

3.2. Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen der GNE

3.2.1. Valosin-Containing-Protein (VCP, p97)

Das bei der erblichen Einschlußkörperchenmyositis (h-IBM) krankheitsverursachende Gen ist das der GNE. Bestimmte Mutationen in der GNE können eine verminderte Oberflächensialylierung zur Folge haben (Noguchi *et al.*, 2004; Huizing *et al.*, 2004). Diese Hyposialylierung könnte Auslöser der Krankheit sein und einem ähnlichen Mechanismus zu Grunde liegen, wie er schon für die Hypo-O-Mannosylierung des α -Dystroglycans beschrieben wurde (Michele *et al.*, 2002). Die GNE existiert in mehreren Isoformen und es wird spekuliert, daß auch ihre unterschiedliche gewebsspezifische Verteilung verantwortlich für den Ausbruch der Krankheit sein kann. Die Ursache der h-IBM muß aber nicht unbedingt in der Biosynthese der Sialinsäuren zu finden sein. Es kann auch die Störung der Interaktion zwischen der GNE und potentieller Interaktionspartner ein Auslöser der Krankheit sein. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten mögliche Interaktionspartner der GNE näher untersucht werden. Bei einer der h-IBM phänotypisch ähnlichen Erkrankung, der IBMPFD, wurden sechs Mutationen im Gen des Valosin-Containing-Proteins (VCP) identifiziert und diese als krankheitsverursachend angesehen (Watts *et al.*, 2004). VCP ist ein 97 kDa großes, homohexameres Protein, welches evolutionär hochkonserviert ist. Als VCP kommt es in Säugetieren und Pflanzen, als VAT in Archaeobakterien, als CDC48 in Hefen sowie als p97 in *Xenopus* vor. Es gehört zu den Typ II AAA ATPasen (ATPases associated with a variety of activities) (Wang *et al.*, 2004), und ist in eine Vielzahl von Prozessen, wie Regulation des Zellzyklus und Suppression der Apoptose involviert. Außerdem findet es seine Funktion im Ubiquitin-Proteasom vermittelten Proteinabbauweg. Desweiteren kann es als Chaperon und Transkriptionsfaktor fungieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde VCP mittels BAC-TO-BAC[®]-Baculovirus-Expressionssystem in *Sf900*-Zellen exprimiert. Mit den exprimierten Proteinen und hGNE1-Konstrukten wurden anschließend *Pull-down*-Versuche, Co-Transfektionen und Co-Immunpräzipitationen durchgeführt.

3.2.2. Expression und Reinigung des humanen VCP-Proteins

Mit bereits vorhandener Bacmid-DNA (Lisewski, 2005) wurden Insektenzellen transfiziert. Nach Herstellung des Baculovirus, der VCP als GST-Fusionsprotein

Ergebnisse

exprimiert, und dessen zweimaliger Amplifikation wurden die Proteinexpressionen in *Sf900*-Zellen durchgeführt. Nach einer Infektionszeit von 48-72 h wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und je nach Volumina mittels einer Spritze oder durch die French-Press aufgeschlossen. Die nach einer weiteren Zentrifugation erhaltene lösliche Fraktion wurde über eine „Glutathion-Sepharose 4B MicroSpin“-Säule chromatographiert. Die resultierenden proteinhaltigen Fraktionen wurden anschließend in einer Western-Blot-Analyse mit einem α -GST-Antikörper analysiert. Humanes VCP wurde in *Sf900*-Zellen überexprimiert und über die Glutathion-Sepharose aufgereinigt (Abb. 42).

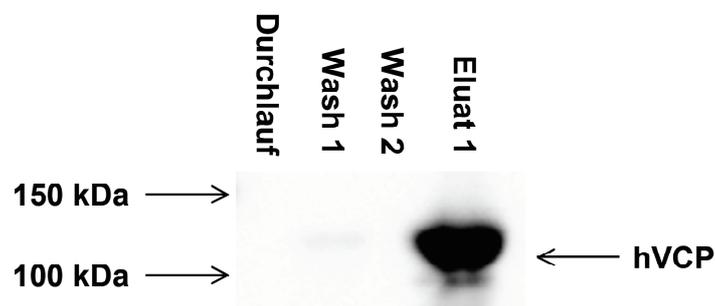


Abbildung 42: α -GST-Immunoblot der Aufreinigung von GST-VCP. GST-VCP konnte in Insektenzellen exprimiert und über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Im Eluat 1 war GST-VCP-Protein nachzuweisen.

3.2.3. Pull-down-Versuche mit GNE und VCP

Im Hinblick auf die erbliche Einschlußkörperchenmyositis (h-IBM) wurden *Pull-down*-Experimente durchgeführt. Humanes VCP wurde als GST-Fusionsprotein (GST-VCP), verschiedene GNE-Konstrukte wurden als His-Fusionsproteine (His-GNE) in Insektenzellen exprimiert. Es wurde mit N-terminale His-getagter hGNE1, N-terminal, His-getagter hGNE1 M712T, der häufigsten GNE-Variante mit h-IBM-typischer Mutation, und mit C-terminal His-getagter hGNE1 gearbeitet. Als Kontrolle diente das GST-Protein. Das GST-VCP-Fusionsprotein sollte über seine Affinität zu Glutathion an die Säule binden. Interagieren die hGNE1-Varianten mit dem VCP, so sollten die hGNE1-Varianten und das VCP mittels α -His- bzw. α -GST-Antikörper im Eluat nachgewiesen werden. GNE- bzw. VCP-spezifische Antikörper waren nicht verfügbar. Die Proteinexpression wurde in *Sf900*-Zellen durchgeführt. Nach einer Infektionszeit von 48-72 h wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, aliquotiert und mittels einer Spritze in einem hypotonen Puffer aufgeschlossen. Die durch

Zentrifugation entstandene lösliche Fraktion von GST-VCP wurde über eine „Glutathion-Sepharose 4B MicroSpin“-Säule chromatographiert. Die Säulen wurden gewaschen, die His-GNE-Lysate wurden über die Säulen gegeben, inkubiert, gewaschen und eluiert. Die Eluate wurden in Western-Blots mit anschließendem immunologischen Proteinnachweis analysiert. Es wurden sechs *Pull-down*-Experimente durchgeführt. Da die Ergebnisse für alle GNE-Konstrukte gleich waren, wurde nur eines in der nachfolgenden Abbildung exemplarisch dargestellt (Abb. 43). In den Eluaten konnten GST-VCP und GST im α -GST-Immunoblot nachgewiesen werden. Die Expression und das Binden an die Säule waren somit für beide Proteine erfolgreich. In den α -His-Immunoblots wurden keine Banden für die einzelnen GNE-Varianten detektiert, obwohl die GNE-Expressionen durch einen colorimetrischen Epimerase-Assay nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), was den Schluß zuläßt, daß unter diesen experimentellen Bedingungen keine Interaktion stattgefunden hat.

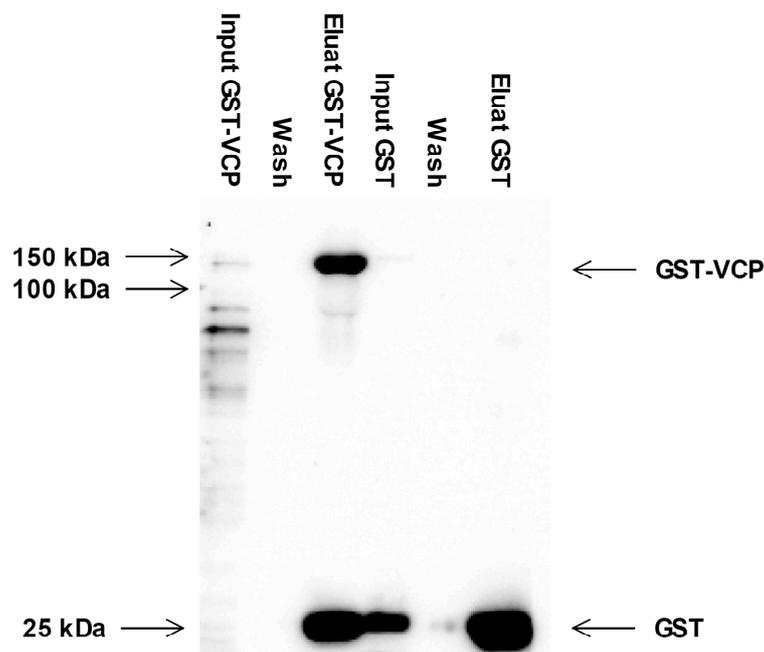


Abbildung 43: α -GST-Immunoblot des GST-Pull-downs mit GST-VCP und C-terminal His-getagtem hGNE1. VCP wurde als GST-Fusionsprotein (GST-VCP) und hGNE1 als C-terminales His-Fusionsprotein (GNE-His) in *Sf900*-Zellen exprimiert. Als Kontrolle wurde GST exprimiert. In den Eluaten sind GST-VCP bzw. GST nachweisbar. In dem α -His-Immunoblot waren keine Banden für hGNE1 detektierbar.

Als nächstes sollte der *Pull-down* als umgekehrter Ansatz durchgeführt werden. Die Zellen wurden analog den vorherigen Versuchen präpariert. Zunächst wurden die

Ergebnisse

hGNE1-Varianten an Ni-NTA-Agarose gebunden und gewaschen. Danach wurden das GST-VCP- und das GST-Lysat über die Säulen gegeben, inkubiert, gewaschen und eluiert. Zur Kontrolle wurden das GST-VCP- und das GST-Lysat auf die freie, ungebundene Ni-NTA-Agarose gegeben. Die Eluate wurden wiederum in Western-Blots mit anschließendem immunologischen Proteinnachweis analysiert. Sowohl der α -His-Immunoblot als auch der colorimetrische Epimerase-Assay zeigen, daß die His-GNE1-Varianten exprimiert wurden und an die Ni-NTA-Agarose gebunden haben. Im α -GST-Immunoblot konnten ebenfalls Banden detektiert werden. Man kann aber erkennen, daß sowohl GST-VCP als auch GST an die Ni-NTA-Agarose binden. GST besitzt offensichtlich eine hohe Affinität zum Ni-NTA-Liganden. Deshalb ist die GST-VCP-Bande, die im Eluat detektiert wurde, nicht aussagekräftig. Da auch hier die Ergebnisse für alle GNE-Konstrukte gleich sind, wurde in der nachfolgenden Abbildung exemplarisch nur ein *Pull-down*-Experiment dargestellt (Abb. 44).

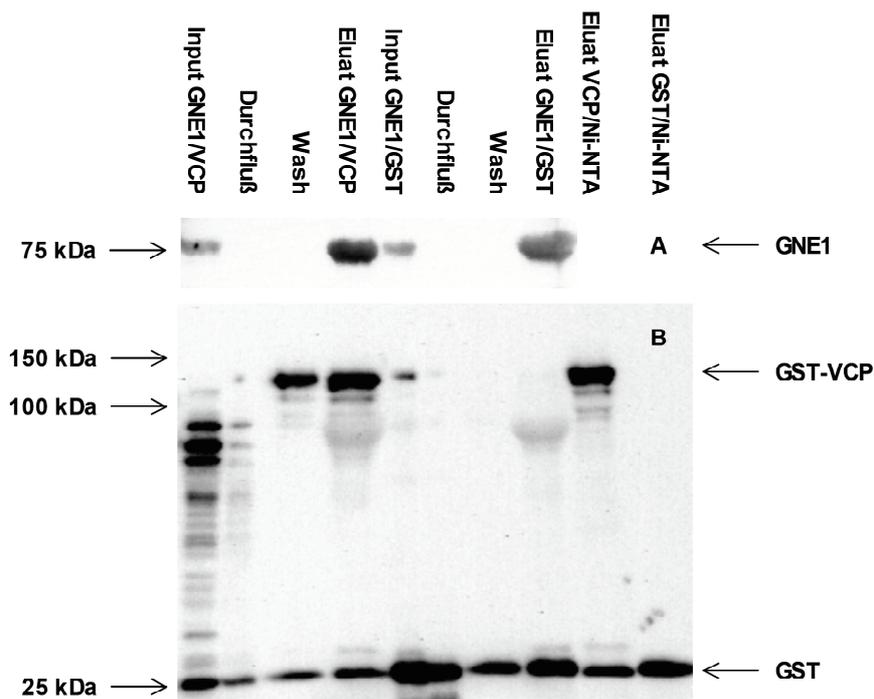


Abbildung 44: (A) α -His-Immunoblot des His-Pull-downs mit GST-VCP bzw. GST und hGNE1-C-His. hGNE1-C-His wurde exprimiert und an die Ni-NTA-Agarose gebunden. **(B) α -GST-Immunoblot des His-Pull-downs mit GST-VCP bzw. GST und hGNE1-C-His.** In den Eluaten sind GST-VCP bzw. GST nachweisbar. In den letzten beiden Proben ist zu sehen, daß GST-VCP bzw. GST an Ni-NTA-Agarose binden. Es findet keine Interaktion statt.

Auch in diesem Versuch konnte keine eindeutige Interaktion nachgewiesen werden. Die beiden *Pull-down*-Versuche wurden mit dem gleichen Ergebnis wiederholt. Daher

wurden die Expressionsbedingungen der *Pull-down*-Versuche variiert. Um entweder ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen bei der Protein-Protein-Interaktion zu verstärken, wurde zum einen unter isotonen und zum anderen unter hypertonen Pufferbedingungen gearbeitet (150 mM bzw. 300 mM NaCl). Sowohl das GST-VCP als auch das GST-Lysat wurden an die Glutathion-Sepharose gebunden und die GNE-Varianten wurden dazugegeben. Umgekehrt wurden die GNE-Varianten an die Ni-NTA-Agarose gebunden und GST-VCP bzw. GST wurden dazugegeben. Die Western-Blots (Abb. 45) zeigen das gleiche Ergebnis wie die vorherigen Versuche. Es ist keine eindeutige Interaktion zwischen VCP und hGNE1 nachzuweisen. Das läßt den Schluß zu, daß weder verstärkte ionische noch verstärkte hydrophobe Wechselwirkungen die Interaktion zwischen den Proteinen bewirken können.

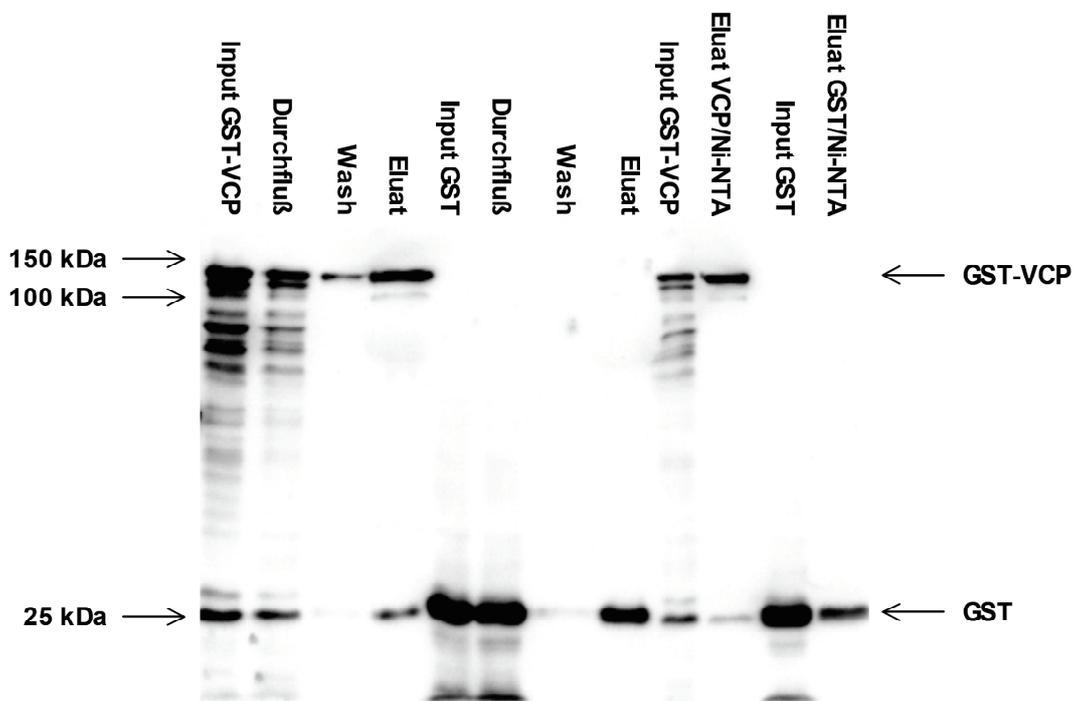


Abbildung 45: α -GST-Immunoblot des *Pull-downs* mit GST-VCP bzw. GST und hGNE1-C-His. In den Eluaten sind GST-VCP bzw. GST nachweisbar. In der drittletzten und letzten Probe ist zu sehen, daß GST-VCP bzw. GST an Ni-NTA-Agarose binden. Es findet keine Interaktion statt. hGNE1-C-His wurde exprimiert und an die Ni-NTA-Agarose gebunden (α -His-Immunoblot nicht gezeigt). hGNE1-Expression durch colorimetrischen Epimerase-Assay nachgewiesen.

3.2.4. Co-Transfektion von Insektenzellen mit VCP und hGNE1

Zu Beginn wurden *Sf900*-Zellen mit humanem GST-VCP bzw. als Kontrolle mit GST und C-terminal His-getagtem hGNE1 co-transfiziert. Nach einer Inkubation von 48-72 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in einem hypertonen Puffer

Ergebnisse

(300 mM NaCl) aufgeschlossen und die Lysate wurden zum einen über eine „Glutathion-Sepharose 4B MicroSpin“-Säule und zum anderen über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Abschließend wurden die Eluate mittels Western-Blot mit anschließendem immunologischen Proteinnachweis mit α -His- und α -GST-Antikörper analysiert. GST-VCP und GST ließen sich gut über die Glutathion-Säulen aufreinigen (Abb. 46A), wohingegen für hGNE1-His keine Banden detektiert werden konnten. Die GNE-Expression konnte aber durch einen colorimetrischen Epimerase-Assay nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte hGNE1-His gut über die Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden, jedoch im gleichen Eluat konnte kein GST-VCP bzw. GST nachgewiesen werden (Abb. 46B). Mit diesem Experiment ließ sich unter den gegebenen Bedingungen keine Interaktion zwischen VCP und GNE1 nachweisen. Generell waren durch die Co-Transfektion die Expressionsraten der Proteine wesentlich geringer.

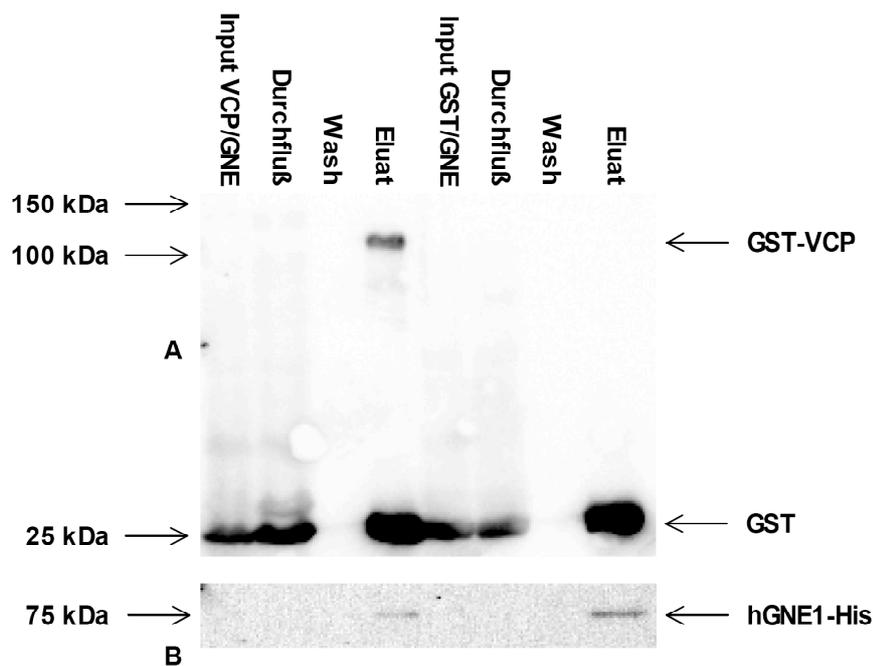


Abbildung 46: (A) α -GST-Immunoblot von über Glutathion-Sepharose aufgereinigten Lysaten der mit GST-VCP bzw. GST und hGNE1 co-transfizierten *Sf900*-Zellen. In den Eluaten sind GST-VCP bzw. GST nachweisbar. Für hGNE1 konnten keine Banden detektiert werden. (B) α -His-Immunoblot von über Ni-NTA-Agarose aufgereinigten Lysaten der mit GST-VCP bzw. GST und hGNE1 co-transfizierten *Sf900*-Zellen. hGNE1 bindet an das Säulenmaterial und ist in den Eluaten nachweisbar. In den gleichen Eluaten konnte jedoch kein GST-VCP bzw. GST nachgewiesen werden. Unter diesen experimentellen Bedingungen scheint keine Interaktion stattzufinden.

3.2.5. Analyse der Interaktion zwischen human VCP und GNE mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) können ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Mit Hilfe eines Antikörpers kann ein Protein mit samt seines Interaktionspartners aus einem Zelllysate präzipitiert werden. Das präzipitierte Protein und sein Interaktionspartner können anschließend in einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Mit den Lysaten der co-transfizierten Insektenzellen (GST-VCP/hGNE1 bzw. GST/hGNE1) wurde eine Co-IP durchgeführt. Die nach einer Zentrifugation erhaltenen Zellpellets wurden mit einem hypertonen (300 mM NaCl) Puffer aufgeschlossen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die nach einer weiteren Zentrifugation erhaltenen Lysate mit Protein G-Sepharose inkubiert. Daraufhin wurden die Lysate zuerst mit dem α -His-Antikörper und danach wiederum mit der Protein G-Sepharose inkubiert. Nach entsprechenden Waschschritten wurde die mit den Proteinen beladene Protein G-Sepharose pelletiert, abschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels Western-Blot analysiert. hGNE1 konnte über die Co-IP gut präzipitiert werden, im α -His-Western-Blot (Abb. 47) ist im Eluat eine deutliche Bande sichtbar, jedoch konnte im α -GST-Western-Blot (Blot nicht gezeigt) kein GST-VCP bzw. GST nachgewiesen werden. Auch dieses Experiment suggeriert, daß keine Interaktion zwischen VCP und hGNE1 existiert. Die Expressionsraten der Proteine waren auch hier wesentlich geringer. Weder andere Virusklone, noch Variationen in der Viruskonzentration oder Änderungen bei den Inkubationszeiten führten zu einer deutlichen Erhöhung der Expressionsrate.

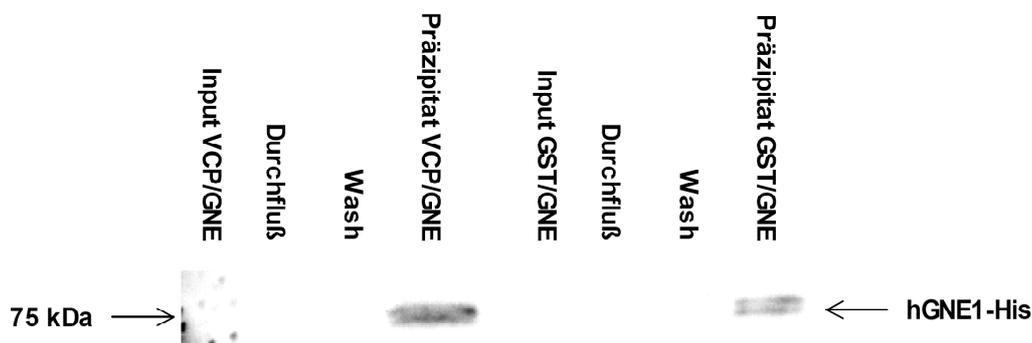


Abbildung 47: α -His-Immunoblot von Co-IP-Präzipitaten der Lysate von co-transfizierten Sf900-Zellen. hGNE1 konnte mittels Protein G-Sepharose präzipitiert werden und ist im Präzipitat nachweisbar. Es ist eine deutliche Bande sichtbar. Im α -GST-Immunoblot konnte in den Präzipitaten kein GST-VCP bzw. GST nachgewiesen werden. Auch dieses Experiment deutet auf keine Interaktion zwischen den einzelnen Proteinen hin.

Ergebnisse

Daraufhin wurden humanes GST-VCP und hGNE1-His einzeln in *Sf900*-Zellen exprimiert. Als Kontrolle wurde nur GST in *Sf900*-Zellen exprimiert. Das nach einer Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde mit einem hypertonen (300 mM NaCl) Puffer aufgeschlossen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde das nach einer weiteren Zentrifugation erhaltene GNE-Lysat mit Protein G-Sepharose inkubiert. Daraufhin wurde das GNE-Lysat zuerst mit dem α -His-Antikörper und danach wiederum mit der Protein G-Sepharose inkubiert. Die mit den Proteinen beladene Protein G-Sepharose wurde pelletiert und anschließend mit dem VCP- und dem GST-Lysat versetzt. Nach einer weiteren Inkubation und entsprechenden Waschschritten wurde die Protein G-Sepharose abschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels Western-Blot analysiert (Abb. 48). In beiden Präzipitaten war GNE1 nachzuweisen. In dem Präzipitat der Co-IP mit GST-VCP konnte mit dem α -GST-Antikörper nachgewiesen werden, daß GST-VCP vorhanden ist. Ebenso konnte aber auch in dem Präzipitat der Co-IP mit dem GST-Lysat GST nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin, daß GST unspezifisch mit dem α -His-Antikörper oder mit der Protein G-Sepharose interagiert, aber keine Interaktion zwischen VCP und GNE1 stattfindet.

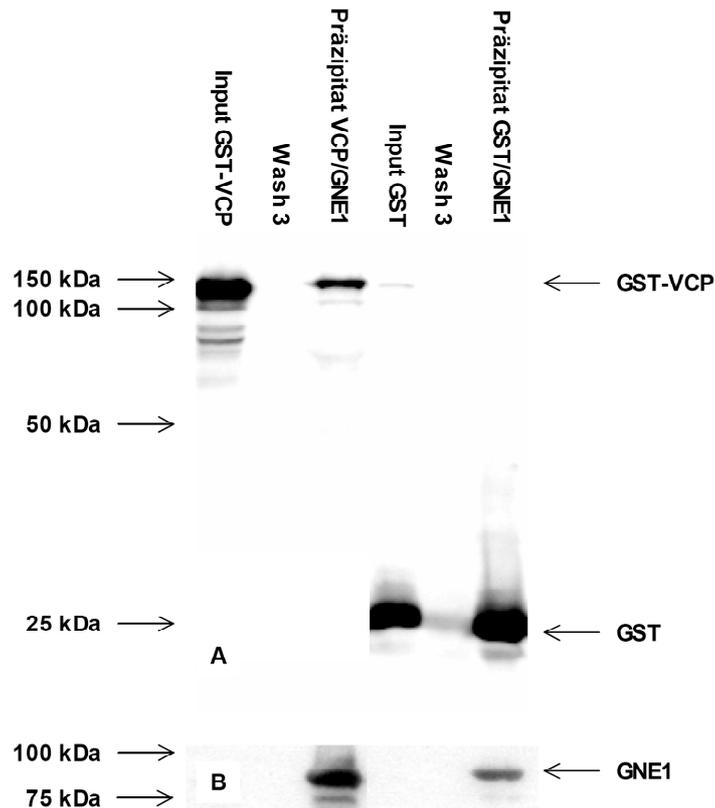


Abbildung 48: Western-Blot-Analysen von Co-IP-Präzipitaten der Lysate von einzeln mit GST-VCP bzw. GST und hGNE1 transfizierten Sf900-Zellen. (A) α -GST-Immunoblot der Co-IP: GST-VCP bzw. GST wurden exprimiert und sind in den Präzipitaten nachweisbar. (B) α -His-Immunoblot der Co-IP: hGNE1 wurde exprimiert, hat an den α -His-Antikörper gebunden und ist im Präzipitat nachweisbar. GST interagiert unspezifisch mit dem α -His-Antikörper oder mit der Protein G-Sepharose. Es findet keine Interaktion statt.

3.2.6. Oxidation Resistance Protein 1 (Oxr1)

Yeast-Two-Hybrid-Screens ergaben, daß auch Oxr1 ein Interaktionspartner der GNE sein kann (persönliche Mitteilung, Stella Mitrani-Rosenbaum). Das Oxr1-Protein ist in eukaryontischen Organismen evolutionär konserviert (Elliot *et al.*, 2004). Die Oxr1-Gene der einzelnen Spezies codieren Proteine mit unterschiedlichen Größen, die aber alle über eine konservierte 300 Aminosäure-große C-terminale Domäne verfügen. Die unterschiedlichen Transkripte werden gewebsspezifisch exprimiert. Es ist weiterhin bekannt, daß das humane Oxr1-Protein im Cytoplasma zum einen in einem speziellen Kompartiment um die Kernperipherie herum lokalisiert ist und zum anderen mit den Mitochondrien assoziiert. Es hat Funktionen im Schutz vor und in der Reparatur von oxidativen Schäden. Die Expression dieses Proteins wird durch Hitze und oxidativen Streß induziert (Elliot *et al.*, 2004).

Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte Oxr1 kloniert und in *E.coli* BL21-Zellen bzw. mittels dem BAC-TO-BAC®-Baculovirus-Expressionssystem in *Sf900*-Zellen exprimiert werden. Mit den exprimierten Proteinen und hGNE1-Konstrukten sollten anschließend *Pull-down*-Versuche durchgeführt werden.

3.2.7. Klonierung der humanen Oxr1-cDNA

Humanes Oxr1 sollte als GST-Fusionsprotein sowohl in *E.coli*- als auch in *Sf900*-Zellen exprimiert werden. Für die Amplifikation der Oxr1-cDNA wurde der kommerziell erhältliche Klon IRATp970F1055D6 (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung; Berlin, Deutschland) als Template eingesetzt. Bei der Überprüfung der cDNA-Sequenz des RZPD-Klons wurde ein zweites alternatives Startcodon identifiziert. Dies hat zur Folge, daß die cDNA für zwei Isoformen, eine lange (Oxr1 long, 94 kDa) und eine kurze (Oxr1 short, 85 kDa), des Oxr1-Proteins codieren kann. Es wurden die degenerierten Primer Oxr1 long-For bzw. Oxr1 short-For und Oxr1-Rev eingesetzt, die weiterhin die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme EcoRI bzw. NotI enthalten. Die PCR-Produkte wurden ausgeschnitten, extrahiert und in den pCR®2.1-TOPO-Vektor ligiert. Nach anschließender Transformation von *E.coli* TOP10-Zellen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, um positive Klone zu identifizieren. Die Plasmide der positiven Klone wurden isoliert. Da die Oxr1-cDNA eine interne EcoRI-Schnittstelle aufweist, wurde mit den Primern Mut Oxr1-For und Mut Oxr1-Rev eine Mutagenese-PCR durchgeführt und damit eine stille Mutation eingefügt. Nach dem DpnI-Verdau wurden die PCR-Produkte extrahiert, *E.coli* TOP10-Zellen wurden transformiert, Plasmide isoliert und ansequenziert. Nach Bestätigung der DNA-Sequenzen wurden die Inserts mit EcoRI und NotI ausgeschnitten und sowohl in den pGEX™-4T-1-Vektor als auch in den pFASTBAC™ 1-Vektor ligiert. Es wurden wiederum *E.coli* TOP10-Zellen transformiert, Plasmide isoliert und sequenziert. Nach Bestätigung der cDNA-Sequenzen wurden abschließend zum einen *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen und zum anderen *E.coli* DH10BAC™-Zellen für die Herstellung der Bacmid-DNA transformiert. Bei der cDNA-Sequenzierung stellte sich jedoch heraus, daß Oxr1 long im pFASTBAC™ 1-GST-Vektor mehrere Mutationen aufwies. Aus Zeitgründen wurde deshalb im Insektenzellsystem nur mit Oxr1 short weitergearbeitet.

3.2.8. Expression und Reinigung der humanen Oxr1-Isoformen

Nach der Transformation von *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen konnten Oxr1 long und Oxr1 short erfolgreich exprimiert werden. Für die Oxr1-Isoformen wurden jeweils mehrere BL21-Klone auf ihre Expressionsrate hin getestet. Nach der IPTG-Induktion wurden die Proteine über Nacht bei 16°C exprimiert. Dabei entsteht ein GST-Fusionsprotein, somit konnten die Proteine über eine „Glutathion-Sepharose 4B MicroSpin“-Säule aufgereinigt werden. Die anschließende SDS-PAGE-Analyse mit anschließender Silberfärbung zeigte für Oxr1 long bzw. für Oxr1 short eine prominente Bande bei einer Größe von etwa 160 kDa bzw. 140 kDa (Abb. 49). Eine Western-Blot-Analyse mit einem α -GST-Antikörper bestätigt die SDS-PAGE-Analyse.

Da die Größe der exprimierten Proteine nicht mit der aus den cDNA-Sequenzen vorhergesagten Größe übereinstimmt, wurden die Proteinbanden mittels Peptide-Mass-Fingerprint analysiert. Oxr1 long und short wurden in BL21 (DE3)-Zellen überexprimiert und über die Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Die drei Banden (1, 2a und 2b; Abb. 50) wurden ausgeschnitten, entfärbt und tryptisch verdaut.

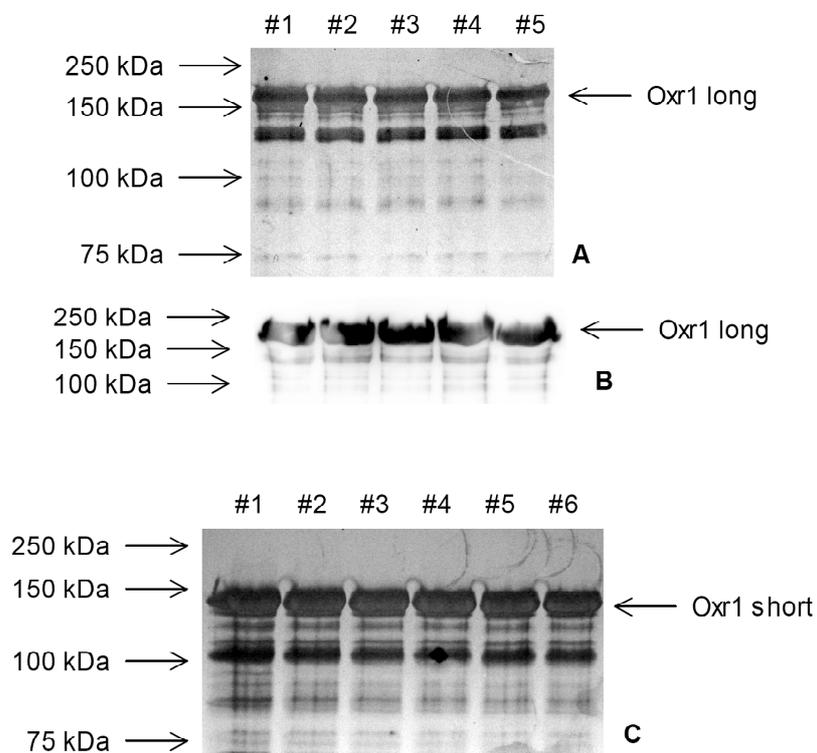


Abbildung 49: Überexpression der Oxr1-Isoformen in *E.coli* BL21-Zellen. (A) Die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung zeigt, daß Oxr1 long in BL21-Zellen überexprimiert wurde. (B) Der α -GST-Western-Blot bestätigt die aus der vorherigen SDS-PAGE erhaltenen Ergebnisse. Oxr1 long wurde in BL21-Zellen überexprimiert. (C) Die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung zeigt, daß Oxr1 short in BL21-Zellen überexprimiert wurde.

Ergebnisse

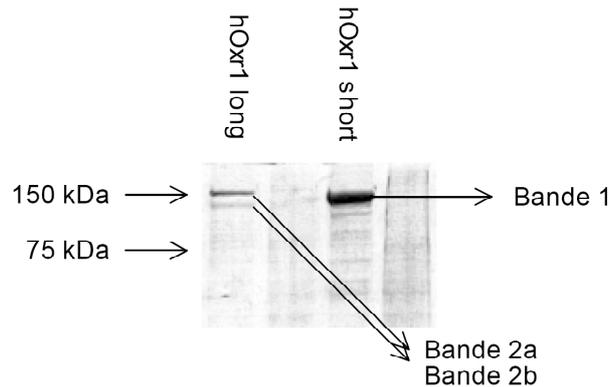


Abbildung 50: SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung von in *E.coli* BL21-Zellen exprimierten Oxr1 long- bzw. Oxr1 short-Protein. Die Proteine wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt und analysiert.

Der Peptide-Mass-Fingerprint führte zu dem Ergebnis, daß die Bande 1 Oxr1 short bzw. die Banden 2a und 2b Oxr1 long entsprechen. Beispielhaft ist das MALDI-MS-Spektrum (Abb. 51) dargestellt, welches für den tryptischen Verdau der Bande 1 aufgenommen wurde. Beschriftet sind nur die Massenpeaks, die später auch dem Protein human Oxr1 zugeordnet werden konnten. Für die Tatsache, daß zahlreiche andere Signale nicht zugeordnet werden können, gibt es mehrere Gründe wie z. B. mehrere überlesene Spaltstellen, unspezifische Spaltung, Modifikationen, Autolyse der Protease sowie Kontaminationen mit Keratin. Aus diesem Spektrum wird eine Peak-Liste extrahiert, mit der dann eine Internet-basierte Suche durchgeführt wird. Diese Suche ergab das oben genannte Ergebnis.

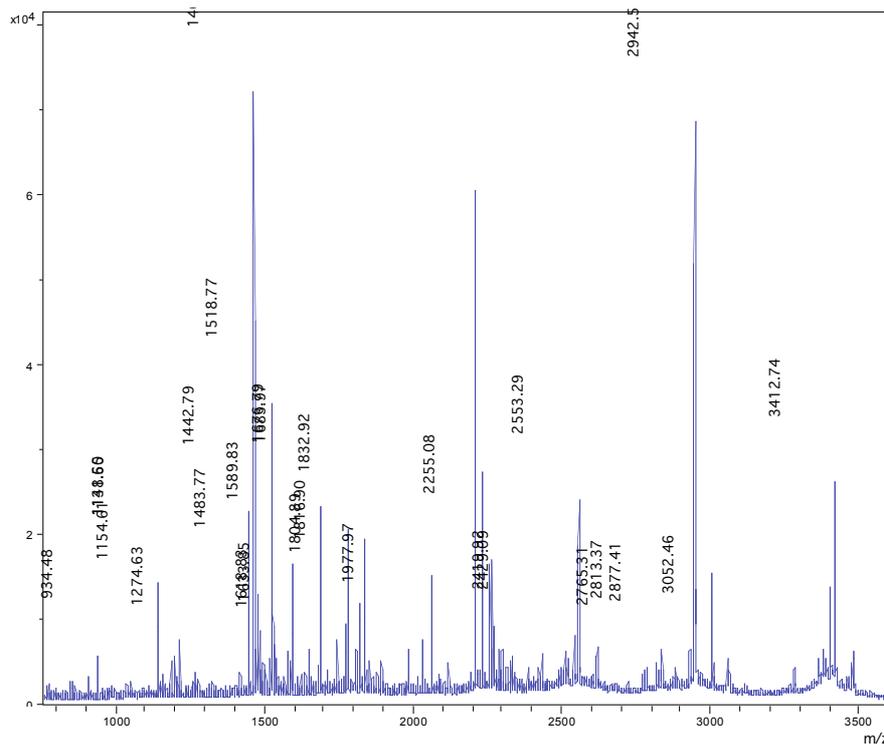


Abbildung 51: MALDI-MS-Spektrum von Oxr1 short. Die Bande 1 (s. Abb. 50) wurde tryptisch verdaut und anschließend in einer MALDI-MS analysiert. Beschriftet sind nur die Massenpeaks, die später auch dem Protein human Oxr1 zugeordnet werden konnten. Die MALDI-MS-Analysen wurden von Chris Weise durchgeführt, Mitarbeiter der AG Multhaupt (Freie Universität Berlin, Institut für Biochemie).

| | | | | | |
|-----|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| 1 | MSFQPKGTI | EYTVESRDSL | NSIALKFDTT | PNELVQLNKL | FSRAVVTGQV |
| 51 | LYVPDPEYVS | SVESPSPSLSP | VSPLSPTSSE | AEFDKTTNPD | VHPTEATPSS |
| 101 | TFTGIRPARV | VSSTSEEEEA | FTEKFLKINC | KYITSGKGTV | SGVLLVTPNN |
| 151 | IMFDPHKNDP | LVQENGCEEY | GIMCPMEEVM | SAAMYKEILD | SKIKESLPID |
| 201 | IDQLSGRDFC | HSKKMTGSNT | EEIDSRIRDA | GNDSASTAPR | STEESLSEDV |
| 251 | FTESELSPIR | EELVSSDELK | QDKSSGASSE | SVQTVNQAEV | ESLTVKSEST |
| 301 | GTPGHLRSDT | EHTNEVGTG | CHKTDLNMLE | MAIKEDQIAD | NFQGISGPKK |
| 351 | DSTSIKGNSD | QDSFLHENS | HQEESQKENM | PCGETAEFKQ | KQSVNKGKQG |
| 401 | KEQNQDSQTE | AEELRKLWKT | HTMQQTKQQR | ENIQQVSQKE | AKHKITSADG |
| 451 | HIESSALLKE | KQRHRLHKFL | CLRVGKPMRK | TFVSQASATM | QYYAQRDKKH |
| 501 | EYWFVAPQER | TDHLYAFFIQ | WSPEIYAEDT | GEYTPREPGFI | VVKKIEESET |
| 551 | IEDSSNQAAA | REWEITTRER | INSKQVATVK | ADLESESEFRP | NLSDPSELLL |
| 601 | PDQIEKLTKH | LPPRTIGYPW | TLVYGTGKHG | TSLKTLYRTM | TGLDTPVLMV |
| 651 | IKSDGQVFG | ALASEPLKVS | DGFYGTGETF | VFTFCPEFEV | FKWTGDNMFF |
| 701 | IKGDMDSLAF | GGGGGFALW | LDGDLYHGRS | HCKTFGNRT | LSKKEDDFIQ |
| 751 | DIEIWAFE | | | | |

Abbildung 52: Sequenzabgleich zwischen den in der MALDI-MS-Analyse gefundenen Peptide und den Datenbankeinträgen. Die in der Datenbank gefundenen Peptide sind rot dargestellt. Es wurden 27 Peptide von Oxr1 gefunden, Etwa 46% der Aminosäuren von Oxr1 konnten identifiziert werden.

Für die Expression von Oxr1 short in Insektenzellen mußte zu Beginn der Baculovirus hergestellt werden. Dazu wurden Sf9-Zellen mit der Bacmid-DNA transfiziert. Nach fünftägiger Inkubation konnte der Kulturüberstand, indem sich der

Ergebnisse

Virus befand, geerntet werden. Um den Titer des Virus zu erhöhen, erfolgte eine zweimalige Amplifikation des Transfektionsüberstands. Um zu überprüfen, ob geeigneter Virus für die Proteinexpression gebildet wurde, wurden die Zellen pelletiert, aufgeschlossen und das Lysat wurde mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert. Bei drei Virusklonen konnte eine schmale Bande mit einer Größe von 120 kDa detektiert werden. Mit diesen Klonen wurde weitergearbeitet. Nach zweimaliger Virusamplifikation wurden schließlich die optimalen Expressionsbedingungen (Viruskonzentrationen) ermittelt. Dazu wurden Zellen mit unterschiedlichen Volumina an Virusstock infiziert. Die Zellen wurden wiederum pelletiert, aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert. Es waren keine Unterschiede bei den verschiedenen Virusmengen sichtbar, alle Proben wiesen die gleiche prominente Bande bei 120 kDa auf. Die Proteinexpression wurde in *Sf900*-Zellen durchgeführt. Nach einer Infektionszeit von 48-72 h wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und je nach Volumina mittels einer Spritze oder durch die French-Press aufgeschlossen. Die durch Zentrifugation entstandene lösliche Fraktion des Zelllysats wurde über eine „Glutathion-Sepharose 4B MicroSpin“-Säule chromatographiert. Die proteinhaltigen Eluate wurden anschließend in einer SDS-PAGE mit Silberfärbung und in einer Western-Blot-Analyse mit einem α -GST-Antikörper analysiert. Oxr1 short konnte in *Sf900*-Zellen überexprimiert und über die Glutathion-Sepharose aufgereinigt werden.

3.2.9. Pull-down-Versuche mit GNE und Oxr1

Humanes Oxr1 long und Oxr1 short wurden als GST-Fusionsprotein (GST-Oxr1 long bzw. GST-Oxr1 short) in *E.coli* BL21-Zellen exprimiert. hGNE1 wurde als C-terminal His-getagtes Fusionsprotein (hGNE1-His) in Insektenzellen exprimiert. Als Kontrolle diente das GST-Protein. Die GST-Oxr1-Fusionsproteine sollten über ihre Affinität zu Glutathion an die Säule binden. Interagiert hGNE1-His mit GST-Oxr1 long bzw. GST-Oxr1 short, so sollten hGNE1-His und GST-Oxr1 long bzw. GST-Oxr1 short mittels α -His- bzw. α -GST-Antikörper im Eluat nachgewiesen werden. Die Proteinexpression wurde in *Sf900*-Zellen durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 48-72 h wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, aliquotiert und mittels einer Spritze in einem hypotonen Puffer aufgeschlossen. Die durch Zentrifugation entstandene lösliche Fraktion von GST-Oxr1 wurde über eine „Glutathion-Sepharose 4B MicroSpin“-Säule chromatographiert. Die Säulen wurden gewaschen, das hGNE1-His-Lysat wurde

über die Säulen gegeben, inkubiert, gewaschen und eluiert. Die Eluate wurden in Western-Blots mit anschließendem immunologischen Proteinnachweis analysiert. In den Eluaten konnten GST-Oxr1 und GST im α -GST-Immunoblot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Expression und das Binden an die Säule waren somit für beide Proteine erfolgreich. In den α -His-Immunoblots wurden keine Banden für hGNE1 detektiert, obwohl die hGNE1-Expressionen durch einen colorimetrischen Epimerase-Assay nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), was den Schluß zuläßt, daß unter diesen experimentellen Bedingungen keine Interaktion stattgefunden hat.

Als nächstes sollte der *Pull-down* als umgekehrter Ansatz durchgeführt werden. Die Zellen wurden analog den vorherigen Versuchen präpariert. Zunächst wurde die hGNE1 an Ni-NTA-Agarose gebunden und gewaschen. Danach wurden die GST-Oxr1-Lysate und das GST-Lysat über die Säulen gegeben, inkubiert, gewaschen und eluiert. Zur Kontrolle wurden die GST-Oxr1-Lysate und das GST-Lysat auch auf die freie, ungebundene Ni-NTA-Agarose gegeben. Die Eluate wurden wiederum in Western-Blots mit anschließendem immunologischen Proteinnachweis analysiert. Da für Oxr1 long bzw. Oxr1 short die Ergebnisse wieder gleich waren, wird hier nur ein Ergebnis exemplarisch gezeigt. Sowohl der α -His-Immunoblot (Abb. 53A) als auch der colorimetrische Epimerase-Assay zeigen, daß hGNE1 exprimiert wurde und an die Ni-NTA-Agarose gebunden hat. Im α -GST-Immunoblot konnten ebenfalls Banden detektiert werden (Abb. 53B). Man kann man aber erkennen, daß sowohl Oxr1 long bzw. Oxr1 short als auch das GST an die Ni-NTA-Agarose binden. GST besitzt eine schon vorher beobachtete Affinität zum Ni-NTA-Liganden. Deshalb sind die Oxr1 long- bzw. Oxr1 short-Banden, die im Eluat detektiert wurden, nicht aussagekräftig.

Auch in diesem Versuch konnte keine eindeutige Interaktion nachgewiesen werden. Daher wurden die Expressionsbedingungen der *Pull-down*-Versuche variiert. Um entweder ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen bei der Protein-Protein-Interaktion zu verstärken, wurde zum einen unter isotonen und zum anderen unter hypertonen Pufferbedingungen gearbeitet (150 bzw. 500 mM NaCl). Sowohl die GST-Oxr1-Lysate und das GST-Lysat wurden an die Glutathion-Sepharose gebunden und hGNE1 wurde dazugegeben, als auch hGNE1 wurde an die Ni-NTA-Agarose gebunden und die GST-Oxr1-Lysate und das GST-Lysat wurden dazugegeben. Die Western-Blots zeigen das gleiche Ergebnis wie die vorherigen Versuche. Es ist keine eindeutige Interaktion zwischen Oxr1 und hGNE1

Ergebnisse

nachzuweisen. Das läßt auch hier den Schluß zu, daß weder verstärkte ionische noch verstärkte hydrophobe Wechselwirkungen die Interaktion zwischen den Proteinen bewirken können.

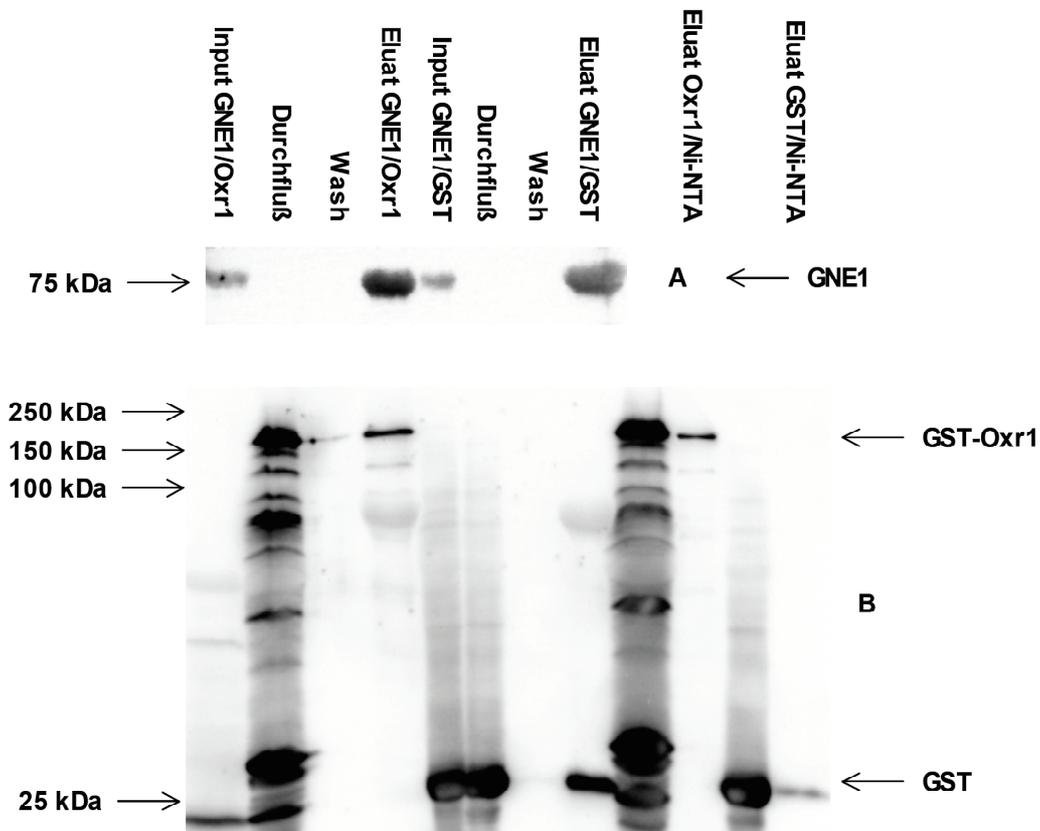


Abbildung 53: Western-Blot-Analysen des His-Pull-downs mit Lysaten von GST-Oxr1 bzw. GST und hGNE1 transfizierten Insektenzellen. (A) α -His-Immunoblot: hGNE1 wurde exprimiert und an die Ni-NTA-Agarose gebunden. (B) α -GST-Immunoblot: In den Eluaten sind GST-Oxr1 bzw. GST nachweisbar. In der drittletzten und letzten Probe ist zu sehen, daß GST-Oxr1 bzw. GST an Ni-NTA-Agarose binden. Es findet keine Interaktion statt.