1.4.2	Konstruktion einer murinen Gehirn-cDNA-Bank.....	18
1.5	Zielsetzung.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Geräte.....	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3	Reagenzien.....	22
2.1.4	Puffer und Medien.....	23
2.1.5	Enzyme.....	25
2.1.6	Reaktionskits.....	25
2.1.7	Bakterienstämme.....	26

2.1.8	Hefestämme.....	26
2.1.9	Plasmide.....	26
2.1.10	Primer.....	27
2.1.11	Antikörper.....	28
2.1.12	Größen-/Molekulargewichtstandards für Nukleinsäuren und Proteine.....	28
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.1	Gesamt-RNA-Extraktion aus Gewebe.....	28
2.2.2	Isolierung von poly(A) ⁺ -RNA.....	29
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese von Gesamt-RNA im denaturierenden Formaldehydgel.....	29
2.2.4	Reverse Transkription von RNA.....	30
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.2.6	DNA-Gelelektrophorese.....	32
2.2.7	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	33
2.2.8	DNA-Aufreinigung.....	33
2.2.9	Restriktionsendonuklease-Verdau von DNA.....	34
2.2.10	5'-Dephosphorylierung von DNA.....	35
2.2.11	Ligation von DNA.....	35
2.2.12	<i>E.coli</i> -Transformation.....	35
2.2.13	Herstellung von kompetenten Bakterienzellen.....	36
2.2.14	DNA-Isolation aus Bakterien.....	37
2.2.15	Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden.....	37
2.2.16	Kolonie-PCR.....	38
2.3	Proteinchemische und immunologische Methoden.....	38
2.3.1	Herstellung von Protein-Lysaten aus Hefekulturen.....	38
2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	39
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
2.3.4	Coomassiefärbung von Proteinen.....	40
2.3.5	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot).....	40
2.3.6	Ponceau-Färbung von Proteinen.....	40
2.3.7	Immunfärbung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	41
2.4	Das Hefe-2-Hybriden-System.....	41

2.4.1	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	41
2.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	42
2.4.3	Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNA aus Hefen.....	42
2.4.4	Konstruktion einer cDNA-Bank aus murinem Gehirn.....	42
2.4.5	Selektion (Screening) durch Kreuzung zweier haploider Hefestämme.....	47
3	ERGEBNISSE.....	48
3.1	Klonierung und Kontrolle der Expressions „bait“-Vektoren.....	48
3.1.1	Isolation von Gesamt-RNA.....	48
3.1.2	Konstruktion der spezifischen Primer.....	49
3.1.3	Klonierung der DNA-Fragmente AB, CD und AD aus muriner cDNA.....	51
3.1.4	Heterologe Proteinexpression.....	52
3.1.5	Untersuchung auf autonome Reporteraktivität und Interaktion der Konstrukte.....	54
3.2	Konstruktion der murinen Gehirn cDNA-Bank im Aktivierungsdomänen- Expressions-Vektor.....	56
3.2.1	Isolation von Gesamt-RNA aus murinem Gehirngewebe.....	56
3.2.2	Synthese und Amplifikation der cDNA.....	56
3.2.3	<i>In vivo</i> Rekombination der cDNA-Bank in Hefe.....	57
3.3	Screening.....	59
3.3.1	1. Screen.....	59
3.3.2	2. Screen.....	60
3.3.3	3. Screen.....	63

4	DISKUSSION.....	67
4.1	Klonierung und Kontrolle der Expressions „bait“-Vektoren.....	69
4.2	Konstruktion der murinen cDNA-Bank.....	70
4.3	Vorversuche.....	72
4.4	Screens.....	72
4.5	Isolierte mögliche intrazelluläre Interaktionspartner der murinen Protocadherine.....	74
4.6	Ausblick.....	77
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	79
6	LITERATUR.....	80
7	ANHANG.....	88
7.1	Danksagung.....	88
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	89
7.3	Curriculum vitae.....	91
7.4	Erklärung.....	92
7.5	Publikation.....	93

1. Einleitung

1.1 Zelladhäsionsmoleküle

Die spezifische Adhäsion zwischen Zellen oder die Anlagerung von Zellen an die extrazelluläre Matrix sind grundlegende Mechanismen, die der Zellerkennung und Migration dienen. Sie sind sowohl an morphologischen Prozessen in der Entwicklung, als auch an der Erhaltung räumlicher Strukturen im adulten Gewebe beteiligt (Aplin et. al. 1998; Gumbiner & Yamada 1995). Des Weiteren spielt die Adhäsion eine Rolle bei der Apoptose, Zelldifferenzierung (W. J. Nelson 1992), Homöostase, Proliferation und der Wundheilung. Die direkte Adhäsion erfolgt spezifisch durch die Interaktion von Rezeptoren mit ihren Liganden.

Zelladhäsionsmoleküle sind membranständige Proteine, die Zelladhäsion vermitteln. Die Zelladhäsionsmoleküle sind in der Lage, extrazelluläre Zell-Zell Bindungen zu eingehen und werden intrazellulär verankert (Jamora & Fuchs 2002). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Adhäsionsmoleküle nicht nur der Zelladhäsion dienen, sondern auch an Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Buckle 1998; Juliano 2002). Die komplexen Regulationsmechanismen der Zelladhäsionsmoleküle spielen bei der physiologischen Entwicklung und der pathologischen Veränderung eine essentielle Rolle. Beispielsweise seien hier Tumormetastasierung (Bullions & Levine 1998; Behrens & Birchmeier 1994) und Autoimmunerkrankungen (Frenette & Wagner 1996a; Frenette & Wagner 1996b; Springer 1990) genannt. Viele dieser Krankheiten sind von entzündlichen Prozessen begleitet, die mit einer Cadherin-vermittelten Leukozyteneinwanderung in das Gewebe einhergehen (Hogg & Doerschuk 1995).

Die Zelladhäsionsmoleküle lassen sich durch ihre Primärstruktur, unterschiedliche Bindungseigenschaften, Einfluß von Ca^{2+} - Ionen oder durch die Wahl ihrer Bindungspartner in unterschiedliche Familien einteilen. Gleiche Interaktionspartner vermitteln eine homotypische Bindung, unterschiedliche Interaktionspartner vermitteln eine heterotypische Bindung.

1.1.1 Integrine

Bei der Familie der Integrine handelt es sich um Zelloberflächenmoleküle, die sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Adhäsion vermitteln können. Integrine ermöglichen die Interaktionen zwischen dem Zellinneren und der Zellumgebung (Hynes 1992), indem sie die Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Aktin-Zytoskelett der Zelle herstellen. Die Interaktionsfähigkeit dieser transmembranären, $\alpha\beta$ -heterodimeren Glykoproteine (Corbi et al. 1987), ist abhängig von dem jeweiligen Liganden und der Bindung von zweiwertigen Kationen (Ca^{2+} oder Mg^{2+}) an der extrazellulären Domäne der α -Untereinheit.

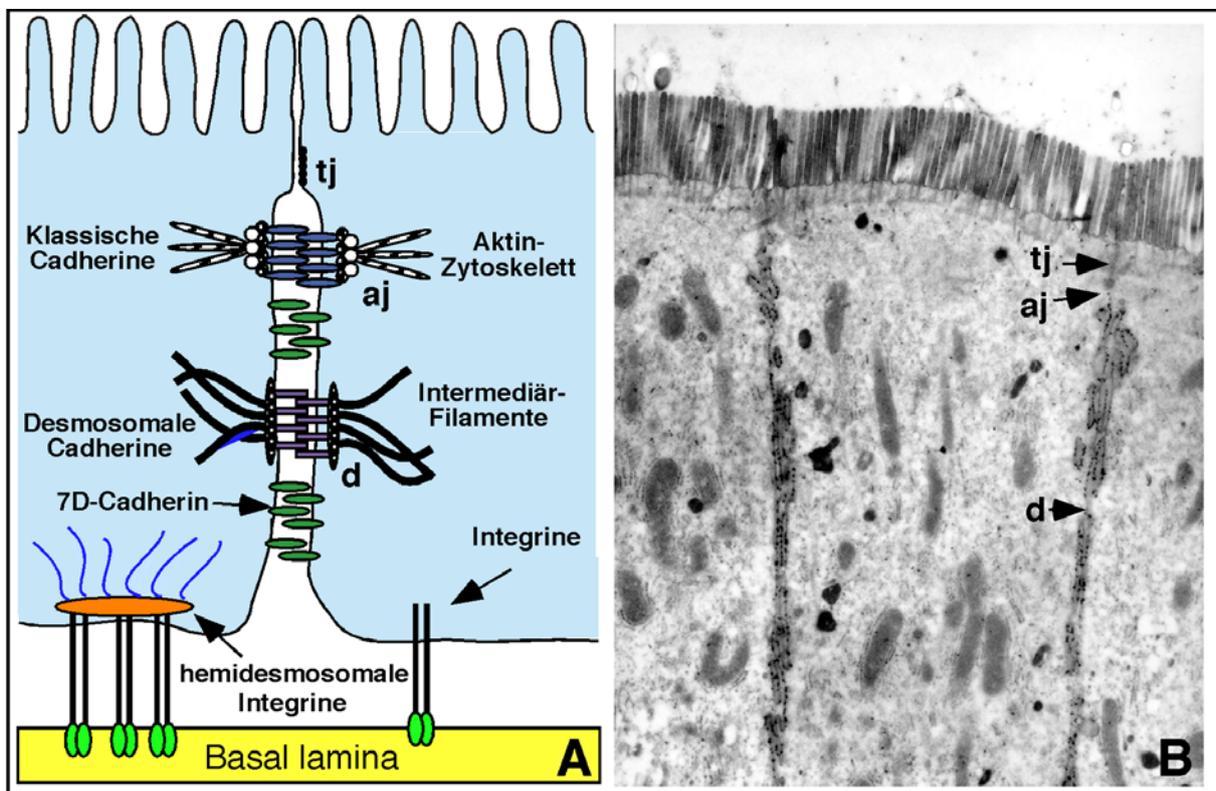


Abb. 1.1: (A) Schematische Ansicht und (B) elektronenmikroskopische Aufnahme von Zellkontaktsomen benachbarter Enterozyten; Maßstab 1:12000. Mit Immunogoldpartikeln markiertes 7D-Cadherin findet sich entlang der lateralen Kontaktbereiche der Zellen, ist aber von den tight junctions (tj), den adherence junctions (aj) und den Desmosomen (d) ausgeschlossen (verändert nach Wendeler et al. 2004).

Als transmembranäre Adhäsionsmoleküle sind Integrine auch am Signaltransduktionsprozess beteiligt. Besonders zu Erwähnen ist die Regulation von Integrinen durch Signale aus dem Inneren der Zelle, die die Bindungsfähigkeit der Integrine nach Bedarf steigern oder vermindern können. Der genaue Regulationsmechanismus ist jedoch noch nicht bekannt (Shattil & Ginsberg 1997; Juliano & Varner 1993; Clark & Brugge 1995).

1.1.2 Selektine

Selektine sind Ca^{2+} -abhängige Glykoproteine, die weiter in P- (platelet cells), E- (endothelial cells), und L-Selektin (lymphocytes) eingeteilt werden. Jedes Selektin ist ein transmembranäres Protein, das eine Lektin-ähnliche aminoternale Domäne und eine extrazelluläre EGF-Domäne (endothelial growth factor) besitzt (Bevilacqua & R. M. Nelson 1993; Gearing & Newman 1993). Sie sind in der Lage, kostimulatorische Signale zu erzeugen, die die Aktivierung von Leukozyten unterstützen (Diacovo et al. 1996; Lo et al. 1995). L-Selektin wird von Leukozyten exprimiert (Gearing et al. 1992) und kann durch Bindung an Integrine die Adhäsion von weiteren Leukozyten bei entzündlichen Prozessen an Zelloberflächen vor Ort vermitteln. P-Selektin wird in den α -Granula von Blutplättchen oder den Weibel-Palade Körperchen von Endothelzellen gespeichert (Gearing & Newman 1993). Es kann durch viele Faktoren aktiviert werden wie z.B. Thrombin, Histamin, aber auch Endotoxine oder Virusinfektionen (Bevilacqua & R. M. Nelson 1993). E-Selektin wird ausschließlich von Endothelzellen nach Aktivierung durch Zytokine wie IL-1 oder TNF gebildet (Bevilacqua 1993; Gearing & Newman 1993).

1.1.3 Immunglobulin Superfamilie (Ig-Superfamilie)

Die Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie sind transmembranäre single pass Glykoproteine, die eine Ca^{+} -unabhängige Adhäsion aufweisen (Sluiter et al. 1993; Diamond & Springer 1994). Sie bestehen aus einer oder mehreren Ig-ähnlichen Domänen, die charakteristisch für den Antikörperaufbau sind. Der Adhäsionsmechanismus zwischen den Zellen erfolgt sowohl homophil als auch

heterophil (González-Amaro et al. 1998; Nieto et al. 1998). Die wichtigsten Vertreter dieser Familie sind PECAM (auf Endothelzellen, Blutplättchen, Neutrophilen und Monozyten), NCAM (Nervenzellen), ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) und VCAM-1 (vaskuläres Adhäsionsmolekül-1). Von diesen Adhäsionsmolekülen wurde bis heute N-CAM am genauesten untersucht, da es von einer Vielzahl von Zellen exprimiert wird, insbesondere von Nervenzellen (G. Kaplanski et al. 1998). Es existieren mindestens 20 verschiedene Formen von N-CAM, die alle durch alternatives Spleissen eines RNA-Transkripts eines einzigen Gens entstehen (Barthels et al. 1992).

1.2 Cadherine

Cadherine sind single-pass transmembranäre Glykoproteine, die sowohl in Vertebraten, als auch Invertebraten exprimiert werden. Bis heute ist kein Zelltyp bekannt, der nicht mindestens ein Cadherin exprimiert. Sie dienen der Zelladhäsion und spielen eine fundamentale Rolle in der normalen Entwicklung von eukaryoten Lebewesen. Die klassischen Cadherine sind 723 bis 748 Aminosäuren lang und bestehen aus fünf extrazellulären Domänen, einem transmembranären Segment und einer cytoplasmatischen Region. Cadherine besitzen eine lange extrazelluläre Polypeptidkette, die aus 5-7 Cadherin-repeats besteht und eine Ähnlichkeit mit Immunglobulindomänen aufweist.

Sie werden als Polypeptide synthetisiert, die dann eine Serie von post-translationalen Modifikationen durchlaufen (Glykosilierung, Phosphorylierung und proteolytische Spaltungen).

Cadherine sind in ihrer Funktion Kalzium-abhängig. Unter Kalziumentzug zeigten *in vitro* Versuche, dass die adhäsive Aktivität der Cadherine verloren geht und ihr Abbau durch Proteasen gesteigert wird.

Die Entdeckung der Cadherine wurde Ende der 1970er und Anfang der 1980er Jahre beschrieben (Hyafil et al. 1980; R Kemler et al. 1977). Die Nomenklatur der Cadherine richtet sich nach den Geweben, in denen sie zuerst entdeckt oder am stärksten exprimiert wurden: N-Cadherin (Nervenzellen) (Hatta 1990), E-Cadherin (Epithelium) und P-Cadherin (Plazenta) (Nose et al. 1987; Nose & Takeichi 1986).

Cadherine vermitteln meist eine homotypische Zell-Zell-Adhäsion, auch wenn heterotypische Bindungen zwischen verschiedenen Cadherinen möglich sind. Sie können als Rezeptor oder Ligand agieren. Sie sind außerdem verantwortlich für die selektive Zell-Zell-Adhäsion und die Positionierung einer Zelle in der embryonalen Entwicklung. Während der embryologischen Entwicklung wird die Expression verschiedener Mitglieder der Cadherinfamilie stadiumsabhängig reguliert und korreliert mit einer Vielzahl morphogenetischer Ereignisse, in denen sowohl Zell-Aggregation als auch Zell-Disaggregation vorkommt.

Die Funktion der Cadherine bei diesen Prozessen wurde durch den Einsatz monoklonaler anti-Cadherin Antikörper charakterisiert, die nach Zugabe zu embryologischem Gewebe eine schwere Zerstörung der Struktur mit Auflösung des Gewebes bis hin zur Apoptose einzelner Zellen verursachen.

1.2.1 Klassische Cadherine

Bei den klassischen Cadherinen handelt es sich um die zuerst entdeckten und somit am ausführlichsten erforschten Cadherine. Sie umfassen ca. 20 Proteine, zu denen unter anderem N-, P- und E-Cadherin gehören. Sie vermitteln eine Zell-Zell-Adhäsion entlang der gesamten Zellkontaktfläche, wobei sie sich unter anderem an der Zonula adherens konzentrieren. Die Zelle wird durch diesen spezifischen Membrankontakt stabilisiert und über das Aktin-Zytoskelett wird ein Epithelverband ermöglicht (Boller et al. 1985).

Die extrazellulären Domänen der klassischen Cadherine bestehen aus 3 bis 5 Wiederholungs-Domänen mit je einer Länge von etwa 110 Aminosäuren. 1995 wurde die Tertiärstruktur der äußersten N-terminalen Cadherin-Domäne (EC1) von E-Cadherin (Overduin et al. 1995) und N-Cadherin (Shapiro, Fannon et al. 1995; Shapiro, Kwong et al. 1995) aufgeklärt. Die Strukturanalyse ergab, dass es sich bei der Grundstruktur der Domänen um eine zylindrische β -Faltblatt Anordnung handelt, die aus sieben antiparallelen Einzelsträngen besteht. Neben dieser Tertiärstruktur finden sich außerdem vier hoch konservierte Aminosäuresequenzmotive in der Cadherinfamilie.

Die N-terminalen 113 Aminosäuren, die ein konserviertes HAV Motiv beinhalten, haben eine entscheidende Rolle bei der spezifischen Bindung von Liganden. Der extrazelluläre Teil der klassischen Cadherine ist in der Zellmembran durch eine transmembranäre Domäne von annähernd 24 Aminosäuren verankert. Der cytoplasmatische Teil, der hochkonservierte Bereiche mit einer Bindungssequenz für das Armadillo-Protein, β -Catenin und Plakoglobin enthält, wird auch Catenin-Bindungssequenz genannt. Wie man mittlerweile weiß, spielen klassische Cadherine, die sowohl über β -Catenin am Aktin-Zytoskelett verankert sind als auch an α -Catenin binden, eine entscheidende Rolle im Wnt-Signalweg (Gumbiner 1998; Gumbiner 2005).

1.3 Protocadherine

Die Protocadherine umfassen zur Zeit (Stand 2009) mehr als 70 Vertreter bei Vertebraten und stellen damit die größte Subfamilie innerhalb der Cadherinfamilie dar. Die Nomenklatur in der Literatur war zunächst nicht eindeutig, da bei ihrer Entdeckung Kohmura den Namen CNR (cadherin related neuronal receptor) verwendete, sich jedoch inzwischen die Bezeichnung Pcdh (Protocadherin) durchgesetzt hat. Bei der Einteilung korreliert die Nomenklatur mit der Reihenfolge der Entdeckung (Pcdh1 – 20), bzw. mit der Lokalisation (Pcdh α , β und γ).

Bei den Protocadherinen handelt es sich um trans-synaptische Erkennungsmoleküle, die in spezifischen Regionen des Gehirns exprimiert werden (Kohmura et al. 1998a; Q Wu et al. 2001; Q Wu & T Maniatis 2000). Kürzlich wurde entdeckt, dass eine gesteigerte Expression an ZNS-Synapsen stattfindet (Phillips et al. 2003; Esumi et al. 2005; Jontes & Phillips 2006). Man spricht ihnen eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung des Gehirns, speziell bei der Zellmigration und Positionierung zu und bei der Herstellung und Erhaltung neuronaler Verbindungen. Auf dem Chromosom 5q31 sind die humanen Protocadherine der Gruppen α , β und γ in drei großen Clustern Tandem-artig angeordnet. Jeder Cluster besteht aus 14-22 Protocadheringenen (Q Wu & T Maniatis 1999; Q Wu & T Maniatis 2000; Q Wu et al. 2001).

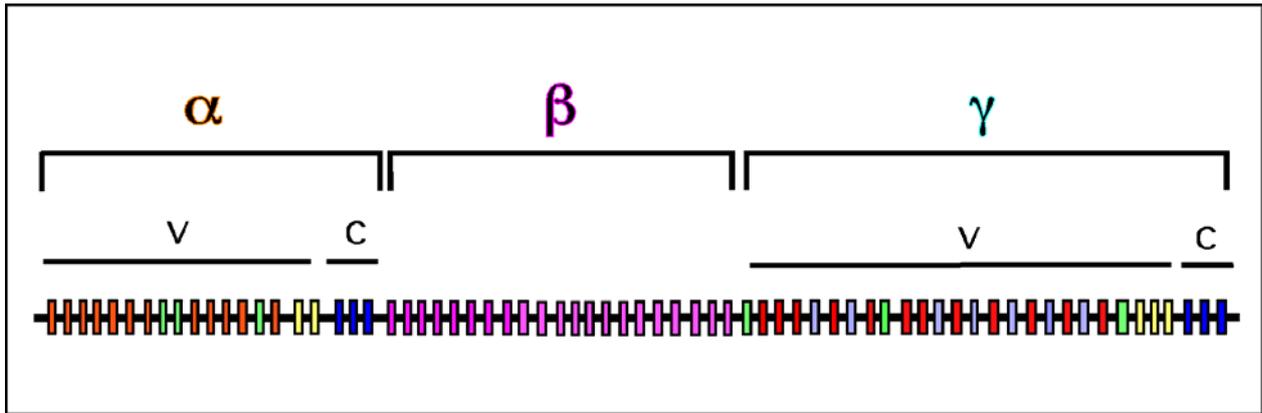


Abb. 1.3.1: Darstellung der tandemähnlichen Anordnung der murinen Protocadherin-Cluster α , β , und γ mit ihrer variablen (v) und konstanten (c) Regionen.

Cluster α und γ wurden bereits genauer charakterisiert; sie bestehen jeweils aus einer Region mit einer Vielzahl an variablen Exonen und einer Region mit drei konstanten Exonen (siehe Abb. 1.3.1). Die variablen Exone kodieren für ähnliche Cadherinrepeats enthaltende extrazelluläre Domäne, eine transmembranäre Region und für einen Teil der cytoplasmatischen Region.

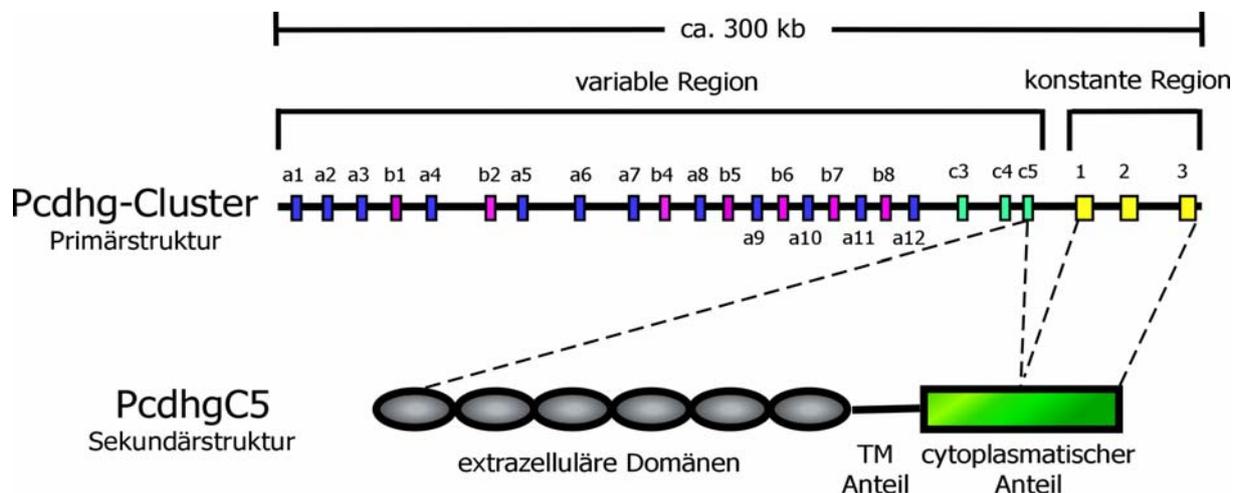


Abb. 1.3.2: Innerhalb des Pcdhg- γ -Clusters gibt es 22 ähnliche Exons, die jeweils für den extrazellulären und transmembranären Anteil (TM) und den N-Terminus des cytoplasmatischen Anteils kodieren. Am 3'-Ende des Clusters gibt es drei Exone, die für den C-Terminus des cytoplasmatischen Anteils des jeweiligen Protocadherins kodieren.

Die drei konstanten Exone kodieren den C-terminalen Anteil der cytoplasmatischen Region, die von allen Protocadherinen des jeweiligen Clusters geteilt wird. Die variable und konstante Region werden durch *cis-splicing* der mRNA durch einen Promoter 5' *upstream* jedes einzelnen variablen Protocadherin-Exons miteinander kombiniert (Tasic et al. 2002; X. Wang, Weiner et al. 2002; X. Wang, Su et al. 2002) (siehe Abb. 1.3.2).

Durch diesen Mechanismus können eine Vielzahl von Molekülen verschiedener Spezifität produziert werden, die durch die konstante cytoplasmatische Region immer an den gleichen intrazellulären Partner binden können.

Über das Adhäsionsverhalten der Protocadherine ist bekannt, dass extrazelluläre Domänen eine schwache homophile Adhäsion eingehen können. Die experimentelle Vorgehensweise basiert auf Adhäsionsversuchen mit klassischen Cadherinen. Eine direkte kalziumabhängige Zelladhäsion wurde für die verwandte Familie der μ -Protocadherine nachgewiesen (M Goldberg et al. 2000; Michael Goldberg et al. 2002). Bei Protocadherin 10 wurde ein homotypischer Zell-Zellkontakt in Zellkulturassays nachgewiesen, wenn transfizierte Zellen mit R-Cadherin exprimierenden Zellen vermischt wurden. Auffallend ist das Fehlen jeglicher Adhäsion bei Versuchen mit den Mitgliedern des Protocadherin- β -Clusters (Sago et al. 1995). Schwache Adhäsion konnte auch beim Protocadherin- γ -C3 gezeigt werden, die relevant verstärkt werden konnte durch den Einsatz eines chimären Moleküls, dessen cytoplasmatische Region durch die von E-Cadherin ersetzt worden war (Obata et al. 1995; Obata et al. 1998).

Bis dato konnten nur wenige Interaktionspartner der cytoplasmatischen Region der Protocadherine detektiert werden. An erster Stelle steht die Tyrosinkinase Fyn, die an den konstanten Teil der cytoplasmatischen Region der α -Protocadherine bindet (Kohmura et al. 1998b). Die α -Isoform des Proteins Phosphatase 1 bindet an die längste *splice*-Variante des Protocadherin 7 (PP1) (Yoshida et al. 1998; Yoshida et al. 1999; Yoshida & Sugano 1999). Der zuletzt gefundene Interaktionspartner ist die Phosphotyrosin-bindende Domäne des Adapterproteins *Disabled 1* (Dab1) (Homayouni et al. 2001), das an Protocadherin 18 bindet. Sowohl die Protocadherine als auch die genannten Interaktionspartner werden im hohen Maße im Gehirn exprimiert. PP1 wird zur Erhaltung der Synapsenform benötigt und Dab1 spielt eine essentielle Rolle im Reelin Signaltransduktionsweg (Benhayon et al. 2003; Homayouni et al. 2001; Senzaki

et al. 1999; Takei et al. 2001). Reelin wiederum ist Entscheidend für die korrekte Anordnung der Gehirnzellen in den entsprechenden Zellschichten bei der Entstehung des Neocortex. Weitere Experimente basieren zur Zeit auf der Annahme, dass α -Protocadherine sowohl zu heterophilen Interaktionen fähig sind, als auch bei Bedarf die Funktion eines Rezeptormoleküls übernehmen können. Diese Vermutung konnte jedoch in Bezug auf α -Protocadherin und Reelin noch nicht *in vivo* bestätigt werden. Klinische Bedeutsamkeit erlangen die Protocadherine bei Gendefekten. Ausfälle des Protocadherins 15 (β -Cluster) verursachen das Ames Waltzer hearing loss Syndrom, bei dem es zu Schwerhörigkeit kommt (Alagramam et al. 2001a; Z M Ahmed et al. 2001; Ball et al. 2003; Hampton et al. 2003). Ausfälle des Protocadherin 23 hingegen führen zum Usher-Syndrom, das sowohl mit Schwerhörigkeit, als auch Blindheit durch eine retina pigmentosa assoziiert ist (Z M Ahmed et al. 2001; Z M Ahmed et al. 2003; Zubair M Ahmed et al. 2003; K N Alagramam et al. 2001b; Ball et al. 2003; Ben-Yosef et al. 2003; Hampton et al. 2003). Weitere Untersuchungen zeigen eine mögliche Assoziation zwischen Gendefekten im Protocadherin 8 und Schizophrenie (Bray et al. 2002; Ross et al. 2003). Aktuell wird über die Protocadherine in ihrer Funktion als Adhäsionsproteine an Synapsen oder anderen Lokalisationen diskutiert (Jontes & Phillips 2006; Morishita & Takeshi Yagi 2007; X. Wang, Su et al. 2002), sowie über mögliche homophile Erkennungssignale zwischen Neuronen. Möglicherweise können einige Funktionen, die den Protocadherinen zugeordnet werden, möglicherweise über ein cytoplasmatisches Spaltprodukt, das zum Zellkern wandert, reguliert werden (Bonn et al. 2007; Haas et al. 2005).

1.4 Das Hefe-2-Hybriden System

Das Hefe-2-Hybriden System stellt innerhalb der Molekularbiologie eine effektive Methode zur Identifizierung spezifischer Protein-Protein-Interaktionen in eukaryotischen Zellen mittels genetischem Assay dar (Chien et al. 1991a; Fields & Song 1989; J. Meng et al. 2005). Der herausragende Vorteil dieser Methode gegenüber *in vitro* Methoden ist, dass die Proteine direkt in einem eukaryotischen System *in vivo* exprimiert und getestet werden.

1.4.1 Grundlagen

Das Hefe-2-Hybriden System (Y2H) dient der Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo*. Das Prinzip des Hefe-2-Hybriden-Systems beruht auf dem molekularen Aufbau eukaryotischer Transkriptionsfaktoren, die aus funktionell unabhängigen, trennbaren Domänen bestehen (Brent 1985; Brent & Ptashne 1985). Die DNA-Bindungsdomäne bindet spezifisch an die *upstream activation site* (UAS). Durch eine Aktivierungsdomäne, die mit Komponenten des basalen Transkriptionsfaktor-Komplexes interagiert, wird die Transkription durch den RNA-Polymerase II-Komplex gestartet (Keegan et al. 1986; Hope & Struhl 1986).

Trennt man die beiden Untereinheiten, Bindungs- (BD) und Aktivierungsdomäne (AD), molekularbiologisch voneinander, exprimiert sie aber als Proteine gemeinsam in einer Zelle, so findet keine Transkription des unter der spezifischen UAS Kontrolle stehenden Gens statt. Zwar bindet die DNA-Bindungsdomäne an ihre Zielsequenz, doch ohne Interaktion mit der DNA-Aktivierungsdomäne kann die räumliche Nähe zur UAS nicht geschaffen werden (Fields & Song 1989).

Werden beide Domänen jedoch durch Interaktion fusionierter Hybridproteine wieder in unmittelbarem räumlichen Kontakt gebracht, so ist die vollständige Aktivität des Transkriptionsfaktors wiederhergestellt (siehe Abb. 1.4.1).

Als Beispiel für eine starke Protein-Protein-Interaktion seien hier die Proteine des Simian Virus 40 (SV 40) genannt, das large Tumor(T) Protein und p53 (S. Chen & Paucha 1990; DeCaprio et al. 1988; Lane & Crawford 1979). Bei Koexpression der beiden Hybridproteine, SV 40 large T-Fragment als Fusionsprotein mit DNA-AD und p53 als Fusionsprotein mit DNA-BD, in einem Hefestamm wird die AD in räumlicher Nähe zur BD und zur UAS lokalisiert und kann somit ihre Funktion der Transkriptionsaktivierung ausüben.

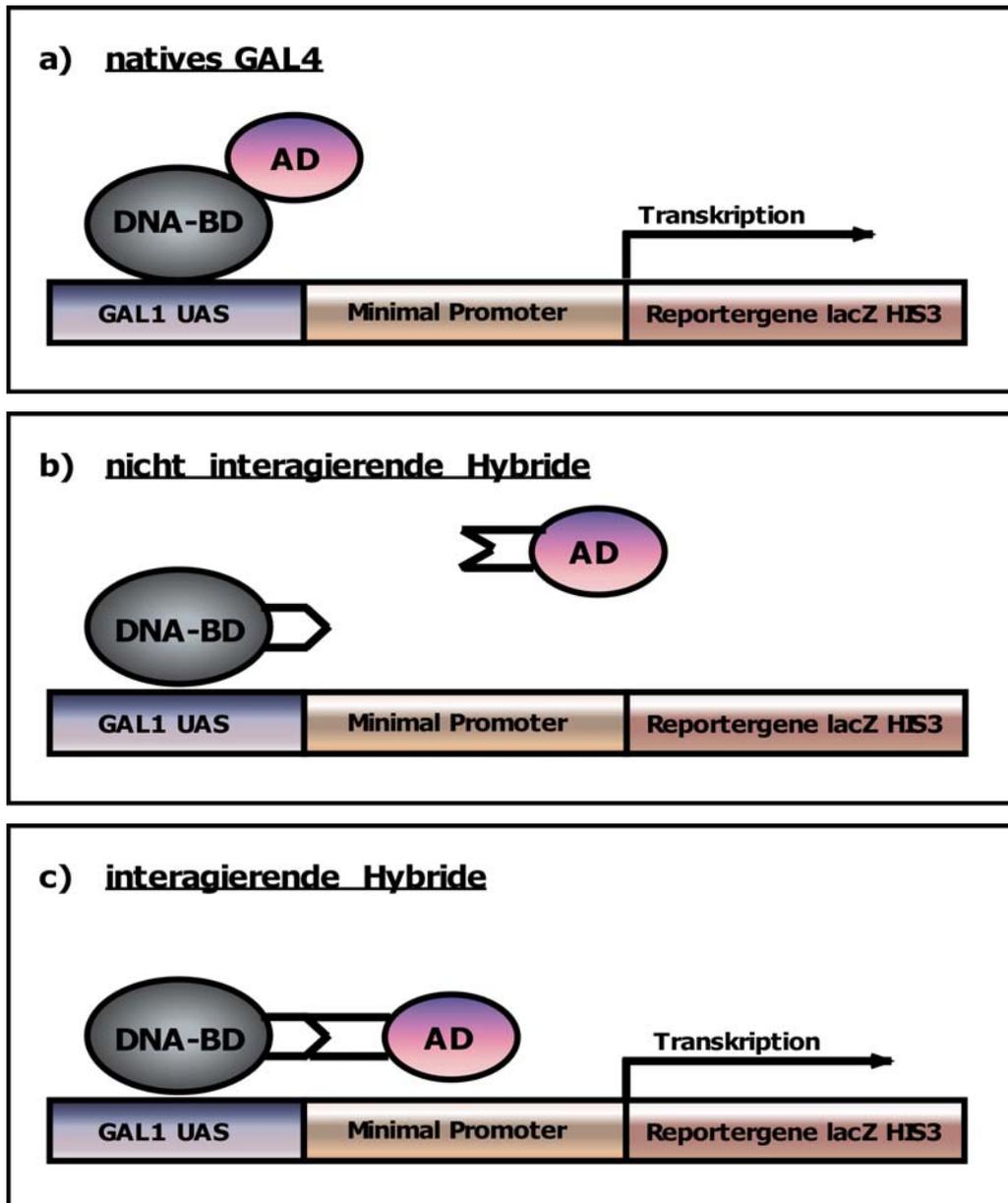


Abb. 1.4.1: Modell der Transkriptionsaktivierung durch Rekonstitution des Transkriptionsfaktors GAL4. a) natives GAL 4 Protein enthält DNA-BD und -AD, Transkription der Reportergene. b) Das Hybrid enthält entweder DNA-BD oder AD, keine Transkription. c) Protein-Protein Interaktion zwischen den beiden Hybriden bringt DNA-BD und AD in räumliche Nähe, erfolgreiche Transkription eines Reportergens. (verändert nach Fields & Song 1989).

Die am häufigsten eingesetzten Systeme benutzen die GAL4 oder LexA DNA-BD. Als Reportergene wurden in dieser Arbeit *HIS3* (Imidazolglyzerinphosphat-Dehydrogenase) und *ADE2* (Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase) verwendet, die an der

jeweiligen Aminosäure-Biosynthese beteiligt sind. Eine gezielte Wachstumsselektion von haploiden, auxotrophen Hefestämmen auf Mangelnährböden ist mit diesen Reporter genen möglich, da die Hefen nach erfolgreicher Transformation prototroph für die jeweiligen Aminosäuren sind.

Das Y2H System wird zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von Proteinen eingesetzt, deren biochemische Charakteristika und Struktur bekannt sind, um mögliche Interaktionen durch Deletion und Punktmutation *in vivo* im Y2H System qualitativ und quantitativ (β -Galactidase Assay) zu analysieren. So lassen sich Subdomänen eines Proteins und sogar kleine Aminosäuremotive, die für die Interaktion zweier Proteine essentiell sind, identifizieren. Auf diese Weise konnten z.B. die Bereiche für die Bindung von p53 an SV40 large T-Antigen im Y2H-System genau charakterisiert werden (Li & Fields 1993).

In Y2H-Screens zur Identifikation unbekannter Interaktionspartner wird das bekannte Zielprotein als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) eingesetzt, um daran bindende Proteine zu detektieren. Dabei wird eine cDNA-Bank aus dem gewünschten Gewebe oder Organismus mit der DNA-Aktivierungsdomäne (DNA-AD) fusioniert und mit dem Zielfusionsprotein koexprimiert. Mittels auxotropher Selektion können dann positive Klone auf Selektionsmedien identifiziert werden (Chien et al. 1991b; Fields & Sternglanz 1994). So wurde unter anderem die Interaktion von humanem Protocadherin 18 mit der Dab1 Phosphotyrosin Bindungsdomäne identifiziert, einem intrazellulären Adapterprotein, das Reelin reguliert (Homayouni et al. 2001).

1.4.2 Konstruktion einer murinen Gehirn-cDNA-Bank

In der vorliegenden Arbeit wird zum Screening eine cDNA-Bank aus murinem Gehirn hergestellt.

Die Konstruktion der Bank beruht auf dem Prinzip der homologen Rekombination in Hefe. Dazu werden an die cDNA 5' und 3' spezifische Sequenzanker angehängt (SMART III und CDS III), die in der Lage sind mit den gleichen Sequenzankern am

Zielvektor, in diesem Fall pGADT7-Rec (enthält DNA-AD), homolog in der Hefe zu rekombinieren.

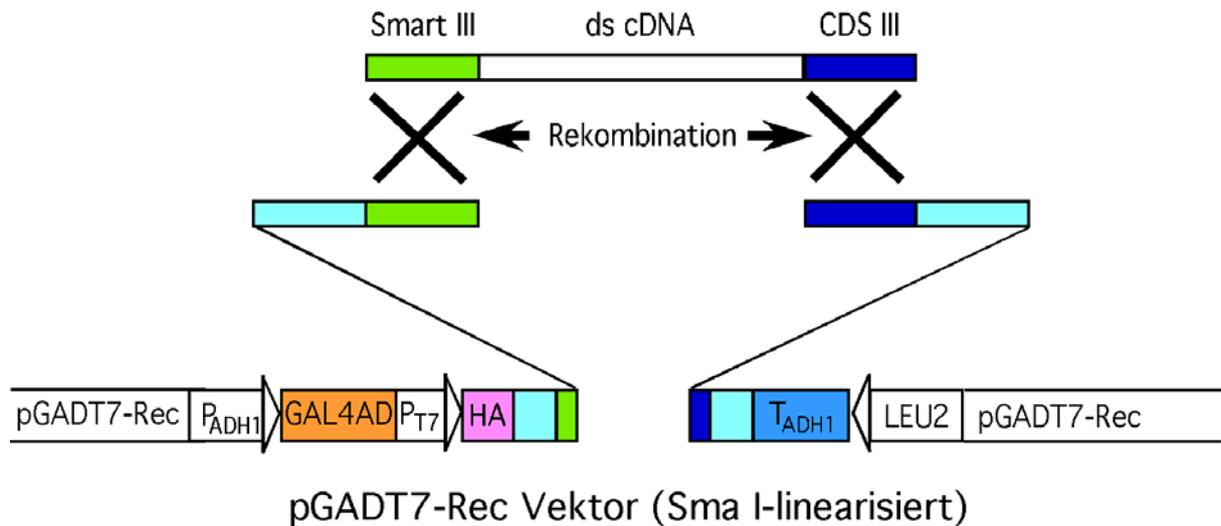


Abb. 1.4.2.: Konstruktion einer AD-Fusion cDNA-Bank durch homologe Rekombination in haploiden Hefestämmen (*Saccharomyces cerevisiae*). Die gewünschte cDNA wird mit dem Expressionsvektor pGADT7-Rec in Hefe kotransformiert. In der Hefezelle wird der linearisierte pGADT7-Rec Vektor mit der cDNA homolog rekombiniert und somit ein voll funktionsfähiger Expressionsvektor gebildet (nach Matchmaker, Clontech, Heidelberg).

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, bisher unbekannte intrazelluläre Interaktionspartner des konservierten cytoplasmatischen Anteils des Protocadherin γ -Clusters in Mausgehirn zu identifizieren. Dazu wurde eine Maushirn cDNA-Bank konstruiert und im Hefe-2-Hybriden Systems eingesetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Elektrophorese

Horizontal-Gelapparatur 30008 (Renner-Schauernheim); Horizontal-Gelapparatur Mini Sub-Cell (Bio-Rad, München); Mini Protean II System (Bio-Rad, München); Mini Trans blot (Bio-Rad, München); Netzgerät 200/2.0 (Bio-Rad, München); Sequenzierapparatur S2 (GIBCO/BRL, Eggenstein); Geldokumentationseinrichtung Gel Doc II (Biometra, Göttingen)

Bakterien- und -Hefekulturen

Brutschrank B 6060 (Heraeus-Christ, Hanau); Mikrobiologische Sicherheitswerkbank LaminAir[®] HBB2448 (Heraeus-Christ, Hanau); sterile Werkbank Gelaire[®] BSB 4A (Flow Laboratories, Meckenheim); Lichtmikroskop IM, invers (Zeiss, Oberkochen); Autoklav DS 202 (Webeco, Bad Schwartau); Warmluft-Rundschtüttler „Aerotron“ (Infors AG, Bottmingen, CH); Schüttelwasserbad (GFL, Burgwedel); Elektroporator Genepulser II/PulseController Plus/Capacitance Extender Plus (Bio-Rad, München)

Zentrifugen

Kühlzentrifuge RC 5C Plus mit SS34- und SLA 1500-Rotoren (Sorvall/Dupont, Bad Homburg); Tischzentrifuge 5415 (Eppendorf, Hamburg); Tischzentrifuge 5402, temperierbar (Eppendorf, Hamburg) Zellzentrifuge RT6000D (Sorvall/DuPont, Bad Homburg)

Sequenzierautomaten und Thermocycler

„DNA Sequencer 310“ und „DNA Sequencer 377“ (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt); Thermocycler „DNA Thermal Cycler 480“ (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt); Thermocycler „Trio Thermoblock“ (Biometra, Göttingen)

Sonstige Geräte

Fluoreszenzmikroskop „Axioplan“ (Zeiss, Oberkochen); UV-Photometer „Ultrospec 2000“ (Amersham/Pharmacia, Freiburg); Speed-Vac „Centrivac“ (Heraeus-Christ, Hanau); Ultra-Tiefkühltruhe U54285 (New Brunswick Scientific/Labotec, Göttingen); Multiplate Reader MRX (Dynatech, Guernsey, GB); Ultra Turrax T25 (IKA-Labortechnik/Janke und Kinkel, Staufen)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Reaktionsgefäße mit 0.5, 1.5 und 2 ml (Eppendorf, Hamburg; Greiner, Nürtingen)
- Dünnwandige PCR-Reaktionsgefäße 0.5 ml (Biozym, Hess. Oldendorf)
- Einwegpipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nümbrecht)
- Centri-Sep spin columns (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Multiwellplatten, 96 well, U-Bottom, 3077 (Falcon/Beckton-Dickinson, Heidelberg)
- Multiwellplatten, 6 well (Falcon/Beckton-Dickinson, Heidelberg)
- Sterilfilter, Minisart[®], Porengröße 0.2 µm (Sartorius, Göttingen)
- Sterilfilter, FP 030/2, Porengröße 0.45 µm (Schleicher & Schuell, Dassel)
- Rundfilter zur Mikrodialyse, Typ VS, Porengröße 0.025 µm (Millipore, Eschborn)
- Filterpapier Whatman[®] 3 MM (Whatman International Ltd., Maidstone, GB)
- Nitrocellulose-Membranen, Hybond C (Amersham/Pharmacia, Freiburg)
- Nylon-Membranen, Hybond-N (Amersham/Pharmacia, Freiburg)
- Nylon-Hybridisierungsnetz (Biometra, Göttingen)
- Röntgenfilm, X-OMAT[™] AR 5 (Kodak, Stuttgart)
- Farbdiafilm für Kunstlicht, Ektachrom 100 (Kodak, Stuttgart)

Sterile Einwegmaterialien wie Pipetten, Schraubdeckel-Röhrchen oder Platten und Schalen für die Bakterien- bzw. Hefekultur wurden von Falcon/Beckton-Dickinson (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) oder Greiner (Nürtingen) bezogen.

2.1.3 Reagenzien

- Acrylamid, RotiphoreseR Gel 30, 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
- Acrylamid, (29:1) und (19:1) für ABI-Sequenziergeräte (bio-Rad, München)
- Acrylamid „ready to use“ für Sequenziergele, Acryl-a-Mix 6 (Promega, Mannheim)
- Agarose, „Low melting“ (FMC Biozym, Hess. Oldendorf)
- Agarose NA (Amersham/Pharmacia, Freiburg)
- Agarose, SeaKem Gold (FMC Biozym, Hameln)
- Agarose, Ultra Pure (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Ammoniumpersulfat (Sigma-Aldrich, München)
- Ampicillin, Na-Salz (Sigma-Aldrich, München)
- Bacto-Trypton (Dico, Detroit, USA)
- BCA-Protein Assay Reagent (Pierce, Weiskirch)
- Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)
- BSA (bovines Serumalbumin; Sigma-Aldrich, München)
- Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, und dTTP; Amersham/Pharmacia, Freiburg)
- DMSO (Dimethylsulfoxid; serva, Heidelberg)
- ECLTM „Western blotting detection reagents“ (Amersham-Buchler, Braunschweig)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, München)
- Formamid (Sigma-Aldrich, München)
- D-Glucose (Merck, Darmstadt)
- Harnstoff (Sigma-Aldrich, München)
- Hefeextrakt (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- IPTG (Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid; Sigma-Aldrich, München)
- Kanamycinsulfat (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- N-Laurylsarkosin (Sigma-Aldrich, München)
- Levamisole (Sigma-Aldrich, München)
- Magermilchpulver (Nestlé, Frankfurt/M.)
- 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
- MOPS (3-[N-Phospholino]Propansulfonsäure; Sigma-Aldrich, München)
- Nukleotidtriphosphate (ATP, CTP, GTP, TTP; Boehringer/Roche, Mannheim)
- Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)
- Phenol, Tris-gepuffert auf pH 7,8 (Merck, Darmstadt)

- Ponceau S (Sigma-Aldrich, München)
- Proteinaseinhibitoren (Chymostatin, Leupeptin und Pepstatin A; Sigma-Aldrich, München)
- Repel-Silan (Amersham/Pharmacia, Freiburg)
- SDS (Sodium dodecylsulfat; Serva, Heidelberg)
- Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich, München)
- Sephadex G-25 (Amersham/Pharmacia, Freiburg)
- TEMED (N,N,N',N',-Tetramethyl-Ethylendiamin; Bio-Rad, München)
- Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethan; Merck, Darmstadt)
- Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurant; Sigma-Aldrich, München)
- X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galactosid; GIBCO/BRL, Eggenstein)

Alle anderen Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.4 Puffer und Medien

- PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,4 mM KH_2PO_4 ; 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7,4)
- PBS: PBS mit 0,1 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 0,132 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Biochrom, Berlin)
- TAE: 40 mM Tris/Essigsäure, pH 8,3; 1mM EDTA
- TBE: 100 mM Tris/HCl, pH 8,3; 83 mM Borsäure; 1 mM EDTA
- TBS: 25 mM Tris/HCl, pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl
- TE: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA
- LB-Medium: 1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl; pH 7,5 mit NaOH einstellen
- LB-Agar: 1,5% (w/v) Agar in LB-Medium
- SOC-Medium: 2% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl; vor Gebrauch mit 10 mM MgCl_2 und 20 mM Glucose versetzen

Spezielle Medien zur Hefekultivierung

- YPD-Medium: 1% Select Yeast Extract (Gibco BRL), 2% Bacto-Peptone (Difco Laboratories), 40% Glucose, pH 5,8

- SD (5x): Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories), pH 5,8

Synthetisches Minimal-Medium (SM): 5x SD, 40% Glucose, 10x Aminosäuren (Sigma-Aldrich, München) wie folgt:

L-Isoleucin	300	mg/l
L-Valin	1500	mg/l
L-Adeninhemisulfat	200	mg/l
L-Arginin HCl	200	mg/l
L-Histidin HCl Monohydrat	200	mg/l
L-Leucin	1000	mg/l
L-Lysin HCl	300	mg/l
L-Methionin	200	mg/l
L-Phenylalanin	500	mg/l
L-Threonin	2000	mg/l
L-Tryptophan	200	mg/l
L-Tyrosin	300	mg/l
L-Uracil	200	mg/l

DO- Supplemente: (Sigma-Aldrich, München)

-Histidin (His), -Leucin (Leu), -Tryptophan (Trp), -Adenin (Ade)

-Leu/-Trp, -His/-Leu/-Trp, -Ade/-His/-Leu/-Trp

2.1.5 Enzyme

- Alkalische Phosphatase (CIP = „calf intestine phosphatase“; Boehringer/Roche, Mannheim)
- T4 DNA-Ligase (GIBCO/BRL, Eggenstein oder NEB, Schwalbach, Taunus)
- *Taq* DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- *Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg)
- RNase A, DNase frei (QIAGEN, Hilden)
- Rnasin (Rnase-Inhibitor; MBI Fermentas, St.Leon-Rot)
- T3 und T7 RNA-Polymerase (Boehringer/Roche, Mannheim)
- SuperScript™ (Reverse Transcriptase; GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Lysozym (Sigma-Aldrich, München)
- Proteinase K (Merck, Darmstadt)

Restriktionsendonukleasen wurden von NEB (Schalbach/Taunus), Amersham/Pharmacia (Freiburg) oder Boehringer/Roche (Mannheim) bezogen.

2.1.6 Reaktionskits

- ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- ABI PRISM™ dRhondamin Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- ECL-Detection Kit (Amersham/Pharmacia, Freiburg)
- QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit (QIAGEN, Hilden)
- QIAQuick Plasmid Mini Kit (QIAGEN, Hilden)
- QIAQuick PCR Purifikation/Gel Extraktion/Nucleotide Removal Kit (QIAGEN, Hilden)
- TA Cloning® Kit (Invitrogen, Groningen, Holland)
- Topo TA Cloning® Kit (Invitrogen, Groningen, Holland)
- Topo blunt Cloning® Kit (Invitrogen, Groningen, Holland)
- T7-Sequencing Kit (Amersham/Pharmacia, Freiburg)

2.1.7 Bakterienstämme

- *E. coli* DH5 α (Life Technologies, Eggenstein)

Genotyp: supE44, Δ lac, U169, (ϕ 80, lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1

- *E. coli* Top10F' (Invitrogen, Groningen, Holland)

Genotyp: [F' lacIq, Tn10(tetR)], mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80, lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139 Δ (ara-leu)7679, galU, galK, rpsL(Str^R), endA1, nupG

2.1.8 Hefestämme

- *S. cerevisiae* AH109 ^{b,c} (Clontech, Heidelberg)

MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ ,

LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1

- *S. cerevisiae* Y187^c (Clontech, Heidelberg)

MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ ,

met⁻, gal80 Δ , URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1

2.1.9 Plasmide

- pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] (Invitrogen, Groningen, Holland)

- pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Groningen, Holland)

- pGBKT7, Bait-Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten (Clontech, Heidelberg, Heidelberg)

- pGADT7-Rec, Vektor zur Konstruktion einer cDNA-Bank (Clontech, Heidelberg, Heidelberg)

- pGAD424, Pray-Vektor zur Subklonierung eines PCR-Produktes für Vorversuche (Clontech, Heidelberg, Heidelberg)

- pGBKT7-53, Kontrollvektor (Clontech, Heidelberg, Heidelberg)

- pGBKT7-Lam, Kontrollvektor (Clontech, Heidelberg, Heidelberg)

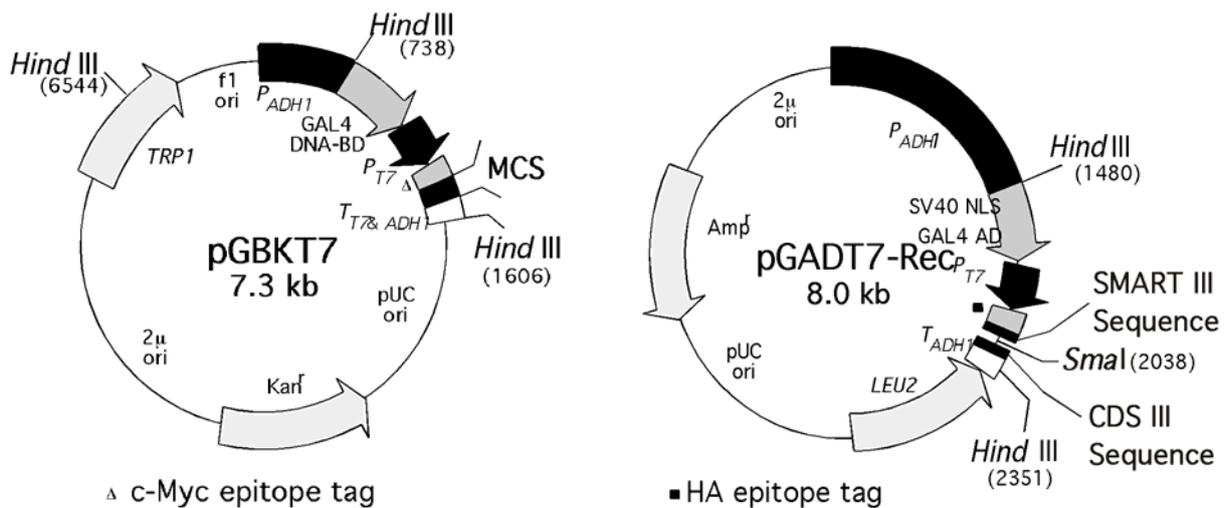


Abb. 2.1.9: Klonierungsvektoren pGBKT7 als Bait-Expressionsvektor und pGADT7 als Prey-Expressionsvektor (Clontech, Heidelberg)

2.1.10 Primer

PCDGC 5R 2951	5'- GCT CCT ACC AGT ATC CTG GGG TGA GCC CTG
PCDGC 5F 2027	5'- AAT CCA GTG ACT TCC TCA CAC ACC CTC CTG
C5FA	5'- CCG GAA TTC TCA GCT AAG TGT CTG CGG AGG
C5RB	5'- ACG CGT CGA CTT ACT GGC TCC GCT CCC GCA
C5FC	5'- CCG GAA TTC CAA GCC CCG CCC AAC ACT GAC
C5RD	5'- ACG CGT CGA CTT AGC CAG CGG CAT TGG TCA
CDS III	5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCGCCGACATG-d(T) ₃₀ -3'
SMART	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCC GGG-3'
5'-LD-PCR	5'-TTCCACCCAAGC AGTGGTATCAACGCAGAGTGG-3'
3'-LD-PCR	5'-GTATCGATGCCACCCCTCTAGAGGCCGAGGCCG CCGACA-3'
M13 forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
T7 Sequenzierprimer	5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3'
3'BD-DNA Seq-primer	5'-GACTCTTAGGTTTTAAAACGAAAA -3'

2.1.11 Antikörper

Primärantikörper

-monoklonaler GAL4 DNA-Bindungsdomänen-Antikörper (Clontech, Heidelberg)

Sekundärantikörper

- RAM, HRP-konjugiert (Dakopatts, Hamburg)

2.1.12 Größen-/Molekulargewichtsstandards für Nukleinsäuren und Proteine

- 100 bp DNA-Leiter (GIBCO/BRL, Eggenstein),

Fragmentgrößen (bp): 100, 200, 300, 400, 500, 600 (doppelte Menge), 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2072

- 1 kb DNA-Leiter (GIBCO/BRL, Eggenstein)

Fragmentgrößen (bp): 75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216

- RNA-Größenstandard (GIBCO/BRL, Eggenstein)

Fragmentgrößen (kb): 0,24; 1,35; 2,37; 4,40; 7,46; 9,49

- SDS-7B Protein-Molekulargewichtsstandard, gefärbt (Sigma-Aldrich, München)

Molekulare Massen (kD): 26, 36, 48, 58, 84, 116, 180

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Gesamt-RNA-Extraktion aus Gewebe

Die Extraktion von Gesamt-RNA, in diesem Fall aus murinem Gehirngewebe, erfolgt unter Verwendung von TRIZOL Reagenz (Gibco BRL, Eggenstein) laut Protokoll des Herstellers. Das Verfahren beruht auf einer Einstufen-Isolierung der RNA durch TRIZOL, einem sauren Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Gemisch. Nach der Präparation des Mausgehirns wird sofort das Organ gewogen, mit PBS umspült und nach Zugabe von TRIZOL (1ml pro 50-100 mg Gewebe) mit Hilfe eines Ultra Turrax-Homogenisators für 3-5 min homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten

bei Raumtemperatur wird Chloroform (0,2 ml pro ml TRIZOL) hinzugegeben und das Gemisch 10 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Von den drei Phasen, einer roten Protein-Phenolphase, einer DNA-haltigen Intermediärphase und der oberen wässrigen RNA-enthaltenden Phase, wird die RNA-Phase abpipettiert. Die RNA wird mit Ethanol gefällt und in DEPC-behandeltem ddH₂O resuspendiert und anschließend bei -80°C gelagert. Als längerfristige Lagerungsmethode wird die RNA als Ethanolpräzipitat bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2 Isolierung von poly(A)⁺-RNA

Die Isolation von poly(A)⁺-RNA erfolgt mittels einer QIAGEN Oligotex-Suspension nach Protokoll des Herstellers. Das Prinzip beruht auf der Basenpaarung von mRNA mit poly-Adenosin Sequenzen an Oligo-Thymidin, die an Latexpartikel gebunden sind. Die Abtrennung der gebundenen mRNA erfolgt über eine sterile Miniatursäule mit Fritte (Spin Column Protokoll, QIAGEN) durch Zentrifugation. Die erhaltene RNA wird einer Ethanolfällung unterzogen und wie Gesamt-RNA gelagert.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von Gesamt-RNA im denaturierenden Formaldehydgel

Um sowohl die Qualität als auch die Quantität der isolierten RNA abzuschätzen, werden RNA-Moleküle in einem denaturierenden Formaldehydgel der Größe nach aufgetrennt.

Formaldehydagarosegel

Als Erstes werden 10 ml 10x MOPS-Puffer (10x MOPS-Puffer: 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7 mit NaOH eingestellt) und 1,5 g Agarose in 85 ml ddH₂O unter Erhitzen aufgelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C werden 5 ml 37% Formaldehyd dazugegeben und das Gel in vorgesehenen Kammern unter dem Abzug gegossen.

RNA-Vorbereitung

Nach diesem Verfahren werden sowohl die RNA-Proben als auch der RNA-Größenstandard (Gibco, BRL) behandelt.

Es werden jeweils die gleiche RNA-Ausgangsmengen je Probe eingesetzt. Bis zu 35 µg Gesamt-RNA in DEPC-Wasser werden mit 10 µl deionisiertem Formamid, 4 ml 37% Formaldehyd, 3 µl 10 MOPS-Puffer und 1 µl Ethidiumbromid (500mg/ml) versetzt. Zur vollständigen Denaturierung der Proben werden diese 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis schockgekühlt. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel werden noch 3 µl RNA-Auftragspuffer (DEPC-behandeltes, autoklaviertes Wasser mit 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol FF und 70% (v/v) Glycerin) dazugegeben. Das Gesamtvolumen wird in eine Geltasche des Formaldehydagarosegels pipettiert und eine Spannung von 8 Volt/cm für ca. 2 Stunden unter einem Abzug angelegt. Als Laufpuffer eine 1x MOPS Lösung verwendet. Wenn die Farbfront 2/3 der Laufstrecke im Gel erreicht hat, wird zur Detektion der RNA diese unter UV-Licht betrachtet und bei Bedarf photographiert.

2.2.4 Reverse Transkription von RNA

Zur reversen Transkription von RNA wird SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase verwendet.

Der Reaktionsansatz zur Erzeugung der Erststrang-cDNA setzt sich wie folgt zusammen:

	1	µl	eines spezifischen Primers (500µg/ml)
	2	µg	Gesamt-RNA
	1	µl	10 mM dNTP-Mix (10mM je dATP, dGTP, dCTP, und dTTP)
ad	12	µl	steriles, destilliertes Wasser

Das Gemisch wird 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.

Als nächstes wird hinzugefügt:

1	µl	RNaseOUT Recombinat Ribonuclease Inhibitor (40 units/µl)
4	µl	5X First-Strand Puffer
2	µl	0.1 M DTT

Das Gemisch wird bei 42°C für 2 min inkubiert. Anschließend gibt man 1 µl (200 Units) SuperScript II hinzu und inkubiert 50 min bei 42°C.

Zur Inaktivierung der reversen Transkription wird der Ansatz bei 70°C 15 min erhitzt. Die entstandene cDNA kann nun mittels PCR amplifiziert werden. Um die zur cDNA komplementäre RNA zu entfernen gibt man 1µl (2 Units) *E.coli* RNase H hinzu und inkubiert 20 min bei 37°C.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Amplifikation von gewünschten DNA-Fragmenten. Der hier eingesetzte Standard PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen (Abweichungen werden separat beschrieben):

	1	µl	Template DNA (20 ng)
	1	µl	Primer 1 (10 µM)
	1	µl	Primer 2 (10 µM)
	2	µl	Reaktionspuffer mit 15 mM MgCl ₂
	2	µl	Nukleotide, 10 mM (jedes Nukleotid)
ad	20	µl	Wasser

Standardreaktionsbedingungen:

Prä-Zyklus	Initiales Aufschmelzen der DNA	90 s 95°C
Zyklus	Aufschmelzen	30 s 95°C
	Primer-Hybridisierung („Annealing“)	20 s AT (Annealing-Temperatur)
	Elongation	EZ (Elongationszeit) 72°C
Post-Zyklus	Finale Elongation	2 min 72°C
	Kühlen	ohne Limitierung 4°C

PCR (1) für cDNA nach Reverser Transkription (RT)

Template	cDNA nach RT
Primer 1	PCDGC 5R 2951 5'- GCT CCT ACC AGT ATC CTG GGG TGA GCC CTG
Primer 2	PCDGC 5F 2027 5'- AAT CCA GTG ACT TCC TCA CAC ACC CTC CTG
Reaktionsbedingungen	25 Zyklen mit AT = 61°C und EZ = 2 min

PCR (2) Amplifikation der DNA-Fragmente AB/CD/AD

Template	PCDG C5 (bp 2027-2951) im pCR [®] - Blunt II-TOPO – Vektor
Primer 1	C5FA 5'- CCG GAA TTC TCA GCT AAG TGT CTG CGG AGG
Primer 2	C5RB 5'- ACG CGT CGA CTT ACT GGC TCC GCT CCC GCA
Primer 3	C5FC 5'- CCG GAA TTC CAA GCC CCG CCC AAC ACT GAC
Primer 4	C5RD 5'- ACG CGT CGA CTT AGC CAG CGG CAT TGG TCA
Reaktionsbedingungen	30 Zyklen mit AT = 72°C und EZ = 72°C

2.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird eingesetzt, um Reinheit, Fragmentgröße oder Konzentration einer DNA-Lösung zu überprüfen (analytisch) oder um gezielt DNA-Fragmente zu isolieren und sie dadurch von unerwünschter DNA zu reinigen (präparativ). Die Agarose wird in 1x TAE-Puffer unter mehrmaligem Aufkochen gelöst und Ethidiumbromid nach Abkühlen auf etwa 50°C zugesetzt.

Analytisches Agarosegel:

Je nach DNA-Fragmentgröße werden 0,75 bis 2%-ige Agarosegele mit Probenaschen hergestellt. Die DNA-Proben werden mit 1/4 Volumen Probenpuffer (100 mM EDTA; 4x TAE; 50% Glycerin; 0,1% Bromphenolblau) versetzt und zusammen mit einem geeigneten Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter

Spannung (80-100V) in 1x TAE-Puffer. Durch Interkalation des zugesetzten Ethidiumbromids (10 mg/ml Ethidiumbromid in TAE) kann die DNA mittels UV-Licht (312 nm) detektiert und dokumentiert werden.

Präparatives Agarosegel:

Die präparative Gelelektrophorese erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die analytische Gelelektrophorese. Allerdings wird hierbei eine „low melting point“ Agarose verwendet um die Weiterverarbeitung zu erleichtern. Die gewünschten DNA-Fragmente werden mit einem Skalpell unter langwelligem UV-Licht (366 nm) herausgetrennt und aus dem Gel isoliert (siehe Kapitel 2.2.7).

2.2.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach Isolation der gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel, werden diese gewogen und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.8 DNA-Aufreinigung

Ethanolpräzipitation von DNA

Die DNA-Lösung wird mit 1/10 ihres Volumens 3M Natriumacetatlösung, pH 4,8 versetzt, das 2,5-fache Volumen gekühltes Ethanol (100%) zugegeben und bei 14000 rpm 4°C für 30 min in einer Eppendorf Zentrifuge zentrifugiert, das Pellet mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und das Ethanol vollständig verworfen. Das Pellet wird dann in 20µl sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen.

Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Der Phenol/Chloroformlösung (1:1) werden 4-5 Kristalle 8-Hydroxychinolin zugesetzt. Dadurch färbt sich die Lösung schwach gelb. Bei Umschlagen der Indikatorfarbe nach rot sollte die Lösung nicht mehr verwendet werden. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

DNA-Lösung mit dem selben Volumen Phenol/Chloroform-Lösung (1:1) versetzen, 1 min vortexen, 2 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Heraeus) zentrifugieren

und die wäßrige obere Phase in ein neues Gefäß überführen. Dabei ist darauf zu achten, dass weder organische noch Interphase mitgenommen werden.

Reinigung von PCR-Produkten

Zur Weiterverarbeitung von Produkten nach einer Polymerasenkettenreaktion müssen diese von verwendeten Oligonukleotiden und Enzymen getrennt werden.

Dazu wird hier ein PCR-Purification-Kit („QIAquick PCR-Purification-Kit“, QIAGEN, Hilden), Durchführung laut Herstellerangaben, verwendet. Das Prinzip beruht auf der Bindung der DNA an eine Silica-Matrix in Miniatursäulchen. Diese Methode kann auch als Alternative zur Phenol/Chloroform Extraktion verwendet werden.

2.2.9 Restriktionsendonuklease-Verdau von DNA

Bei einem Restriktionsverdau werden im allgemeinen 10 µl doppelsträngige Plasmid-DNA aus einem Mini-Prep eingesetzt.

Restriktionsansätze setzen sich wie folgt zusammen:

	3	µl	10x Restriktionspuffer
	10	µl	DNA aus Mini-Prep
	1-2	µl	Restriktionsenzym (0.5-1 Unit pro µ DNA)
ad	20	µl	Wasser

Danach wird das Gemisch bei 37°C oder Raumtemperatur, je nach Enzym, 1 h lang in einem temperierten Heizblock inkubiert. Der Ansatz wird mit 3 µl DNA-Probenpuffer gemischt und zur Überprüfung mit einem Agarosegel aufgetrennt, das 0,1 µg/ml Ethidiumbromid enthält. Die Konzentration des Agarosegels (0,75-2,0%) richtet sich nach der Größe der zu untersuchenden Fragmente. Zur Detektion der gewünschten Banden wird das Gel unter UV-Licht betrachtet und Banden aus dem Gel mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten und laut Protokoll zur DNA-Gelextraktion weiter verarbeitet.

2.2.10 5'-Dephosphorylierung von DNA

Um bei Klonierungen mit einem blunt end Vektor die Religation zu verhindern, kann man das 5' Ende des Vektors dephosphorylieren. Dazu verwendet man CIP (calf intestine phosphatase; Roche/Boehringer Mannheim, Mannheim). Der präparative Reaktionsansatz wird mit 0,1 Volumenanteil 10x Dephosphorylasepuffer und 2 Units CIP versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wird das Enzym durch Inkubation bei 80°C für 20 min inaktiviert.

2.2.11 Ligation von DNA

Zur Ligation von Restriktionsfragmenten werden Restriktionsfragment und Vektor in einem Verhältnis von 2:1 zu einem Endvolumen von 10µl vereinigt. Die Ligation erfolgt entweder für 12 h bei 16°C mit 7,5 Units T4 DNA-Ligase (Amersham/Pharmacia, Freiburg) oder für 2 h bei 24 °C mit 3 Units hochkonzentrierter T4-Ligase (Gibco BRL). Um optimale Ligationsbedingungen zu erhalten, wird dem Ligationsansatz eine 10x Pufferstammlösung laut Angaben des Herstellers hinzugefügt.

Bei der Ligation von Taq-Polymerase PCR-Produkten nutzt man die Begebenheit, dass diese Polymerase ein einzelnes Desoxyadenosin am 3'-Ende anhängt. Diese Eigenschaft macht sich das TA-Klonierungsprinzip zunutze (z.B. TA Cloning Kit, Invitrogen). Die Enden des geöffneten Plasmidvektors sind mit Mono-Desoxythymidin-Überhängen versehen und Paaren sich mit den Überhängen des PCR-Produktes. Die weiteren Ligationsschritte erfolgen wie vorher beschrieben.

2.2.12 *E.coli*-Transformation

Chemische Transformation mit Hitzeschock

Die als Standardtransformation geltende Methode dient zur Transformation von geschlossenen Plasmiden und wurde unter anderem von Hanahan beschrieben (Hanahan 1983). Hierbei handelt es sich um käuflich erworbene (*E. coli* Top 10F, Invitrogen) oder um selbst kompetent gemachte (*E. coli*, DH5α) Bakterien.

Zunächst werden die Zellen auf Eis aufgetaut, jegliches Zentrifugieren oder Auf- und Abpipettieren sollte unterlassen werden, um die Zellen nicht zu zerstören. Als nächstes wird den Zellen die zu transformierende DNA hinzugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der daraufhin erfolgende 2 minütige Hitzeschock bei 42 °C wird durch sofortiges Abkühlen in einem Eisbad bis zur Raumtemperatur beendet. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium werden die Bakterien unter Schütteln 1 h bei 37°C inkubiert. Schließlich werden die transformierten Bakterien auf LB-Platten mit dem gewünschten Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen. Die Antibiotika werden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin 100 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml. Die LB-Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Elektroporation

Bei der Elektroporation wird ein Aliquot elektrokompetenter Bakterien (40 µl) auf Eis aufgetaut, mit 1-2 µl (abhängig vom Salzgehalt) des Ligationsansatzes versetzt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (0,1 cm) überführt. Ziel ist es, durch einen elektrischen Impuls eine Reorganisation der Bakterienmembran auszulösen und somit der DNA zu ermöglichen in das Zellinnere zu gelangen. Die Küvette wird in die Pulschamber des Gerätes (Genpulsar II, Biorad, München) eingesetzt und einer Spannung von 1,8 kV ausgesetzt. Danach werden die Bakterien in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 500 µl SOC-Medium versetzt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 1 h im Heizblock. Zuletzt wird der Transformationsansatz auf LB-Platten mit dem gewünschten Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert

2.2.13 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen

Mit 4 ml einer Bakterien-Übernachtskultur werden 800 ml LB-Medium (ohne NaCl hergestellt) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Inkubation wird fortgeführt, bis eine Absorption von 0,5-0,6 bei einer Wellenlänge von 620 nm erreicht wird. Die nächsten Schritte müssen vollständig auf Eis erfolgen. Die Zellsuspension wird 30 min auf Eis gekühlt und dann bei 4000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die sedimentierten Zellen werden mit gekühltem Wasser zum Waschen erneut zentrifugiert. Im nächsten Waschschrift werden die Zellen in 20 ml

10% Glycerin aufgenommen, abzentrifugiert und das Volumen auf 1 ml 10% Glycerin reduziert. Die elektrokompenten Bakterien werden in 40 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.14 DNA-Isolation aus Bakterien

Plasmid-DNA Minipräparation mit QIAGEN-Miniatursäulen

Zur Isolation von Plasmid-DNA nach einer Bakterientransformation wird eine 1,5 ml Übernachtskultur der gewünschten Kolonie angesetzt. Der Zellaufschluss erfolgt durch alkalische Lyse. Ziel ist es, die Plasmid-DNA an die Silica-Matrix einer Miniatursäule zu binden. Dazu werden den transformierten Zellen der Übernachtskultur die Kit-Komponenten zugegeben, um Proteine, genomische DNA und Zelldebris zu entfernen. Nach einem Waschschrift mit einem ethanolhaltigen Puffer kann die Plasmid-DNA (maximal 10 µg) eluiert werden. Alle Lösungen, sowie Säulen, sind im Kit enthalten und werden laut Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.15 Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden

Zur Sequenzierung mit Didesoxynukleotiden wird „Big Dye“ von Applied Biosystem (PE, Weiterstadt) eingesetzt. Der Standardsequenzieransatz setzt sich wie folgt zusammen:

0,5 - 1 µg	Plasmid-DNA (in 4 µl enthalten)
1 µl	Sequenzierprimer (10µM)
4 µl	Big Dye Ready Reaction Mix
1 µl	ddH ₂ O

Das „Cycle Sequencing“ wird am Thermal-Cycler 480 durchgeführt:

2 min 94°C
 25 x (30 sec 95°C; 20 sec 50°C; 4 min 60 °C)
 Kühlen auf 4°C

Nach der PCR werden die Sequenzierprodukte über Centri-Sep Säulen mit Sephadex G50 (Sigma-Aldrich, München) gereinigt, um nicht inkorporierte Nukleotide und Primer abzutrennen. Die Analyse erfolgt am Kapillarsequenzierer von Applied Biosystems/Perkin Elmer (ABI 310). Die erhaltenen Sequenzen werden mit den Programmen Tetra Analyze und Tetra Complign Software (Mac Molly) ausgewertet.

2.2.16 Kolonie-PCR

Durch PCR wurden aus Klonierungsexperimenten hervorgegangene Klone analysiert. Dabei wurden die Bakterienkolonien in 20 µl ddH₂O resuspendiert und als Matrize direkt in einer PCR-Reaktion verwendet. Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen der Standard-PCR unter Verwendung von Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase. Für die Kolonie-PCR mit Hefesuspension wurden folgende Mengen eingesetzt: 5 µl Hefesuspension; 3 µl 10 x PCR-Puffer; 1,2 µl MgSO₄ (50 mM); je 0,6 µl Vorwärts-Primer (10 µM), Rückwärts-Primer (10 µM); 0,6 µl dNTPs (10 mM) und 0,2 µl Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase auf 30 µl mit ddH₂O aufgefüllt.

2.3 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.3.1 Herstellung von Protein-Lysaten aus Hefekulturen

Eine Übernachtskultur der gewünschten Hefekolonie (Ø 2-3mm) wird in 5 ml flüssigem Selektionsmedium bei 30°C in einem Schüttelinkubator inkubiert.

Nach 20-24 h werden 3 ml der Kultur 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird mit ddH₂O gewaschen, abzentrifugiert und anschließend in 0,05% Triton X-100 in PBS resuspendiert. Die Zellen werden mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat wird 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen in ein neues Gefäß zur sofortigen Weiterverarbeitung überführt.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgt nach der modifizierten Lowry-Methode (Lowry *et al.*, 1951; Smith *et al.*, 1985). Hierbei handelt es sich um die Bicinchoninsäuremethode (BCA). Es werden fertige BCA-Protein-Assay-Reagenzien (Pierce, Weisskirchen) in Mikrotiterplatten verwendet. 10 µl der gewünschten Proteinlösung werden mit 200 µl des BCA-Reagenzes versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wird die Proteinkonzentration bei 570 nm im Photometer gemessen. Das Prinzip beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ im alkalischen Milieu und einer violetten Komplexbildung mit Bicinchoninsäure. Eine Kalibrierung des Gerätes erfolgt bei jeder Messung durch einen mitgeführten BSA-Proteinstandard.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen erfolgt nach der SDS-PAGE-Methode nach Laemmli (Laemmli 1970).

Zusammensetzung der SDS-Gele:

	Sammelgel	Trenngel
Konzentration	3 %	12,5 %
Acrylamid (30%)	1,7 ml	8,3 ml
Bisacrylamid (2%)	0,7 ml	1,0 ml
1 M Tris-HCl (pH 8,7)	1,25 ml	7,5 ml
Dest. Wasser	6,3 ml	3,0 ml
SDS (10%)	100µl	100µl
APS (10%)	50µl	70µl
TEMED	17µl	25µl

Zunächst wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen, auf dessen Oberkante noch vor der Polymerisation etwas Isopropanol gegeben wird, um die Polymerisation unter Ausschluß von Luftsauerstoff zu gewährleisten. Ist das Trenngel polymerisiert, wird das Isopropanol entfernt, das Sammelgel (0,5-1,0 cm lang)

gegossen und ein Teflonkamm zwischen die Gasplatten geschoben. Die Proteinlösungen werden nun mit 1/3 Volumen 4x-Laemmli-Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 3% (w/v) SDS, 5% (w/v) 2-Mercaptoethanol, 10% (w/v) Glycerin, 0,025 mg/ml Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 96°C erhitzt. Nach kurzem Zentrifugieren wird eine definierte Proteinmenge pro Geltasche eingesetzt. Die Trennung der Proteine erfolgt über 1 h bei 40 mA.

2.3.4 Coomassiefärbung von Proteinen

Um Proteine im Polyacrylamidgel zu detektieren, inkubiert man das Gel 30 min in Färbelösung bei Raumtemperatur. Danach wird das Gel im Entfärber gewaschen, bis sich nur noch die Proteinspur farblich darstellt.

Färbelösung: 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,025% Coomassie brilliant blue R250

Entfärber: 10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

2.3.5 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Zuerst werden sechs Blatt Whatman 3 mm Filterpapier und eine Nitrocellulose-Membran auf Gelgröße zugeschnitten und in Blotpuffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 10% (v/v) Methanol) eingeweicht. Die Blotkammer wird wie folgt geschichtet: 3 Blatt Filterpapier, dann die Membran blasenfrei auflegen. Nach Abtrennen der Taschen wird nun das Proteingel auf die Membran gelegt, sowie 3 weitere Blatt Filterpapier. Die Apparatur wird geschlossen und 1 h bei 400 mA geblottet.

2.3.6 Ponceau-Färbung von Proteinen

Nach dem Blotten wird die Membran in Ponceau S-Lösung (0,2% (w/v) in 0,3% Trichloressigsäure) gefärbt und die Ergebnisse dokumentiert. Die Färbung der Proteine verblasst durch das Waschen in TBS (siehe Kapitel 2.1.4)

Immunfärbung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die Membran wird dreimal je 5 min mit TBST-Puffer (0,05% (w/v) Tween 20 in TBS, pH 7,3) gewaschen. Um unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper mit der Membran zu verhindern, wird sie 1 h in Blockierungspuffer (BLOTTO, 5% Milchpulver in TBST) geschwenkt. Daraufhin erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper für mindestens 1 h (auch über Nacht möglich) bei Raumtemperatur. Die Antikörperkonzentration richtet sich nach Angaben des Herstellers. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5-10 min in TBST erfolgt die Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Antikörper werden wiederum in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung im Blockierungspuffer eingesetzt und 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Danach wird die Membran erneut dreimal jeweils 5 min in TBST gewaschen und anschließend eine ECL Entwicklung angeschlossen. Dabei werden 4-8 ml des ECLTM-Reagenzes für 1 min über die Membran gegeben, die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Membran in eine Filmkassette mit Röntgenfilm gelegt. Die Exposition des Röntgenfilms dauert zwischen 5 s und 30 min.

2.4 Das Hefe-2-Hybriden-System

2.4.1 Transformation von Hefen (small scale transformation)

Die Transformation von Hefe erfolgt nach der Lithiumacetat-Methode (Ito et al. 1983), modifiziert durch Schiestl und Gietz (Gietz & Robert H Schiestl 2007; R H Schiestl & Gietz 1989) und Hill (Hill et al. 1991). Dazu werden 25 ml YPD mit Hefezellen einer einzelnen Kolonie angeimpft und 14-24 h bei 30°C im Schüttelinkubator (250 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ > 1 inkubiert. Dann werden 150 ml YPD mit der Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ nicht größer als 0,2 angeimpft. Die Kultur wird wieder unter den gleichen Bedingungen inkubiert bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 (Dauer ca. 3-6 h, je nach Hefestamm). Die Zellen werden bei 1000x g (Beckmann JA-10: 2300 rpm) abzentrifugiert, mit sterilem Wasser gewaschen und das Pellet in 750 µl 1x TE/LiAc resuspendiert. Anschließend vermischt man 1 µl der gewünschten Miniprep-DNA (ca. 250 ng), 50 µg Lachssperma-DNA als Träger-DNA und 50 µl der kompetenten Hefe.

Man fügt nun 300 µl steriles PEG/TE/LiAc hinzu und inkubiert 30 min bei 30°C in einem Schüttelthermoblock. Nach Zugabe von 35 µl DMSO erfolgt ein 15 minütiger Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen werden dann sofort auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 250 µl sterilem Wasser aufgenommen und anschließend auf dem gewünschten Selektionsmedium ausplattiert.

2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Eine Übernachtskultur der gewünschten Hefekolonie (ø 2-3 mm) wird in 5 ml flüssigem Selektionsmedium bei 30°C in einem Schüttelinkubator angesetzt.

Nach 20-24 h werden 3 ml der Kultur bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. In der verbleibenden Flüssigkeit wird das Pellet durch vortexen resuspendiert, 200 µl Hefe-Lysis-Lösung (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100) hinzugefügt, 200 µl Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) und 300 mg "acid washed glassbeads" (Sigma-Aldrich, München) hinzugegeben und wiederum 2 min bei höchster Stufe gevortext. Das Gemisch wird 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand (200-220 µl) in ein neues Gefäß überführt. Danach folgt eine Natriumacetat-Ethanol-Fällung wie in 2.2.8 beschrieben und eine Transformation in *E. coli* durch Elektroporation (2.2.12).

2.4.3 Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA aus Hefen

Da bei der Plasmid-DNA-Isolierung aus Hefen bloß sehr geringe Mengen an DNA erhalten werden, wird hier zur suffizienten Transformation in *E. coli* die Elektroporation (wie in 2.2.12 beschrieben) verwendet.

2.4.4 Konstruktion einer cDNA-Bank aus murinem Gehirn

Das Prinzip der Konstruktion einer cDNA-Bank in Hefezellen beruht auf der homologen Rekombination *in vivo* nach Kotransformation von cDNA und einem Rekombinationsvektor.

Als Material wird das Matchmaker Library Construction Kit (Clontech, Heidelberg) verwendet.

Zuerst wird zur Synthese der Einzelstrang-cDNA der Primer CDS III eingesetzt, ein Oligo d(T) Primer welcher den ersten Überhang an der cDNA für die spätere homologe Rekombination in den AD-Vektor pGADT7-Rec bildet. Am Ende der Erststrangsynthese bildet der CDS III Primer eine d(C) Sequenz, an die wiederum der zweite Primer SMART III mit einer d(G) Sequenz anlagern kann und die Doppelstrang-Synthese der cDNA komplettiert (siehe Abb. 3.2.2.1).

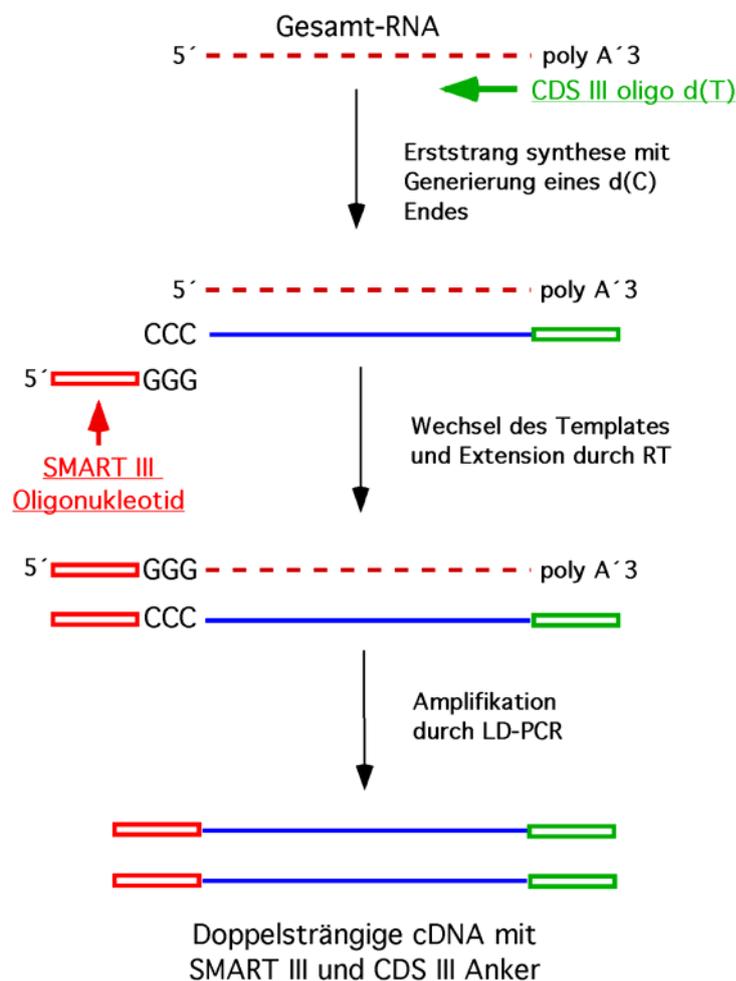


Abb. 3.2.2.1: Das Schema zeigt das Prinzip der cDNA-Synthese zur homologen Rekombination in den pGADT7-der auch über den SMART III und CDS III Anker verfügt (Matchmaker, Clontech, Heidelberg).

Synthese einer Erststrang-cDNA mit Oligo d(T)-Primern

Der Ansatz sieht wie folgt aus:

	1-2 μ l	RNA (0,1-2,0 μ g Gesamt-RNA)
	1,0 μ l	CDS III Primer (10 μ M) 5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T) ₃₀ -3'
ad	4,0 μ l	ddH ₂ O

Der Inhalt wird vermischt und 2 min bei 72°C im Heizblock inkubiert, anschließend wird das Reaktionsgemisch 2 min auf Eis abgekühlt und Folgendes zum Gemisch hinzugefügt:

	2,2 μ l	5x First-Strand Buffer
	1,0 μ l	DTT (20 mM)
	1,0 μ l	dNTP Mix (10mM)
	1,0 μ l	RNase I (5 units/ml)
	<u>1,0 μl</u>	<u>PowerScript Reverse Transkriptase</u>
	10,2 μ l	Gesamtvolumen

Wiederum wird der Inhalt durch leichtes Schütteln vermischt und dann 10 min bei 42°C inkubiert. Dann gibt man

	1,0 μ l	SMART Oligonukleotide (10 μ M) 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGG-3'
--	-------------	---

hinzu und inkubiert 1 h bei 42°C, gefolgt von 10 min bei 75°C um die Erststrang-Synthese zu beenden. Das Gemisch wird auf Raumtemperatur abgekühlt, bevor man 1 μ l (2 units) RNase H hinzugibt und 20 min bei 37°C inkubiert.

Die doppelsträngige cDNA wird mittels *Long distance* PCR (LD-PCR) und den Primern 5'PCR und 3'PCR, die sich an die SMART III und CDS III Anker anlagern können, amplifiziert.

Amplifizierung der cDNA durch *Long Distance*-PCR (LD-PCR)

Der Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

2	µl	Erststrang-cDNA
70	µl	deionisiertes Wasser
10	µl	10x Advantage 2 PCR Puffer
2	µl	5x dNTP Mix
2	µl	5'-PCR Primer (10 µM) 5'-TTCCACCCAAGC AGTGGTATCAACGCAGAGTGG-3'
2	µl	3'-PCR Primer (10 µM) 5'-GTATCGATGCCC ACCCTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACA-3'
10	µl	10x GC-Melt Solution
2	µl	<u>50x Advantage 2 Polymerase Mix</u>
100	µl	Gesamt Volumen

Reaktionsbedingungen:

Prä-Zyklus	Initiales Aufschmelzen der DNA	30 sec 95°C
Zyklus	Aufschmelzen	10 sec 95°C
	Primer-Hybridisierung/Elongation	6 min (+5 sec je Zyklus) 68°C
Post-Zyklus	Finale Elongation	5 min 68°C
	Kühlen	ohne Limitierung 4°C

Im Anschluß an die PCR wird ein 5 µl Aliquot auf einem 1,2 %igen Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.6) zur Kontrolle der vorangegangenen Schritte analysiert.

Bei einem positivem Ergebnis (siehe Abb.3.2.2.2.) erfolgt die Aufreinigung der cDNA mittels CHROMA SPIN+TE-400 Säulen (Clontech, Heidelberg). Ziel ist es, durch Verwendung der Säule cDNA-Fragmente kleiner als 200 bp herauszufiltern. Die Durchführung erfolgt gemäß den Herstellerangaben. Die gesäuberte cDNA wird in 20 µl deionisiertem Wasser gelöst und ist nun bereit für die *in vivo* Rekombination in den Vektor pGADT7-Rec.

Transformation des Hefestammes AH109 mit vorbereiteter cDNA und pGADT7-Rec.

Zuerst wird die Hefe laut Protokoll 2.4.1 zur Transformation vorbereitet. Anschließend wird in einem vorgekühlten, sterilen Reaktionsgefäß (15 ml) Folgendes vermischt:

20	µl	cDNA
6	µl	pGADT7-Rec (0,5 µg/µl)
20	µl	denaturiertes Heringssperma als Träger-DNA
600	µl	kompetente Hefezellen

Das Gemisch wird vorsichtig geschüttelt, 2,5 ml PEG/LiAc-Lösung hinzugeben und 45 min bei 30°C inkubiert. Alle 15 min die Zellen nochmals durchmischen und anschließend 160 µl DMSO hinzugeben und 20 min bei 42°C einem Hitzeschock aussetzen. Die Zellen dann bei 700 x g 5 min zentrifugieren und 3 ml YPD+ (YPD siehe 2.1.4, 4 mg/l Adenin (2 ml einer 2 mg/l Lösung) und 20 mg/l Tryptophan (4 ml einer 5 mg/ml Lösung) hinzugeben und 90 min bei 30°C schütteln lassen. Nach nochmaligem Zentrifugieren wird das Pellet in 15 ml sterilem NaCl (0,9%) resuspendiert und je 150 µl auf insgesamt 100 -Leu-Platten (150 mm) ausgestrichen. Die weitere Inkubation erfolgt bei 30°C, je nach Wachstumsgeschwindigkeit (3-6 Tage) bis die ersten Kolonien sichtbar werden ($\geq 1 \times 10^6$ Kolonien / 3µg pGADT7-Rec).

Ernten der cDNA-Bank

Zum Ernten der cDNA-Bank werden die Platten für 3-4 h in einen Kühlraum bei 4°C gestellt. Danach gibt man zu jeder Platte 5 ml Freezing Medium (YPD mit 25% (v/v) Glycerol) und sammelt die Kolonien mit Flüssigkeit in einer sterilen Flasche. Die Überprüfung der Zelldichte erfolgt mittels Hemocytometer und sollte $\leq 2 \times 10^7$ Zellen/ml betragen. Bei Bedarf kann die Zelldichte durch Zentrifugation reduziert werden. Aliquots zu je 1 ml werden bei -80°C gelagert.

2.4.5 Selektion (Screening) durch Kreuzung zweier haploider Hefestämme (Mating)

Die Zellen zweier haploider Hefestämme mit passendem *mating type* MAT_a (AH108) und MAT_α (Y187) können zu einem diploiden Hefestamm, mit dem Genom beider Stämme, verschmelzen.

Das „Screenen“ erfolgt nach dem MATCHMAKER Library Construction and Screening Kit User Manual.

Kreuzung zweier haploider Hefestämme

Zuerst taut man ein 1 ml Aliquot ($\geq 2 \times 10^7$ Zellen) der cDNA-Bank in AH109 bei Raumtemperatur auf. Diese mischt man dann mit einer Übernachtskultur Y187 in einem 2 l Erlenmeyer-Kolben und gibt 45 ml 2x YPDA/Kan 50 µg/ml (0,2% Adeninhemisulfat 15 ml/l YPD) hinzu. Das Gemisch inkubiert man 20-24 h bei 30°C im Schüttler bei maximal 30-50 rpm. Nach 20 h erfolgt die erste Überprüfung unter dem Phasenkontrastmikroskop. Sollten noch Zygoten zu sehen sein, erweitert man die Inkubation um weitere 4 h. Das Gemisch wird dann bei 1000 x g zentrifugiert, mit 0,5 x YPDA gewaschen und anschließend in 10 ml 0,5 x YPDA resuspendiert. Die Zellen (200/Platte) werden nun auf dem gewünschten Selektionsmedium ausplattiert (-His/-Ade/-Leu/-Trp) und bei 30°C inkubiert bis Kolonien sichtbar werden. Im Allgemeinen wachsen die ersten Kolonien nach 2-3 Tagen, man sollte aber mindestens 5 Tage warten, um langsamer wachsenden Klonen ein Erscheinen zu ermöglichen. Die Kolonien können sich in Größe und Farbe unterscheiden. Eindeutig positive Klone erreichen eine Größe von > 2 mm und sind farblich tendenziell weiß. Bei einer Rosafärbung der Kolonie weist dies auf einen Adeninhemisulfat-Mangel hin. Die Klone werden auf neue Selektionsmediumsplatten überimpft und zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Zur langfristigen Aufbewahrung werden diese bei -80°C in Freezing Medium gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Kontrolle der Expressions“bait“-Vektoren

Den Anfang der Ergebnisse bildet die Klonierung des gewünschten DNA-Fragments, in diesem Fall die cytoplasmatische Domäne des Protocadherins γ C5, in den Expressionvektor pGBKT7.

3.1.1 Isolation von Gesamt-RNA

Zur Gewinnung der benötigten Gesamt-RNA aus murinem Gehirn, wurde nach der Präparation sofort die Gesamt-RNA-Extraktion mit Trizol (siehe Kapitel 2.2.1) angeschlossen um die Qualität zu optimieren.

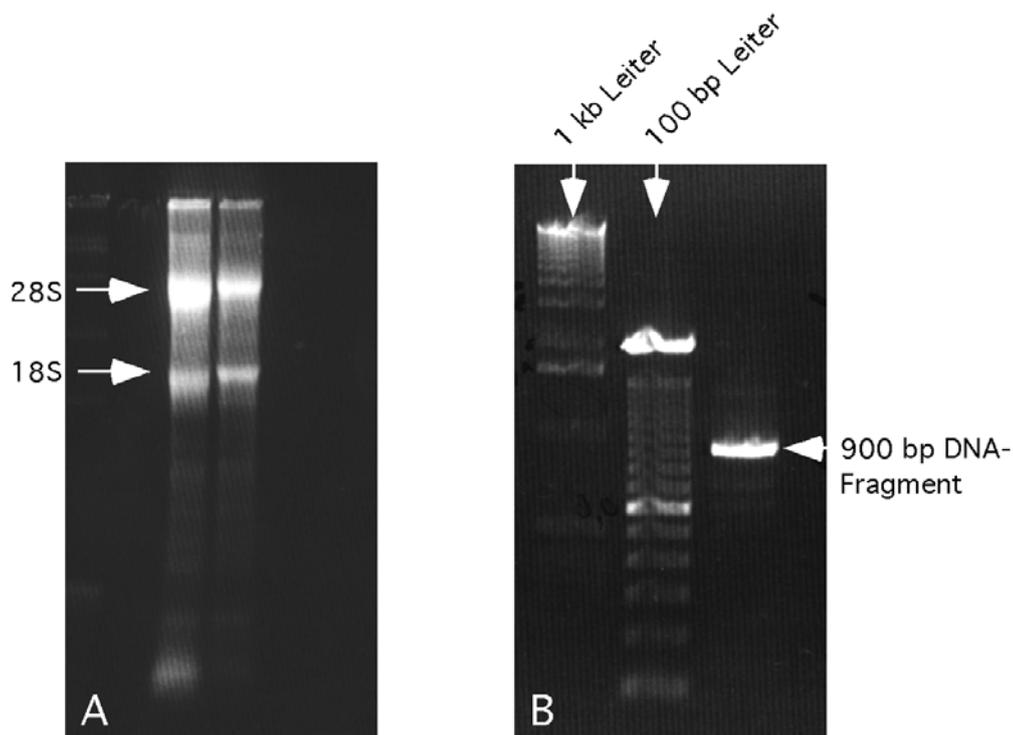


Abb. 3.1.1: (A) zeigt die RNA-Qualitäts-Kontrolle in der Agarose-Elektrophorese (siehe Kapitel 2.2.3). Bei guter Qualität sind die 28S- und 18S-rRNA-Banden im Verhältnis 2:1 sichtbar. Bild (B) zeigt die Kontrolle des 900 bp DNA-Fragments von Protocadherin γ C5 mit den spezifischen Primern PCDGC5.F2027 und PCDGC5.R2951 in einer DNA-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.6)

Aus der isolierten Gesamt-RNA wurde mit spezifischen Primern cDNA amplifiziert, um das gewünschte DNA-Fragment aus dem Protocadherin γ C5-Gen zu isolieren.

3.1.2 Konstruktion spezifischer Primer

Ziel war es, das für die cytoplasmatische Domäne des Protocadherin γ C5 kodierende DNA-Fragment zu amplifizieren. Als Ausgangssequenz wurde die publizierte cDNA-Sequenz des Protocadherins γ C5 verwendet (Q Wu et al. 2001). Zunächst wurde mit Hilfe eines Hydrophobizitätsdiagramms die transmembranäre Domäne genauer lokalisiert. Der Vorwärts-Primer (PCDGC5.F2027) und Rückwärts-Primer (PCDGC5.R2951) wurden so gewählt, dass die transmembranäre Domäne, die variable cytoplasmatische Domäne und die konstante cytoplasmatische Domäne enthalten sind. Dieses DNA-Fragment ist 900 bp lang (siehe Abb. 3.1.1). Um den Bereich weiter zu unterteilen, wurden die Primer A (C5FA) und B (C5RB) um das Fragment AB mit einer Länge von 300 bp ausgewählt, die nur die variable Region der cytoplasmatischen Domäne umfassen. Für die konstante cytoplasmatische Domäne (CD) wurden die Primer C (C5FC) und D (C5RD) entworfen. Das DNA-Fragment CD hat eine Länge von 300 bp. Zusätzlich wurde noch das DNA-Fragment AD (600 bp) verwendet, das den kompletten Sequenzabschnitt enthält. Um die Klonierung in den Expressionsvektor pGBKT7 zu ermöglichen, wurden den Primern Restriktionsschnittstellen hinzugefügt. Die Vorwärts- Primer A und C erhielten eine *EcoR1* Schnittstelle, die Rückwärts-Primer B und D eine *Sal1* Schnittstelle. Die Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, dass sie in der *multiple cloning site* des Vektors pGBKT7 existieren und nicht innerhalb der Sequenz der Ziel-DNA-Fragmente vorkommen.

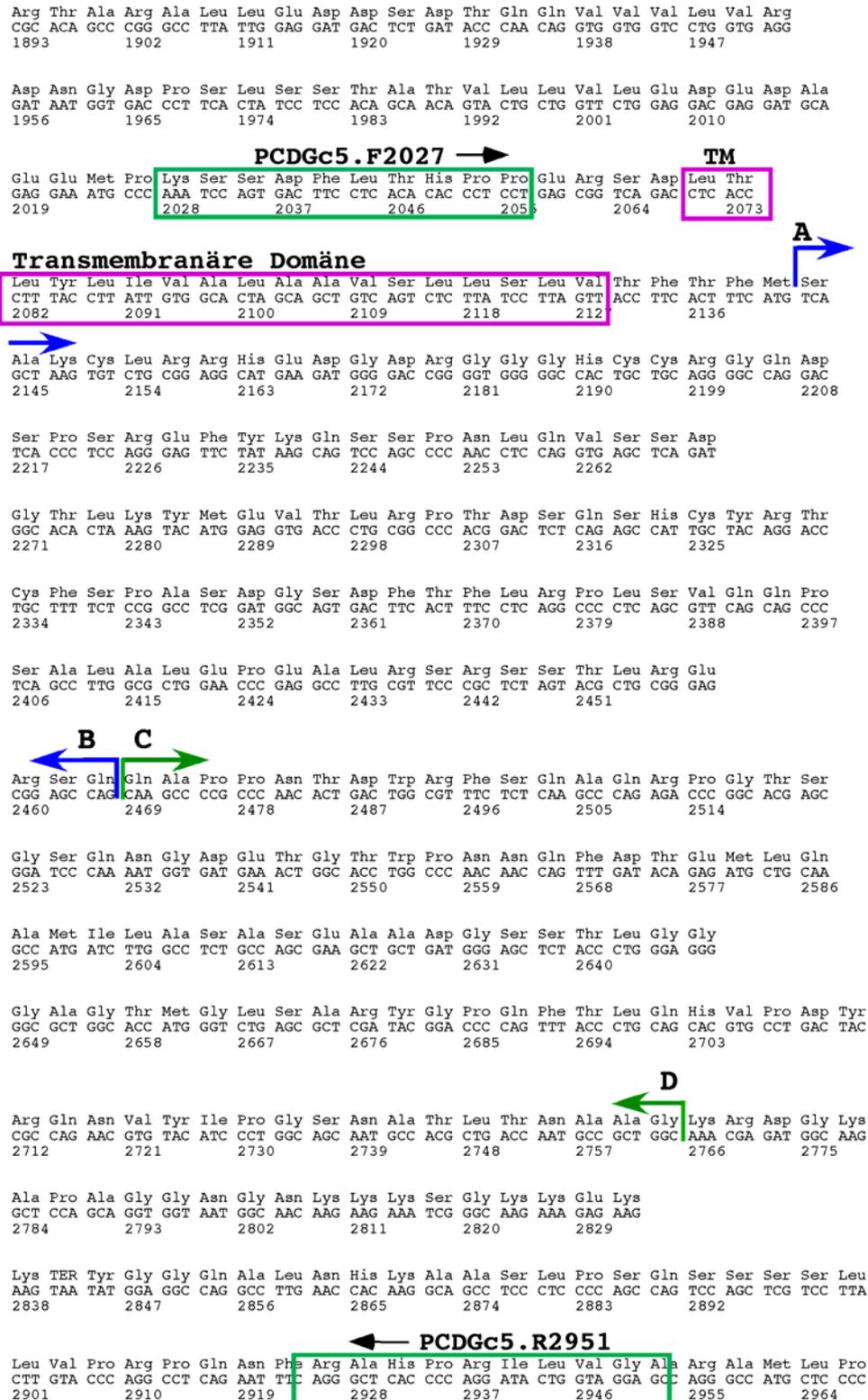


Abb. 3.1.2: Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz des Protocadherin γ C5. Darstellung der transmembranären Domäne (TM) und Bindungssequenz der gewählten Primer (AY013813, GenBank, NCBI).

3.1.3 Klonierung der DNA-Fragmente AB, CD und AD aus muriner cDNA

Zur Klonierung wurde zuerst die PCR unter Verwendung der oben genannten Primer optimiert, um Nebenprodukte ausschließen zu können. Die PCR-Produkte wurden dann im Agarose-Elektrophorese-Gel detektiert und daraus extrahiert (siehe Kapitel 2.2.6 und 2.2.7). Um Mutationen innerhalb der Sequenz ausschließen zu können, wurden die PCR-Produkte AB, CD und AD in TOPO4-Blunt-Vektor einkloniert und mit M13 Vorwärts- und Rückwärts-Primern sequenziert. Nach dieser Kontrolle wurden die Klone mit vollständiger und korrekter Sequenz einem Restriktionsverdau mit *EcoR1* unterzogen, um sie aus dem TOPO4-Blunt-Vektor herauszuschneiden, über ein Agarose-Gel aufzureinigen und nach zusätzlichem Verdau mit *Sal1* in den Ziel-Vektor pGBKT7 zu klonieren. Anschließend wurden die Klonierungskonstrukte nochmals durch Kontrollverdau mit *EcoR1* und *Sal1* und erneuten Sequenzieren mit den Sequenzier-Primern T7 und 3'DNA-BD auf ihre Korrektheit hin überprüft.

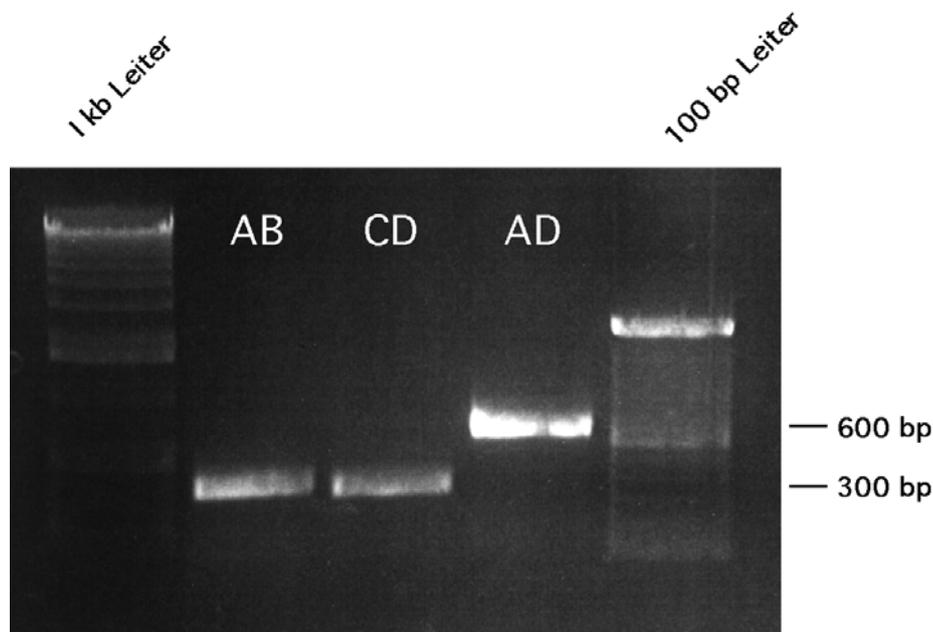


Abb. 3.1.3: DNA-Agarose-Elektrophorese (Konzentration 1 %) zur Überprüfung der DNA-Fragmente AB,CD und AD

3.1.4 Heterologe Proteinexpression

Um die Expression der Fusionsproteine in Hefe zu kontrollieren, wurden zuerst die DNA-Konstrukte des pGBKT7 mit den Fragmenten AB, CD und AD in den Hefestamm Y187 transformiert (siehe Kapitel 2.4.1). Nach 2-3 Tagen bei 30°C wurde eine der jeweiligen Kolonien in Flüssigmedium (SD/-Trp) überimpft und bis auf eine OD_{600} 0,6-0,8 kultiviert. Die Hefezellen wurden dann durch Ultraschall (siehe Kapitel 2.3.1) aufgeschlossen und die Proteinkonzentration mittels BCA-Methode (siehe Kapitel 2.3.2) bestimmt. Die Lysate wurden auf einem 12,5 % Acrylamidgel (siehe Kapitel 2.3.3) aufgetrennt (40 μ g / Bande) und auf ihre Proteinexpression hin im Western Blot kontrolliert. Bei dem hier verwendeten Primärantikörper handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper von Clontech gegen die GAL4-Bindungsdomäne (Abb. 3.1.4).

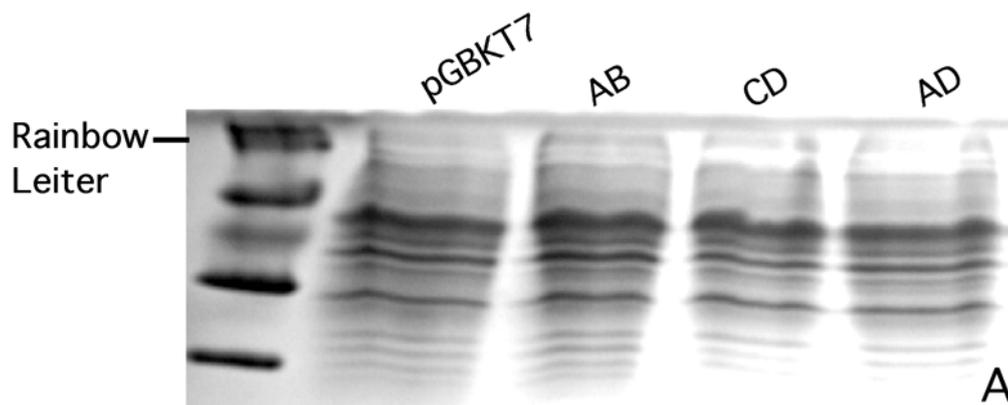


Abb. 3.1.4: (A): Proteinexpression in Y187: Coomassiefärbung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel (Konzentration 12,5 %).

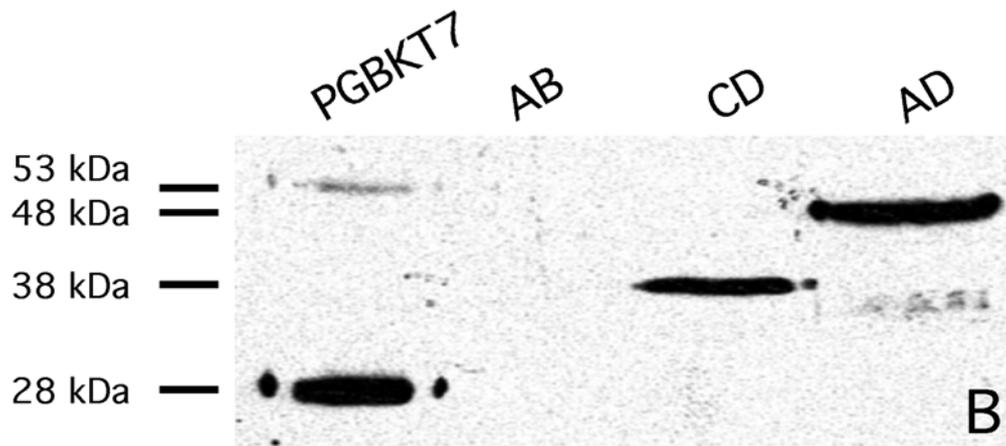


Abb. 3.1.4: (B): Western Blot zur Expressionskontrolle der Konstrukte AB, CD und AD im Expressionsvektor pGBKT7.

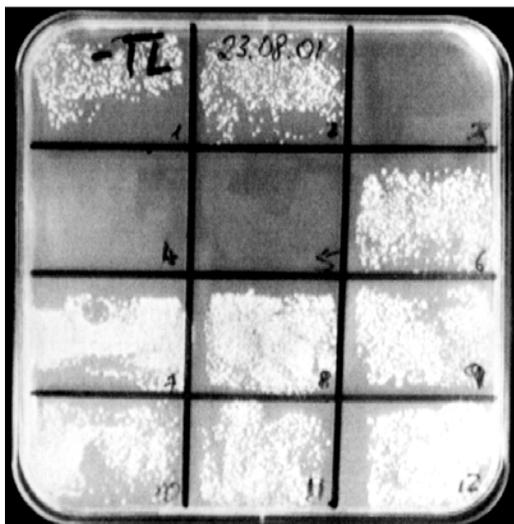
Die Coomassiefärbung des Acrylamid-Gels (Abb. 3.1.4 A) zeigt , dass in jeder Spur eine vergleichbare Menge an Protein aufgetragen wurde. Die Stärke der Protein-Banden sollte daher mit der Expressionsstärke korrelieren. Wie zu erwarten zeigte pGBKT7 eine Bande bei etwa 28 kDa. Die zusätzliche Bande bei 53 kDa ist ein übliches Nebenprodukt, auf das in der Clontech Antikörperbeschreibung hingewiesen wurde und das als interne Qualitätskontrolle dient. Das Fusionsprotein mit dem CD-Fragment zeigt eine deutliche Expression bei 38 kDa, das AD-Fragment-Fusionsprotein bei etwa 48 kDa. Eindeutig zu sehen ist, dass das AB-Fragment nicht exprimiert wurde (Abb. 3.1.4 B). Auch bei Wiederholung des Experiments mit verschiedenen AB Klonen und Proteinmengen konnte keine Expression nachgewiesen werden.

Um die Reinheit der ohne Selektionsdruck kultivierten Hefestämme zu wahren, wurden diese regelmäßig auf das Vorhandensein von Wildtyp-Hefen auf Mangelmedien überprüft. Weiterhin mußte sichergestellt werden, dass der Hefestamm nur auf Vollmedium (YPD) wuchs und nicht auf Selektionsmedien. Verunreinigungen oder Defizite in den Hefestämmen konnten oftmals durch Farbveränderungen beobachtet werden. Frische Hefe zeigte immer eine cremig-weiße Färbung, bei Mutationen konnte sie dunkelrot werden oder leicht rosa bei Adeninhemisulfat-Defizit.

3.1.5 Untersuchung auf autonome Reporteraktivität und Interaktion der Konstrukte

Bevor der Hauptscreen durchgeführt werden kann, müssen zunächst einige Vorversuche stattfinden, um jegliche Autoaktivierung der Reportergene durch die Hefestämme, die Klonierungskonstrukte und die verwendeten Vektoren ausschließen zu können.

Dazu wurden die in den AD-Vektor (pGAD424: LEU2, Amp^R) oder BD-Vektor (pGBKT7: TRP1, Kan^r) klonierten Konstrukte AB, CD und AD in verschiedenen Kombinationen in die Hefestämme AH109 und Y187 transformiert. Bei der hier verwendeten Positiv-Kontrolle handelt es sich um p53 (pGBKT7-p53), das bei Koexpression mit SV40 large T antigen (pGADT7-Rec+SV40 large T antigen) interagiert (Iwabuchi et al. 1993; Li & Fields 1993). Als Negativ-Kontrolle wurde pGADT7-Rec mit SV 40 large T antigen Fragment in Kombination mit dem BD-Vektor pGBKT7-Lam, eine Fusion des BD-Vektors mit humanem Lamin C (Bartel et al. 1993), verwendet.



pGBKT7-p53 pGADT7-Rec SV40 ⊕	pGBKT7-lam pGADT7-Rec SV40 ⊖	Hefestamm Y187
pGBKT7	pGADT7	pGBKT7 pGAD424
pGBKT7-AB pGADT7-AB	pGBKT7-AB pGADT7-CD	pGBKT7-AB pGADT7-AD
pGBKT7-CD pGADT7-CD	pGBKT7-CD pGADT7-AD	pGBKT7-AD pGADT7-AD

Abb. 3.1.5: Vorversuche zum Ausschluß autonomer Reporteraktivität und unspezifischer Interaktion der Konstrukte. Hier exemplarisch das Selektionsmedium -Trp/-Leu mit den zu untersuchen Kombinationen.

Die hier verwendeten Selektionsmedien -Trp, -Leu, -Trp/-Leu dienen der Kontrolle des verwendeten Hefestamms und der AD und BD Vektoren. Das Selektionsmedium -His/-Ade/-Leu/-Trp wurde ausschließlich zur Interaktionsüberprüfung verwendet. In der folgenden Tabelle (3.1.5) werden die einzelnen erwarteten (E) und beobachteten (B) Ergebnisse veranschaulicht.

Kotransformations-Kombinationen	-T	-T	-L	-L	-TL	-TL	-HALT	-HALT
erwartete (E) und beobachtete (B) Ergebnisse	(E)	(B)	(E)	(B)	(E)	(B)	(E)	(B)
pGBKT7+p53 / pGADT7+SV40 <i>Positiv-Kontrolle</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
pGBKT7+lam / pGADT7+SV40 <i>Negativ-Kontrolle</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
Hefestamm Y187 oder AH109	-	-	-	-	-	-	-	-
pGBKT7	+	+	-	-	-	-	-	-
pGADT7	-	-	+	+	-	-	-	-
pGBKT7 / pGAD424	+	+	+	+	+	+	-	-
pGBKT7-AB / pGAD424-AB	+	+	+	+	+	+	-	-
pGBKT7-AB / pGAD424-CD	+	+	+	+	+	+	-	-
pGBKT7-AB / pGAD424-AD	+	+	+	+	+	+	-	-
pGBKT7-CD / pGAD424-CD	+	+	+	+	+	+	-	-
pGBKT7-CD / pGAD424-AD	+	+	+	+	+	+	-	-
pGBKT7-AD / pGAD424-AD	+	+	+	+	+	+	-	-

Tab. 3.1.5.: Übersicht über die Vorversuchkombinationen auf den Selektionsmedien -Leu, -Trp, -Leu/-Trp und -His/-Ade/-Leu/-Trp.

Wie anhand der Tabelle zu ersehen ist, zeigten weder die benutzten Hefestämme noch die Konstrukte AB, CD und AD autonome Reporterogenaktivität oder Interaktionen untereinander. Nach den erfolgten Überprüfungen konnten die Konstrukte nun zum Screenen verwendet werden.

3.2 Konstruktion der murinen cDNA-Bank im Aktivierungsdomänen - Expressionsvektor

3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus murinem Gehirngewebe

Um von einer guten Gesamt-RNA-Qualität ausgehen zu können, wurde das murine Groß- und Kleinhirn präpariert und direkt weiterverarbeitet. Die RNA-Extraktion erfolgte nach der Trizol-Methode wie unter 2.2.1 beschrieben. Laut Protokoll sollten 100 ng Gesamt-RNA eingesetzt werden, jedoch wurde nach mehrfacher Optimierung die doppelte Ausgangsmenge an Gesamt-RNA verwendet, um ein besseres Ergebnis zu erhalten. Zu Optimierungszwecken wurde die Konstruktion der Bank dreimal durchgeführt. Dabei wurden die Gesamt-RNA Einsatzmenge, die eingesetzten Fragmentgrößen der cDNA und die Anzahl der transformierten Kolonien variiert.

3.2.2 Synthese und Amplifikation der cDNA

Die Synthese der Einzelstrang-cDNA und die Komplettierung der Doppelstrangsynthese mittels *long distance* PCR (LD-PCR) wurde wie unter 2.4.4 beschrieben durchgeführt. Die Zyklenzahl der *long distance* PCR wurde auf 20 optimiert. Das Produkt wurde auf einem analytischen DNA Agarose-Gel überprüft und bei bestätigter Größenvarianz der DNA-Fragmente weiterverarbeitet (siehe Abb. 3.2.2.2).

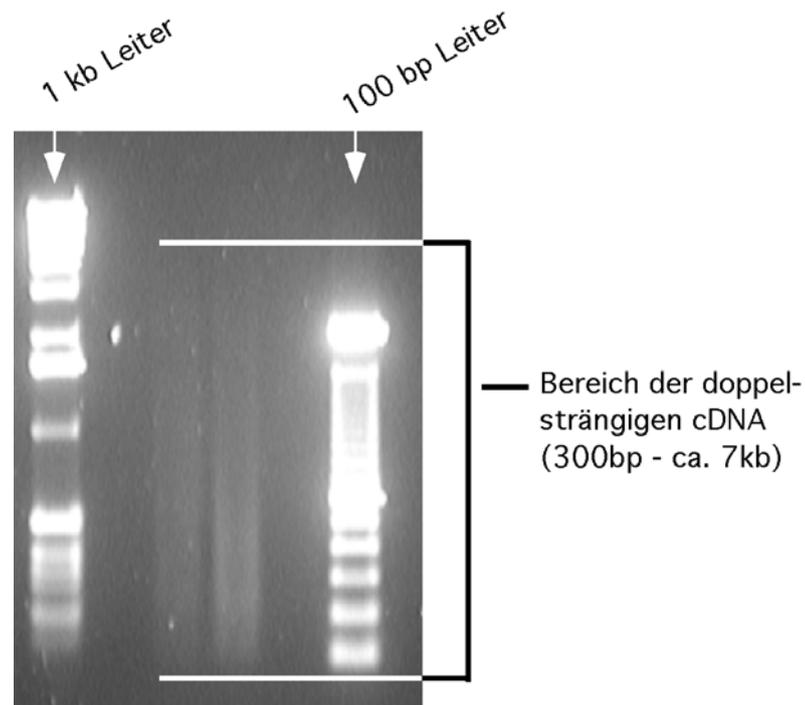


Abb. 3.2.2.2: Analytisches DNA Agarose-Gel zur Überprüfung der cDNA Größenfragmente (Konzentration 1 %)

Im nächsten Schritt wurde die cDNA über eine CHROMA SPIN+TE-400 Säule aufgereinigt (Clontech) um cDNA-Fragmente mit einer Größe unter 200 bp zurück zuhalten (siehe Kapitel 2.4.4) und somit eine bessere Qualität der murinen cDNA Bank gewährleisten zu können.

3.2.3 *In Vivo* Rekombination der cDNA-Bank in Hefe

Nach Fertigstellung der cDNA wurde diese mit pGADT7-Rec in den Hefestamm AH109 transformiert (siehe Kapitel 2.4.4). Der Transformationsansatz wurde dann auf 100 Platten ausgestrichen. Bei den Selektionsplatten wurde entsprechend dem AD-Vektor - Leu-Medium verwendet. Zur Kontrolle wurden noch eine Verdünnungsreihe des Transformationsansatzes (1:10-1:10000) mitgeführt, um die Transformationseffizienz beurteilen zu können (siehe Abb. 3.2.3.2). Nach vier Tagen wurde die cDNA-Bank geerntet und bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz belief sich auf ca. 2×10^6 Kolonien / $3 \mu\text{g}$ pGADT7-Rec.

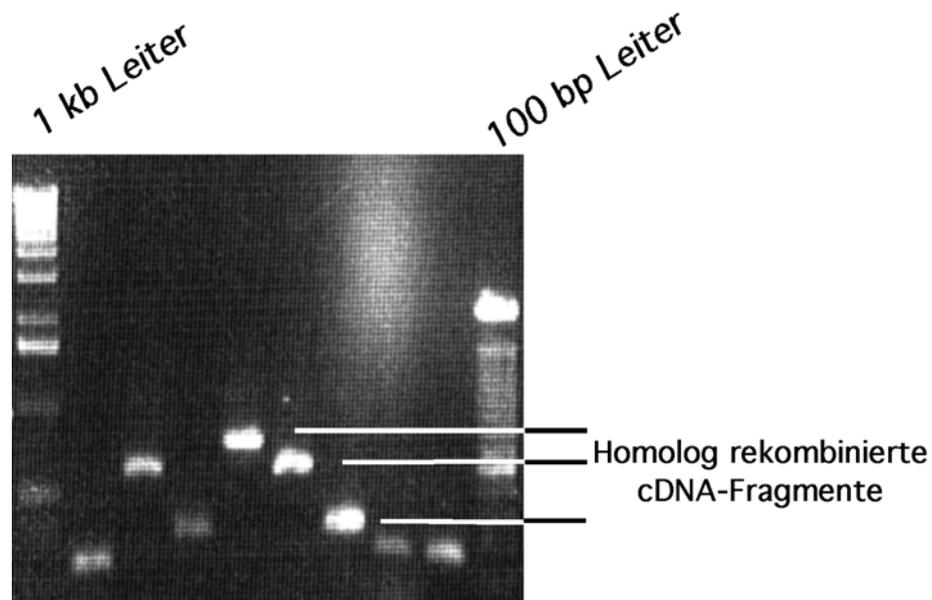


Abb. 3.2.3.1: Auf dem Gel-Elektrophorese-Bild (Konzentration 1 %) sieht man eine Kontroll PCR aus den cDNA-Bank-Kolonien mit den Primern T7 und 3AD. Die Fragmentgrößenspannweite betrug ca. 300 - 900 bp.

Nach durchgeführten Kontrollen und positiver Auswertung konnte die Bank zum Screenen weiterverwendet werden.



Abb. 3.2.3.2.: Kontrollplatte zur Berechnung der Transformationseffizienz der homologen Rekombination der cDNA mit pGADT7-Rec. 1:100 Verdünnung, Selektionsmedium -Leu.

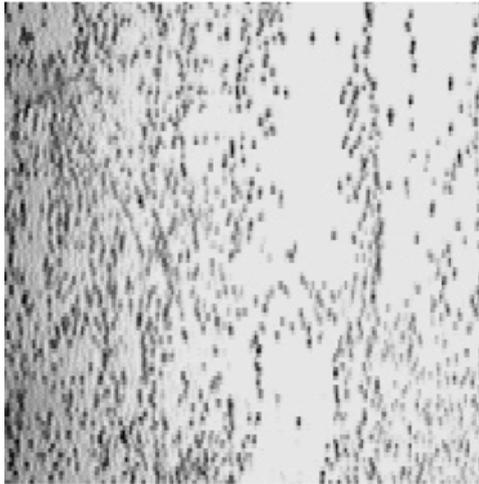
Zur weiteren Kontrolle der cDNA-Bank wurde eine Kolonie-PCR mit den Primern 3AD und T7 angesetzt, um eine Aussage über die Varianz der Fragmentgrößen, die homolog in den pGADT7-Rec rekombiniert hatten, treffen zu können. Auf der Abb. 3.2.3.1 ist zu sehen, dass das Ziel, eine größtmögliche Varianz, erreicht wurde.

3.3 Screening

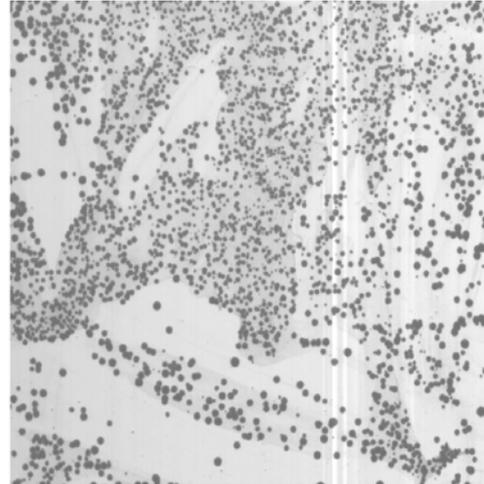
Der Screenansatz wurde dreimal wiederholt, da in jedem der Ansätze verschiedene Probleme auftraten, die hier erläutert werden.

3.3.1 1. Screen

Nach Abschluss aller Vorversuche, einschließlich der Überprüfung der cDNA-Bank, wurde mit der Vorbereitung für den eigentlichen Screen begonnen. Dazu wurden bei jedem Screen 50 SD/-Leu Selektionsplatten vorbereitet und eine Kotransformation mit pGADT7+cDNA (prey) und pGBKT7+Pcdh γ C5 CD oder AD (bait) für den *Libraryscreen* durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.5). Das Konstrukt pGBKT7-AB wurde nicht zum Screenen verwendet, da sich beim Westernblot gezeigt hatte, dass keine Proteinexpression stattfand (siehe Abb. 3.1.4 B). Im ersten Screen wurde die zuerst konstruierte cDNA-Bank verwendet, obwohl sie eine äußerst niedrige Transformationseffizienz aufwies. Zur Berechnung der Transformationseffizienz der einzelnen Konstrukte und der Effizienz der Kotransformation, wurde zusätzlich ein Aliquot der Kotransformation auf die Selektionsmedien SD/-Trp, SD/-Leu und SD/-Leu/-Trp ausplattiert, der Rest auf dem Maximalselektionsmedium SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert und täglich auf Kolonien-Wachstum kontrolliert. Nach 2-3 Tagen zeigte sich eine sehr große Zahl an Kolonien (Abb. 3.3.1). Laut Protokoll hätten die Platten 6-7 Tage bei 30°C inkubiert werden sollen, jedoch zeigte sich schon nach 2-3 Tagen eine unüberschaubare Anzahl an Kolonien (Abb. 3.3.1). An diesem Punkt wurde der Versuch abgebrochen, da nach Protokoll wenige Kolonien zu erwarten wären und die Frage zu klären galt, ob sich ein interner Fehler ergeben hatte.



1.Screen, Library
mit pGBKT7-AD



1.Screen, Library
mit pGBKT7-CD

Abb. 3.3.1: 1. Screenversuch mit pGBKT7-CD und pGBKT7-AD auf dem Selektionsmedium SD/-Leu/-His/-Trp/-Ade. Man sieht das „rasenähnliche“ Wachstum der Hefekolonien.

3.3.2 2. Screen

Vor Durchführung des 2. Screens wurden die Selektionsmedien und Platten neu hergestellt und ausgetestet, um Fehler in der Zusammensetzung oder Verunreinigungen ausschließen zu können. Zusätzlich wurde die erste cDNA-Bank auf Autoaktivierung oder aktivierenden Mutationen getestet, indem sie auf den Selektionsmedien SD/-Leu, SD/-Trp, SD/-Leu/-Trp und SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp ausplattiert wurde. Zu beobachten war nur ein Wachstum auf der SD/-Leu-Platte, somit konnte diese Fehlerquelle ausgeschlossen werden (siehe Abb. 3.3.2.1).

Mit den neu hergestellten Platten wurde erneut ein *Library Screen* durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.5). Nach 2-3 Tagen bei 30 °C zeigte sich erneut eine sehr hohe Anzahl an Hefekolonien mit angeblichen positiven Interaktionen, so dass im Folgenden 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) eingesetzt wurde. 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor des Hefe His3 Proteins (His3p) und dient der Inhibition der Histidin-Biosynthese bei geringer His3-Protein Expression.

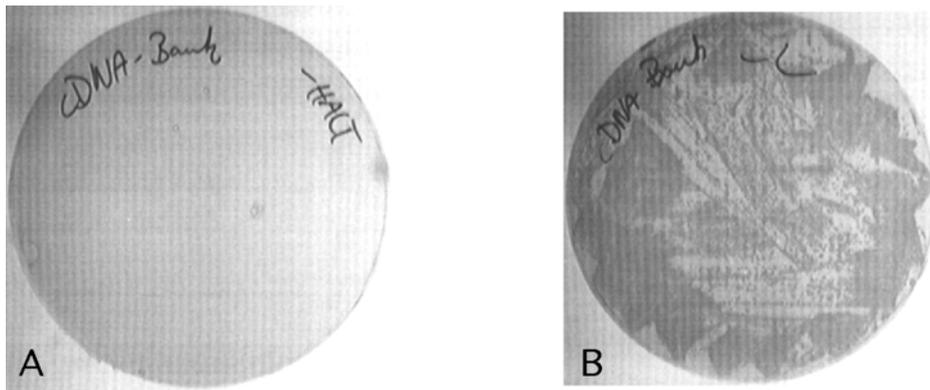


Abb. 3.3.2.1: Bild (A) zeigt die erfolgreiche Kontrolle der cDNA-Bank auf SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp-Platten. Bild (B) zeigt das gleiche Aliquot der cDNA-Bank auf dem Selektionsmedium SD/-Leu. Da die cDNA in den Vektor pGADT7-Rec (LEU2/Amp^r) homolog rekombiniert wurde, sind die Klone erwartungsgemäß gewachsen.

Dadurch kann das Hintergrundwachstum auf SD/-His-Medien unterdrückt werden und das Wachstum der Klone auf starke positive Interaktionen beschränken (Fields & Sternglanz 1994; Durfee et al. 1993). Laut Clonetch-Protokoll lag die empfohlene 3-AT Menge im Bereich von 2,5-15 mM.

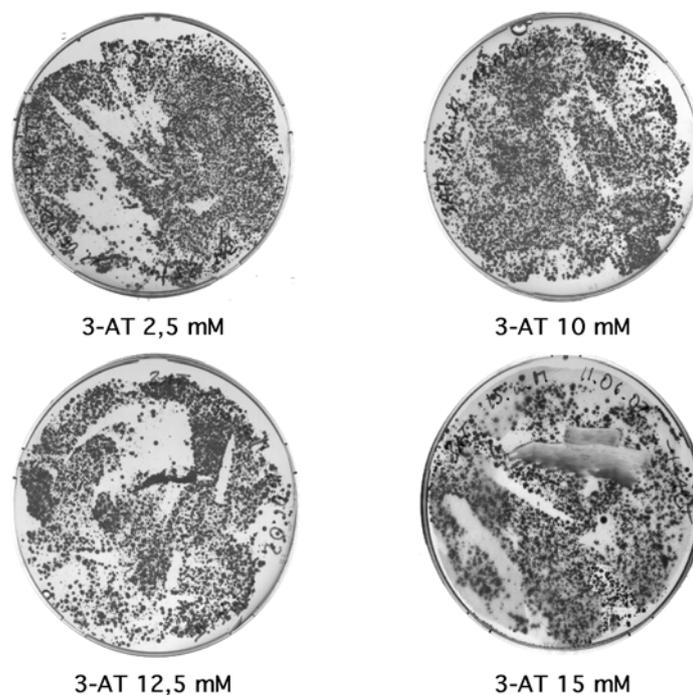


Abb. 3.3.2.2: Überimpfung des 2. Screens auf Selektionsplatten (SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp) mit 3-AT (2,5;10;12,5;15 mM).

Dazu wurden einige der überwachsenen Platten des 2. Screen auf SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp-Selektionsplatten mit unterschiedlichen 3-AT Mengen überimpft und weitere Tage bei 30°C inkubiert, um eine mögliche Wachstumsreduktion unter 3-AT zu beobachten.

Wie auf Abb. 3.3.2.2. deutlich zu sehen, wurde das Wachstum der Kolonien durch 3-AT in der vom Protokoll vorgegebenen Menge in keiner Weise beeinflusst. Im nächsten Schritt wurde die 3-AT Menge zur Optimierung des Systems auf 20, 30 und 40 mM erhöht, um herauszufinden bis zu welcher Konzentration Wachstum noch möglich sei. Das Ergebnis zeigte sich bei allen 3-AT Konzentrationen ähnlich (siehe Kapitel 3.3.2.3). Das Wachstum des 2.Screens konnte auch mit bis zu 100 mM 3-AT nicht gehemmt werden. Eine Optimierung der Zubereitung 3-AT-haltiger Medien und das Verwenden von neuem Material zeigten keine Änderung.

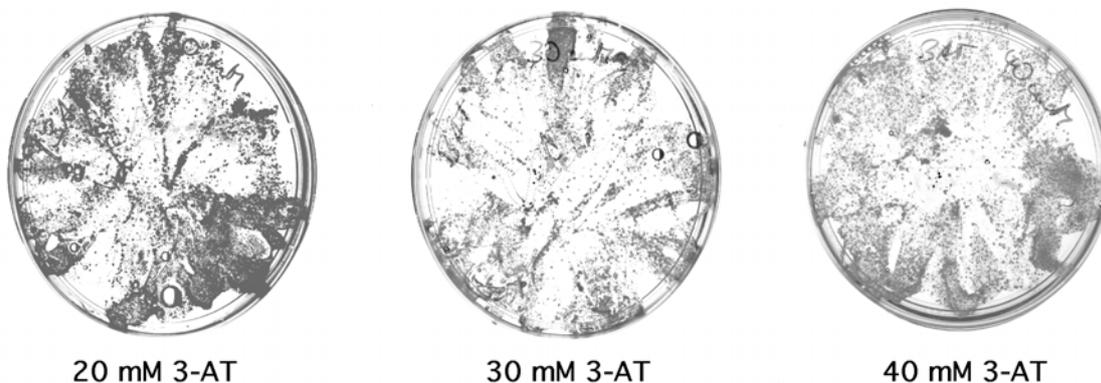


Abb. 3.3.2.3.: Überimpfung des 2. Screens auf SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp-Selektionsplatten mit 20, 30 und 40 mM 3-AT. Verschiedene 3-AT Konzentrationen zeigen keinen Einfluß auf das Kolonienwachstum.

Da die Transformationseffizienz der ersten cDNA-Bank etwas unterhalb des im Protokoll empfohlenen Minimums lag, wurde eine dritter Screen mit einer neuen cDNA-Bank durchgeführt.

3.3.3 3. Screen

Im 3. Screen wurden die SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp-Selektionsplatten mit 20 mM 3-AT versetzt. Die cDNA-Bank zeigte eine ausreichende Transformationseffizienz (3.2.3), nachdem die doppelte Menge Gesamt-RNA verwendet worden war. Nach der Kotransformation der neuen cDNA-Bank mit den Konstrukten CD und AD wurden die Platten 5-6 Tage bei 30°C inkubiert.

Nach vier Tagen zeigten sich die ersten Kolonien. Die Anzahl belief sich auf ca. 100 Klone pro Platte und war damit weitaus geringer als bei den vorherigen Screens. Von den insgesamt 100 Platten wurden je 5 Kolonien auf frische Platten ausplattiert und bei 4°C gelagert. Die Kotransformationseffizienz des Screeningansatzes lag bei 66% Diploiden. Die Berechnung sieht aus wie folgt:

$$\frac{\text{\#cfu/ml diploider Hefen}}{\text{\#cfu/ml limitierender Partner}} \times 100 = \% \text{ Diploider}$$

$$\frac{0.12}{0.18 \text{ (Partner von AH109)}} \times 100 = 66.6\% \text{ Diploider}$$

Anschließend wurden alle 500 Klone mittels Kolonie-PCR weiter analysiert (siehe Kapitel 2.2.16). 10 µl der Kolonie-PCR-Ansätze wurden auf ein 1 %iges Agarosegel gegeben. Erfahrungen aus vorherigen Y2H Screens zeigen, dass oft der Leervektor pGADT7-Rec falsch-positive Kolonien erzeugt, trotz negativer Reaktion in Vorversuchen. Das PCR-Produkt des Leervektors ist 291 bp lang. Dementsprechend wurden nur Hefeklone weiter charakterisiert, deren PCR-Produkt auf dem Gel größer als ca. 300 bp war. Vorrangig wurden Klone analysiert, deren Kolonie-PCR-Produkte sehr lang waren, da dies auf die Rekombination von cDNA-Fragmenten hindeutete, die für ein Protein in voller Länge kodierten.

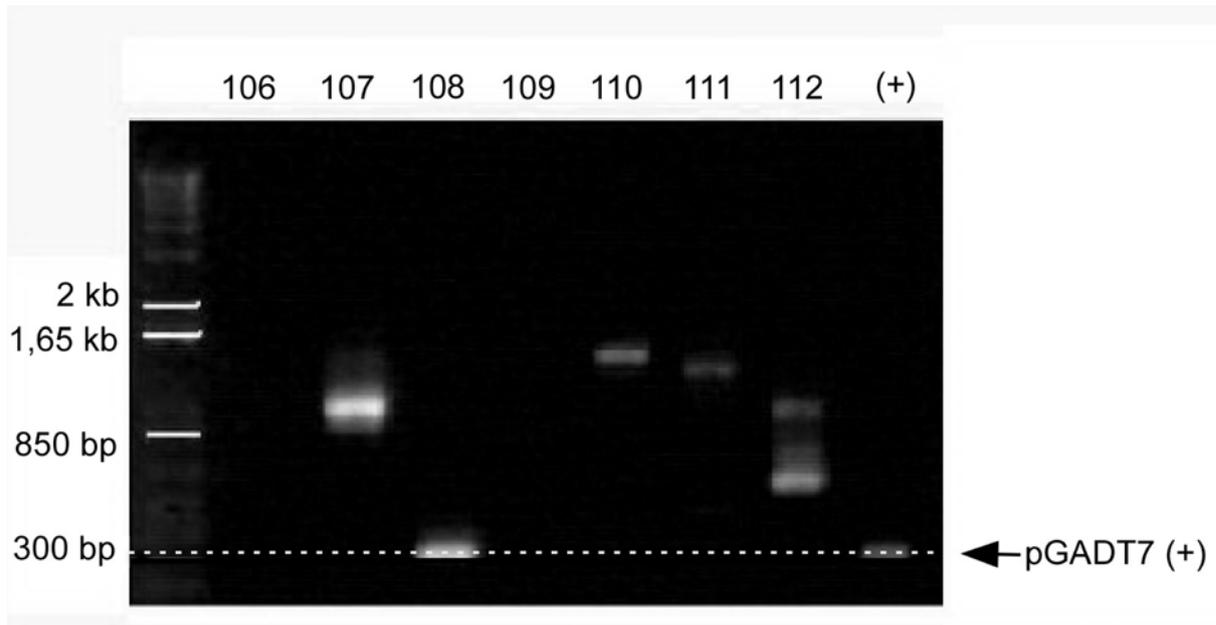


Abb. 3.3.2.4: Kolonie-PCR der Klone 106 bis 112 und der positiv-Kontrolle (+) pGADT7-Rec. 107, 110, 111 und 112 wurden weiter verwendet, 106 und 109 weisen keine Bande auf und wurden somit nicht weiter analysiert. 108 zeigt eine Bande in Höhe der Positiv-Kontrolle und ist vermutlich der religierte Vektor und wurde somit ausgeschlossen.

Insgesamt zeigten nur 214 Klone (Abb. 3.3.2.5.), trotz mehrfachen Optimierens der Kolonie-PCR bezüglich der eingesetzten Materialmengen oder Temperaturen, ein positives Ergebnis, so dass sie zur weiteren Analyse durch Sequenzierung vorbereitet werden konnten.

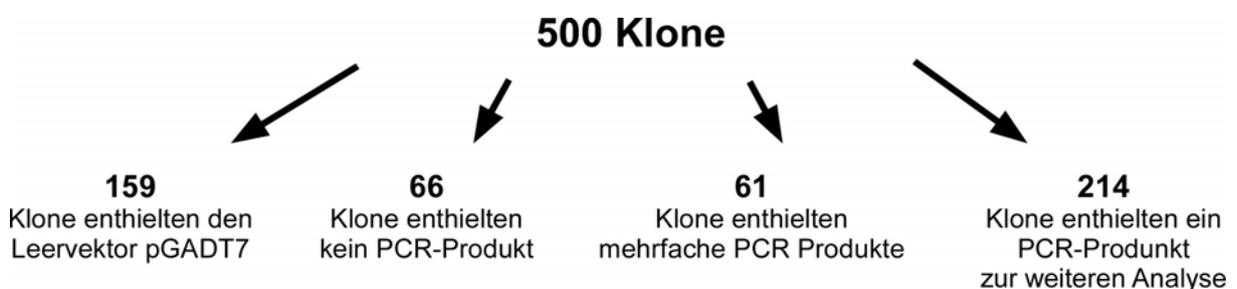


Abb. 3.3.2.5: Ergebnisse der Kolonie-PCR

Dazu wurde die Plasmid-DNA aus den Hefeklonen laut Protokoll (siehe Kapitel 2.4.2) extrahiert und zur Sequenzierung vorbereitet. Anschließend wurde eine Sequenzierung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.15) und die DNA-Sequenzen der gefundenen potentiellen Interaktionspartner mittels NCBI BLAST ausgewertet.

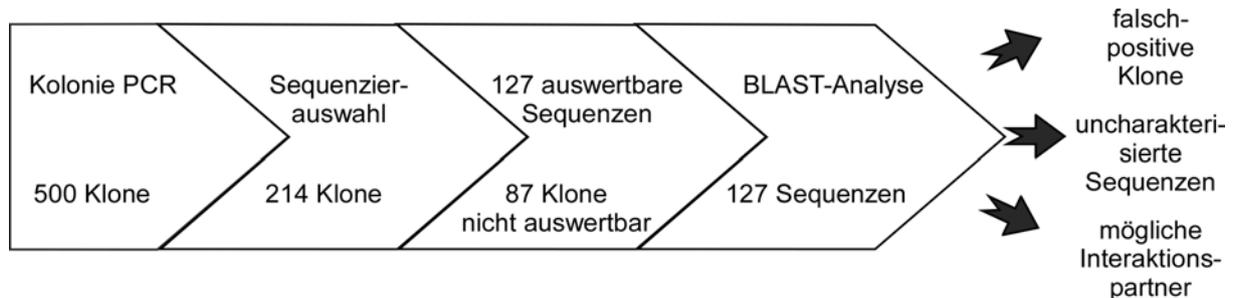


Abb. 3.3.2.6: Prozessdarstellung von der Auswahl bis zur Charakterisierung der Hefeklone

Insgesamt 127 Klone zeigten eine auswertbare Sequenz und konnten mittels NCBI BLAST charakterisiert werden. Die genauen BLAST Ergebnisse für die Klone 497, 499, und 500 sahen wie folgt aus:

497	NM_009790.4 Mus musculus calmodulin 1 (Calm1), mRNA
499	NT_039341.7 Mus musculus chromosome 6 genomic contig, strain C57BL/6J
500	NT_039492.7 Mus musculus chromosome 10 genomic contig, strain C57BL/6J

Tab. 3.3.3.1.: Exemplarischer Tabellenausschnitt für die BLAST-Ergebnisse der Klone 497, 499 und 500 (). Die komplette Tabellenauswertung umfasst 127 Klone.

Ein möglicher Interaktionspartner des cytoplasmatischen Anteils des Protocadherins γ c5 konnte mit Klon 497 identifiziert werden, das Calmodulin 1 Protein. Die codierende Sequenz des CALM1 Gens beträgt 450 Basenpaare, das Protein besteht aus 149

Aminosäuren. Klon 497 schliesst den Bereich von 225 bp bis zum Stopcodon mit ein (siehe Abb. 3.3.2.7).

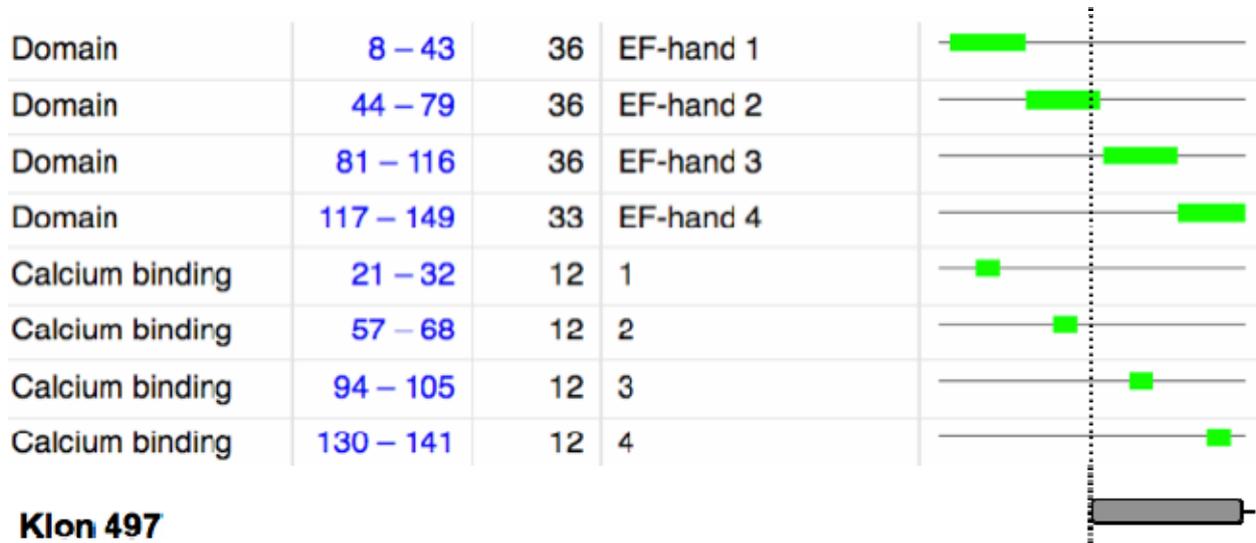


Abb. 3.3.2.7: Schematische Darstellung einzelner Domänen des murinen Calmodulin Gens im Vergleich zum Prey-Klon 497 (<http://www.uniprot.org>)

4 Diskussion

Der Begriff Protocadherin wurde 1993 durch Shintaro Suzuki und Mitarbeiter eingeführt (Sano et al. 1993). Bei dem Versuch neue Cadherinklassen zu entdecken, wurden degenerierte Primer der Ectodomänen klassischer Cadherine zur PCR verwendet. Dadurch wurden neue Fragmente Cadherin-ähnlicher Ectodomänen entdeckt, die sowohl in Wirbel- als auch in Wirbellosentieren reproduzierbar waren.

Der Gedanke entstand, dass es sich hierbei um evolutionär ursprüngliche, cadherinartige Moleküle handeln könnte, so dass damals der Name Protocadherine gewählt wurde.

Die Protocadherine wurden einer evolutionären Diversifizierung aufgrund reverser Transkription, Gen-Duplikationen und Translokationen unterworfen, so dass mittlerweile über 70 humane und murine Protocadherine bekannt sind und sie somit eine der größten Subfamilien der klassischen Cadherine darstellen (Yagi & Takeichi 2000). Bei Vergleichen des Protocadherinaufbaus mit der Cadherinsuperfamilie zeigten sich spezifische Unterschiede (Vanhalst et al. 2001; Obata et al. 1995). Murine und humane Protocadherine enthalten sechs Ectodomänen, die von einem langen Exon kodiert werden. Bei der genomischen Organisation der Protocadherine zeigen sich drei tandemähnliche Protocadheringencluster, α , β und γ , die insgesamt 52 Protocadherine kodieren, bei den humanen Protocadherinen an drei chromosomalen Stellen, 5q31, 13q21 und Xq21 (Angst et al. 2001) bei der Maus auf Chromosom 18c. Diese und andere Protocadherine werden in hohem Maße im Gehirn an Synapsenenden exprimiert (Phillips et al. 2003; X. Wang, Weiner et al. 2002).

Die Klonierung der Protocadherine verdeutlichte, dass sie extrazellulär über eine große Varianz verfügen, jedoch der cytoplasmatische Anteil innerhalb eines Clusters hoch konserviert ist. Daraus könnte man schließen, dass intrazellulär derselbe Interaktionspartner vorzufinden wäre.

Bis zum jetzigen Stand konnten nur wenige Interaktionspartner isoliert werden. Extrazellulär weist Protocadherin α eine Rezeptorfunktion für Reelin auf (Senzaki et al. 1999) und intrazellulär eine Interaktion mit der Tyrosin-Kinase Fyn (Kohmura et al. 1998a). Protocadherin 18 interagiert intrazellulär mit der Phosphotyrosin-bindenden

Domäne des Adapterproteins Disabled 1 (Dab1) und Protocadherin 7 mit der α -Isoform der Protein-Phosphatase 1 (PP1) (Kenichi Yoshida 2003). Im γ -Cluster der Protocadherine konnte bisher eine zytoplasmatische Bindung mit Protein SCG 10 nachgewiesen werden, welche eine Mikrotubulin-destabilisierende Wirkung erzielt und eine Veränderung des Mikrotubulinzytoskeletts herbeiführt. Man vermutet, dass es dabei zu einer Reaktionsveränderung der extrazellulären Signale kommt, welche die neuronale Entwicklung beeinflusst (Gayet et al. 2004)

Das in dieser Arbeit untersuchte Protocadherin γ C5 weist wie Protocadherine des α -Clusters, die mit der Tyrosin-Kinase Fyn intrazellulär interagieren, eine 240 Aminosäuren lange intrazelluläre Domäne auf. Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch Protocadherin γ C5 mindestens einen intrazellulären Interaktionspartner besitzen sollte. Mittels des Yeast-2-Hybrid Systems sollte ein solcher identifiziert werden (X. Wang, Weiner et al. 2002; X. Wang, Su et al. 2002).

Die Möglichkeiten eine Protein-Protein-Interaktion zu detektieren unterteilen sich in *in vitro* und *in vivo* Versuche.

Die *in vitro* Versuchsmöglichkeiten zur Identifikation einer Interaktion sind beispielsweise das Markieren von Proteinen (His, Flag, HA) und Chromatographie, Immunpräzipitation, *in vitro* Translation und *binding assays*, sowie eine Alanin-Scan Mutagenese. Die Nachteile aller *in vitro* Versuche sind mögliche Artefakte, künstliche Bedingungen und somit eine fragliche korrekte Proteinfaltung. Insbesondere müssen Ergebnisse *in vivo* bestätigt werden. Auch spezifische Probleme können auftreten, z.B. die starke Abhängigkeit der Immunpräzipitationsergebnisse von den verwendeten Antikörpern.

In vivo Untersuchungsmöglichkeiten von Protein-Protein-Interaktionen sind das Yeast-2-Hybrid und Yeast-3-Hybrid-System Weiterhin noch das Split-Ubiquitin System, das *ras recruitment system* und das *bacterial n-hybrid-System*.

Nachteile dieser Systeme liegen in möglichen falsch positiven Ergebnissen aufgrund eigenständiger Aktivierung der Reportergene. Weiterhin bedeutet eine Interaktion des *preys* mit einem cDNA-Bank-kodierten Protein nicht unbedingt, dass diese auch

physiologischerweise *in vivo* interagieren. Zum einen könnte die zeitliche Expression oder auch die Lokalisation beider Proteine im Zellsystem völlig unterschiedlich sein. Zusätzlich ist eine quantitativ repräsentative cDNA-Bank eine Voraussetzung für einen erfolgreichen Screen.

In dieser Doktorarbeit wurde das Yeast-2-Hybrid System zur Identifikation einer Protein-protein-Interaktion gewählt, da schon die Interaktion von Protocadherin 7 mit PP1 in diesem System detektiert wurde (K Yoshida et al. 1999) und die Interaktion von Protocadherin α mit der Tyrosin-Kinase Fyn durch das Yeast-2-Hybrid System bestätigt wurde (Kohmura et al. 1998b). Die Vorteile des Hefe-Systems liegen darin, dass die Hefe ein Eukaryont ist und kontrolliert kultiviert und manipuliert werden kann. Man arbeitet unter natürlichen Bedingungen und kann somit von korrekt gefalteten und modifizierten Proteinstrukturen ausgehen. Transformierte Proteinexpressionsvektoren werden stabil in der Hefe aufgenommen und ermöglichen eine quantitativ und qualitativ adäquate Proteinexpression. Durch die *in vivo* Expression in Hefe werden die Proteine nativ gefaltet und posttranslational modifiziert. Die Hefe enthält keine nicht-kodierende DNA Abschnitte und die genomische Sequenz ist bekannt, so dass das spätere Sequenzieren und Auswerten möglicher Ergebnisse vereinfacht wird. Beim Einsetzen einer Gewebe-spezifischen cDNA-Bank erhält man das größtmögliche Spektrum der von diesem Gewebe exprimierten Proteine und möglichen Interaktionspartnern.

4.1 Klonierung und Kontrolle der Expressions („bait“)-Konstrukte

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefevektoren pGBKT7 und pGADT7-Rec (siehe Kapitel 2.1.9) wurden aufgrund ihres hohen Proteinexpressionslevels und der hohen Signalstärken im Westernblot ausgewählt.

Der DNA-AD Vektor pGADT7-Rec für das „prey“ besitzt einen *full length* ADH1 Promoter, der eine hohe Proteinexpression während des logarithmischen Wachstums der Hefezellen ermöglicht. Zur Transkriptionsunterdrückung kommt es erst in späteren Wachstumsphasen durch Ethanolansammlung, einem Stoffwechselprodukt der Hefe. Der Vektor enthält die DNA-AD von GAL4 und ermöglicht durch LEU2 die Selektion auf

SD/-Leu-Medium. Für bakterielle Selektion steht noch eine Ampicillinresistenz zur Verfügung.

Der DNA-BD Vektor pGBKT7 für das „bait“ verfügt über ein 700 bp langes Fragment des ADH1 Promoter, das ihm zwar eine hohe Expression ermöglicht, jedoch nicht die spätere Ethanolbildung. Er enthält die DNA-BD von GAL4 und die Hefeselektion wird über die TRP1-Genexpression auf SD/-Trp Medium ermöglicht. Die Selektion in Bakterienkultur erfolgt über eine Kanamycinresistenz.

Die zum Screenen konstruierten Fragmente AB, CD und AD wurden gewählt, um die verschiedenen Abschnitte der zytosolischen Domäne des Protocadherins γ C5 zu repräsentieren. Das AB-Fragment stellt die variable Region der zytosolischen Domäne dar, das CD-Fragment die konstante Region und AD umfasst sowohl die variable als auch konstante Region der cytosolischen Domäne. Ziel war es, zuerst mit dem AD-Fragment zu Screenen und anschließend mit AB und CD, um positive Interaktionspartner des AD-Fragments der variablen oder konstanten Region zuordnen zu können. Bei der Proteinexpressionskontrolle der „bait“-Konstrukte sah man, dass das AB-Fragment nicht exprimiert wurde (Abb. 3.1.4 B). Eingebaute Stopcodons, *frameshift* Mutationen wie z.B. Deletion oder Insertion konnten durch Kontrollsequenzierung aller Konstrukte ausgeschlossen werden. Möglicherweise war das gebildete „bait“-Protein toxisch, das Peptid in der Hefe nicht stabil, oder eine korrekte Faltung bzw posttranslationale Modifikationen unter den gegebenen Bedingungen in der Hefe nicht möglich und führte zur Nicht-Expression respektive sofortigen Abbau.

Somit wurden die Versuche nur mit den „bait“-Konstrukten CD und AD fortgeführt.

4.2 Konstruktion der murinen cDNA-Bank

In dieser Doktorarbeit wurde eine murine cDNA-Bank durch homologe Rekombination in den Hefevektor pGADT7-Rec kloniert. Die Möglichkeit vorgefertigte, käuflich erwerbliche cDNA-Banken für die Screens zu verwenden wurde nicht in Betracht gezogen, da Bedenken bestanden in Bezug auf die Qualität solcher Banken und die Möglichkeit der unterrepräsentativ seltenen „preys“. Durch vielfache Amplifikation der

Banken besteht das Risiko, dass häufige „preys“ (*housekeeping* Gene) überproportional zu seltenen „preys“ vorhanden sind und mit seltenen Interaktionspartner unmöglich machen.

Die Vorteile der Konstruktion einer eigenen cDNA-Bank liegen darin, dass man spezifisch die gewünschte RNA, hier aus murinem Gehirn, einsetzen kann. Durch homologe Rekombination der cDNA in einen Hefevektor (pGADT7-Rec) innerhalb des Hefestamms AH109 wurden direkt Hefe-Matingbedingungen für den Hefestamm Y187 mit dem „bait“-Konstrukt geschaffen. Die cDNA wurde mit möglichst wenigen PCR-Zyklen synthetisiert um Fehler bei der Amplifikation zu vermeiden. Durch anschließende Gelfiltration der cDNA (siehe Kapitel 3.2.2) wurde sichergestellt, dass Fragmentgrößen < 200 bp aussortiert wurden. Fragmente, die Proteindomänen in Hefe exprimieren, bewegen sich im Größenbereich von 400 bis 800 bp. Größere Fragmente sind genauso wenig erwünscht, da sie die Gefahr bergen auf Proteinebene toxisch zu sein, nicht exprimiert zu werden oder nicht korrekt gefaltet zu werden. Ein Vorteil der homologen Rekombination in Hefe liegt darin, dass bei Hefen eine Überlappungssequenz von 30-40 bp ausreicht um erfolgreich homolog zu rekombinieren, eine Sequenzlänge, die leicht mit Hilfe spezifischer Primer an die gewünschte cDNA angehängt werden kann. Insgesamt wurden drei cDNA-Banken konstruiert.

Für die erste Bank wurde bereits vorhandene Maushirn gesamt-RNA verwendet. Die erhaltene Kolonienzahl belief sich auf < 10^6 cfu/3 μ g pGADT7-Rec. Da die Kolonienzahl weit unter den Anforderungen des Protokolls lag ($\geq 10^6$ cfu/3 μ g pGADT7-Rec), war vermutlich die verwendete Gesamt-RNA bereits partiell durch Nukleasen degradiert worden.

Für die zweite Bank wurde gesamt-RNA aus frischem murinem Gehirn extrahiert und sofort weiterverarbeitet. Diese Bank wurde für den ersten und zweiten Screen verwendet. Da erneut die geforderte Kolonienzahl für die cDNA Bank nicht erreicht wurde, wurde die Menge der eingesetzten Gesamt-RNA bei der Herstellung der dritten cDNA Bank erhöht.

Die dritte murine cDNA-Bank wurde mit der doppelten Ausgangsmenge an Gesamt-RNA aus murinem Gehirn und doppelter Menge an pGADT7-Rec Vektor konstruiert.

Diese Protokolländerung führte zu der gewünschten Kolonienzahl ($\geq 2 \times 10^6$ cfu/3 μ g pGADT7-Rec); diese cDNA-Bank wurde für den dritten Screen verwendet.

4.3 Vorversuche

Die Vorversuche dienten dazu, transkriptionale Autoaktivierungen der Reportergene im Hefestamm AH 109 auf den Selektionsmedien SD/-Leu, SD/-Trp, SD/-Leu/-Trp und SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp durch die eingesetzten Vektoren und „bait“-Fragmente auszuschließen.

Dazu wurden die „bait“-Fragmente sowohl in den DNA-BD Vektor pGBKT7 ligiert als auch in den DNA-AD Vektor pGAD424, welcher über die gleichen Eigenschaften wie pGADT7-Rec verfügt, jedoch zusätzlich eine *multiple cloning site* besitzt, um die „bait“-Fragmente in den Vektor klonieren zu können.

Die durchgeführten Vorversuche zeigten keinen Anhalt für eine Autoaktivierung der Reportergene, so dass das Hefe-2-Hybriden System zur Beantwortung der Fragestellung verwendet werden konnte.

4.4 Screens

1. Screen

Im ersten Screen wurden separat die Konstrukte pGBKT7-CD und pGBKT7-AD eingesetzt und mit der zweiten cDNA-Bank aus murinem Gehirn kombiniert. Trotz der zu geringen cfu/ 3 μ g pGADT7-Rec der Bank, zeigte sich als Ergebnis der Hefekreuzung bereits nach 3 Tagen das Wachstum einer übermäßigen Kolonienzahl (> 1000 Kolonien / Platte). Die Ursache dafür ist vermutlich die bereits in der Anleitung des Herstellers beschriebene „leaky“ HIS3 Expression, welche darin begründet liegt, dass auch Proteine, die keine dauerhafte Interaktion eingehen, in der Lage sind, die Transkription des HIS3 Gens zu induzieren und somit das Wachsen der Hefe auf SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp ermöglichen. Des Weiteren ist bekannt, dass es bei Verwendung des Hefestamms AH109 zu einer leicht erhöhten HIS3 Expression durch intrinsisch

wirkende DNA bindende Einheiten des „bait“-Proteins kommen kann. Um diesen Problemen beim zweiten Screen entgegenzuwirken, wurde 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) eingesetzt. 3-AT ist ein kompetitiver Feedback-Inhibitor des HIS3 Proteins (His3p) und wird verwendet, um bei niedrigem Level der His3p Expression die Biosynthese von L-Histidin zu verhindern und somit das Hintergrundwachstum falsch-positiver Klone zu supprimieren (Fields, 1993, Durfee *et al.*, 1993).

2. Screen

Der zweite Screen wurde mit den gleichen Konstrukten und der gleichen cDNA-Bank durchgeführt. Diesmal wurde den SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp –Platten jeweils 15 mM 3-AT zugefügt. Nach 5 Tagen zeigten die Platten wieder eine unzählbare Menge an Kolonien, so dass die Wirkung des 3-AT in Frage gestellt werden mußte. Um sowohl den 2. Screen als auch den Umgang mit 3-AT zu überprüfen, wurde eine neue Charge 3-AT verwendet, die erst kurzfristig vor der Zumischung in das Plattenmedium in Lösung gebracht wurde. Zusätzlich wurde bei Zugabe auf die Mediumtemperatur geachtet, da 3-AT bei Temperaturen über 50°C zerfällt. Diesmal wurden SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp-Platten mit verschiedenen 3-AT Konzentrationen hergestellt (20, 40, 60, 80, 100 mM) und eine exemplarische Platte des zweiten Screens auf die neuen 3-AT-Medien überimpft. Das Ergebnis zeigte Wachstum der gleichen Anzahl Hefekolonien auf Platten aller 3-AT Konzentrationen, was zu der Annahme führte, dass die verwendete murine cDNA-Bank entweder überdurchschnittlich viele falsch-positive „preys“ besaß oder das interagierende Hybridprotein disproportional häufig vorkommt (Luban *et al.*, 1993). Da ein systematischer Konstruktionsfehler in der murinen cDNA-Bank nicht auszuschließen war, wurde eine dritte cDNA-Bank konstruiert und für den folgenden Screen verwendet.

3. Screen

Im dritten Screen wurde die zuletzt erstellte cDNA-Bank mit Hefen, die das Konstrukt pGBKT7-AD enthielten, verpaart. Aus Zeitgründen wurde pGBKT7-CD nicht mitgeführt, da das CD-Fragment im AD-Fragment enthalten ist.

Diesmal wurden den SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp - Platten 20 mM 3-AT hinzugesetzt. Nach sieben Tagen wuchsen etwa 100 Kolonien pro Platte (insgesamt 60 Platten), ein

Ergebnis, dass in keinem Fall unüblich ist (Morkel *et al.*, 1997). Die deutlich niedrigere Kolonienzahl beim dritten Screen läßt sich vermutlich durch den Einsatz einer für den Hefestamm AH109 unüblich hohen Konzentration 3-AT und der qualitativ und quantitativ stringend überprüften murinen cDNA-Bank erklären.

4.5 Isolierte und identifizierte mögliche intrazelluläre Interaktionspartner der murinen Protocadherine

Insgesamt wurden 500 Kolonien zur weiteren Analyse auf SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp-Platten überimpft und mittels Kolonie-PCR kontrolliert, bevor sie sequenziert wurden.

Als einziger plausibler Interaktionspartner konnte der Klon 497 im NCBI Blast als C-terminaler Anteil des Calmodulin 1 Gens (*calm1*) identifiziert werden. Der isolierte und sequenzierte Klon umfasst die C-terminalen EF-Hand Strukturen 3 und 4 des Calmodulin Proteins und die Kalziumbindungsdomänen 3 und 4 (siehe Abb. 3.3.2.7).

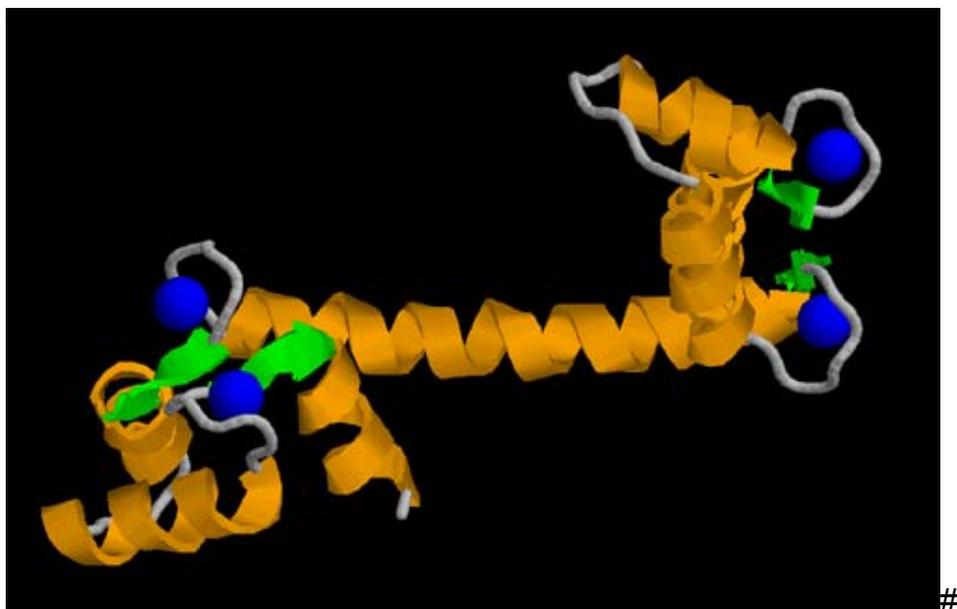


Abb. 4.5.1: Die Abbildung zeigt die typische Helix-Schleife-Helix-Struktur von Calmodulin mit den 4 Kalzium-bindenden Regionen (Public-Domain Programm RasMol).

Calmodulin gehört zur Gruppe der Kalzium-bindenden Proteine, die im Zytosol oder an der zytosolischen Membranseite lokalisiert sind. Calmodulin wird ubiquitär in allen Zellarten des Körpers exprimiert, jedoch vorrangig im zentralen Nervensystem. Das Protein besteht aus 149 Aminosäuren und enthält 4 Kalzium-bindende Domänen.

Es konnte mittlerweile eine große Vielfalt an Funktionen von Calmodulin nachgewiesen werden. Durch die Bindung von Kalzium unterstützt Calmodulin die Regulationen von diversen Enzymen und Proteinen und spielt eine essentielle Rolle in der Signaltransduktion und Freisetzung von Neurotransmittern (Xia & Storm 2005).

Bisher wurden als Interaktionspartner des aktivierten Calmodulin/Kalzium Komplexes unter anderem die CaM-abhängige Kinase (CaMK), die Adenylylcyclase, die Phosphatase Calcineurin und die endotheliale NO-Synthase (eNOS) beschrieben.

Als initial die Gruppe der Protocadherine entdeckt wurde, vermutete man, dass sie wie auch klassische Cadherine eine Adhäsionsfunktion hätten. Im weiteren Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass die adhäsiven Eigenschaften der Protocadherine recht schwach sind und sie eher zellregulierende Funktionen besitzen. Das würde auch die ubiquitäre Lokalisation wie z.B. an Synapsen, an nicht-synaptischen Plasmamembranen, axonalen und dendritischen tubulovesikulären Strukturen erklären (Phillips et al. 2003). Protocadherin des γ -Clusters spielen eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Synapsen (X. Wang, Su et al. 2002; Weiner et al. 2005). Bei Versuchen der Überexpression einer Protocadherin γ Isoform konnten Struktur- und Dichteänderung der Synapse gezeigt werden (Fernández-Monreal et al. 2009). Weiterhin scheint der cytoplasmatische Anteil des Protocadherin γ -Clusters an der verminderten Expression der Tyrosinkinase PYK2 und der fokalen Adhäsionskinase FAK beteiligt zu sein, wodurch die Apoptose der Synapse unterdrückt werden kann (J. Chen et al. 2009).

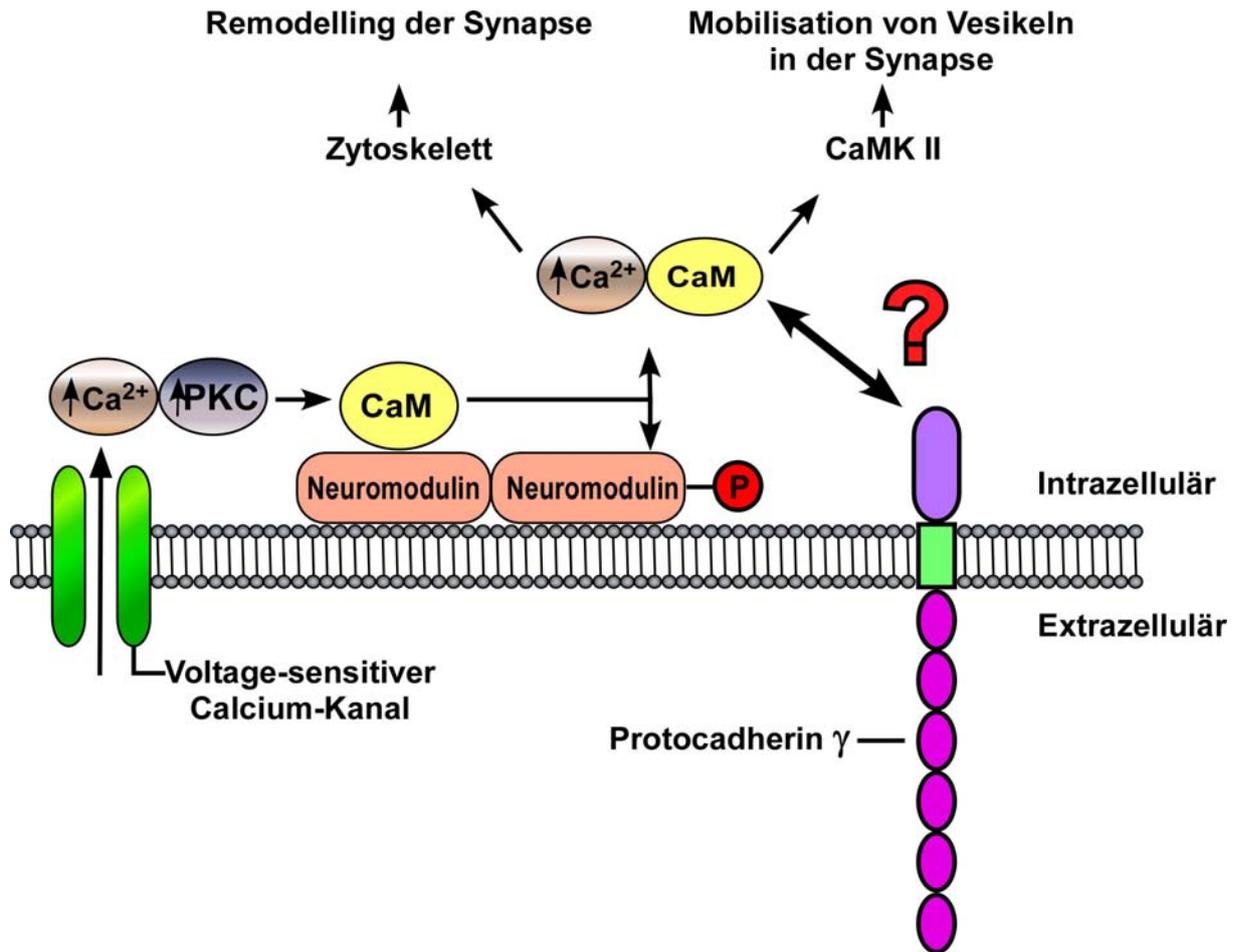


Abb. 4.5.2: Modelldarstellung der Interaktionsmöglichkeit von Protocadherin γ und Calmodulin (CaM) (modifiziert nach Xia & Storm 2005).

Sowohl Calmodulin als auch γ -Protocadherinen werden eine wichtige Rolle in der Strukturbildung und Plastizitätsänderung der Synapse zugeschrieben. Beide Proteine vermitteln Signale (A. Cheng et al. 2003) zur Unterdrückung der Apoptose, so dass ihre potentielle Protein-Protein-Interaktion intrazellulär möglich und sinnvoll wäre.

4.6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels des Hefe-2-Hybriden Systems Calmodulin als möglicher Interaktionspartner für Protocadherin γ C5 identifiziert. Um diese potentielle Protein-Protein-Interaktion zu bestätigen, müssen weitere Versuche durchgeführt werden.

Rescreen

Zunächst müssen die Bait- und Prey-Plasmide aus der Hefe isoliert und amplifiziert werden, bevor erneut durch Kotransformation der beiden Plasmide die Interaktion durch Wachstum auf den entsprechenden Selektionsmedien verifiziert werden kann.

Um eine direkte Interaktion des Preys mit der Bindungsdomäne des GAL4-Proteins im Bait-Vektor auszuschliessen, werden durch Primer-adaptierte PCR-Klonierung die Bait- und Prey-Sequenzen ausgetauscht und in die jeweils anderen Vektoren kloniert. Nach Amplifikation, erneuter Kotransformation und positiver Selektion auf entsprechenden Mangelmedien sollte das Prey in voller Länge aus einer cDNA-Bank isoliert und in den Prey-Vektor inkloniert werden.

Analyse der Interaktion des Gesamt-Prey Proteins im Hefesystem

Im Hefe-2-Hybriden System kann das Calmodulin-Protein in voller Länge auf seine Interaktion mit dem Bait analysiert werden. Zur Bestimmung der notwendigen und hinreichenden Peptidgrösse bzw. Proteindomäne für die Interaktion mit dem Bait können PCR-gestützt immer kürzere Fragmente hergestellt und per Kotransformation auf Interaktion getestet werden. Die Stärke der Interaktion kann photometrisch in relativen X-Gal Einheiten bestimmt werden, indem X-Gal zu transformierten AH109 Hefe-Flüssigkulturen hinzugegeben wird. Die Umwandlung zu einem blauen Farbstoff geschieht durch das induzierte Reporter-gen beta-Galactosidase (lacZ) unter Kontrolle von GAL4 Aktivierungssequenzen.

Selbst die Testung von möglichen Inhibitoren der Protein-Protein-Interaktion ist in solch einem Assay gut möglich, die Wasserlöslichkeit der eingesetzten Agenzien vorausgesetzt.

Zellkulturstudien

Für eine physiologischere Charakterisierung der Calmodulin-Protocadherin Interaktion ist auf zellulärer Ebene abschliessend eine Untersuchung im murinen Zellkultursystem notwendig.

Das Protocadherin γ C5 und das Calmodulin werden in entsprechende Vektoren inkloniert, zunächst einzeln in die Zellen transfiziert und ihre Expression per Westernblot überprüft. Durch Titration der Vektormengen in Kotransfektionen kann die Menge der Interaktionspartner variiert und in Pulldown-Assays die Interaktion überprüft werden. Des Weiteren sind Experimente mit GFP-Fusionsproteinen denkbar, in denen die beiden Proteine fluoreszenzmikroskopisch in der Zelle lokalisiert werden.

5 Zusammenfassung

Protocadherine gehören zur Superfamilie der Cadherine und werden in α , β und γ -Cluster unterteilt. Sie üben sowohl zelladhäsive als auch regulatorische Funktionen aus. Alle Mitglieder der Protocadherine besitzen eine variable extrazelluläre Domäne und eine größtenteils identische zytoplasmatische Domäne. Protocadherine kommen hauptsächlich im zentralen Nervensystem vor und scheinen in den Ablauf der synaptischen Signalübertragung und Synapsenerhaltung involviert zu sein.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels des Hefe-2-Hybriden Systems einen potentiellen intrazellulären Protein-Protein-Interaktionspartner des Protocadherins γ C5 zu identifizieren. Dazu wurde eine cDNA-Bank aus murinem Gehirn konstruiert und auf Interaktion mit dem konstanten, cytoplasmatischen Teil des Protocadherin γ C5 getestet. Als potentieller Interaktionspartner konnte Calmodulin (Calm1) identifiziert werden, welches durch weitere Versuche analysiert und verifiziert werden muß.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmed, Z.M. u. a., 2001. Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *American Journal of Human Genetics*, 69(1), 25-34.
- Ahmed, Z.M. u. a., 2003. The molecular genetics of Usher syndrome. *Clinical Genetics*, 63(6), 431-44.
- Ahmed, Z.M. u. a., 2003. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Human Molecular Genetics*, 12(24), 3215-23.
- Alagramam, K.N. u. a., 2001a. The mouse Ames waltzer hearing-loss mutant is caused by mutation of Pcdh15, a novel protocadherin gene. *Nature Genetics*, 27(1), 99-102.
- Alagramam, K.N. u. a., 2001b. The mouse Ames waltzer hearing-loss mutant is caused by mutation of Pcdh15, a novel protocadherin gene. *Nature Genetics*, 27(1), 99-102.
- Angst, B.D., Marcozzi, C. & Magee, A.I., 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 4), 629-641.
- Aplin, A.E. u. a., 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological Reviews*, 50(2), 197-263.
- Ball, S.L., Bardenstein, D. & Alagramam, K.N., 2003. Assessment of retinal structure and function in Ames waltzer mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(9), 3986-92.
- Bartel, P. u. a., 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques*, 14(6), 920-4.
- Barthels, D. u. a., 1992. High Degree of NCAM Diversity Generated by Alternative RNA Splicing in Brain and Muscle. *The European Journal of Neuroscience*, 4(4), 327-337.
- Behrens, J. & Birchmeier, W., 1994. Cell-cell adhesion in invasion and metastasis of carcinomas. *Cancer Treatment and Research*, 71, 251-66.
- Benhayon, D., Magdaleno, S. & Curran, T., 2003. Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of Disabled-1. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 112(1-2), 33-45.
- Ben-Yosef, T. u. a., 2003. A mutation of PCDH15 among Ashkenazi Jews with the type 1 Usher syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 348(17), 1664-70.

- Bevilacqua, M.P., 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annual Review of Immunology*, 11, 767-804.
- Bevilacqua, M.P. & Nelson, R.M., 1993. Selectins. *The Journal of Clinical Investigation*, 91(2), 379-87.
- Boller, K., Vestweber, D. & Kemler, R., 1985. Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 100(1), 327-32.
- Bonn, S., Seeburg, P.H. & Schwarz, M.K., 2007. Combinatorial expression of alpha- and gamma-protocadherins alters their presenilin-dependent processing. *Molecular and Cellular Biology*, 27(11), 4121-32.
- Bray, N.J. u. a., 2002. Screening the human protocadherin 8 (PCDH8) gene in schizophrenia. *Genes, Brain, and Behavior*, 1(3), 187-91.
- Brent, R., 1985. Repression of transcription in yeast. *Cell*, 42(1), 3-4.
- Brent, R. & Ptashne, M., 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, 43(3 Pt 2), 729-36.
- Buckle, D., 1998. Intracellular targets. *IDrugs: The Investigational Drugs Journal*, 1(5), 508-10.
- Bullions, L.C. & Levine, A.J., 1998. The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. *Current Opinion in Oncology*, 10(1), 81-7.
- Chen, J. u. a., 2009. alpha- and gamma-Protocadherins negatively regulate PYK2. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 2880-2890.
- Chen, S. & Paucha, E., 1990. Identification of a region of simian virus 40 large T antigen required for cell transformation. *Journal of Virology*, 64(7), 3350-7.
- Cheng, A. u. a., 2003. Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signaling upstream of Akt kinase in embryonic neocortical neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7591-7599.
- Chien, C.T. u. a., 1991a. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21), 9578-82.
- Chien, C.T. u. a., 1991b. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21), 9578-82.
- Clark, E.A. & Brugge, J.S., 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5208), 233-9.

- Corbi, A.L. u. a., 1987. cDNA cloning and complete primary structure of the alpha subunit of a leukocyte adhesion glycoprotein, p150,95. *The EMBO Journal*, 6(13), 4023-8.
- DeCaprio, J.A. u. a., 1988. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, 54(2), 275-83.
- Diacovo, T.G. u. a., 1996. Interactions of human alpha/beta and gamma/delta T lymphocyte subsets in shear flow with E-selectin and P-selectin. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1193-203.
- Diamond, M.S. & Springer, T.A., 1994. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Current Biology: CB*, 4(6), 506-17.
- Durfee, T. u. a., 1993. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes & Development*, 7(4), 555-69.
- Esumi, S. u. a., 2005. Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the protocadherin-alpha gene cluster in single neurons. *Nature Genetics*, 37(2), 171-6.
- Fernández-Monreal, M., Kang, S. & Phillips, G.R., 2009. Gamma-protocadherin homophilic interaction and intracellular trafficking is controlled by the cytoplasmic domain in neurons. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 40(3), 344-353.
- Fields, S. & Song, O., 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245-6.
- Fields, S. & Sternglanz, R., 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetics: TIG*, 10(8), 286-92.
- Frenette, P.S. & Wagner, D.D., 1996a. Adhesion molecules--Part 1. *The New England Journal of Medicine*, 334(23), 1526-9.
- Frenette, P.S. & Wagner, D.D., 1996b. Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells. *The New England Journal of Medicine*, 335(1), 43-5.
- Gayet, O. u. a., 2004. The b1 isoform of protocadherin-gamma (Pcdhgamma) interacts with the microtubule-destabilizing protein SCG10. *FEBS Letters*, 578(1-2), 175-179.
- Gearing, A.J. u. a., 1992. Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 667, 324-31.
- Gearing, A.J. & Newman, W., 1993. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunology Today*, 14(10), 506-12.
- Gietz, R.D. & Schiestl, R.H., 2007. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2(1), 38-41.

- Goldberg, M. u. a., 2000. μ -Protocadherin, a novel developmentally regulated protocadherin with mucin-like domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24622-9.
- Goldberg, M. u. a., 2002. Identification and expression analysis of the human μ -protocadherin gene in fetal and adult kidneys. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 283(3), F454-63.
- González-Amaro, R., Díaz-González, F. & Sánchez-Madrid, F., 1998. Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs*, 56(6), 977-88.
- Gumbiner, B.M., 1998. Propagation and localization of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(4), 430-5.
- Gumbiner, B.M. & Yamada, K.M., 1995. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(5), 615-8.
- Gumbiner, B.M., 2005. Coordinate gene regulation by two different catenins. *Developmental Cell*, 8(6), 795-6.
- Haas, I.G. u. a., 2005. Presenilin-dependent processing and nuclear function of gamma-protocadherins. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9313-9.
- Hampton, L.L. u. a., 2003. A new spontaneous mutation in the mouse Ames waltzer gene, *Pcdh15*. *Hearing Research*, 180(1-2), 67-75.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-80.
- Hatta, M., 1990. [Cell adhesion molecules in the nervous system]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, 35(4 Suppl), 349-56.
- Hill, J. u. a., 1991. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Research*, 19(20), 5791.
- Hogg, J.C. & Doerschuk, C.M., 1995. Leukocyte traffic in the lung. *Annual Review of Physiology*, 57, 97-114.
- Homayouni, R., Rice, D.S. & Curran, T., 2001. Disabled-1 interacts with a novel developmentally regulated protocadherin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(2), 539-47.
- Hope, I.A. & Struhl, K., 1986. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, 46(6), 885-94.
- Hyafil, F. u. a., 1980. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell*, 21(3), 927-34.

- Hynes, R.O., 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1), 11-25.
- Ito, H. u. a., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 163-8.
- Iwabuchi, K. u. a., 1993. Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, 8(6), 1693-6.
- Jamora, C. & Fuchs, E., 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biology*, 4(4), E101-8.
- Jontes, J.D. & Phillips, G.R., 2006. Selective stabilization and synaptic specificity: a new cell-biological model. *Trends in Neurosciences*, 29(4), 186-91.
- Juliano, R.L., 2002. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42, 283-323.
- Juliano, R.L. & Varner, J.A., 1993. Adhesion molecules in cancer: the role of integrins. *Current Opinion in Cell Biology*, 5(5), 812-8.
- Kaplanski, G. u. a., 1998. Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood*, 92(4), 1259-67.
- Keegan, L., Gill, G. & Ptashne, M., 1986. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science (New York, N.Y.)*, 231(4739), 699-704.
- Kemler, R. u. a., 1977. Surface antigen in early differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(10), 4449-52.
- Kohmura, N. u. a., 1998a. Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron*, 20(6), 1137-51.
- Kohmura, N. u. a., 1998b. Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron*, 20(6), 1137-51.
- Lane, D.P. & Crawford, L.V., 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278(5701), 261-3.
- Li, B. & Fields, S., 1993. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(10), 957-63.

- Lo, S.K. u. a., 1995. Induction of tissue factor on monocytes by adhesion to endothelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(9), 4768-77.
- Meng, J. u. a., 2005. Methods to study protein-protein interactions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 289, 341-58.
- Morishita, H. & Yagi, T., 2007. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(5), 584-92.
- Nelson, W.J., 1992. Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5084), 948-55.
- Nieto, M. u. a., 1998. Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(7), 3330-9.
- Nose, A., Nagafuchi, A. & Takeichi, M., 1987. Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules. *The EMBO Journal*, 6(12), 3655-61.
- Nose, A. & Takeichi, M., 1986. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *The Journal of Cell Biology*, 103(6 Pt 2), 2649-58.
- Obata, S. u. a., 1998. A common protocadherin tail: multiple protocadherins share the same sequence in their cytoplasmic domains and are expressed in different regions of brain. *Cell Adhesion and Communication*, 6(4), 323-33.
- Obata, S. u. a., 1995. Protocadherin Pcdh2 shows properties similar to, but distinct from, those of classical cadherins. *Journal of Cell Science*, 108 (Pt 12), 3765-73.
- Overduin, M. u. a., 1995. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5196), 386-9.
- Phillips, G.R. u. a., 2003. Gamma-protocadherins are targeted to subsets of synapses and intracellular organelles in neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(12), 5096-104.
- Ross, N.L.J. u. a., 2003. Quantitation of X-Y homologous genes in patients with schizophrenia by multiplex polymerase chain reaction. *Psychiatric Genetics*, 13(2), 115-9.
- Sago, H. u. a., 1995. Cloning, expression, and chromosomal localization of a novel cadherin-related protein, protocadherin-3. *Genomics*, 29(3), 631-40.
- Sano, K. u. a., 1993. Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *The EMBO Journal*, 12(6), 2249-2256.

- Schiestl, R.H. & Gietz, R.D., 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics*, 16(5-6), 339-46.
- Senzaki, K., Ogawa, M. & Yagi, T., 1999. Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell*, 99(6), 635-47.
- Shapiro, L., Fannon, A.M. u. a., 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*, 374(6520), 327-37.
- Shapiro, L., Kwong, P.D. u. a., 1995. Considerations on the folding topology and evolutionary origin of cadherin domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15), 6793-7.
- Shattil, S.J. & Ginsberg, M.H., 1997. Integrin signaling in vascular biology. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(11 Suppl), S91-5.
- Sluiter, W. u. a., 1993. Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 22 Suppl 4, S37-44.
- Springer, T.A., 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(6283), 425-34.
- Takei, Y. u. a., 2001. Two novel CNRs from the CNR gene cluster have molecular features distinct from those of CNR1 to 8. *Genomics*, 72(3), 321-30.
- Tasic, B. u. a., 2002. Promoter choice determines splice site selection in protocadherin alpha and gamma pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*, 10(1), 21-33.
- Vanhalst, K. u. a., 2001. The human and murine protocadherin-beta one-exon gene families show high evolutionary conservation, despite the difference in gene number. *FEBS Letters*, 495(1-2), 120-5.
- Wang, X., Su, H. & Bradley, A., 2002. Molecular mechanisms governing Pcdh-gamma gene expression: evidence for a multiple promoter and cis-alternative splicing model. *Genes & Development*, 16(15), 1890-905.
- Wang, X., Weiner, J.A. u. a., 2002. Gamma protocadherins are required for survival of spinal interneurons. *Neuron*, 36(5), 843-54.
- Weiner, J.A. u. a., 2005. Gamma protocadherins are required for synaptic development in the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1), 8-14.
- Wendeler, M.W. u. a., 2004. Ksp-cadherin is a functional cell-cell adhesion molecule related to LI-cadherin. *Experimental Cell Research*, 294(2), 345-355.

- Wu, Q. & Maniatis, T., 1999. A striking organization of a large family of human neural cadherin-like cell adhesion genes. *Cell*, 97(6), 779-90.
- Wu, Q. & Maniatis, T., 2000. Large exons encoding multiple ectodomains are a characteristic feature of protocadherin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3124-9.
- Wu, Q. u. a., 2001. Comparative DNA sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters. *Genome Research*, 11(3), 389-404.
- Xia, Z. & Storm, D.R., 2005. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(4), 267-276.
- Yagi, T. & Takeichi, M., 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & Development*, 14(10), 1169-1180.
- Yoshida, K. & Sugano, S., 1999. Identification of a novel protocadherin gene (PCDH11) on the human XY homology region in Xq21.3. *Genomics*, 62(3), 540-3.
- Yoshida, K. u. a., 1999. BH-protocadherin-c, a member of the cadherin superfamily, interacts with protein phosphatase 1 alpha through its intracellular domain. *FEBS Letters*, 460(1), 93-8.
- Yoshida, K. u. a., 1998. Cloning, expression analysis, and chromosomal localization of BH-protocadherin (PCDH7), a novel member of the cadherin superfamily. *Genomics*, 49(3), 458-61.
- Yoshida, K., 2003. Fibroblast cell shape and adhesion in vitro is altered by overexpression of the 7a and 7b isoforms of protocadherin 7, but not the 7c isoform. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 8(3), 735-741.

7 Anhang

7.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch Motivation, Geduld und Verständnis zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu allererst möchte ich mich bei Professor Dr. med. Eckart Köttgen für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas und für die gewährte experimentelle Freiheit sowie fachliche Unterstützung bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. med. Rudolf Tauber möchte ich mich dafür bedanken, dass ich die begonnene Arbeit unter seiner Leitung fortführen durfte.

Des weiteren möchte ich mich für die Tipps und Tricks im Bereich „Geheimnisse der Hefe-Genetik“ bei Jan Paul Rudolph bedanken und bei Peter und Christina Hoffmann, die mir stets mit Rat und Tat bis einschließlich der Korrekturlesung zur Seite standen.

Mein letzter Dank gilt meiner Mutter und meinem Ehemann für ihre unerschöpfliche Geduld und Unterstützung.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-amino-1,2,4-triazol
°C	Grad Celsius
μ	Micro
-A/	Adenosinmangelmedium für Hefe
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
ADE2	Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase
AK	Antikörper
Amp.	Ampicillin
AT	Annealing-Temperatur
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindungsdomäne
bp	"basepair" (Basenpaare)
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
cfu	colony forming units
CNR	Cadherin-related neuronal receptors
ddH ₂ O	deionisiertes, destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP`s	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC	Cadherin Ektodomäne
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZ	Elongationszeit
g	Erdschwerebeschleunigung 1g = 9.80665 m/s ²
HIS3	Imidazolglyzerinphosphat-Dehydrogenase
-H/-His	Histidinmangelmedium für Hefe
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
-L/-Leu	Leucinmangelmedium für Hefe

LB	Luria-Bertani-Medium
LiAc	Lithiumacetat
M	Molar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	"messenger" (Boten)-RNA
MW	Molekulargewicht
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NMDA	N-methyl-D-aspartat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	"phosphate buffered saline" (Phosphatgepufferte Salzlösung)
Pcdh γ	gamma Protocadherin
PEG	Polyethylenglycol
PCR	"polymerase chain reaction" (Polymerasekettenreaktion)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rt	reverse transkriptase
SDS	"sodium dodecylsulphate" (Natriumdodecylsulfat)
-T/-Trp	Tryptophanmangelmedium für Hefe
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UAS	upstream activation site
UV	Ultraviolettes Licht
Y2H	Yeast Two Hybrid
ZNS	Zentralnervensystem

7.3 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.4 Erklärung

Ich, Karin Weimann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Isolation und Charakterisierung möglicher intrazellulärer Interaktionspartner muriner Protocadherine“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter gearbeitet und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

7.5 Publikation

Teilveröffentlichung aus der Arbeit

C. Schlaak, P. Hoffmann, **K. May**, and A. Weimann, 2005. Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in E.coli: a comparison of different physical methods. *Biotechnol Lett.* (2005), 27, 1003-1005