

Für meine Eltern,  
Sonja und Lara.

Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann)

Cystein-reiches Protein 2, ein neues Substrat der cGMP-Kinase I:  
gewebespezifische Expression und Identifizierung von interagierenden  
Proteinen

Peter Pöschl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. P. Ruth (Eberhard-Karls-Universität Tübingen)
2. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

Die Dissertation wurde am 16.01.2003 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2003 angenommen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	cGMP-ABHÄNGIGE PROTEINKINASEN	7
1.1.1	EXPRESSION cGMP-ABHÄNGIGER PROTEINKINASEN	7
1.1.2	cGMP-KINASE UND INTRAZELLULÄRE Ca <sup>2+</sup> -KONZENTRATION	8
1.1.3	cGMP-KINASE UND SENSITIVITÄT KONTRAKTILER FILAMENTE	9
1.1.4	cGMP-KINASE UND ZELLPROLIFERATION	12
1.2	CRP2, EIN NEUES SUBSTRAT DER cGMP-ABHÄNGIGEN PROTEINKINASE	12
1.3	ZIEL DER ARBEIT	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>15</b>
2.1	BAKTERIEN- UND HEFENSTÄMME	15
2.1.1	VERWENDETE STÄMME	15
2.1.2	NÄHRMEDIEN UND ANTIBIOTIKA	15
2.1.3	KULTIVIERUNG	18
2.1.4	BESTIMMUNG DER ZELLDICHTE	18
2.1.5	VERWENDETE PLASMIDE	19
2.2	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	19
2.2.1	REINIGUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	19
2.2.1.1	Präzipitation von Nukleinsäuren	19
2.2.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	20
2.2.2	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNS	20
2.2.3	ENZYMATISCHE MODIFIKATION VON DNS	21
2.2.3.1	Restriktionsendonukleasen	21
2.2.3.2	Verknüpfung von DNS-Fragmenten mit T4 DNS-Ligase	21
2.2.4	AUFTRENNUNG UND ISOLIERUNG VON DNS-FRAGMENTEN	22
2.2.4.1	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	22
2.2.4.2	Agarosegel-Elektrophorese	23
2.2.4.3	Elektroelution	23
2.2.5	SEQUENZIEREN VON PLASMID-DNS UND PCR-PRODUKTEN	23

2.2.5.1	Sequenzierreaktion	24
2.2.6	POLYMERASE – KETTENREAKTION (PCR)	25
2.2.6.1	Standardprotokoll	26
2.2.7	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	26
2.2.8	ISOLIERUNG UND ANALYSE VON RNS	27
2.2.8.1	Isolierung von Gesamt-RNS	27
2.2.8.2	Isolierung von Poly-(A)-RNS	27
2.2.8.3	Gelelektrophorese von RNS	28
2.2.8.4	Herstellung <sup>32</sup> P-markierter Sonden	29
2.2.8.5	Northern-Blot-Analyse	29
2.3	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINEN	31
2.3.1	ORGANENTNAHME AUS RATTEN	31
2.3.2	PROTEINEXTRAKTION AUS RATTENGEWEBEN	31
2.3.3	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH LOWRY	32
2.3.4	SDS POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	33
2.3.5	SDS/TRICIN-POLYACRYLAMID-ELEKTROPHORESE	34
2.3.6	IMMUNOLOGISCHE DETEKTION	35
2.3.6.1	Protein Transfer durch Semidry-Blotting	35
2.3.6.2	Immundetektion	36
2.3.6.3	Proteindetektion durch Farbstoffe	38
2.4	ZWEI-HYBRID-SYSTEM	39
2.4.1	TRANSFORMATION VON HEFEZELLEN	41
2.4.2	LITHIUM – AZETAT TRANSFORMATION I	42
2.4.3	LITHIUM – ACETAT TRANSFORMATION II	42
2.4.4	PROTEINEXTRAKTION AUS HEFEN	43
2.4.5	ERNTEN DER TRANSFORMIERTEN ZELLEN	44
2.4.6	BESTIMMUNG DER WIEDERAUSPLATTIERUNGSEFFIZIENZ	45
2.4.7	DURCHMUSTERUNG DER cDNS-BIBLIOTHEK AUF INTERAKTOREN	45
2.4.8	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER β-GALAKTOSIDASE-AKTIVITÄT IN HEFEN	46

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
3.1	CHARAKTERISIERUNG DER INTERAKTION VON CRP2 UND CGKI	48
3.1.1	SPEZIFITÄT DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER	48
3.1.2	GEWEBESPEZIFISCHE VERTEILUNG VON CGKI UND CRP2	50
3.2	ISOFORM-SPEZIFISCHE INTERAKTION DER CGKI MIT CRP2	53
3.2.1	BASALE CHARAKTERISIERUNG VON CRP2 ALS KÖDERPROTEIN	54
3.2.2	INTERAKTION DER VERSCHIEDENEN ISOFORMEN DER CGKI MIT CRP2	56
3.2.3	ISOFORM SPEZIFISCHE INTERAKTION VON CRP2 MIT CGKI	57
3.3	CRP2-INTERAKTORSUCHE	59
3.3.1	ÜBERPRÜFUNG DER SPEZIFITÄT DER CRP2/EIF-4AI-INTERAKTION	61
3.3.2	BESCHREIBUNG DES CRP2-INTERAKTORS EIF-4AI	62
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>64</b>
4.1	GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VON CRP2	64
4.2	INTERAKTION VON CRP2 UND CGKI	64
4.3	INTERAKTION VON CRP2 UND EIF-4AI	65
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>75</b>
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	75
6.2	KURZSCHREIBWEISE DER AMINOSÄUREN	78
6.3	LITERATURVERZEICHNIS	79

# 1 Einleitung

Eine Beeinträchtigung der Relaxation der glatten Muskulatur führt zu Erkrankungen wie Hypertonie, Asthma oder Dysmotilität des Magendarmtraktes. Achalasie und Morbus Hirschsprung sind Beispiele für die letztgenannte Störung. Auch die Hyperproliferation von glatten Muskelzellen steht in engem Zusammenhang mit menschlichen Erkrankungen wie z.B. der Arteriosklerose und der hypertrophen Pylorusstenose. Eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation sowohl des Tonus als auch der Zellproliferation von glatten Muskelzellen wird dem gasförmigen Botenstoff NO zugeschrieben (Loscalzo und Welch 1995; Lloyd-Jones und Bloch 1996). Vor einem knappen Vierteljahrhundert wurde erkannt, dass die Freisetzung von NO aus Nitroglyzerin zur Bildung von cGMP führt (Katsuki et al. 1977). Erst zehn Jahre später wurde gezeigt, dass der vom Endothel freigesetzte Relaxationsfaktor (EDRF) mit NO identisch ist (Ignarro et al. 1987). Nitroglyzerin und Natrium-Nitroprussid sind gängige Pharmaka, die über NO-Bildung zur Gefäßrelaxation führen. NO führt in seinen Zielzellen über eine Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) zum intrazellulären Anstieg von cGMP (Vaandrager und de Jonge 1996). Neben der löslichen Guanylatzyklase existiert auch eine partikuläre Guanylatzyklase. Davon existieren mehrere Isoformen (Carvajal et al. 2000), die nach extrazellulärer Stimulation mit natriuretischen Peptiden ebenfalls cGMP bilden (Garbers und Lowe 1994). Für den sekundären Botenstoff cGMP sind drei verschiedene Effektorproteine beschrieben worden: cGMP aktivierte Kationenkanäle (Biel et al. 1998), cGMP regulierte Phosphodiesterasen (Sonnenburg und Beavo 1994) und cGMP abhängige Proteinkinasen (Pfeifer et al. 1999). Die cGMP aktivierten Kationenkanäle spielen insbesondere für den Sehvorgang eine große Rolle. Intrazelluläre zyklische Nukleotide werden durch Phosphodiesterasen, von denen zahlreiche Isoformen vorliegen, abgebaut. Durch Stimulation der Isoform II bzw. Inhibition der Isoform III kann cGMP Einfluß auf die zelluläre Konzentration eines anderen sekundären Botenstoffes, des cAMP's nehmen. Der Abbau von cGMP erfolgt durch die Phosphodiesterase V (Lincoln et al. 1993). Spezifische Hemmung dieser Isoform durch das Pharmakon Sildenafil (Viagra®) führt zur Verstärkung der über cGMP-Kinasen vermittelten cGMP-Effekte. Durch Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur kommt es zur erhöhten Durchblutung der Corpora cavernosa und zur Erektion.

## 1.1 cGMP-abhängige Proteinkinasen

Die meisten Wirkungen von cGMP werden durch cGMP-abhängige Proteinkinasen vermittelt. Es gibt zwei verschiedene Gene für cGMP abhängige Proteinkinasen (cGK). Sie kodieren für die cGKI (Hofmann et al. 1992) und cGKII (de Jonge 1981). Beide cGMP-abhängigen Proteinkinasen sind Homodimere, deren monomere Untereinheiten ein Molekulargewicht von 77 kDa (cGKI) bzw. 87 kDa (cGKII) aufweisen. Sie werden wie die cAMP-abhängige Proteinkinase zu den Serin/Threonin-Kinasen gezählt. Die Funktion dieser Proteine besteht in der Verknüpfung einer Phosphatgruppe mit der Hydroxylgruppe von Serin- bzw. Threoninresten von Substraten. Durch diese posttranslationale Modifikation ändern Substrate ihre Tertiär- bzw. Quartärstruktur, was häufig zu einer Funktionsänderung dieser Proteine führt. Von der cGKI sind zwei Isoformen, cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  bekannt. Diese unterschiedlichen Formen entstehen durch alternatives Spleißen (Wernet et al. 1989) und unterscheiden sich in der Länge des Aminoterminus und ihrer Affinität zu cGMP (Ruth et al. 1997).

### 1.1.1 Expression der cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Die cGKI wurde in zahlreichen Organen des Säugetiers nachgewiesen. Eine besonders hohe Expression wurde in den Purkinjezellen des Cerebellum (Lohmann et al. 1981), in Thrombozyten (Waldmann et al. 1986) und in glatten Muskelzellen gefunden (Huber et al. 1998). In den neuronalen Strukturen des Hippocampus (Kleppisch et al. 1999) und der Spinalganglien (Qian et al. 1996) konnte ebenfalls eine starke Expression gezeigt werden. Auch in der Niere (Joyce et al. 1986), dem vaskulären Endothel (Draijer et al. 1995), neutrophilen Granulozyten und Makrophagen konnte die cGKI gefunden werden (Lincoln et al. 1993; Pryzwansky et al. 1995).

Die cGKII findet sich dagegen in den Chondrozyten des Säulenknorpels der Epiphysenfuge (Pfeifer et al. 1996), im aufsteigenden Teil der Henle Schleife der Niere sowie in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates (Gambaryan et al. 1996). Im Intestinum befindet sich die cGKII im Bürstensaum des Dünndarms (Markert et al. 1995).

### 1.1.2 cGMP-Kinase reguliert die intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Die muskuläre Kontraktion ist generell  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig. So korreliert auch der Tonus glatter Muskelzellen mit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Im entspannten Zustand blockiert Caldesmon die Myosin-Bindungsstellen am Aktin. Steigt  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle an, so lagert sich Calmodulin an Caldesmon und führt so zur Freigabe der Myosin-Aktin-Interaktion. Ferner führt ein solcher  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zur Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK), die die leichten Ketten des Myosins phosphoryliert. Dadurch kommt es zur Anlagerung von Myosin an Aktin (Peiper 1996). Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steigt einerseits durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von außen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, andererseits durch Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, vornehmlich des sarkoplasmatischen Retikulum. Letztere Möglichkeit wird durch den sekundären Botenstoff Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) gesteuert. Die Aktivierung der cGK führt auf verschiedenen Wegen zur Senkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle.

Erst kürzlich konnte ein neues Substrat der cGKIß identifiziert werden. Es handelt sich dabei um das sogenannte  $\text{IP}_3$ -Rezeptor-assoziierte-cGKI-Substrat (IRAG). Es konnte in vivo gezeigt werden, dass phosphoryliertes IRAG die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum nach  $\text{IP}_3$ -Stimulation inhibiert (Schlossmann et al. 2000).

Auch eine Phosphorylierung des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors am sarkoplasmatischen Retikulum durch cGKI konnte gezeigt werden (Komalavilas und Lincoln 1996). Obwohl ein Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über diesen Mechanismus nahe liegt, konnte dies bis dato jedoch nicht bewiesen werden (Haug et al. 1999).

Einen weiteren Mechanismus, der zur Senkung von  $\text{Ca}^{2+}$  führt, stellt die Phosphorylierung des Spannungs- und Kalzium-aktivierten maxi  $\text{K}^+$ -Kanals ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) durch cGKI dar (Alioua et al. 1998; Fukao et al. 1999). cGKI erhöht die Aktivität des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  durch Erhöhung der Spannungs- und Kalziumempfindlichkeit (Furukawa et al. 1996). Die Stimulation des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  führt durch  $\text{K}^+$ -Ausstrom zur Hyperpolarisation der Zelle. Diese Hyperpolarisation reduziert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle.

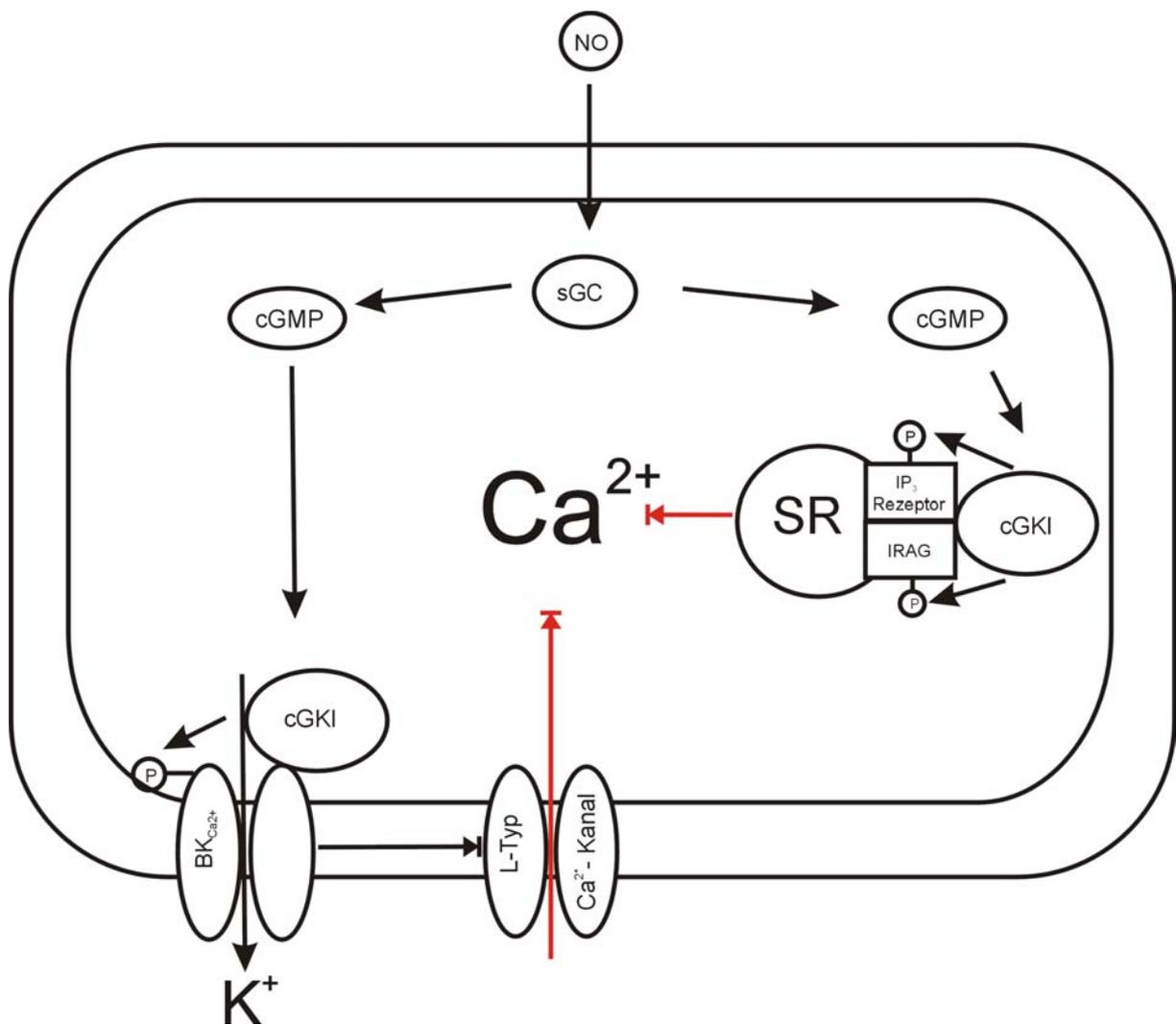


Abb. 1.1 Signalkaskade von NO/cGMP/cGKI. Erläuterungen siehe Text.

### 1.1.3 cGMP-Kinase beeinflusst die Sensitivität kontraktile Filamente

Die Spannung der glatten Muskulatur ist nicht nur von der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration abhängig. Die Sensitivität der kontraktile Filamente für Ca<sup>2+</sup> ist von deren Phosphorylierung abhängig. Bei gleichbleibender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration steigt die Kontraktilität mit dem Grad der Phosphorylierung der leichten Myosinketten (Somlyo et al. 1999). Die beiden Enzyme Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) und Myosin-Leichtketten-Phosphatase (PP1M) regulieren diesen Prozess. Die PP1M besteht aus drei Untereinheiten, einer Myosin bindenden Untereinheit (MBS), einer kleinen 20 kDa großen Untereinheit und der katalytischen Untereinheit. Die Rho-Kinase ist in

der Lage, die Myosin bindende Untereinheit zu phosphorylieren, was die Aktivität der PP1M herabsetzt und somit die Kontraktion steigert (Komatsu et al. 2002). Das kleine G-Protein RhoA aktiviert die RhoA-abhängige Kinase. Es konnte gezeigt werden, dass RhoA von der cGKI phosphoryliert und so inaktiviert wird (Sauzeau et al. 2000). Dies verhindert die Aktivierung der RhoA-Kinase und die durch sie vermittelte PP1M-Hemmung, was zu einer Herabsetzung der  $Ca^{2+}$ -Sensitivität der kontraktilen Filamente führt. Die erhöhte Kontraktion arteriosklerotischer Gefäße auf vasokonstriktorisches Reize wurde mit einer verstärkten Aktivierung im RhoA/RhoA-Kinase-Signalweg in Zusammenhang gebracht (Chitale et al. 2001). Es konnte des weiteren eine direkte Phosphorylierung der PP1M durch die cGKI $\alpha$  gezeigt werden. Durch die für diese Isoform spezifische aminoterminalen „Leucin-Zipper“-Domäne findet eine Interaktion der cGKI $\alpha$  mit der MBS von PP1M statt. Eine Inhibition dieser Bindung, die die Phosphorylierung der MBS durch cGKI $\alpha$  unmöglich macht führt zur Erhöhung der Kontraktilität bei gleichbleibender  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Surks et al. 1999). Telokin ist ein weiteres Substrat der cGKI, das an der Regulation der  $Ca^{2+}$ -Sensitivität der kontraktilen Filamente beteiligt ist. Phosphorylierung von Telokin führt zu einer Herabsetzung des Muskeltonus bei gleichbleibender  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Dieser Effekt wurde einer Regulierung der PP1M Aktivität zugeschrieben (Wu et al. 1998; Komatsu et al. 2002).

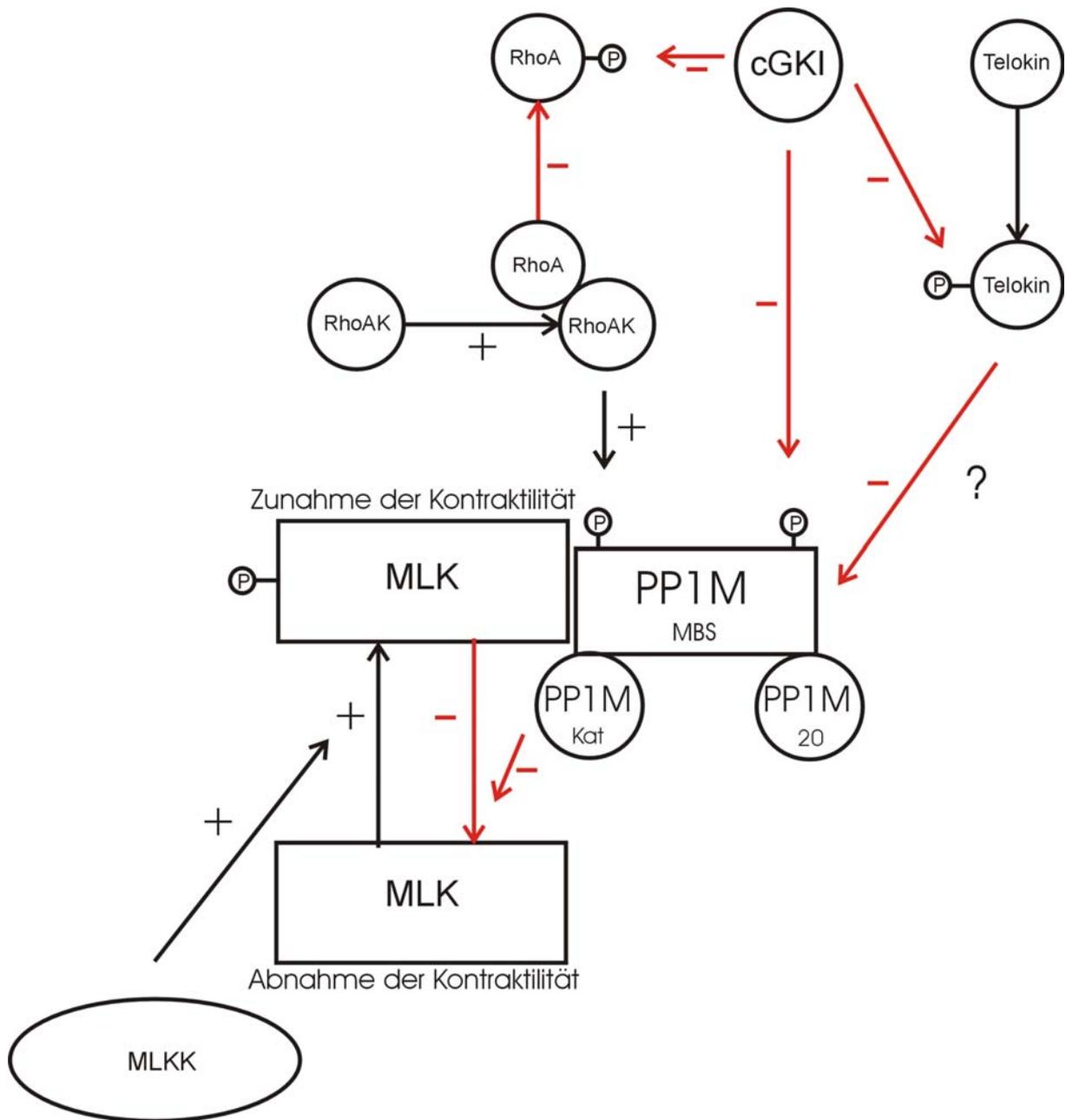


Abb 1.2 Beeinflussung der Sensitivität der kontraktilen Filamente durch cGKI. Rote Signalwege indizieren eine Verminderung, schwarze Signalwege eine Erhöhung der Sensitivität der kontraktilen Filamente. RhoA wird durch Phosphorylierung inaktiviert. Die Aktivität von PP1M wird durch Phosphorylierung von MBS reguliert. RhoAK-abhängige Phosphorylierung von MBS inhibiert PP1M, cGKI-abhängige Phosphorylierung von MBS stimuliert PP1M. Telokin wird cGKI-abhängig phosphoryliert. Diese Phosphorylierung vermindert die Kontraktilität bei gleichbleibender  $Ca^{2+}$ -Konzentration, möglicherweise über PP1M-Aktivierung. PP1M dephosphoryliert die MLK und senkt so deren  $Ca^{2+}$ -Sensitivität. Die MLKK erhöht die  $Ca^{2+}$ -Sensitivität der MLK durch Phosphorylierung. RhoAK = RhoA Kinase, MLK = Myosin leichte Ketten, MLKK = Myosin-leichte-Ketten-Kinase, PP1M = Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase, MBS = Myosin bindende Untereinheit der PP1M, Kat = katalytische Untereinheit der PP1M, 20 = 20kDa Untereinheit der PP1M, sonstige Abkürzungen siehe Text.

#### 1.1.4 cGMP-Kinase beeinflusst die Zellproliferation

Ein die Proliferation beeinflussender Effekt von NO ist lange bekannt (Garg und Hassid 1989). 1998 zeigten Chiche et al., dass sowohl NO, als auch cGMP die DNS-Synthese und die Proliferation von glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie der Ratte hemmten. Dieser Effekt war cGKI vermittelt und konnte nach spezifischer Inhibition der cGKI aufgehoben werden (Chiche et al. 1998). Mitogene wie epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) oder plättchenabstammender Wachstumsfaktor (PDGF) erhöhen die Aktivität Mitogen-abhängiger Kinasen (MAPK), die den Zellzyklus vorantreiben. Durch Erhöhung der cGK Aktivität werden die MAPK nach Stimulierung mit Wachstumsfaktoren gebremst. Dies konnte in Abhängigkeit von atrialem natriuretischem Faktor gezeigt werden (Pandey et al. 2000). Andererseits konnten andere Arbeitsgruppen einen konträren Effekt der cGK auf die Aktivität der MAPK, nämlich die Aktivierung ihrer Signalwege und damit eine Steigerung der Proliferation zeigen (Komalavilas und Lincoln 1996). Schließlich gelang es einer Arbeitsgruppe, sowohl proliferationssteigernde, als auch -hemmende Effekte der NO/cGMP Kaskade nachzuweisen. Es gelang, eine Konzentrationsabhängigkeit dieser Effekte darzustellen. Bei hohen Konzentrationen von NO wurde die Proliferation von Osteoblasten durch cGMP vermindert, bei niedrigen Konzentrationen zeigte sich eine cGMP-abhängige Wachstumsstimulation (Mancini et al. 2000). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass cGK in die Zellproliferation involviert ist. Bislang ist allerdings noch unklar, über welche Substrate diese Wirkungen vermittelt werden.

#### 1.2 CRP2, ein neues Substrat der cGMP-abhängigen Proteinkinase

Erst kürzlich wurde CRP2, „Cysteinreiches-Protein 2“, als neues Substrat der cGKIß beschrieben. CRP2 wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems aus einer cDNS-Bibliothek des Dünndarms als Interaktor der cGKIß identifiziert. Eine Kolokalisation der beiden Proteine in der inneren Zirkulärschicht, der Muscularis Mucosae und Neuronen des myenterischen und submukösen Plexus konnte gezeigt werden (Huber et al. 2000).

CRP2 ist ein 23 kDa großes Protein, das erstmals 1993 aus dem Gehirn der Ratte kloniert wurde und beim Menschen auf Chromosom 14 zu finden ist (Okano et al. 1993). Es ist aus zwei sehr ähnlichen Domänen aufgebaut. Diese beiden Domänen bestehen aus jeweils zwei Zinkfingern. Der Zinkkomplex wird durch Cysteine und Histidine gebildet. Nach dem zweiten Zinkfinger findet sich eine glycinreiche Region, die von einem nukleären Lokalisationssignal gefolgt wird. Dieser typische Aufbau ist weit verbreitet und wird nach der Erstbeschreibung in den Transkriptionsfaktoren Lin-11, Isl-1 und Mec-3 von *C. elegans* und von der Ratte „LIM-Domäne“ genannt. Das Segment zwischen den LIM Domänen enthält die Konsensussequenz Arg-Lys-Thr-Ser für die Phosphorylierung durch Serin-Threonin-Kinasen. Es konnte gezeigt werden, dass die cGKI CRP2 an dieser Stelle phosphoryliert (Huber et al. 2000).

Spekulationen über die Funktion von CRP2 können sich bislang nur auf verwandte Proteine von CRP2 beziehen. Die Proteine CRP1 (McLaughlin et al. 1994), CRP2/SmLIM (Jain et al. 1996) und CRP3/MLP (Arber et al. 1994) sind solche Proteine. Es wird angenommen, dass sie mit ihren LIM Domänen Protein-Protein Interaktionen eingehen (Feuerstein et al. 1994). Einige CRPs werden mit Zyxin und  $\alpha$ -Actinin entlang von Stress Fasern und an fokalen Adhäsionsplaques gefunden (Schmeichel und Beckerle 1994; Louis et al. 1997). Für CRP1 und CRP2/SmLIM konnte eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit der Expression von der Zellproliferation nachgewiesen werden (Weiskirchen und Bister 1993; Weiskirchen et al. 1995). CRP3/MLP Elimination in der Zellkultur blockiert die myogene Differenzierung von Myoblasten, während Überexpression diese beschleunigt (Arber et al. 1994). CRP3/MLP-defiziente Mäuse zeigen eine defekte Differenzierung des Herz- und Skelettmuskels (Arber et al. 1997).

Ein ähnlicher Zusammenhang von CRP2 mit der Zellproliferation bzw. –differenzierung wäre vorstellbar. Möglicherweise werden die antiproliferativen und differenzierenden Effekte der cGKI über CRP2 vermittelt.

### 1.3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es 1) das Expressionsmuster von CRP2 mit dem Expressionsmuster der cGKI zu vergleichen, um die Gewebe, in denen beide

Proteine ko-exprimiert werden, zu identifizieren. 2) Die Spezifität der CRP2-cGKI-Interaktion soll bezüglich der cGKI-Isoformen genauer analysiert werden. 3) Den Hauptteil der Arbeit nimmt die Suche nach neuen Interaktionspartnern von CRP2 ein. Mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems sollen mit CRP2 interagierende Proteine gefunden werden. Aufgrund der daraus entstehenden Erkenntnisse könnten genauere Aussagen über die Funktion von CRP2 getroffen werden, die bislang unbekannt ist. Möglicherweise ergeben sich so auch neue Einsichten in den gesamten NO-cGMP-cGK Signaltransduktionsweg und ein besseres Verständnis der Krankheiten, die mit Veränderungen in diesem System assoziiert sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterien- und Hefenstämmen

#### 2.1.1 Verwendete Stämme

##### **Bakterien:**

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde als Wirtsorganismus der chemisch kompetente *Escherichia coli* Stamm Epicurian Coli<sup>®</sup> XL2-Blue MRF' (Stratagene) verwendet. Sein Genotyp kann mit  $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{endA1 supE44 thi-1 recA1 gxrA96 relA1 lac[F'proAB lacI}^q\text{Z}\Delta\text{M15 Tn10(Tet}^r\text{) Amy Cam}^r\text{]}^a$  beschrieben werden.

##### **Hefen:**

Die Identifikation von Interaktionspartnern mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems wurde in dem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm EGY 48 (Brent Labor, Boston Massachusetts, Invitrogen) durchgeführt. Dieser Hefestamm besitzt folgenden Genotyp: MAT $\alpha$ , his3, trp1, ura3, LexA<sub>opx6</sub> –Leu2. Deshalb konnten Uracil, Tryptophan und Histidin als Selektionsmarker eingesetzt werden. Das unter der Kontrolle von 6 LexA-Operatoren stehende genomische Leucin Gen diente als Reporter-Gen.

#### 2.1.2 Nährmedien und Antibiotika

Zur Züchtung von *E. coli* Bakterien wurde das Luria-Bertani (LB)-Medium verwendet. NZY<sup>+</sup>-Medium wurde verwendet, um frisch transformierte Bakterien zu suspendieren. Sämtliche zur Bakterienzucht benutzten Medien wurden durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C und 2 bar sterilisiert. LB-Medium wurde bei Raumtemperatur und NZY<sup>+</sup>-Medium bei –20°C gelagert.

<b>LB-Medium:</b>		<b>NZY<sup>+</sup>-Medium:</b>	
Pepton 140 (Gibco)	10 g	NZ Amin	10 g
Hefeextrakt (Gibco)	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g	NaCl	5 g
Glukose	1 g	pH	7,5
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml		
pH	7,2 – 7,5		

Dem NZY<sup>+</sup>-Medium wurden vor Gebrauch je 12,5 ml 1 M MgCl und 1 M MgSO<sub>4</sub>, sowie 20 ml 20% Glucose hinzugefügt. Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde dem LB-Medium kurz vor Gebrauch das Antibiotikum Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Eine wässrige Stammlösung mit der Konzentration von 100 mg/ml (Ampicillin-Na<sup>+</sup>, Sigma) wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt. Für Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar (USB) zugegeben. Vor Zugabe des Antibiotikums ließ man das Medium auf 50°C abkühlen, um es dann in Petrischalen zu gießen.

Die Züchtung der Hefen erfolgte mit YPD-Medium bzw. –Agarplatten. Vor Transformationen wurde dem Medium Adenin zugegeben (YPAD). Für Hefen, die mit Plasmiden transformiert waren, kam ein Komplett-Minimal-Medium zum Einsatz, welches, je nach verwendetem Plasmid, bestimmte Aminosäuren bzw. Basen nicht enthielt, um Selektionsdruck zu erzeugen. Als Kohlenstoffquelle dienten entweder D-Glucose oder Galaktose, um den GAL1-Promotor zu aktivieren. Zur Beschleunigung des Wachstums wurde im Fall von Galaktose zusätzlich Raffinose verwendet. Um die Expression der β-Galaktosidase zu überprüfen, wurde zusätzlich das chromogene Substrat X-Gal hinzugefügt. Alle Medien wurden zur Sterilisation für 15 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert.

<b>YPD-Medium:</b>		<b>YPAD-Medium:</b>	
Hefeextrakt (Difco)	10 g	YPD-Medium (1l)	
Pepton (Difco)	20 g	Adeninhemisulfat (Sigma)	30 mg
H <sub>2</sub> O	ad 900 ml		
autoklavieren			
20% D-Glucose	100 ml		

**CM-Medien:**

Hefe Stickstoff Basis ohne Aminosäuren (YNB, Difco)	6,7 g
His, Ura – Dropout (Clontech)	0,75 g
His, Ura, Trp – Dropout (Clontech)	0,70 g
His, Ura, Trp, Leu – Dropout (Clontech)	0,60 g
His, Ura, Leu – Dropout (Clontech)	0,65 g
H <sub>2</sub> O ad 900 ml	
autoklavieren	
20 % D-Glucose (Difco)	100 ml
alteRNStiv: 20 % Galaktose / 10 % Raffinose (Difco)	100 ml

Die Zucker wurden sterilfiltriert. Agarplatten wurden durch Zugabe von 2 % Bacto Agar (Difco) und pH-Einstellung auf 5,8 hergestellt.

**X-Gal-Platten:** (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid, Eurogentec)

Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren (YNB, Difco)	6,7 g
entsprechender Dropout	x g
Bacto Agar	20 g
H <sub>2</sub> O ad 800 ml	
autoklavieren	
20 % entsprechender Zucker	100 ml
0,7 M KPO <sub>4</sub> pH 7,0	100 ml
20 mg/ml X-Gal in DMF	2 ml

**0,7 M KPO<sub>4</sub> pH 7,0:**

1 M KPO <sub>4</sub>	86.1 ml
1 MKPO <sub>4</sub>	53.9 ml
H <sub>2</sub> O	60 ml

Die Medien und Agarplatten wurden nach der Herstellung bei 4°C gelagert und maximal eine Woche verwendet. Die Zuckerlösungen wurden nach Sterilfiltration bei –20°C aufbewahrt.

### 2.1.3 Kultivierung

Die Kultivierung der *E. coli* Bakterien erfolgte aerob in LB Medium. Die Flüssigkulturen wurden in Plastikröhrchen oder Erlenmeyerkolben bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Um Einzelkolonien zu erhalten wurden Bakteriensuspensionen auf Ampicillin Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur längeren Aufbewahrung wurden sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Flüssigkulturen 1:1 mit Glycerol (Roth) vermischt und bei –80°C eingefroren. Die Kultivierung der Hefen erfolgte analog der Bakterien mit Hilfe der beschriebenen Medien bzw. Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsmarkern. Im Unterschied zu den Bakterien betrug die Inkubationstemperatur 30°C. Die längerfristige Aufbewahrung erfolgte in 15%igen Glycerolstocks bei –80°C.

### 2.1.4 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde durch photometrische Trübungsmessung bei 600 nm bestimmt. Als Referenz diente das jeweilige Medium. Eine  $OD_{600}$  von 1,235 entsprach im Fall der Hefen einer Zellzahl von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml. In besonders wichtigen Fällen wurde die Zelldichte zusätzlich mit der Neubauer Zählkammer überprüft.

## 2.1.5 Verwendete Plasmide

Tab. 2.1

Plasmid	Selektions-Marker	Eigenschaften	Verwendung
pEG202	HIS3, Ap <sup>r</sup>	ADHpro, LexA, MKS, ADHter	Expression d. Köderproteins (Gyrius 1993)
pJG4-5	TRP1, Ap <sup>r</sup>	GAL1pro, Transkriptionsaktivierungsdomäne, EcoRI-XhoI Klonierungsstelle, ADHter	Expression der cDNS Bibliothek (Gyrius 1993)
pSH18-34	URA3, Ap <sup>r</sup>	8 LexA Operatoren, lacZ Gen	LacZ Reporterplasmid, Indikator der Aktivierung der Transkription
pJK101	URA3, Ap <sup>r</sup>	GAL1pro, LexA Operator, lacZ Gen	konstitutiv aktives lacZ-Gen, Bestätigung der Bindung des Köderproteins an den lexA Operator
PRFHM1	HIS3, Ap <sup>r</sup>	ADHpro, LexA, Bicoid Domäne	Negativ-Kontrolle für die Aktivierung der Transkription
pSH17-4	HIS3, Ap <sup>r</sup>	ADHpro, LexA, GAL4 Aktivierungsdomäne	positiv Kontrolle für die Aktivierung der Transkription

## 2.2 Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren

### 2.2.1 Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Plasmide und DNS-Fragmente wurden durch Ethanol-Präzipitation konzentriert und von störenden Substanzen getrennt (Sambrook et al. 1989). Die Nukleinsäurelösung

wurde im Fall von DNS mit 1/10 Volumen 3M Natriumazetat und dem 2,5fachen Volumen 100% eiskalten Ethanol versetzt und für 15 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Fall von RNS wurde der Nukleinsäurelösung 1/10 Volumen 10x Probenpuffer des PolyA (Quik) mRNS Isolation Kits der Firma Stratagene und das 2,5fache Volumen 100% Ethanol zugegeben und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden in beiden Fällen die ausgefallenen Nukleinsäuren abzentrifugiert (12000 x g, 15min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), der Überstand dekantiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nach erneuter Zentrifugation (12000 x g, 15min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac) getrocknet und in der gewünschten Menge sterilen Wassers aufgenommen.

### 2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die aromatischen Basen der Nukleinsäuren absorbieren elektromagnetische Strahlung im Bereich von 250 – 270 nm. Es ist daher unter zu Hilfenahme des Lambert-Beerschen-Gesetzes möglich, die Nukleinsäurekonzentration zu bestimmen. Bei monochromatischem Licht der Wellenlänge 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine gemessene Extinktion von 1:

- 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  doppelsträngiger DNS
- 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  einzelsträngiger RNS

Da die aromatischen Aminosäuren der Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen, kann die Reinheit von DNS und RNS über das Verhältnis  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  abgeschätzt werden. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

### 2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNS

Zur Gewinnung hochreiner Plasmid-DNS wurden die „Qiagen Plasmid Mini bzw. Maxi Kits“ (Qiagen) verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse in Verbindung mit einer darauffolgenden chromatographischen Reinigung über eine Anionenaustauschersäule (Birnboim und Doly 1979). Sämtliche benötigten Lösungen wurden vom Hersteller bereitgestellt. Die Durchführung erfolgte gemäß der vom Hersteller beigefügten Anleitung. Die aufgereinigte Plasmid-DNS wurde photometrisch vermessen (siehe 2.2.1.2) und durch Fällung (siehe 2.2.1.1) in eine geeignete Konzentration gebracht.

## 2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNS

### 2.2.3.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Endo-Desoxyribonukleasen, die spezifische Basensequenzen innerhalb einer DNS-Doppelhelix erkennen und die DNS in beiden Strängen spalten (Sambrook et al. 1989). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme spalten ihr DNS-Substrat innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz, so dass Fragmente mit definierten Enden entstehen. Die Spaltung der DNS erfolgt dabei nicht an gegenüberliegenden Nukleotiden, sondern um 5 Nukleotide versetzt, was ein Überhängen einander komplementärer Basen am 5'- bzw. 3'-Ende zur Folge hat (als sticky ends bezeichnet). Die endständigen Nukleotide besitzen immer eine 5'-Phosphat-Gruppe und eine 3'-OH-Gruppe, was die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden ermöglicht. Restriktionsendonukleasen werden durch einen Buchstabencode nach dem Wirtsorganismus, aus dem sie isoliert wurden, benannt. Die verwendeten Enzyme, ihre Erkennungssequenzen und zugehörigen Puffer werden in Tabelle 2.2 dargestellt.

Tab. 2.2

<b>Restriktionsenzym</b>	<b>Firma</b>	<b>Erkennungssequenz</b>	<b>Puffer</b>
EcoR I	NEB	5' G/AATTC-3'	NEB 3
Xho I	NEB	5'-C/TCGAG-3'	NEB 3
Dde I	Boehringer	5'-C/TNAG	Boehringer H

Der Restriktionsansatz, für den von jedem Enzym 10 U eingesetzt wurden, wurde bei 37°C für 1 h inkubiert und anschließend durch Gelelektrophorese untersucht.

### 2.2.3.2 Verknüpfung von DNS-Fragmenten mit T4 DNS-Ligase

Die T4 DNS-Ligase (NEB) katalysiert ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende doppelsträngiger DNS. Dadurch wird eine Neukombination von DNS-Fragmenten sowie der Einbau in ein geeignetes Plasmid möglich. Als Substrat dienen sowohl überhängende als auch glatte Enden von zuvor mit Restriktionsenzymen behandelten DNS-Molekülen. Ligase, linearisierter Vektor und Fremd-DNS wurden in

Ligasepuffer gemischt und für 3 h bei 22°C inkubiert. Anschließend konnte das rekombinante Plasmid durch Transformation in *E. coli* eingeschleust werden.

## 2.2.4 Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten

Da die einzelnen Nukleotide der Nukleinsäuren durch Phosphate verknüpft sind, sind letztere mehrfach negativ geladen, was eine Auftrennung im elektrischen Feld nach Masse gestattet. Durch Interkalation mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Sigma) können die getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich diente ein DNS-Standard (1kb Leiter, Gibco-BRL). Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wurde dem Auftragspuffer der Farbmaler Bromphenolblau (Sigma) zugesetzt. Dieser wandert mit den DNS-Fragmenten von 10-100 bp und markiert somit die Lauffront.

### **1 x TBE (Laufpuffer)**

Tris	10,8 g
Borsäure (Roth)	5,5 g
0.5 M EDTA pH 8.0	4,0 ml
H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	

### **Auftragspuffer (6 x dye)**

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18 g
0,5 M EDTA pH 8,0	24ml
10 x TBE	60ml
Bromphenolblau (50mg/ml)	3ml
H <sub>2</sub> O ad 100 ml	

### **Ethidiumbromidstammlösung**

10 mg/ml (Sigma), wässrig

### 2.2.4.1 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

DNS-Fragmente mit einer Größe von 50-1000 bp wurden durch vertikale Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Dafür wurden 5%-ige Polyacrylamidgele und 1x TBE als Laufpuffer verwendet (Sambrook et al. 1989). Die Trennstrecke betrug 15 cm und die Dicke der Gele 0,75 mm.

### **Polyacrylamidgel (30 ml):**

Acrylamid/ N,N'-Bisacrylamid (29:1), 40% (Rotiophoresegel, Roth)	3,5 ml
10 x TBE	3 ml
dH <sub>2</sub> O ad 30 ml	
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, Serva)	35 ml
30 % APS (Fluka)	80 µl

Den DNS-Proben wurde vor dem Auftragen 1/6 Volumen Auftragspuffer zugegeben. Zum Einlaufen wurde eine Spannung von 150 V angelegt, zur Trennung 270 V für 1h. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5 min lang in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt, mit Wasser gewaschen und unter UV-Licht ausgewertet.

### **2.2.4.2 Agarosegel-Elektrophorese**

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten im Bereich von 1 bis 10 kb erfolgte durch horizontale Agarosegel-Elektrophorese (Sambrook et al. 1989). 0,7 % (g/v) Agarose (Seakam GTG, Biozym) wurde in 1 x TBE im Mikrowellenherd geschmolzen. Der Gellösung wurde vor dem Gießen in eine horizontale Kammer Ethidiumbromid zugegeben (finale Konzentration im Gel: 1 µg/ml). Die Elektrophorese erfolgte für 1-3 h bei konstanter Spannung von 100 V in einer BioRad-Elektrophoresekammer mit 1 x TBE als Laufpuffer. Vor dem Auftragen wurden die DNS-Proben mit 1/6 Volumen Auftragspuffer versetzt.

### **2.2.4.3 Elektroelution**

Um ein DNS-Fragment bestimmter Größe aus einem Gemisch zu isolieren, wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde in einen Dialyseschlauch mit TBE überführt und die DNS in einer horizontalen Elektrophoresekammer auf Eis bei 150 mA aus dem Gel isoliert. Nach etwa 1,5 h wurde die DNS durch Ethanol gefällt und in einem entsprechenden Volumen an Wasser aufgenommen.

### **2.2.5 Sequenzieren von Plasmid-DNS und PCR-Produkten**

Die Sequenzanalyse von Plasmid bzw. PCR-Produkt DNS erfolgte mit der von Sanger (Sanger et al. 1977) entwickelten Didesoxymethode. Hierbei synthetisiert

eine DNS-Polymerase in vitro an einer einzelsträngigen DNS-Matritze den komplementären Strang. In Anwesenheit von 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) kommt es zu Kettenabbrüchen, da eine OH-Gruppe in 3'-Position der Nukleotide für eine DNS-Verlängerung notwendig ist. Bei sorgfältiger Wahl des Verhältnisses zwischen dNTPs und ddNTPs entsteht eine Mischung aus DNS-Fragmenten jeder möglichen Länge. Die unterschiedlich langen Fragmente werden über eine Säule aufgetrennt, so dass die Polynukleotide nach aufsteigender Länge geordnet einem Detektor zugeführt werden. Die 4 Basen Guanin, Adenin, Thymin und Cytosin der ddNTPs sind jeweils mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, was eine Sequenzierung in einem Ansatz ermöglicht.

### 2.2.5.1 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktion zur Synthese der unterschiedlich langen, fluoreszierenden DNS-Fragmente wurde folgender Ansatz verwendet:

#### **Sequenzierreaktion**

Ready Reaction Mix (PerkinElmer)	8 µl
Primer (0,8 pmol/µl)	4 µl
DNS (50-500 ng)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die vier verschiedenen ddNTPs, die jeweils bei einer anderen Wellenlänge fluoreszieren (ddGTP: 540 nm, ddATP: 570 nm, ddCTP: 630 nm, ddTTP: 600 nm), die dNTPs und die Taq Polymerase waren in dem Ready Reaction Mix enthalten. Der Ansatz der Sequenzreaktion wurde kurz gemischt und in einem Thermocycler amplifiziert. Zunächst wurde die DNS 2 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde folgendes Protokoll für 25 Zyklen durchgeführt:

- 95°C, 30 s (Denaturierung)
- 50°C, 40 s (Annealing)
- 60°C, 4 min (Elongation)

Da nur ein Primer zugegeben wird, findet bei dieser Sequenzierreaktion nur eine lineare Vermehrung der DNS-Matritze, und nicht wie bei der PCR eine exponentielle Amplifikation statt.

Das Produkt der Reaktion muss mittels einer Gelfiltrationssäule (CentiSep Column, Perkin Elmer) von freien fluoreszierenden Nukleotiden gereinigt werden. Es wurde

auf die Säule pipettiert und 2 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Die gereinigte DNS wurde aufgefangen und danach für 15 min in einer Vacuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) resuspendiert, 3 min bei 95°C denaturiert und in einen ABI-Prism-Sequenzier-Automaten gestellt. Die Lösung wurde von dem Gerät in eine mit Polymer gefüllte Kapillare aufgezogen. Durch die angelegte Spannung von 12,2 kV wanderten die DNS-Fragmente nach Größe aufgetrennt durch den Laserdetektor. Aus der Abfolge der vom Laserdetektor bestimmten Farbsignale errechnete der Sequenzierautomat die Nukleotidabfolge.

### 2.2.6 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein in vitro Verfahren zur selektiven Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Zwei Oligonukleotid-Primer sind erforderlich, die spezifisch an den kodierenden bzw. an den nichtkodierenden Strang eines DNS-Moleküls binden. Diese beiden Primer grenzen dabei genau das gewünschte DNS-Stück ein. Die DNS-Matritze wird durch Denaturierung (94°C) zunächst in Einzelstränge aufgeschmolzen. Dann können die Primer, die in großem Überschuß vorliegen, an ihre entsprechende Zielsequenz binden (Primer-Annealing, 45-60°C). Die für die Primer-Anlagerung gewählte Temperatur ist von der Gibbs'schen Energie der Basenpaarbildung abhängig. Ausgehend von diesem kurzen doppelsträngigen Bereich wird der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'→3'-Richtung synthetisiert (Elongation, 72°C). Nach erneutem Aufschmelzen der DNS und Primer-Anlagerung ist die hitzestabile DNS-Polymerase in der Lage, erneut die komplementäre DNS Synthese durchzuführen. Mit jedem Zyklus kommt es zu einer Verdopplung der DNS und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Oligonukleotide flankierten DNS-Sequenz. Theoretisch entstehen bei n Zyklen  $2^{n-1}$  amplifizierte Moleküle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR verwendet, um die DNS-Sequenz von im Zwei-Hybrid-System entdeckten, interagierenden Proteinen zu amplifizieren.

### 2.2.6.1 Standardprotokoll

Die PCR wurde in einem Thermo Cycler (Biometra) durchgeführt. Es kam die thermostabile Taq-Polymerase (Boehringer) zum Einsatz. Es wurde eine sehr kleine Menge Hefezellen eines interessanten, auf Agarplatten wachsenden Klons mit einer Pipettenspitze abgenommen, in 74 µl Wasser suspendiert und 5 min bei 99°C denaturiert. Anschließend wurden 16 µl der Lösung 1 hinzugegeben und für weitere 5 min bei 96°C inkubiert. Während einer darauffolgenden 5-minütigen Inkubation bei 80°C kamen 10 µl der Lösung 2 hinzu. Danach wurde das in Tabelle 2.3 angegebene Protokoll gestartet.

Tab. 2.3

Anzahl der Zyklen	Denaturierung	Primer-Anlagerung	DNS-Polymerisation
25	94°C; 1 min	55°C ; 1 min	72°C; 1,5 min
1	94°C; 1 min	55°C ; 1 min	72°C; 5 min

#### Lsg. 1 :

Primer TH5 (25 pmol/µl)	1 µl
Primer TH7 (25 pmol/µl)	1 µl
dNTPs (10mM)	2 µl
10x Taq-Puffer	9 µl
H <sub>2</sub> O steril	3 µl

#### Lsg. 2 :

Taq-Polymerase	0,5 µl
10x Taq-Puffer	1 µl
H <sub>2</sub> O steril	8,5 µl

### 2.2.7 Transformation von Bakterien

Für die Amplifikation von Plasmiden wurden ultrakompetente E. coli Bakterien der Firma Stratagene (Epicurian Coli<sup>®</sup> XL2-Blue MRF') verwendet. Die chemisch kompetenten Bakterien wurden nach dem mitgelieferten Protokoll der Firma Stratagene transformiert. Nach der Transformation wurden die Bakterien zunächst 1 h in NZY<sup>+</sup> geschüttelt. Anschließend wurden sie auf Ampicillin-haltige Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch den bestehenden Selektionsdruck konnten nur erfolgreich transformierte Bakterien anwachsen.

## 2.2.8 Isolierung und Analyse von RNS

Ein großes Problem beim Arbeiten mit RNS stellt deren Instabilität bei Anwesenheit von RNAsen dar. RNAsen sind RNS abbauende Enzyme, die besonders stabil, d.h. äußerst schwer und beispielsweise nicht durch Autoklavieren inaktivierbar sind. Bestimmte chemische Agentien, wie Guanidiniumisothiocyanat oder  $\beta$ -Mercaptoethanol, sind jedoch in der Lage, die Aktivität der RNAsen zu minimieren (Chirgwin et al. 1979). Alle verwendeten Glasgefäße, Pinzetten, Magnetrührstäbe etc. wurden zur RNase- Dekontamination mindestens 6 h bei 250°C gebacken. Das für RNS-Zwecke benutzte Wasser wurde mit DMPC behandelt, um anwesende RNAsen zu inaktivieren.

### **dH<sub>2</sub>O<sub>DMPC</sub>**

Dimethylpyrocarbonat (DMPC, Sigma)                      1,0 g

dH<sub>2</sub>O ad 1000ml

Die Lösung wurde über Nacht gerührt; Reste von DMPC wurden tags darauf durch Autoklavieren entfernt.

### 2.2.8.1 Isolierung von Gesamt-RNS

Es kam das RNS-Isolations-Kit der Firma Stratagene zur Anwendung. Dieses System wendet die Guanidiniumisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode an (Chirgwin et al. 1979; Chomczynski und Sacchi 1987). 1 g frisch präpariertes Gewebe wurde nach der Präparation sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewebe wurde sodann homogenisiert (Ultraturrax) und anschließend dem Protokoll der Firma Stratagene unterzogen. Zuletzt wurden Konzentration und Reinheit photometrisch überprüft (siehe 2.2.1.2).

### 2.2.8.2 Isolierung von Poly-(A)-RNS

Da fast alle eukaryontischen Boten-RNS-Moleküle (mRNS) nach der Transkription am 3'-Ende polyadenyliert werden, ist es möglich, mit Hilfe dieser Poly-A-Schwänze die Boten-RNS aus einem Gemisch von RNS-Molekülen (t-RNS, r-RNS, m-RNS) zu isolieren. Das verwendete Poly-(A)-Quick mRNS-Isolation-Kit (Stratagene) bedient sich der Säulenchromatographie mit Oligo (dT)-Cellulose. Nur die m-RNS bindet über

Basenpaarbindungen mit ihrem Poly (A)- Schwanz an das Säulenmaterial, während alle anderen RNS-Formen die Säule durchlaufen.

Nach Bindung der Poly (A) RNS an die Oligo (dT) Säule wurden Verunreinigungen durch einige Waschschrirte entfernt. Die reine mRNS wurde eluiert und nachdem photometrisch ihre Konzentration und Reinheit bestimmt war, gefällt, in Rnase-freiem Wasser aufgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Ausbeute betrug ca. 2% der Gesamt-RNS.

### 2.2.8.3 Gelelektrophorese von RNS

Durch die negativen Ladungen des Phosphatrückgrats der RNS ist es möglich, diese im elektrischen Feld aufzutrennen. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit der RNS-Moleküle umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNS, die das Wanderungsverhalten beeinflussen, zu verhindern, wurde die Elektrophorese in Gegenwart von Formaldehyd durchgeführt.

#### **10 x Laufpuffer, pH 7,0:**

MOPS	41,9 g
NaAc	4,1 g
EDTA	3,7 g
dH <sub>2</sub> O <sub>DMPC</sub>	ad 1000 ml

#### **Gellösung:**

Agarose (Seakam GTG, Biozym)	0,5 g
10 x Laufpuffer	5 ml
dH <sub>2</sub> O <sub>DMPC</sub>	36,7 ml
Mikrowelle; abkühlen auf ca. 60°C	
37 % Formaldehyd (Roth)	8,3 ml

#### **Probenpuffer (ca. 5 µl pro 1 µg RNS):**

Formamide (Roth)	10 ml
37 % Formaldehyd (Roth)	3,5 ml
10 x Laufpuffer	2 ml
Ficoll Typ 400 (Sigma)	0,2 g
Bromphenolblau (Sigma)	0,04 %
dH <sub>2</sub> O <sub>DMPC</sub>	3,7 ml
Ethidiumbromid (Sigma)	5 µl/ml

Durch die Interkalation von Ethidiumbromid konnten die RNS Moleküle im UV Licht dargestellt werden. Als Molekulargewichtsstandard diente die RNS-Ladder-Lösung von Gibco-BRL mit folgenden Fragmenten (in kb): 0,24; 1,35; 2,37; 4,40; 7,46; 9,49

#### 2.2.8.4 Herstellung <sup>32</sup>P-markierter Sonden

Es kam das sogenannte „Random-primed-Labeling“ Verfahren zum Einsatz. Dabei wird ein Gemisch aus Zufalls-Hexanukleotiden als Primer benutzt (Feinberg und Vogelstein 1983), das an die aus einem Restriktionsverdau (siehe 2.2.3.1) stammende, zuvor hitzedenaturierte DNS-Matritze band. Das Klenow-Enzym (Boehringer) synthetisierte zur Matritze komplementäre Fragmente, in die  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP eingebaut wurde. Überschüssige, nicht eingebaute Desoxyribonukleosidtriphosphate wurden nach Abschluss der Fragment-Synthese durch Säulenchromatographie über eine Nick<sup>TM</sup>-Column (Pharmacia) entfernt. Die gereinigte Probe wurde mit TE-Puffer von der Säule eluiert und ihre spezifische Aktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

<b>TE-Puffer:</b>		<b>Labelingansatz:</b>	
1 M Tris ph 8,0	10 ml	DNS (denaturiert)	8 $\mu$ l
0,5 M EDTA pH 8,0	2 ml	dXTP (G, A, T)	3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1000 ml	$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP (10 mC/ml)	6 $\mu$ l
		Puffer Nr. 6 (Boehringer)	2 $\mu$ l
		Klenow-Enzym	1 $\mu$ l

#### 2.2.8.5 Northern-Blot-Analyse

Die Northern-Blot-Analyse ist ein Verfahren zum Nachweis von RNS-Transkripten in Geweben. Poly (A) RNS wurde elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) übertragen. Das Gel wurde zusammen mit einem Lineal photographiert, um später die Laufstrecke des nachgewiesenen RNS-Moleküls mit dem Molekulargewichtsstandard vergleichen zu können. Das Gel wurde dann auf einen mit einem Filterpapier bedeckten Schwamm gelegt, der sich in einer Wanne mit ca. 600 ml 20 x SSC-Puffer befand. Auf das Gel wurde die Nylonmembran plaziert, auf der die Lage der Geltaschen markiert wurde. Um entsprechende Kapillarkräfte, die den SSC-Puffer durch das Gel und die Membran saugen, aufzubauen, wurde abschließend ein Papiertuchstapel aufgelegt, der mit einer Glasplatte beschwert wurde. Während der 16 bis 18 h dauernden Blotzeit wanderten die Nukleinsäuremoleküle mit dem Puffer aus dem Gel mit und blieben in der Filtermembran hängen. Die Membran wurde dann mit UV Licht bestrahlt und 2 h

bei 80°C getrocknet. Nach dieser Behandlung waren die Nukleotide der RNS kovalent an die Aminogruppen des Nylonfilters gebunden.

### Hybridisierung:

Die Membran mit der immobilisierten RNS wurde mit Prähybridisierungspuffer in einen Hybridisierungsbeutel (Gibco-BRL) eingeschweißt und im Wasserbad für eine Stunde bei 65°C und eine weitere Stunde bei 42°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C mit der Hybridisierlösung, die die entsprechende <sup>32</sup>P-markierte Sonde enthielt (5x10<sup>6</sup> cpm/ml). 16 bis 18 Stunden später wurde durch folgende Waschschriffe unspezifisch gebundene und überschüssige Sonde von der Membran entfernt:

2 x 5 min in 2 x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei Raumtemperatur

2x 10 min in 1 x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei Raumtemperatur

2x 15 min in 0.1 x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei 42°C

Durch Auflegen der Nylonmembran auf eine Phosphoimage-Platte, konnte das Hybridisieren der radioaktiven Sonde mit der komplementären RNS mit Hilfe eines Image-Analyzers (BAS-1500, Fuji) nachgewiesen werden. Die Membran konnte nach zwei viertelstündigen Waschschriffen mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS-Lösung bei 95°C (Entfernung der gebundenen Sonde) erneut zur Hybridisierung eingesetzt werden.

#### Prähybridisierungslösung:

5 x PE	2,0 ml
20 x SSC	2,5 ml
100 % Formamid (deionisiert)	5,0 ml
ssDNS (10 mg/ml, Gibco-BRL)	150 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

#### Hybridisierungslösung:

5 x PE	10 ml
20 x SSC	1,25 ml
100 % Formamid (deionisiert)	2,5 ml
ssDNS (10 mg/ml)	75 µl
Sonde (5x10 <sup>6</sup> cpm/ml)	5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 5 ml

#### 5 x PE-Lösung:

Natriumpyrophosphat	1 g
SDS	10 g
Polyvinylpyrrolidon (40.000)	2 g
Ficoll (400.000)	2 g
1 M Tris pH 7,5	50 ml
0,5 M EDTA	10 ml
H <sub>2</sub> O	ad circa 150 ml

→ bei 65°C ca 30 min lösen  
 → auf 37°C abkühlen  
 + 5 % BSA (frisch) 40 ml  
 + H<sub>2</sub>O ad 200 ml  
 sterilfiltrieren; bei -20°C lagern

**20 x SSC:**

NaCl	175,3 g
Na <sub>3</sub> Citrat	88,2 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**10 % SDS-Lösung:**

Natriumduodecylsulfat	50 g
H <sub>2</sub> O ad	500 ml

## 2.3 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen

### 2.3.1 Organentnahme aus Ratten

Aus einer Ratte wurden die Organe Großhirn, Kleinhirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, Ösophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon, Uterus, Eileiter und Skelettmuskel einzeln entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 2.3.2 Proteinextraktion aus Rattengeweben

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Organe wurden mit Hilfe eines Mörsers auf Trockeneis pulverisiert und jeweils 4 Spatelspitzen in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 800  $\mu\text{l}$  im kochenden Wasserbad erhitzter SDS/PAGE-Probenpuffer zugegeben und kurz stark gemischt. Durch 5-minütiges Kochen und die Anwesenheit von SDS und DTT erfolgte die Denaturierung der Proben. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min konnte die DNS durch Pipettieren abgetrennt werden. Falls nötig, wurde des weiteren ein DNS-Verdau durch Zugabe von 10U DNase durchgeführt. In diesem Fall wurde 5min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und danach erneut bei 14000 rpm 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### **4x SDS/PAGE Probenpuffer**

Tris	0,24g, pH 6,7
SDS	0,5g
Bromphenolblau	4mg
Glycerol	4ml
H <sub>2</sub> O	ad 10ml

vor Gebrauch DTT 200mM zugeben

### **2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry**

Mit dieser colorimetrischen Methode (Lowry et al. 1951) können Proteine von im Puffer vorhandenen Substanzen, die bei anderen Protein-Konzentrations-Bestimmungs-Verfahren stören, durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) getrennt werden. Nach anschließender Verseifung der Proteine, ist die alkalische Proteinlösung jetzt in der Lage, Metallionen zu reduzieren. Im vorliegenden Fall werden zweiwertige Kupferionen zu einwertigen reduziert, die daraufhin einen Kupfer-Wolfram-Komplex mit einem spezifischen Reagenz (Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz) bilden. Die Absorption dieses Komplexes wird bei 750nm gemessen. Die Konzentration der Proben kann mit Hilfe einer gleichzeitig vermessenen Eichgeraden (50–1000µg/ml BSA) bestimmt werden. Es wurden also jeweils 100µl BSA-Standard oder Probenverdünnung mit 1ml 4°C kalter 10% TCA gefällt, 15min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden mit je 100µl 1M NaOH resuspendiert und durch 30-minütige Inkubation bei 95°C im Heizblock denaturiert. In der Zwischenzeit wurde ein aus einem Teil Lsg. A, einem Teil Lsg. B und 98 Teilen Lsg. C bestehendes Gemisch vorbereitet. Zu jedem Standard und jeder Probe wurde sodann 1 ml dieses Gemisches gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von je 100 µl Lsg. D erfolgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min. Anschließend wurde eine photometrische Messung der Proben und Standards bei 750nm durchgeführt und die Konzentration der Proben über die Standard-Eichgerade bestimmt.

**Lsg. A**1% CuSO<sub>4</sub> x5H<sub>2</sub>O in Wasser**Lsg. B**

2% Na-K-Tartrat in Wasser

**Lsg. C**2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, wasserfrei, in Wasser**Lsg. D**10 Teile Folin-Ciocalteus-Phenolrea-  
genz + 13 Teile H<sub>2</sub>O

### 2.3.4 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei diesem Verfahren nach (Laemmli 1970) lagert sich Duodecylsulfat mit seiner Kohlenstoffkette in Proteine ein und verleiht diesen durch seine Sulfatgruppe eine gleichmäßige negative Ladung. Diese negative Ladung ermöglicht ein Wandern im elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol. Trägt man die mit SDS denaturierten Proteine auf ein Polyacrylamid-Gel auf, so wird die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Protein- und der Gelporengröße. Je höher-prozentig das Gel ist, desto besser ist die Auftrennung im niedermolekularen Bereich. Da SDS alle nicht kovalenten Wechselwirkungen der Proteine zerstört und die Anwesenheit von DTT alle Disulfidbrücken reduziert, erscheinen die Proteine unter diesen Bedingungen stets als Monomere. Durch vorgefärbte Proteinmolekulargewichtsstandards (14–200 kDa bzw. 3-40 kDa, Gibco) ist es möglich, die Auftrennung während des Gellaufs zu verfolgen. Es kam eine Mini-Gel-Apparatur der Firma Biorad zum Einsatz. Das Trenngel wurde nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS, Fluka) und N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) sofort zwischen zwei durch 0,75 mm dicke Platzhalter getrennte Glasplatten bis etwa 2,5 cm unter den Rand eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach 1 Stunde wurde der Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das jetzt polymerisierte Trenngel geschichtet. Durch luftblasenfreies Einsetzen eines Plastikammes konnten im Sammelgel Taschen für den Probenauftrag erzeugt werden. Nach weiteren 30 min war auch das Sammelgel polymerisiert und das Gel konnte nun mit den Glasplatten in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt werden. Anoden- und Kathodenkammer wurden mit 1x Laufpuffer befüllt und die Geltaschen wurden sorgfältig gespült. Es wurde den Proben und dem Molekulargewichtsstandard final 1x SDS/PAGE Probenpuffer (siehe 2.3.2) zugegeben. Nach 5 min Denaturierung bei 95°C ließ man die Proben bei 80 V bis ins

Trenngel einlaufen. Dann wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Nachdem die durch den Farbstoff im Probenpuffer erkennbare Lauffront den Gelrand erreicht hatte, wurde die Spannung abgestellt und das Gel entweder gefärbt (siehe 2.3.6.3) oder ein Immunoblot durchgeführt (siehe 2.3.6.2).

#### Lösung A

30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)

#### Lösung B

2M Tris pH 8,8	75 ml
10 % SDS	4 ml
H <sub>2</sub> O	21 ml

#### Lösung C

1 M Tris pH 6,8	50 ml
10 % SDS	4 ml
H <sub>2</sub> O	46 ml

#### Sammelgel

Lösung A	0,67 ml
Lösung C	1,0 ml
H <sub>2</sub> O	2,3 ml
10 % APS	40 µl
TEMED	10 µl

#### Trenngel (X %)

Lösung A	X/3 ml
Lösung B	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	7,5 – X/3 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	10 µl

#### 10 x Laufpuffer pH 8,3

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### 2.3.5 SDS/Tricin-Polyacrylamid-Elektrophorese

Proteine, die ein Molekulargewicht unter 30 kDa haben, werden mit der herkömmlichen Gelelektrophorese nur unscharf aufgetrennt, da SDS und kleine Proteine komigrieren. Mit einem Tris/Tricin-System (Schagger und von Jagow 1987) und modifiziertem Puffer ist es jedoch möglich, auch solche Proteine effizient aufzutrennen. Abgesehen von der Tatsache, dass noch eine weitere Gelschicht, ein sogenanntes etwa 0,5 cm dickes „Spacergel“, eingefügt wurde und unterschiedliche

Puffer für Anoden- und Kathodenkammern verwendet wurden, erfolgte die Gelherstellung analog der in 2.4 beschriebenen Prozedur. In der ersten Stunde wurde eine Spannung von 30 V angelegt, anschließend wurde auf 150 V erhöht.

<b>Gelpuffer</b>	<b>Anodenpuffer</b>	<b>Kathodenpuffer</b>
Tris 3,0 M pH 8,25	Tris 0,2 M pH 8,9	Tris 0.1 M pH 8,25
SDS 0,3 %	bei 4°C lagern	Tricin 0,1 M
		SDS 0,1 %
		bei 4°C lagern

Tab 2.4

	Trenngel	Spacergel	Sammelgel
48,5% Acrylamid/ 1,5% Bisacrylamid	5 ml	1 ml	0.5 ml
Gelpuffer	5 ml	1,6 ml	1,55 ml
Glycerin	2 g		
H <sub>2</sub> O	5 ml	2,3 ml	4,2 ml
TEMED	10 µl	4 µl	10 µl
APS 10 %	50 µl	17 µl	50 µl

## 2.3.6 Immunologische Detektion

### 2.3.6.1 Protein Transfer durch Semidry-Blotting

Mit Hilfe der Western-Blot-Methode wurden die Proteine CRP2 und cGKIβ spezifisch nachgewiesen. Nach der Auftrennung von Gewebelysat bzw. Hefezellysat durch Elektrophorese (siehe 2.3.4 bzw. 2.3.5), wurden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PDVF)-Membran transferiert. Da die Proteine durch die Anwesenheit von SDS immer noch polyanionisch waren, konnte durch Anlegen einer Spannung eine Wanderung aus dem Gel vom Minuspol weg in die Membran in Richtung Pluspol bewirkt werden. Es wurde eine Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Membran über einen Zeitraum von einer Stunde appliziert. Der Blotaufbau erfolgte

folgendermaßen: Es wurden eine PDVF-Membran (Immobilion P, Millipore) in Größe des Trenngels und 15 etwas größere Filterpapiere (GB001, Schleicher & Schüll) ausgeschnitten. Auf die gewässerte Anodenplatte wurden 6 Lagen mit Anodenpuffer 1 getränkte und drei weitere Lagen mit Anodenpuffer 2 getränkte Filterpapiere gelegt. Dann folgte die in Anodenpuffer 2 gewässerte PDVF-Membran, auf die das Gel plaziert wurde. Auf das Gel kamen schließlich 6 Lagen mit Kathodenpuffer getränktes Filterpapier und die gewässerte Kathodenplatte. Es wurde stets darauf geachtet, die einzelnen Lagen luftblasenfrei zu bekommen, um die elektrische Leitfähigkeit des Stapels zu optimieren.

<b>Anodenpuffer 1</b>	<b>Anodenpuffer 2</b>	<b>Kathodenpuffer</b>
Tris 300mM pH 10,4	Tris 25mM pH 10,4	Tris 20mM pH 7,6
Methanol 20%	Methanol 20%	$\epsilon$ -Aminocaprinsre. 40mM
		Methanol 20%

### 2.3.6.2 Immundetektion

Die PDVF-Membran wurde über Nacht bei 4°C mit Blockierlösung behandelt, um unspezifische Antikörperbindung an freie Proteinbindungsstellen zu verhindern. Am nächsten Morgen wurde die Blockierlösung durch dreimaliges Waschen für 5 min mit 1x TBST wieder entfernt. Die Membran wurde sodann mit 15 ml der jeweiligen Primärantikörper-Lösung beschichtet und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Primärantikörperlösung, die für weitere Versuche aufgehoben wurde, folgte ein weiterer Waschschrift mit 1% Magermilchpulver in TBST (3 x 5 min). Anschließend erfolgte eine Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 20 ml Sekundärantikörperlösung. Danach wurde die Membran 2x 5 min mit 1% Magermilchpulver in TBST und 1x 5 min mit TBST gewaschen. Im Fall eines an Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörpers wurde mit dem ECL-System durch Belichtung eines Röntgenfilmes (Amersham), im Fall eines an alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Sekundärantikörpers mit Hilfe von AP- Detektionslösung detektiert. Im letzteren Fall wurde die Membran direkt gefärbt.

**10x TBST**

Tris 100 mM pH 8,0

NaCl 1,5 M

Tween 20 0.5%

**Blockierlösung**

5% Magermilchpulver in 1x TBST

**Alkalischer Phosphatase Puffer**

Tris 10 mM pH 9,5

NaCl 100 mM

MgCl<sub>2</sub> 5 mM**AP-Detektionslsg.**

AP Puffer 20 ml

BCIP Lsg. 80 µl

NBT Lsg. 80 µl

**BCIP Lsg.**

5-Bromo-4-chloro-inoylphosphat (Sigma) 25 mg/ml in 50% DMF

Lagerung bei -20°C

**NBT Lsg.**

Nitroblau-Tetrazolium (Sigma) 50 mg/ml in 70% DMF

Lagerung bei -20°C

**VERWENDETE ANTIKÖRPER****Primärantikörper**

Antikörper	Epitop	erzeugt in	Verdünnung
A-III-1 Antiserum	CRP2 Gesamtprotein; poly- klonal	Kaninchen	1:300
66-3-1 Antikörper	AS 89-102 von CRP2, Sequenz:GPIFVPVVRTEERK polyklonal	Kaninchen	1:200
88-3-1 Antikörper	cGMP Kinase; Iα u. Iβ Iso- form	Kaninchen	1:1000

## Sekundärantikörper

Detektionsenzym	Firma	Epitop	erzeugt in	Verdünnung
Alkalische Phosphatase	Dianova	Kaninchen IgG	Esel	1:5000
Meerrettichperoxidase	Amersham	Kaninchen Ig	Esel	1:1000

### 2.3.6.3 Proteindetektion durch Farbstoffe

Die Gele wurden nach der Elektrophorese durch den unspezifischen Proteinfarbstoff Coomassie Blau gefärbt, indem sie 30 min bei Raumtemperatur in der Färbelösung geschwenkt wurden. Dadurch wurden die Proteine neben der Anfärbung gleichzeitig fixiert. Anschließend wurden die Gele mit Entfärbelösung für 1 h entfärbt, wobei alle 20 min die Entfärbelösung ausgetauscht wurde. Nachdem nun nur noch die Proteinbanden auf durchsichtigem Gelhintergrund erkennbar waren, wurden die Gele zu Dokumentationszwecken bei 60°C für 2 h im Vakuum auf Filterpapieren getrocknet. Zur Analyse von Blotmembranen wurde der Proteinfarbstoff Ponceau S eingesetzt. Bei dieser zwar sehr insensitiven, jedoch äußerst schnellen und reversiblen Färbemethode wurden die Blotmembranen 30 s in Ponceau S-Lösung geschwenkt. Es erschienen rote Proteinbanden auf einem rosafarbenen Hintergrund. Diese Hintergrundfärbung wurde mit Wasser ausgewaschen, die Membran zur Dokumentation fotokopiert und schließlich mit Elektrophoresepuffer entfärbt.

#### **Coomassie Färbelsg.**

Coomassie Brilliant Blau 0,15%

Methanol 45,5%

Essigsäure 9%

#### **Entfärbelsg.**

Methanol 30%

Essigsäure 15%

#### **Ponceau S Lsg.**

Ponceau S 0,5%

Essigsäure 1%

## 2.4 Zwei-Hybrid-System

Das Zwei-Hybrid-System ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in Hefezellen (Chien et al. 1991; Gyuris et al. 1993; Ausubel et al. 1995). Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass Transkriptionsaktivatoren und -inhibitoren aus zwei Domänen, nämlich einer DNS-Bindungsdomäne und einer Aktivierungs-/Inhibitionsdomäne, aufgebaut sind. So ist es beispielsweise möglich, die Bindungsdomäne des Transkriptioninhibitors LexA, der spezifisch an LexA-Operatoren bindet, mit der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsaktivators GAL 4 zu fusionieren. Dadurch kommt es zur Expression von Genen, deren Promotor von LexA-Operatoren kontrolliert wird (Lewin 2000). Für das Zwei-Hybrid-System bedeutet dies, dass ein bekanntes Protein, welches Köderprotein genannt wird (in diesem Fall CRP2), als Fusionsprotein mit LexA in Hefen durch das Plasmid pEG 202 exprimiert wird. Auf diese Weise „fixiert“ man sozusagen das Köderprotein an bestimmten Reportergenen, da LexA an seine Operatoren binden wird. Bei den Reportergenen handelt es sich zum Einen um ein auf einem Plasmid (pSH 18-34) eingebrachtes lacZ-Gen, das unter der Kontrolle von 8 LexA-Operatoren steht. Als zweites Reportergen dient das im Genom der Hefe vorliegende Gen zur Leucin Synthese, das beim Hefestamm EGY 48 unter die Kontrolle von 6 LexA-Operatoren gestellt wurde und unter normalen Umständen inaktiv ist. Um mögliche Interaktionspartner des Köderproteins in einem bestimmten Gewebe zu finden, benötigt man eine cDNS-Bibliothek dieses Gewebes, welche die DNS aller in diesem Gewebe exprimierten Gene enthält. Nun werden die einzelnen cDNS-Stücke jeweils mit einer Domäne, die eine Reihe saurer Aminosäuren enthält, auf dem Plasmid pJK 4-5 fusioniert. Dies geschieht auf die gleiche Weise wie die Fusion des Köderproteins. Die saure Domäne dieses zweiten Fusionsproteins entspricht der Aktivierungsdomäne von Transkriptionsaktivatoren wie beispielsweise GAL 4. Das Fusionsprotein des pJK 4-5-Plasmides steht unter dem GAL 1-Promotor und wird daher nur in Gegenwart von Galaktose als Kohlenstoffquelle exprimiert. Auf diese Weise kann der Zeitpunkt der Expression durch Zugabe von Galaktose ins Medium bestimmt werden. Das Plasmid pJK 4-5 wird in Hefezellen, die bereits das Köder-Fusions-Protein und den lacZ-Reporter enthalten, transformiert. Kommt es nun nach Zugabe von Galaktose zu einer Interaktion zwischen dem an den LexA-Operatoren fixierten Köderprotein und dem das cDNS-Stück repräsentierenden Protein, so wird

die Transkription der unter den LexA-Operatoren stehenden Gene durch die saure Domäne des letzteren Proteins aktiviert. Konkret bedeutet dies im vorliegenden System, dass die Hefezellen, in denen eine Interaktion zustande gekommen ist, in der Lage sind, selbst Leucin zu synthetisieren und auf Leucin defizienten Medien überleben können. Ferner exprimieren solche Hefen  $\beta$ -Galaktosidase, die durch die Aktivierung des lacZ-Gens zustande kommt. Diese  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität kann durch ein chromogenes Substrat (X-Gal), welches den Agarplatten beigemischt wird, nachgewiesen werden. Bei dessen Umsatz färben sich die Zellen blau (Abb. 2-1).

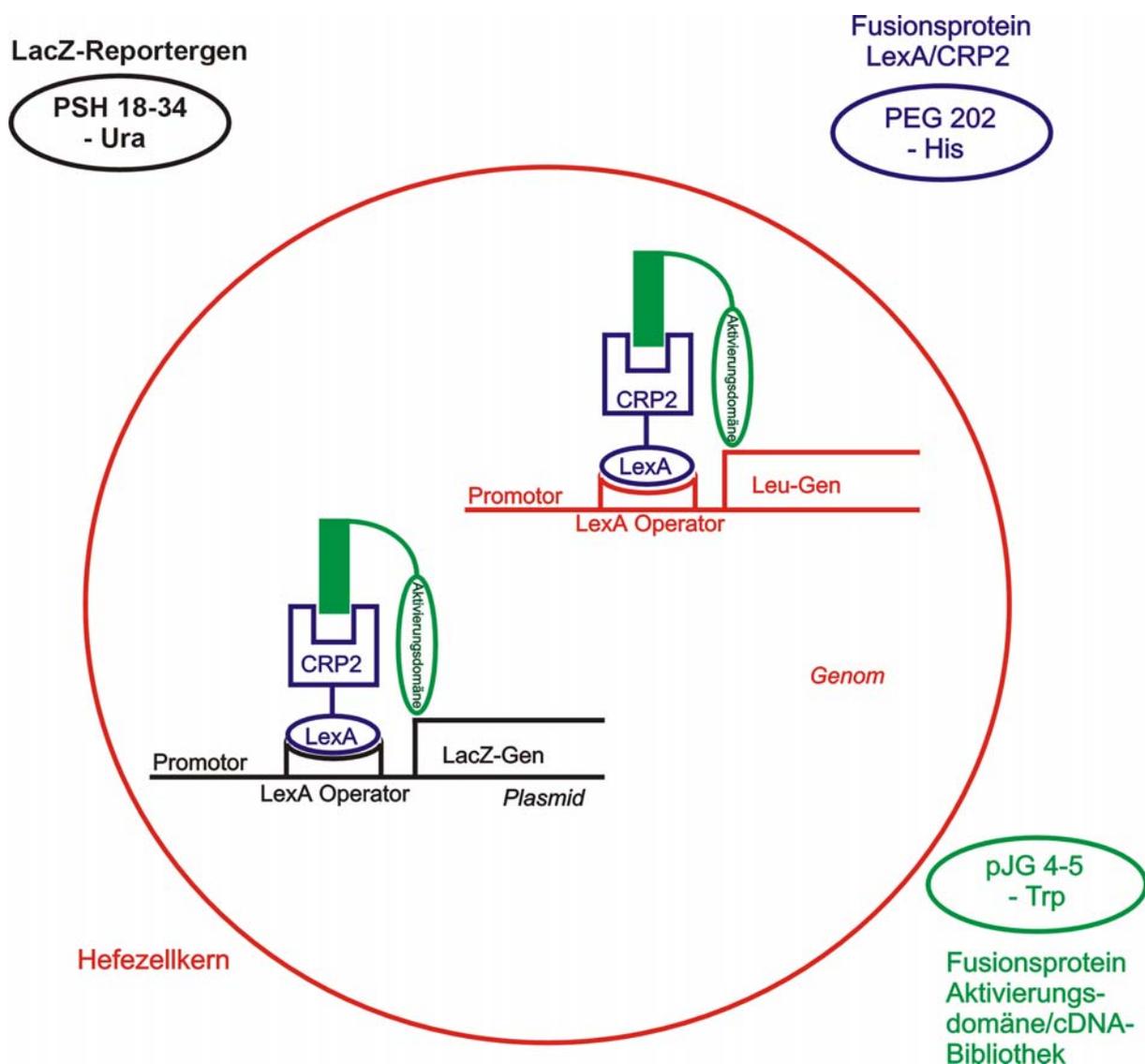


Abb. 2-1 Zwei-Hybrid-System. Dargestellt ist die Bindung der interagierenden Fusionsproteine an die jeweiligen Reporter gene, was zu deren Aktivierung führt. Nähere Erläuterungen siehe Text.

## 2.4.1 Transformation von Hefezellen

Die Transformation wurde mit Hilfe der Lithium-Acetat-Methode (Gietz et al. 1992; Gietz et al. 1995) durchgeführt. Durch die Anwesenheit alkalischer Kationen nehmen die Zellen leichter Fremd-DNS auf. Des weiteren erleichtert die Zugabe einer Träger-DNS das Einschleusen der Plasmide. Für das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Zwei-Hybrid-System ist es notwendig, drei verschiedene Plasmide in jede einzelne Zelle zu transformieren. Es handelt sich dabei um das Reporter-Plasmid (pSH 18–34), das das Gen für das Köderprotein CRP2-tragende Plasmid (pEG 202/CRP2) und das einen Vertreter einer cDNS-Bibliothek tragende Plasmid (pJK 4–5). Die beiden ersten Plasmide können in einem Schritt gleichzeitig transformiert werden (Lithium-Azetat Transformation I). Um jedoch eine ausreichend große Repräsentation der einzelnen cDNS-Moleküle zu erhalten, die für eine erfolgreiche Interaktor-Suche notwendig ist, muss eine möglichst hohe Transformationseffizienz für das Bibliothek-Plasmid erreicht werden. Deshalb wird das Plasmid pJK 4-5 in einem zweiten Schritt in zuvor mit dem Köder- und dem Reporterplasmid transformierte Hefen eingebracht (Lithium-Azetat Transformation II). Gleichzeitig darf es bei der Durchführung der zweiten Transformation nicht zu einem Ausschleusen der beiden ersten Plasmide kommen. Die Präsenz der Plasmide erlaubt den Hefen die Synthese von Histidin (pEG 202), Uracil (pSH 18–34) und Tryptophan (pJK 4–5). Dies kann zur Selektion erfolgreich transformierter Hefen herangezogen werden, indem diese auf Histidin, Uracil und Tryptophan defizienten Medien gehalten werden.

### **Einzelstrang Träger DNS (SS-DNS)**

DNS-NA<sup>+</sup> Type III Salmon Testis (Sigma) 250 mg

TE Puffer 100 mg

=> aliquotieren, -20°C, 5 min 100°C vor Gebrauch

### **TE Puffer pH 8,0**

Tris 10 mM

EDTA 1,0 mM

### **Lithiumacetat pH 8,4 – 8,9**

LiAc (Sigma) 51 g

H<sub>2</sub>O ad 500 ml

pH mit verdünnter Essigsäure

einstellen; steril filtrieren

### **Polyethylenglycol (PEG 3350, Sigma)**

PEG 5g

H<sub>2</sub>O ad 10 ml

steril filtrieren

## 2.4.2 Lithium – Azetat Transformation I

Zur Transformation der beiden ersten Plasmide wurde ein Wild Typ Hefeklon in 5 ml YPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C und 225 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde ein  $2,5 \times 10^8$  Zellen entsprechendes Volumen in 50 ml YPAD-Medium überbracht und bei 30°C und 225 rpm so lange inkubiert, bis eine Zelldichte von  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml erreicht war. Nach dem Ernten (5000 rpm 5 min) und einem Waschschrift mit 25 ml Wasser wurden die Zellen in 1 ml 100 mM Lithium-Azetat aufgenommen. Dann wurden die Zellen pelletiert und zu einem finalen Volumen von 500  $\mu$ l mit 100 mM Lithium-Azetat resuspendiert. Anschließend wurden der Ansatz aliquotiert (50  $\mu$ l), die Aliquots pelletiert und die entstandenen Zellpellets mit dem folgenden Transformationsmix in genau dieser Reihenfolge vorsichtig überschichtet.

### **Transformationsmix:**

50% PEG	250 $\mu$ l
1,0 M LiAc	36 $\mu$ l
SS-DNS ( 2mg/ml)	50 $\mu$ l
Plasmid-DNS + Wasser	25 $\mu$ l ( 1 $\mu$ g pro Plasmid)

Nach starkem Mischen (mind. 1 min), bis das Pellet vollständig gelöst war, folgten eine Inkubation bei 30°C für 30 min und anschließend ein Hitzeschock bei 42°C für 25 min. Die Zellen wurden dann pelletiert und nach Entfernung des Transformationsmixes vorsichtig in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. Dann wurden die Hefen auf Glu/CM –His,-Ura Agarplatten ausplattiert.

## 2.4.3 Lithium-AzetatTransformation II

Über Nacht wurden Hefezellen, die bereits das Reporter- und das Köderplasmid enthielten, in 25 ml Glu/CM -His,-Ura-Flüssigmedium bei 30°C und 225 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde ein Volumen, das  $2,5 \times 10^8$  Zellen pro ml enthielt, 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 50 ml 30° C warmem YPAD-Medium resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen wie

oben bis zu einer Zelldichte von  $2 \times 10^7$  Zellen pro ml inkubiert. Nachdem die Zellen mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen worden waren, wurden sie in 3 ml 100mM Li-Ac aufgenommen, 15 min bei  $30^\circ\text{C}$  gehalten und danach abzentrifugiert. Anschließend wurden folgende Komponenten in ein anderes Reaktionsgefäß in genau dieser Reihenfolge gegeben.

PEG 50%	2,4 ml
1,0 M Li-Ac	360 $\mu\text{l}$
SS-DNS (2mg/ml)	500 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O steril	396 $\mu\text{l}$

Dann wurde dieser Mix gut gemischt und vorsichtig auf das Zellpellet gegeben. Schließlich wurde zu diesem Ansatz 5  $\mu\text{g}$  cDNS pipettiert. Nach starkem Mischen für mindestens 1 min folgte eine Inkubation bei  $30^\circ\text{C}$  und anschließend ein Hitzeschock bei  $42^\circ\text{C}$  für jeweils 30 min. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 1025  $\mu\text{l}$  aufgenommen und ein Teil auf 100 mm Durchmesser Glu/CM-His,-Ura,-Trp Agarplatten zur Bestimmung der Transformationseffizienz ausplattiert. Der Rest wurde auf 250 mm Durchmesser Agarplatten der gleichen Zusammensetzung ausgestrichen. Nach 2 Tagen konnten die Transformationseffizienz bestimmt, beziehungsweise die Transformanten geerntet werden.

#### 2.4.4 Proteinextraktion aus Hefen

Wildtyp Hefezellen, beziehungsweise transformierte Hefezellen wurden in 5 ml YPD Medium oder dem den jeweiligen transformierten Plasmiden entsprechenden defizienten Medium abends angeimpft und bei  $30^\circ\text{C}$ , 225 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Hefen in 25 ml des entsprechenden Mediums auf eine Zelldichte von  $3,75 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter umgesetzt. Anschließend wurde 4 bis 5 Stunden bei  $30^\circ\text{C}$ , 225 rpm bis zu einer Zelldichte zwischen  $1,3 \times 10^7$  und  $2,0 \times 10^7$  Zellen pro ml inkubiert. Aus dem 25 ml-Ansatz wurden jeweils 1,5 ml getrennt 5 min bei 15000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 50  $\mu\text{l}$   $95^\circ\text{C}$  heißem 1x SDS PAGE Proben Puffer aufgenommen. Nachdem das Pellet in Lösung gebracht worden war, wurden die Proben 3 min bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert und danach sofort auf Trockeneis gestellt. Für die Gelelektrophorese

wurden 20 µl pro Spur aufgetragen, nachdem die Extrakte kurz zuvor für 3 min nochmals aufgekocht worden waren. Zur Detektion wurde der gegen eine Peptidsequenz aus CRP2 gerichtete Antikörper 66-3-1 verwendet. Als Sekundärantikörper kam ein an Meerrettichperoxidase gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper zur Anwendung. Mit Hilfe des ECL-Systems konnte ein um 22kDa (LexA) vergrößertes Protein nachgewiesen werden. Alternativ wurden, um die Zellyse zu vergleichen, verschiedene Varianten des Aufschlusses getestet: 2x SDS PAGE Probenpuffer, 2x SDS PAGE Probenpuffer vor der Elektrophorese 1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt, 2x 60 s Behandlung mit Ultraschall, 4–4 Microns.

#### 2.4.5 Ernten der transformierten Zellen

Bei diesem für Kontaminationen äußerst anfälligen Schritt wurden die 250mm Durchmesser-Platten mit 4ml Glu/CM-His,-Ura,-Trp Medium überschichtet und 4h unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das jetzt durch abgelöste Hefen trübe Medium mit einer sterilen Pipette abpipettiert und in 50ml Röhrchen gesammelt. Diese Prozedur wurde zwei weitere Male mit 2,5ml Medium wiederholt. Das gesamte gesammelte Medium wurde dann bei 5000 rpm 5min abzentrifugiert, die entstandenen Pellets 1:1 in Glu/CM-His,-Ura,-Trp Medium aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nachdem die Zellen einmal mit sterilem Wasser gewaschen worden waren, wurden sie schließlich 1:1 mit 65% Glycerollösung resuspendiert und in 1ml Aliquots bei -80°C eingefroren.

##### **Glycerollösung**

Glycerol	65%(steril)
MgSO <sub>4</sub>	0,1M
Tris	25mM

## 2.4.6 Bestimmung der Wiederausplattierungseffizienz

Die Zahl der für die Interaktorsuche ausplattierten Zellen ist von der Transformations- und der Wiederausplattierungseffizienz abhängig. Daher ist es wichtig, auch letztere zu bestimmen. Man verdünnte dafür analog zum Ansatz für die spätere Interaktorsuche ein Aliquot aus einem Glycerolstock 1:10 mit Gal/Raff/CM-His,-Ura,-Trp und inkubierte 4h bei 30°C und 225rpm zur Induktion des GAL-Promotors. Dann wurden Verdünnungen im Bereich von 1:1000 bis 1:150000 angefertigt und 100µl der einzelnen Verdünnungen auf jeweils zwei Gal/Raff/CM-His,-Ura,-Trp 100mm Durchmesser-Platten ausplattiert. Nach zwei Tagen konnte über die Verdünnungen die Effizienz der Wiederausplattierung bestimmt werden.

## 2.4.7 Untersuchung der cDNS-Bibliothek auf Interaktoren

Da nicht alle Zellen nach den beiden Transformationen die gleiche Wiederausplattierungseffizienz haben, sollte jeder unabhängige Klon 3-10 mal auf den Selektionsplatten vertreten sein. Man setzte also für die Interaktorsuche das Zehnfache der Transformationseffizienz ein. Durch die Bestimmung der Wiederausplattierungseffizienz war es möglich, dasjenige Volumen zu berechnen, das nach der 4h-Inkubation (siehe 2.4.6) der zehnfachen Menge der Transformationseffizienz entsprach. Gleichzeitig durfte die Zahl der Kolonie-formenden Einheiten pro Platte nicht  $10^6$  übertreffen, um sogenanntes „cross-feeding“ zu vermeiden. Darunter versteht man die Versorgung von Zellen ohne spezifische Interaktion mit Leucin durch Zellen mit spezifischer Interaktion in deren Nachbarschaft. Es wurde ein Gefrierstock Aliquot 1:10 mit Gal/Raff/CM-His,-Ura,-Trp verdünnt und 4h bei 30°C und 225 rpm zur Induktion des GAL-Promotors inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde, basierend auf der Wiederausplattierungseffizienz, ein Volumen mit der Konzentration von  $10^7$  Zellen pro ml hergestellt. 100µl entsprachen also den gewünschten  $10^6$  Zellen pro Selektionsplatte. Es wurden dann so viele Gal/Raff/CM-His,-Ura,-Trp,-Leu -Platten mit 100µl ausplattiert, bis das Zehnfache der Transformationseffizienz erreicht war. Danach wurden die Platten bei 30°C bebrütet und die Klone in der Reihenfolge, in der sie erschienen (2. - 4. Tag nach Ausplattieren) auf Gal/Raff/CM-His,-Ura,-Trp,-Leu -Masterplatten überführt. Die Zellen kamen über

Nacht auf Glu/CM-His,-Ura,-Trp -Masterplatten und wurden am nächsten Morgen auf folgende Selektionsplatten übertragen. Das Wachstum wurde über die nächsten 3 Tage beobachtet.

#### Erscheinungsbild positiver Klone:

Selektionsplatten	Erscheinungsbild
Glu/Xgal/CM-His,-Ura,-Trp	Weiß
Gal/Raff/Xgal/CM-His,-Ura,-Trp	Blau
Glu/CM-His,-Ura,-Trp,-Leu	Kein Wachstum
Gal/Raff/CM-His,-Ura,-Trp,-Leu	Wachstum

Das in das pJG 4-5-Plasmid eingefügte cDNS Stück der positiven Klone wurde mit Hilfe der PCR amplifiziert und nach einem Restriktionsendonukleasenverdau analysiert. Aufgrund des Restriktionsmusters konnten die Klone in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Anschließend wurde das Amplikon jeweils eines Vertreters der verschiedenen Gruppen sequenziert.

#### 2.4.8 Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Hefen

Da die Affinität zweier Bindungspartner im Zwei-Hybrid-System quantitativ mit der Reporterogenaktivierung korreliert, ist es möglich, die Bindungsaffinität verschiedener Bindungspartner durch quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu vergleichen.

Dazu wurden entsprechend mit Köder- und Interaktionsprotein transformierte Hefezellen in mehreren 5 ml-Kulturen der jeweiligen Selektionsmedien angeimpft und über Nacht bei 30°C und 225 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen bei 2500 rpm 5 min abzentrifugiert, die Zellen in 150 $\mu$ l Z-Puffer aufgenommen und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Anschließend wurden die Zellen 1:10 und 1:20 mit Z-Puffer verdünnt, jeweils 1 Tropfen 0,1% SDS und 2 Tropfen Chloroform zur Permeabilisierung der Zellen hinzugefügt und 20 s gemischt.

Nach 15-minütiger Inkubation bei 30°C im Wasserbad wurde den Ansätzen 200 µl ONPG (0.4 mg/ml) zugegeben, kurz gemischt und weiter bei 30°C im Wasserbad inkubiert, bis die Lösungen eine mittelgelbe Farbe zeigten. Dann wurde die enzymatische Reaktion mit 500 µl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt und nach Zentrifugation bei 2500 rpm für 5 min der Überstand vom Zelldebris abgenommen. Die optische Dichte dieses Überstandes wurde bei 420 nm und 550nm vermessen. Es wurde die Zeit von der Zugabe von ONPG bis zur Beendigung der Reaktion gemessen. Mit Hilfe der folgenden Gleichung konnte die β-Galaktosidase-Aktivität der Hefezellen quantifiziert werden.

$$U = \frac{1000 \times [(OD420) - (1,75 \times OD550)]}{t \times v \times OD600}$$

Gleichung 2-1 OD600 = Zelldichte, OD550 = Lichtbrechung durch Zelldebris, OD420 = Kombination der Absorption von o-Nitrophenol und Lichtbrechung durch Zelldebris, t = Reaktionszeit in min, v = Volumen des Ansatzes in ml.

### Z Puffer

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16,1 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,5 g
KCl	0,75 g
MgSO <sub>4</sub>	0,246 g
β-Mercaptoethanol	2,7 ml
pH 7,0 einstellen	
ad 1000ml H <sub>2</sub> O	
nicht autoklavieren	

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Charakterisierung der Interaktion von CRP2 und cGKI

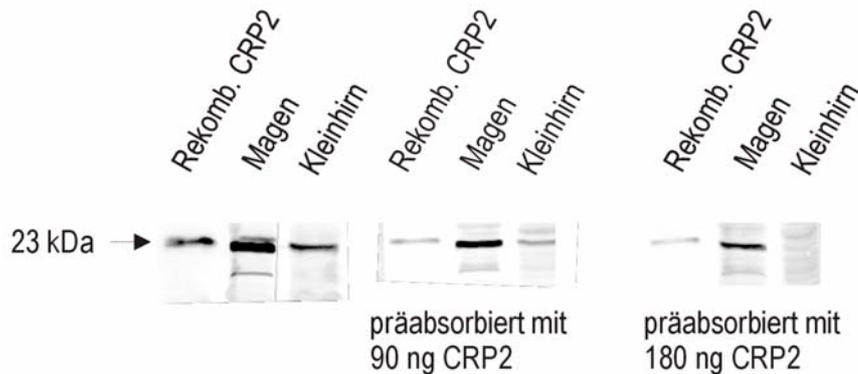
Im ersten Abschnitt dieser Arbeit soll die bereits beschriebene Interaktion von CRP2 und cGKI (Huber et al. 2000) genauer untersucht werden. Zunächst wird die gewebsspezifische Expression dieser beiden Proteine untersucht. Des Weiteren wird die Interaktion der beiden Isoformen cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  mit CRP2 genauer untersucht.

### 3.1.1 Spezifität der verwendeten Antikörper

Um die gewebsspezifische Expression von Proteinen zu analysieren, müssen zuerst die Antikörper evaluiert werden. Durch Präinkubation der verwendeten Primärantikörper mit rekombinantem CRP2 als Antigen sollten die Bindungsstellen für die spezifischen Epitope gesättigt werden (Präabsorption). Das Antigen wurde dabei in den angegebenen Mengen eingesetzt. Anschließend wurden die so vorbehandelten Antikörper für die Detektion eines standardisierten Immunoblots eingesetzt. Im Falle des Antikörpers A-III-1 erkennt man bei Zunahme der Menge des zur Präabsorption eingesetzten Antigens eine kontinuierliche Abnahme der Signalintensität im Immunoblot. Im Kleinhirn beispielsweise ist bei einer Präabsorptionsmenge von 180 ng CRP2 das spezifische Signal fast nicht mehr detektierbar. Auch für den Peptidantikörper 66-3-1 läßt sich eine umgekehrt proportionale Beziehung für die Intensität des detektierten Proteins im Verhältnis zur Menge des zur Präabsorption eingesetzten Antigens zeigen (Abb. 3-1).

# Spezifität der CRP2 Antikörper

A



B

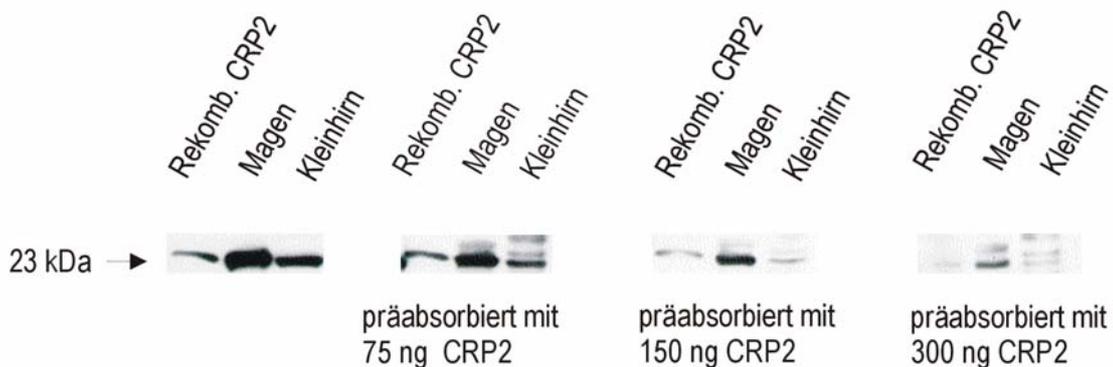


Abb. 3-1 Gezeigt sind Immunoblots. Jeweils 50 µg Gewebematerial wurden aufgetragen. Als Kontrolle dienten 10 ng rekombinantes CRP2. Die Primärantikörper wurden direkt eingesetzt, oder mit den angegebenen Mengen an rekombinatem CRP2 präabsorbiert. A : Als Primärantikörper wurde der Antikörper A-III-1 verwendet, der gegen das gesamte CRP2 Protein gerichtet ist. Die Detektion erfolgte über einen anti-Kaninchen Antikörper, an den das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist. B : Als Primärantikörper wurde ein Peptid Antikörper, gerichtet gegen die Peptidsequenz GPIEVP VVRTEERK aus CRP2 und als Sekundärantikörper ein mit Meerrettich Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper eingesetzt.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass beide Antikörper zur spezifischen Detektion von CRP2 im Immunoblot aus Gewebelysaten eingesetzt werden können. Eine Kreuzreaktion mit anderen CRP Proteinen wird als unwahrscheinlich angesehen, da die Sequenz gegen die 66-3-1 gerichtet ist,

ausschließlich in CRP2 vorkommt und beide Antikörper ein identisches Expressionsmuster ergaben (siehe 3.1.2).

### 3.1.2 Gewebespezifische Verteilung von cGKI und CRP2

Zur Analyse der Expression von cGKI und CRP2 wurden Immunoblots von Gewebelysaten aus verschiedenen Organen der Ratte verwendet. Es kamen dabei der für die cGKI spezifische Antikörper 88-3-1 (Huber et al. 2000) sowie die CRP2 spezifischen Antikörper A-III-1 und 66-3-1 zum Einsatz (Abb. 3-2).

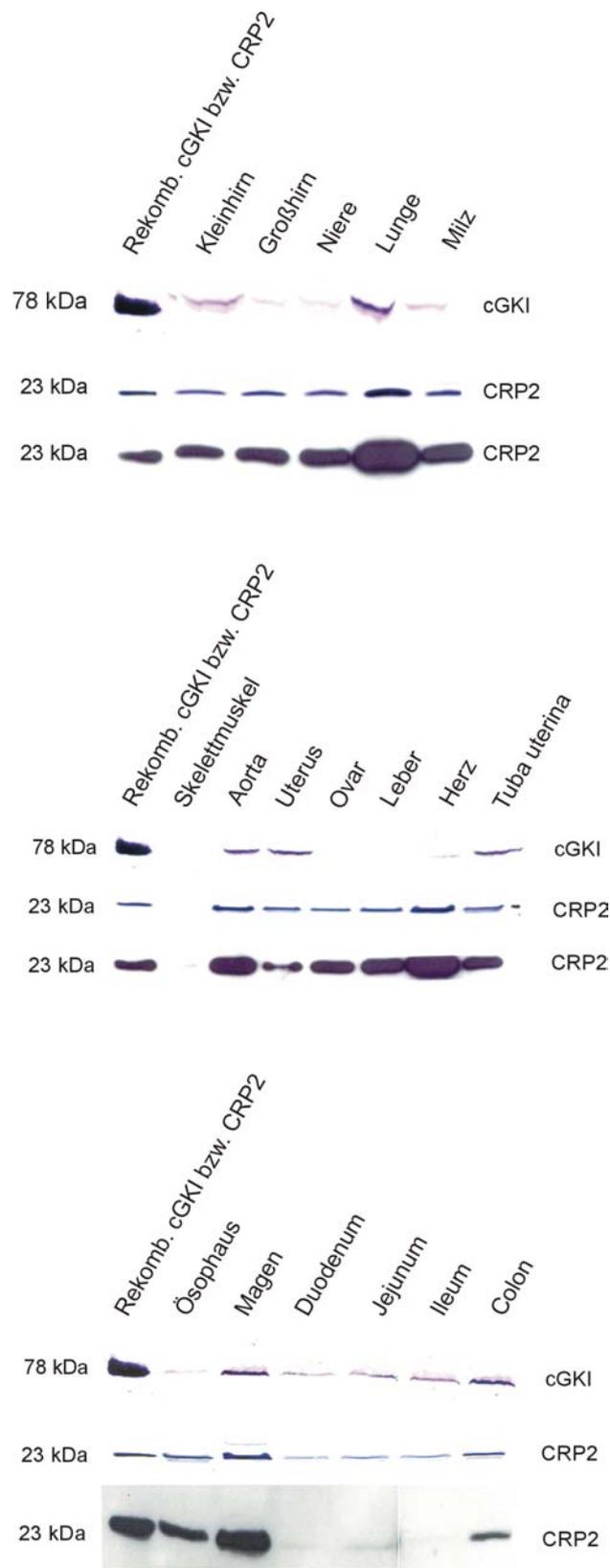


Abb. 3-2 Gezeigt sind Immunoblots. Pro Spur wurden 50µg Gewebelysat der Ratte aufgetragen. Als Kontrolle dienten jeweils 10 ng rekombinantes CRP2 bzw. cGKI. Im oberen Blot wurde der Antikörper 88-3-1 gegen die cGKI, im mittleren der Antikörper A-III-1 gegen das Gesamtprotein CRP2 und im unteren der Antikörper 66-3-1 gegen eine Peptidsequenz aus CRP2 eingesetzt. Zur Detektion kamen in den beiden oberen Blots ein mit dem Enzym Alkalische Phosphatase verknüpfter gegen Kaninchen IgG gerichteter Antikörper zur Verwendung. Im Fall der unteren Reihe wurde ein mit Meerrettichperoxidase verknüpfter anti-Kaninchen IgG Antikörper zur Detektion angewandt.

Die beiden CRP2-Antikörper detektierten ein ähnliches Expressionsmuster. Deshalb und aufgrund der Befunde der Antikörper Spezifitäts Tests (siehe 3.1.1) wurde für beide Antikörper von einem spezifischen Nachweis von CRP2 ohne Kreuzreaktivität mit anderen CRPs ausgegangen. Mit Ausnahme des Skelettmuskels konnte CRP2 in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Auffallend war eine besonders hohe Expression im Herz, in der Aorta, im Magen und besonders in der Lunge. Innerhalb des Gastrointestinaltraktes zeigte der Magen die höchste CRP2 Expression. Dies zeigte sich auch in dem deutlichen Nachweis von CRP2 mRNA im Magen (Abb. 3-3). Die einzelnen Dünndarmsegmente zeigten schwache Expression von CRP2. Im Vergleich dazu wies das Kolon wiederum eine höhere CRP2 Expression auf, ebenso der Ösophagus. Die untersuchten neuronalen Gewebe Großhirn und Kleinhirn enthielten ebenso wie die abdominalen parenchymatösen Organe Leber, Niere und Milz, intermediäre Mengen von CRP2. Auch im Ovar fand sich eine in diesem Bereich liegende CRP2 Menge. Die anderen, hormonell nicht aktiven untersuchten genitalen Organe Uterus und Tuba uterina zeigten ebenfalls eine in diesem Bereich liegende Expression von CRP2. Das Expressionsniveau von CRP2 und cGKI war in fast allen glattmuskulären Organen ähnlich. So wiesen Magen, Colon, Lunge und Aorta für beide Proteine ein hohes Expressionsniveau auf. In den genitalen Hohlorganen Uterus und Tuba uterina war eine mittlere Menge von beiden Proteinen zu erkennen. In den einzelnen Dünndarmsegmenten konnte jedoch wenig CRP2 bzw. cGKI nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme bei den glattmuskulären Hohlorganen bildete der Ösophagus, da dort CRP2 stark, cGKI jedoch kaum exprimiert war. In den parenchymatösen Organen stellte sich jedoch, mit Ausnahme des Kleinhirns, wo beide Proteine sehr stark exprimiert waren, ein deutlich zu Gunsten von CRP2 verschobenes Verhältnis heraus. So fand sich in Großhirn, Niere und Milz deutlich schwächere, und in Ovar, Leber und Herz gar keine cGKI Expression. Im Skelettmuskel waren weder CRP2 noch cGKI nachweisbar.

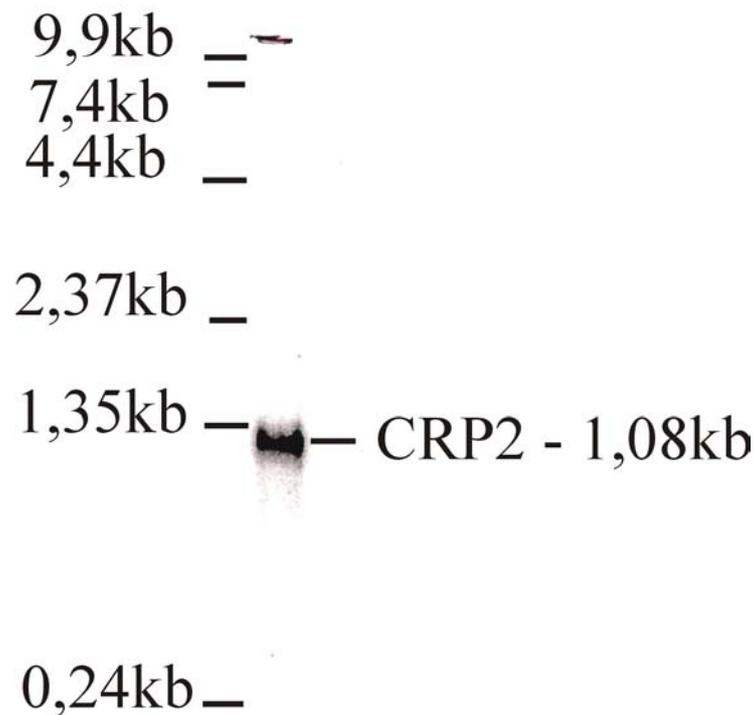


Abb. 3-3 Northern Blot von 5 µg mRNA aus dem Magen der Ratte. Hybridisiert wurde mit einer CRP2 Sonde. Knapp unterhalb der 1,35 kb Bande des Standards ließ sich ein starkes Signal der 1,08 kb langen mRNA von CRP2 nachweisen.

### 3.2 Isoform-spezifische Interaktion der cGKI mit CRP2

Die Interaktion der cGKI  $\beta$ -Isoform mit CRP2 im Zwei-Hybrid-System ist bereits bekannt (Huber et al. 2000). Ferner ist bekannt, dass beide Isoformen der cGKI in der Lage sind, CRP2 zu phosphorylieren (Huber et al. 2000). Nun bestand das Interesse, die Interaktion der cGKI $\alpha$  mit CRP2 im Zwei-Hybrid-System zu untersuchen. Anders als bei dem bereits beschriebenen Ansatz wurde hier jedoch nicht die Kinase, sondern CRP2 als Köderprotein gewählt. Dafür musste eine sogenannte Basischarakterisierung für das Köderprotein CRP2 durchgeführt werden.

### 3.2.1 Basischarakterisierung von CRP2 als Köderprotein

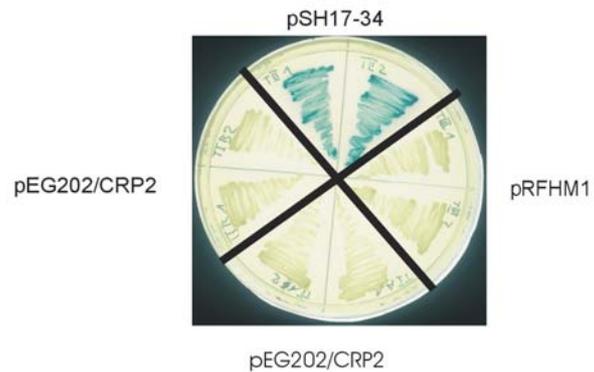
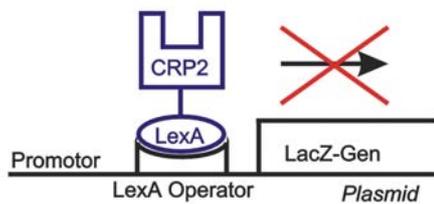
Generell darf ein für das Zwei-Hybrid-System verwendetes Köderprotein nicht intrinsisch die Transkription aktivieren, da dies zu einer unspezifischen Expression der Reportergene führen würde. Des Weiteren muss die Expression des Köderproteins in Hefen sowie dessen Fähigkeit zur nukleären Translokation nachgewiesen werden.

Es musste also sichergestellt werden, dass das Fusionsprotein aus *lexA* und CRP2 nicht die Transkription des *lacZ*-Gens aktiviert. Dies wurde durch einen sog. Aktivierungsassay überprüft. Dazu wurden Hefezellen mit den Plasmiden pSH18-34, welches das *lacZ* Gen hinter dem *lexA* Operator enthält und pEG202/CRP2 transformiert und anschließend die Färbung dieser Zellen in Gegenwart von X-Gal untersucht. Zum Vergleich wurden Hefezellen mit den Plasmiden pSH18-34 und pSH17-34 bzw. pSH18-34 und pRFHM1 transformiert. Das Plasmid pSH17-34 kodiert ein *lexA*-Fusionsprotein mit der GAL4 Aktivierungsdomäne und pRFHM1 kodiert für ein *lexA*-Fusionsprotein, das die Transkription nicht aktiviert. Die pSH17-34 enthaltenden Zellen dienten als Negativkontrolle (blau), während pRFHM1-enthaltende Zellen als Positivkontrolle dienten (weiß). Die mit dem Köderprotein transformierten Zellen blieben weiß und erfüllten somit das erste Testkriterium (Abb. 3-4A). Ferner wurden die pSH18-34 und pEG202/CRP2 transformierten Hefezellen auf ihr Wachstumsverhalten auf Leucin-defizienten Nährböden getestet. Verschiedene Konzentrationen dieser Hefen wurden auf Agarplatten ohne Leucinzusatz ausgestrichen. Gleichzeitig wurden die gleichen Hefen auf Leucin-haltigen Agarplatten ausplattiert. Nach zwei Tagen waren die Leucin-haltigen Agarplatten dicht bewachsen, während auf denen ohne Leucin keine Klone auftraten (Abb. 3-4B). Das Köderprotein selbst führt somit nicht zur Aktivierung des zur Leucinsynthese benötigten Gens. Diese Ergebnisse erhielt man allerdings auch, wenn das Köderprotein nicht synthetisiert würde. Deshalb mussten die Expression und die Translokation in den Nukleus für das *lexA*/CRP2-Fusionsprotein nachgewiesen werden. Dazu wurde ein Repressionsassay durchgeführt. Hierfür wurde ein konstitutiv aktives *lacZ*-Gen auf dem Plasmid pJK101 verwendet. Da dieses *lacZ*-Gen unter der Kontrolle des Gal-Promotors steht, waren alle Hefen, die mit diesem Plasmid transformiert waren in der Anwesenheit von Galaktose und X-Gal blau. Diese *lacZ*-Aktivität kann nur durch Bindung von *lexA* bzw. *lexA* Fusionsproteinen inhibiert werden. Es wurden dann Filterabklatsch-Proben von

pJK101, pJK101 und pRFHM1 bzw. pJK101 und pEG202/CRP2-haltigen Hefekulturen mit X-Gal inkubiert. Die nur mit pJK101 transformierten Zellen dienten dabei als Negativkontrolle für die Repression, während die mit pRFHM1 transformierten Zellen reprimierte Galaktosidase-Aktivität hatten und somit als Positivkontrolle fungierten. Die gleichzeitige Transformation mit pEG202/CRP2 hatte ein vorübergehendes Weißbleiben der Hefezellen zur Folge (Abb. 3-4C).

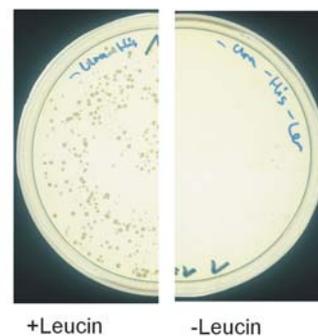
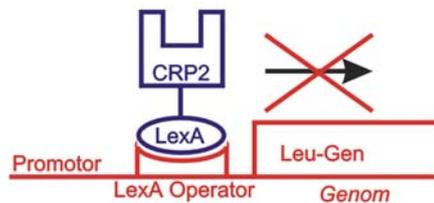
A

### Activation assay



B

### Leu requirement



C

### Repression assay

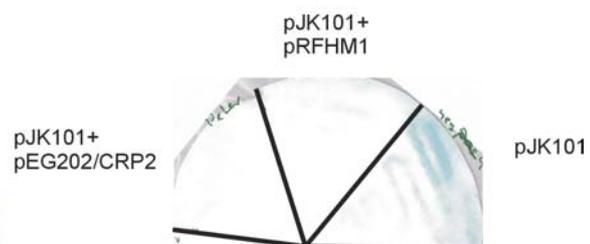
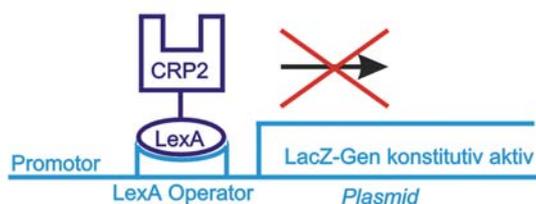


Abb. 3-4 Dargestellt sind die Ergebnisse zur Basischarakterisierung des verwendeten Ködervektors pEG202/CRP2. Erläuterungen siehe Text.

Dieses Ergebnis zeigt, daß das Köderprotein gebildet wird und nukleär lokalisiert ist. Zusätzlich wurde die Expression des *lexA*/CRP2-Fusionsproteins im Immunoblot unter verschiedenen Zellysebedingungen bestätigt (Abb. 3-5).

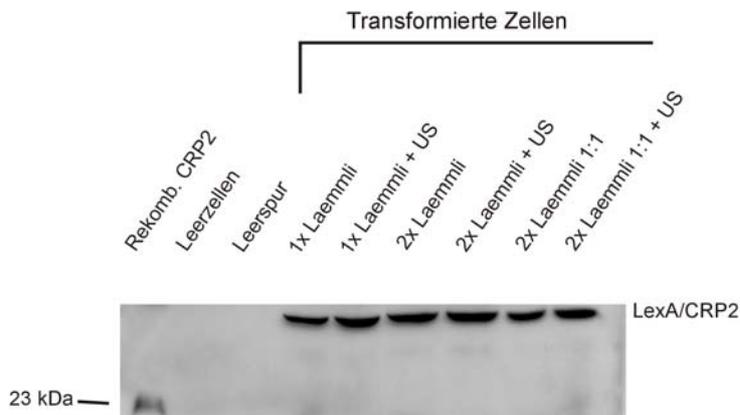


Abb. 3-5 Gezeigt ist ein Immunoblot. Es wurden jeweils 20 µl eines Hefezelleextraktes aus Wildtyp Zellen bzw. mit *lexA*/CRP2-Fusionsprotein transfizierten Zellen aufgetragen (Extraktionsbedingungen siehe 2.4.4). Als Kontrolle dienten 10 ng rekombinantes CRP2. Als Primärantikörper wurde der Antikörper 66-3-1, als Sekundärantikörper ein anti-Kaninchen Antikörper, an den das Enzym Meerrettich Peroxidase gekoppelt ist, eingesetzt. Detektiert wurde mit dem ECL System, Belichtungszeit 1 min. (US=Ultraschallbehandlung; 1:1= 2x Laemmli 1:1 mit H<sub>2</sub>O)

Es konnte ein Protein von 47 kDa nachgewiesen werden. Dies entspricht der sich aus den einzelnen Molekülmassen (CRP2 23 kDa, *lexA* 24 kDa) ergebenden Gesamtmasse des *lexA*/CRP2-Fusionsproteins. Somit waren alle Vorbedingungen bezüglich des Köderproteins erfüllt und es konnte eine Analyse der Interaktion von CRP2 mit den beiden Isoformen der cGKI durchgeführt werden.

### 3.2.2 Interaktion der verschiedenen Isoformen der cGKI mit CRP2

Es wurden Hefezellen gleichzeitig mit dem Köderproteinplasmid pEG202/CRP2, dem *lacZ*-Reporterplasmid pSH18-34 und dem Interaktorplasmid pJG4-5/cGKI $\alpha$  bzw. pJG4-5/cGKI $\beta$  transformiert. Nach zweitägigem Wachstum auf Glucose-haltigen Selektionsplatten (-Ura, -His, -Trp) wurden von jeder Transformation Einzelklone auf Stammpplatten übertragen. Auch diese Platten enthielten Glucose und wiesen die zuvor genannten Selektionskriterien auf. Danach wurden diese Einzelklone auf die Aktivierung der Reportergene überprüft. Zur Überprüfung der Leucin-Gen Aktivierung

wurden die Hefen auch auf Platten ohne Leucin überimpft. Diese Platten enthielten entweder Glucose oder Galaktose und Raffinose als Kohlenstoffquelle. Da das Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne und der jeweiligen cGKI-Isoform nur in Anwesenheit von Galaktose exprimiert wurde, konnte so zwischen einer unspezifischen Leucin-Gen-Aktivierung – in diesem Fall würden die Zellen sowohl auf den Glucose, als auch auf den Galaktose-haltigen Platten wachsen – und einer spezifischen Leucin-Gen-Aktivierung – die Zellen würden nur auf den Galaktose-haltigen Platten wachsen – unterschieden werden. Eine dritte Möglichkeit wäre fehlendes Wachstum auf beiden Plattenarten. Im ersten und letzten Fall kann man von fehlender Proteininteraktion ausgehen. Beide Isoformen wuchsen nur auf den Galaktose-haltigen Leucin-defizienten Platten. Auf ähnliche Weise wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, die durch das Reporterplasmid vermittelt wurde, analysiert. Die Klone wurden wiederum entweder auf Glucose oder Galaktose und Raffinose-haltigen Platten, die zusätzlich X-Gal enthielten, übertragen. Die Spezifität der Aktivierung dieses Reportergens konnte analog der des Leucingens ermittelt werden. Auch das lacZ-Reportergen wurde von beiden Isoformen aktiviert. Neben der bereits bekannten Protein-Protein Interaktion für das Paar CRP2-cGKI $\beta$  (Huber et al. 2000) zeigte sich also auch eine CRP2-Interaktion für die  $\alpha$ -Isoform der cGKI. Was bei genauerer visueller Beurteilung der lacZ-Gen-Aktivierung jedoch auffiel, war eine wesentlich stärkere Blaufärbung im Falle der  $\alpha$ -Isoform.

### 3.2.3 Quantifizierung der CRP2/cGKI-Interaktion in Abhängigkeit von der Isoform

Um eine objektive Aussage über die Affinität einer Protein-Protein-Bindung im Zwei-Hybrid-System zu treffen, muss eine quantitative Bestimmung der durch die Interaktion hervorgerufenen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Hefezellen durchgeführt werden. Dazu wurden jeweils 6 Klone pro Isoform getestet. Um durch die Transformation bedingte Schwankungen auszuschließen, wurden für jede Isoform Klone aus drei verschiedenen Transformationen verwendet. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der einzelnen Klone wurde in einer Verdünnungsreihe als Dreifachmesswerte gemessen. Die Ergebnisse (Tabelle 3.1) zeigen eine mehr als 5

mal stärkere Interaktion der  $\alpha$ -Isoform mit CRP2. Damit erweist sich cGKI $\alpha$  im Vergleich mit cGKI $\beta$  als der stärkere Interaktor (Abb. 3-6).

Tab. 3.1

Klon	Mittelwerte cGKI $\alpha$ Klone	Mittelwert der cGKI $\alpha$ Mittelwerte	Standard meß- fehler	Mittelwerte cGKI $\beta$ Klone	Mittelwert der cGKI $\beta$ Mittelwerte	Standard meß- fehler	Signifi- kantzni- veau (t-Test)
T1K1	0,21	0,16	0,01	0,01	0,03	0,01	p<0,0001
T1K2	0,16			0,03			
T2K1	0,14			0,03			
T2K2	0,13			0,02			
T3K1	0,17			0,03			
T3K2	0,15			0,04			

Mittelwerte der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in U/l bei 2 verschiedenen Verdünnungen (siehe 2.4.8).  
T=Transformation, K=Hefezellklon

### Quantifizierung der $\beta$ -Galactosidase Aktivität in Abhängigkeit von der interagierenden Isoform

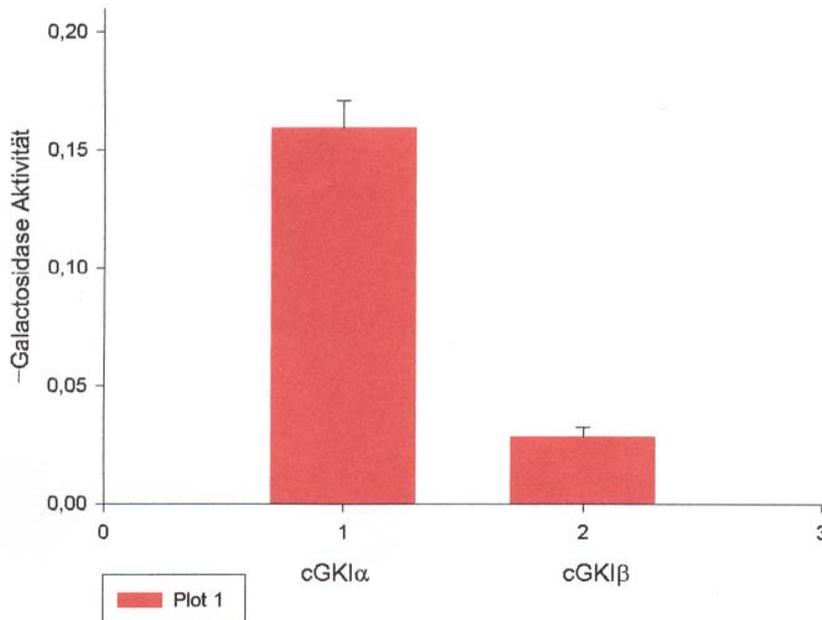


Abb. 3-6 Darstellung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten bei Interaktion von cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  mit CRP2. Die Interaktion cGKI $\alpha$ -CRP2 weist eine 5fach höhere Aktivität und somit deutlich stärkere Interaktion auf als die Interaktion cGKI $\beta$ -CRP2 (Signifikanzniveau p<0,0001).

### 3.3 CRP2-Interaktorsuche

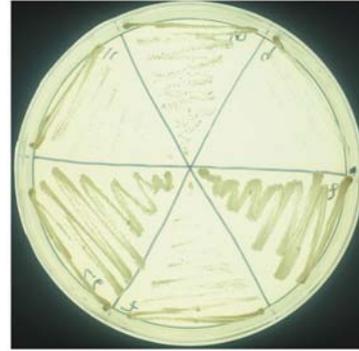
Nachdem die Basischarakterisierung des Köderproteins CRP2 bereits durchgeführt wurde (siehe 3.2.1.), wurde zur Interaktorsuche eine cDNS-Bibliothek der longitudinalen Muskulatur mit myenterischem Plexus des Rattendünndarms verwendet (Huber et al. 2000). Hefezellen, die das Köderprotein und beide Reportergene enthielten (Köderprotein und lacZ Gen auf den Plasmiden pEG202/CRP2 bzw. pSH18-34 und das –LEU Gen genomisch), wurden mit pJG4-5 Plasmiden transformiert, die die cDNS-Bibliothek enthielten. Dabei wurde eine Transformationseffizienz von  $3,74 \times 10^6$  unabhängigen Klonen erreicht (siehe 2.4.3). Der Versuchsablauf bedingt ein Einfrieren der transformierten Hefezellen vor der eigentlichen Interaktorsuche. Dieses Einfrieren und das anschließende Auftauen überleben einige Hefezellen nicht. Da nicht alle Klone die gleiche Wiederausplattierungs-Effizienz besitzen, wurde versucht, jede unabhängige Kolonie ( $3,74 \times 10^6$ ) zehnmals an der Interaktorsuche teilnehmen zu lassen. Es wurde also zunächst bestimmt, welche Menge eines Gefrierstocks verwendet werden musste, um ohne Selektionsbedingungen ein Anwachsen von  $3,74 \times 10^7$  Kolonien zu gewährleisten (siehe 2.4.6). Dann wurde die gleiche Menge an Hefen auf die entsprechenden Selektionsplatten, die Galaktose zur Induktion der unter dem GAL1 Promotor stehenden cDNS-Bibliothek enthielten, ausplattiert (siehe 2.4.7). An den Tagen 2-4 nach dem Ausplattieren wurden sodann 800 Einzelkolonien isoliert und auf Sicherungsplatten amplifiziert. Von diesen 800 Klonen erfüllten nur 4 die für eine positive Interaktion geforderten Bedingungen. Diese positiven Klone zeigten auf galaktosehaltigem Agar in Anwesenheit von X-Gal Blaufärbung; auf glukosehaltigem Agar hingegen blieben sie weiß. Gleichzeitig waren sie nur in der Lage auf Leucindefizienten Nährböden zu wachsen, wenn diese gleichzeitig Galaktose als Kohlenstoffquelle enthielten. Abb. 3-7 zeigt beispielhaft das Wachstum eines positiven Klones. Die cDNS dieser 4 positiven Klone wurde mit Hilfe der PCR mit spezifischen Primern für das Plasmid pJG4-5 isoliert. Anschließend wurden die entstandenen PCR-Amplikons einer Restriktionsanalyse mit dem Enzym Dde I unterzogen. Es stellte sich heraus, dass alle 4 Klone die identische cDNS enthielten (Abb. 3-8). Deshalb wurde lediglich das Amplikon eines Klones sequenziert. Die Datenbankanalyse ergab eine komplette Übereinstimmung mit der 5' UTR und den

ersten 643 kodierenden Basen des eukaryontischen Initiationsfaktors 4A1 der Maus (eIF-4A1).

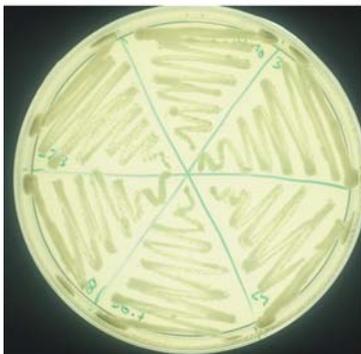
Glu/-Leu



Gal/Raff/-Leu



Glu/X-Gal



Gal/Raff/X-Gal

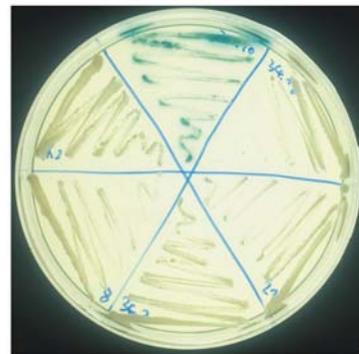


Abb. 3-7 Gezeigt sind vereinzelte Klone des *Interactor hunt*: Die Nährböden der oberen Kulturplatten enthielten kein Leucin, die beiden unteren enthielten X-Gal. Die beiden linken Platten enthielten Glukose, die rechten Galaktose als Kohlenstoffquelle. Auf den Platten wurden jeweils 6 verschiedene Hefeklone an den korrespondierenden Stellen ausplattiert. Als positiv wurde nur der im oberen Sechstel wachsende Klon gewertet, da nur dieser in Anwesenheit von Galaktose (Expression des Gens aus der cDNS-Bibliothek) Wachstum auf Leucin-defizienten Nährböden und Blaufärbung zeigte.

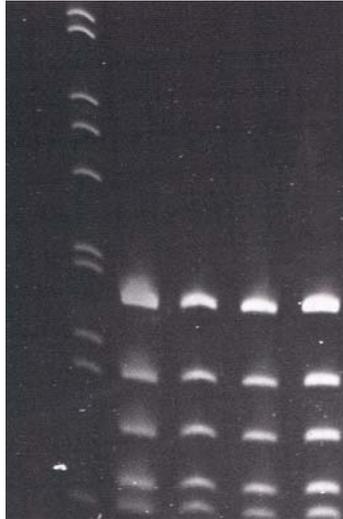


Abb. 3-8 Gezeigt ist ein Ethidium-Bromid gefärbtes DNS PAGE-Gel. PCR Amplikons der cDNS der 4 positiven Klone wurden einem Endonukleaseverdau mit dem Enzym Dde I unterzogen. Das identische Restriktionsmuster sprach dafür, dass alle 4 Klone die gleiche Sequenz enthielten.

### 3.3.1 Überprüfung der Spezifität der CRP2/eIF-4A1-Interaktion

Um sicher zu stellen, dass eIF-4A1 nicht unspezifisch ohne Köderprotein-Interaktion die Transkription der Reportergene aktiviert oder unspezifisch mit verschiedenen Köderproteinen interagiert, wurde ein sogenannter *Rescreen* durchgeführt. Dazu wurde das eIF-4A1-cDNS Stück aus den positiven Klonen mit Hilfe der PCR isoliert und erneut in den pJG4-5 Vektor kloniert. Es wurden sodann durch Transformation verschiedene Hefepopulationen hergestellt und deren Verhalten beobachtet. Alle Populationen wurden mit pJG4-5/eIF-4A1 transformiert, erhielten jedoch unterschiedliche Köderproteine. Zwei Stämme wurden mit pEG202/cGKIß bzw. pEG202 transformiert, um eine eventuell unspezifische Interaktion mit den in diesen Hefen vorliegenden Köderproteinen *lexA/cGKIß* bzw. *lexA* zu untersuchen. Des weiteren wurden Hefen, die ausschließlich eIF-4A1 enthielten generiert, um eine eventuelle direkte Aktivierung der Reportergene durch eIF-4A1 zu zeigen. Diese Hefen wurden selbstverständlich auf Histidin-haltigen Nährböden gehalten, da diese das zur Histidin-Synthese notwendige Plasmid pEG202 nicht enthielten. Zum Vergleich wurde auch die bei der Interaktorsuche gefundene Kombination CRP2 und eIF-4A1 erneut transformiert. Diese vier Hefepopulationen wurden anschließend den Bedingungen der Interaktorsuche unterzogen. Die Expression der Reportergene nach Induktion von eIF-4A1 durch Galaktose wurde analysiert. Dabei zeigte sich,

dass nur die CRP2 und eIF-4AI-kotransformierten Zellen auf Leucin defizienten Nährböden überlebten und auch Blaufärbung in Anwesenheit von X-Gal zeigten (Tabelle 3.2). Dies spricht für eine spezifische Interaktion der beiden Proteine im Zwei-Hybrid-System.

Tab 3.2

Köder	Fisch	Gal/X-Gal	Gal/Leu
CRP2	eIF-4AI	Blau	Wachstum
CGKIß	eIF-4AI	Weiß	kein Wachstum
LexA	eIF-4AI	Weiß	kein Wachstum
Kein Köderprotein	eIF-4AI	Weiß	kein Wachstum

### 3.3.2 Beschreibung des CRP2-Interaktors eIF-4AI

Dieses 46 kDa große Protein wurde erstmals 1985 beschrieben (Nielsen et al. 1985). Es handelt sich um einen Initiationsfaktor der Proteintranslation in eukaryontischen Zellen. Gleichzeitig ist eIF-4AI der Prototyp der sogenannten D-E-A-D-Box-Proteine (Gingras et al. 1999). Die Aminosäuresequenz Aspartat, Glutamat, Alanin und Aspartat bildet eine funktionelle Gruppe, die die Entwindung helikaler Nukleotidstrukturen ermöglicht. Daher werden die Mitglieder der D-E-A-D-Box-Familie auch Helikasen genannt. Die D-E-A-D-Box befindet sich bei eIF-4AI an Position 186-189, innerhalb der in diesem Versuch entdeckten Nukleotidsequenz.

EIF-4AI weist hohe Homologie zu zwei weiteren Proteinen auf, die eIF-4AII bzw. eIF-4AIII genannt werden. EIF-4AI und eIF-4AII stimmen auf Aminosäureebene zu 91% überein und üben die gleiche Funktion aus, unterscheiden sich jedoch in ihrem Expressionsmuster. EIF-4AIII hingegen stimmt nur zu 65% mit eIF-4AI überein, besitzt zwar ebenfalls RNS-abhängige ATPase und ATP-abhängige Helikase-Aktivität, ist aber im Gegensatz zu eIF-4AII nicht in der Lage, die Funktion von eIF-4AI zu übernehmen (Nielsen und Trachsel 1988; Li et al. 1999).

EIF-4AI bzw. eIF-4AII, im Folgenden als eIF-4A zusammengefasst, bildet eine Untereinheit des eIF-4F-Komplexes. Dieser Komplex besteht aus eIF-4G, eIF-4E, Polyadenosin bindendem Protein (PABP), eIF-3 und eIF-4A. Dabei dient eIF-4G als Ankerprotein, an das sich die anderen Komplexpartner anlagern. Während PABP den Polyadenosin-Schwanz der 3' UTR bindet, interagiert eIF-4E mit der 5' Cap Region der mRNS. Dabei stellt man sich vor, dass das mRNS-Molekül eine

ringförmige Struktur um den Initiationsfaktorenkomplex bildet (Abb. 3-9). Die beiden verbleibenden Komplexpartner eIF-3 und eIF-4A ermöglichen schließlich die Anlagerung des gesamten Komplexes mit mRNA-Molekül an die 40 S Ribosomen-Untereinheit. Der Faktor eIF-4A hat zusätzlich über seine RNS-abhängige ATPase und Helikase-Funktion die Aufgabe, die mRNA zu entwinden und ein Ablesen am Ribosom zu ermöglichen (Gingras et al. 1999; Morino et al. 2000). An den Komplex gebundener eIF-4A wird ständig mit frei vorliegendem eIF-4A ausgetauscht (Yoder-Hill et al. 1993). Dies erklärt einerseits die Tatsache, daß eIF-4A etwa 3 bis 6 mal häufiger als die anderen im eIF-4F enthaltenen Proteine vertreten ist. Andererseits lässt sich so die Notwendigkeit erklären, dass freier eIF-4A zusätzlich zu eIF-4F anwesend sein muss, um eine Ribosomenanlagerung zu ermöglichen (Gingras et al. 1999).

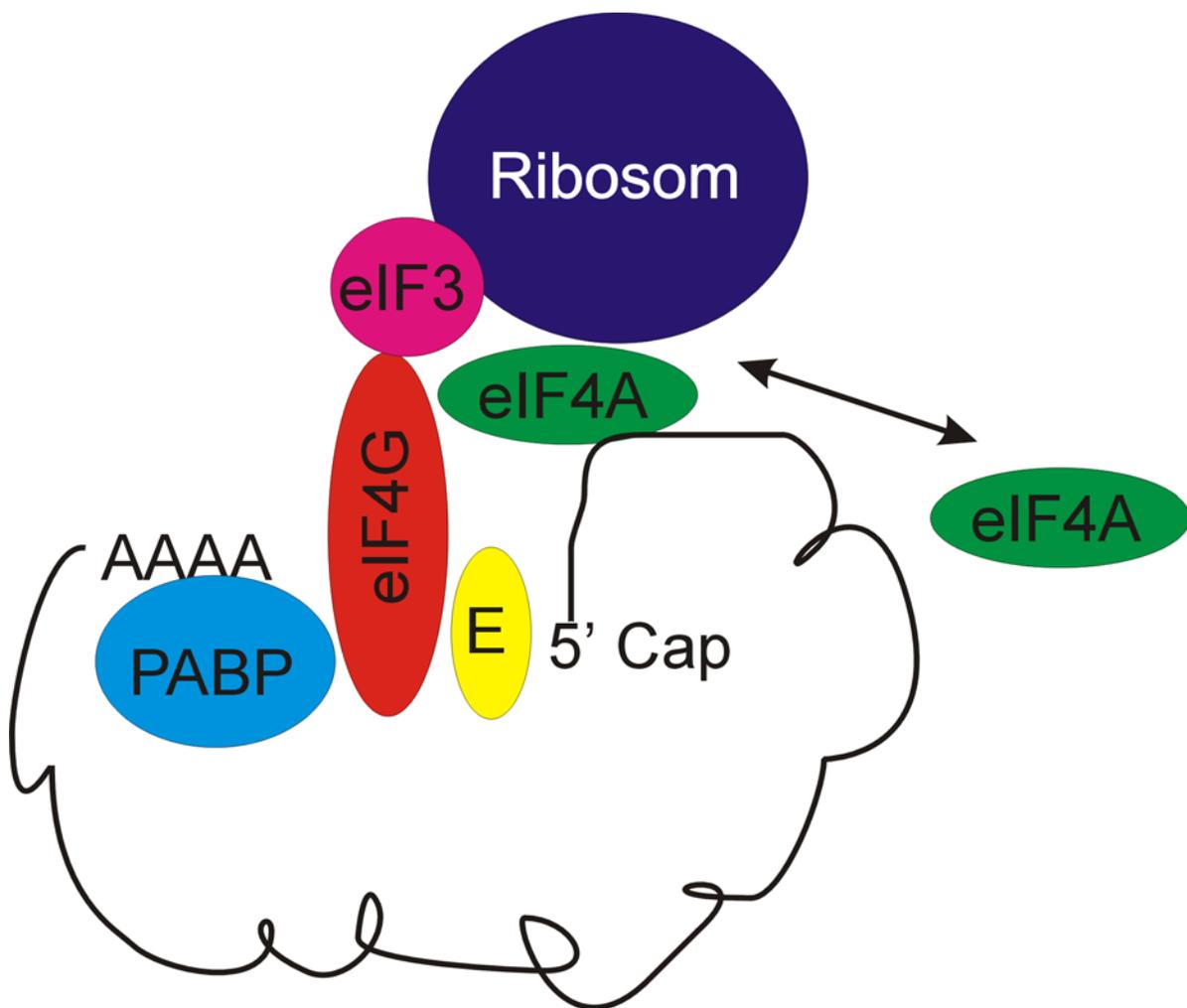


Abb. 3-9 Schema der Protein-Translations-Initiation. Erläuterungen siehe Text. PABP = Polyadenin bindendes Protein, eIF = eukaryontischer Initiationsfaktor, E = eIF4E.

# 4 Diskussion

## 4.1 Gewebespezifische Expression von CRP2

Die Expression von CRP2 und cGKI wurde in verschiedenen Geweben der Ratte verglichen. Es zeigte sich, dass CRP2 nahezu ubiquitär nachzuweisen war. Auch der eukaryontische Initiationsfaktor 4AI ist in allen Geweben vertreten. Es stellt sich jetzt die Frage, ob cGKI über die Phosphorylierung von CRP2 dessen Interaktion mit 4AI reguliert. Diese Frage ist bislang nicht beantwortet. Eine ausschließliche Einbindung der Interaktion CRP2/eIF-4AI in den NO-cGMP-cGK Signalweg muss jedoch ausgeschlossen werden, da die cGKI nicht in allen Geweben exprimiert wird. In den Organen Leber und Ovar ist die cGKI beispielsweise nicht, im Skelettmuskel nur in sehr geringer Menge nachweisbar. In diesen Geweben könnte eine etwaige Regulation der CRP2/eIF-4AI Interaktion über eine andere Serin/Threonin Kinase erfolgen. Für eine Spekulation über den Zusammenhang zwischen der Expressionsdichte von CRP2 und der Zellproliferation in den einzelnen Geweben reichen die vorliegenden Ergebnisse nicht aus. In Geweben mit bekanntermaßen niedriger Proliferation wie Herzmuskel und Skelettmuskel findet sich hohe, beziehungsweise gar keine CRP2 Expression. In den annähernd gleich stark teilungsfähigen Geweben Dünn- und Dickdarm lassen sich ebenfalls sehr unterschiedlich große Mengen CRP2 nachweisen.

## 4.2 Interaktion von CRP2 und cGKI

Durch den Vergleich der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Zwei-Hybrid-System konnte ein Unterschied zwischen den Affinitäten von cGKI $\alpha$  und cGKI $\beta$  zu CRP2 festgestellt werden. Dabei erwies sich die Interaktion von cGKI $\alpha$ /CRP2 mehr als 5 mal so stark wie die von cGKI $\beta$ /CRP2. Es ist bekannt, dass beide Isoformen der cGKI in vitro in

der Lage sind, CRP2 zu phosphorylieren (Huber et al. 2000). Bislang wurde jedoch der cGKI $\beta$  die größere Bedeutung zugeschrieben, da die cGKI/CRP2 Interaktion mit dieser Isoform zuerst in Hefen im Zwei-Hybrid-System gezeigt wurde. Die hier dargestellten Ergebnisse legen allerdings nahe, dass *in vivo* die Interaktion mit der  $\alpha$ -Isoform die wichtigere Rolle spielen könnte. Unklar ist bislang, ob CRP2 ähnlich mit der  $\alpha$ -Isoform kolokalisiert ist, wie für die  $\beta$ -Isoform gezeigt werden konnte (Huber et al. 2000).

### 4.3 Interaktion von CRP2 und eIF-4A1

Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems konnte eine Proteininteraktion von CRP2 mit eIF-4A1 in der Hefezelle demonstriert werden. Eine unspezifische Interaktion dieser Proteine konnte durch Kotransformation der Hefezellen mit eIF-4A1 und *lexA* bzw. cGKI $\beta$  ausgeschlossen werden. In diesem Fall kam es, im Gegensatz zur Kotransformation mit eIF-4A1 und CRP2, zu keiner Aktivierung von Reportergenen. Die intrazelluläre Lokalisation von CRP2, die als perinukleär beschrieben wurde, zeigt, dass eine Interaktion der beiden Proteine räumlich gesehen möglich ist (Huber et al. 2000). Es ist zu erwarten, dass auch eIF-4A1 als Bestandteil von Ribosomen am rauhen endoplasmatischen Retikulum zumindest teilweise perinukleär lokalisiert ist. Selbstverständlich muss diese Interaktion in Säugerzellen beispielsweise durch Koimmunpräzipitation verifiziert werden, wenngleich die erhaltenen Ergebnisse eine tatsächliche Interaktion wahrscheinlich machen. Dieses Resultat erweitert möglicherweise das bisherige Wissen um den NO-cGMP-cGK-Signaltransduktionsweg, was im folgenden als Hypothese dargestellt wird.

Schon seit geraumer Zeit wird der cGMP-abhängigen Proteinkinase antiproliferative Aktivität zugeschrieben (Yu et al. 1997; Chen et al. 1998). Sobald vaskuläre glatte Muskelzellen zu proliferieren beginnen, sinkt die Expression der cGK in diesen Zellen dramatisch. Dies konnte sowohl *in vitro* (Lincoln et al. 1998) als auch *in vivo* gezeigt werden. Nachdem durch koronare Angioplastie bei Schweinen eine Wunde der Koronarintima gesetzt wurde, konnte in der Immunhistochemie die Expression der cGK im Zeitverlauf verfolgt werden. Dabei fiel auf, dass diejenigen Zellen, die sich an der Reparation der Wunde durch Proliferation und Sekretion von

Interzellulärsubstanz beteiligten, einen starken Abfall der cGKI Konzentration aufwiesen. Sobald die Wunde verschlossen war, wandelten sich diese Zellen morphologisch wieder in glatte Muskelzellen um und erreichten die cGKI Expressionsdichte der umliegenden, an der Reparatur nicht beteiligten Zellen (Anderson et al. 2000). Wie kann dieser Effekt auf molekularer Ebene erklärt werden? Bereits 1999 konnten Fukumoto und Kollegen einen Einfluß von cGMP auf den Verlauf des Zellzyklus, nämlich eine Verlängerung der G<sub>1</sub>-Phase, feststellen (Fukumoto et al. 1999). 2 Jahre später konnte diese cGMP-abhängige Proliferationsinhibition in der G<sub>1</sub>-Phase an der glatten Muskulatur des Bronchialsystems bestätigt werden (Hamad und Knox 2001).

Der Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase in die S- Phase, der sogenannte *Restriction Point*, unterliegt einer sehr komplexen Regulation. Während der G<sub>1</sub>-Phase liegt das Retinoblastom Protein, ein wichtiges Tumorsuppressor-Gen, in nicht phosphorylierter Form vor. So kann es mit dem Transkriptionsfaktor E2F eine Verbindung eingehen. Erhält die Zelle ein die Proliferation stimulierendes Signal, so kommt es zur Expression verschiedener Cycline, unter anderem CyclinD. Diese Cycline binden nun an bestimmte Cyclin-abhängige Kinasen, sogenannte cdk's, und phosphorylieren diese, was zu deren Aktivierung führt. Im Falle von CyclinD wird so unter anderem cdk4 aktiviert. Cdk4 phosphoryliert nun seinerseits das Retinoblastom Protein. Dies führt zu einer Dissoziation der Retinoblastom-E2F Bindung. Daraufhin kann E2F mit dem Transkriptionsfaktor DP 1 interagieren und in diesem Komplex die Transkription von für die S-Phase wichtigen Genen, wie beispielsweise der DNS-Polymerase, starten (Sherr 1996) (Abb. 4-1).

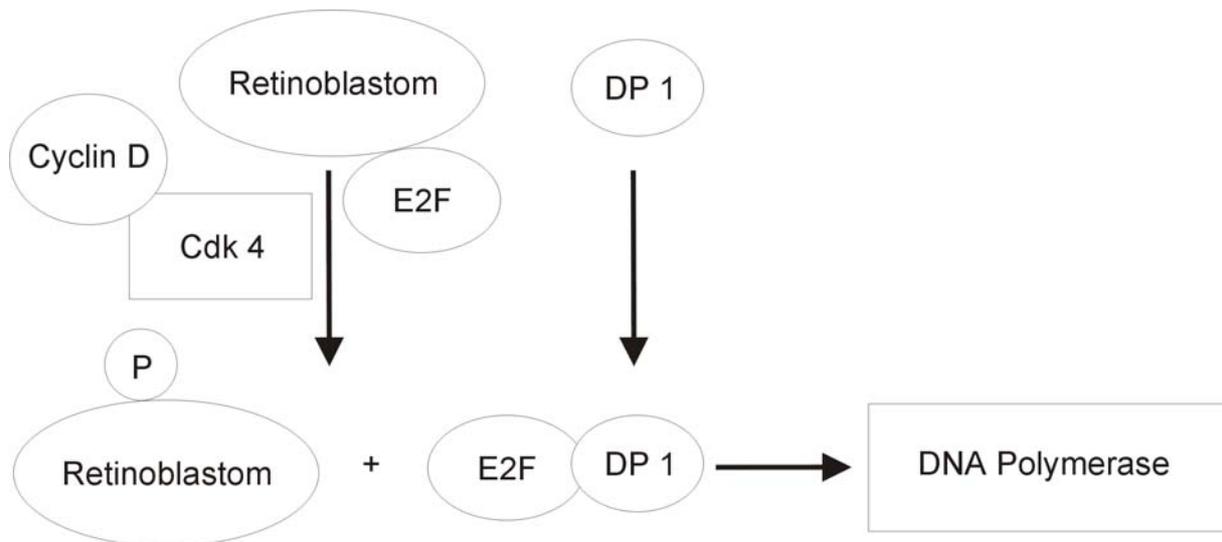


Abb. 4-1 Schema der Kontrolle des *Restriction Point* durch das Retinoblastom Protein. Die Cyclin-abhängige Kinase Cdk4 wird in Anwesenheit von Cyclin D aktiviert und phosphoryliert dann das Retinoblastom Protein. Dieses dissoziiert in phosphorylierter Form von E2F und ermöglicht so die Interaktion von E2F mit DP1, die als Transkriptionsaktivatoren die Transkription der DNS Polymerase starten.

Die Behandlung in Zellkultur gehaltener menschlicher glatter Muskelzellen mit cGMP führte dosisabhängig zu einer Verlängerung der G<sub>1</sub>-Phase unter Proliferationsstimulation. Diese Verlängerung konnte mit einer verminderten cdk4-Aktivität erklärt werden, die wiederum auf eine verringerte CyclinD Expression zurückzuführen war. Auf welchem Weg könnte nun cGMP bzw. die cGK Einfluß auf die CyclinD Expression nehmen? Die cGK phosphoryliert eine Reihe von Substraten wie die Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase (PP1M), Telokin, IRAG oder den BK Kanal. All diese Substrate steuern über Senkung der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration oder eine Verminderung der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der kontraktilen Filamente die Spannung von glatten Muskelzellen. Bei keinem dieser Substrate liegt eine direkte Beteiligung an der Regulation der Proliferation nahe. Bei dem cGKI-Substrat CRP2 hingegen ist jegliche Funktion bis dato unbekannt. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Interaktion von CRP2 mit eIF-4AI nachgewiesen. Ist eIF-4AI an der Regulation der Proliferation beteiligt? Könnte dies der fehlende molekulare Baustein sein, der die antiproliferative Aktivität der cGK erklärt?

Bereits 1988 wurde das eIF-4AI Homologe eIF-4AII, das auf Aminosäuren-Ebene zu 91% mit eIF-4AI übereinstimmt, entdeckt (Nielsen und Trachsel 1988). Das

Expressionsmuster der beiden Isoformen, die sich, wie unter 3.3.2 erläutert, funktionell ersetzen können, war sehr unterschiedlich. Generell wurden beide Proteine ubiquitär gefunden. In manchen Geweben wie Gehirn, Niere und Herz fand sich ein zu Gunsten von eIF-4All verschobenes bzw. ausgeglichenes Verhältnis der Isoformen. In anderen Geweben wie Thymus, Milz und Leber fand sich jedoch ein sehr deutlich zu Gunsten von eIF-4AI verschobenes Verhältnis. Vergleicht man nun die Proliferationsfähigkeit von Gehirn und Herzmuskel mit der der lymphatischen Organe Thymus und Milz, so könnte man den Schluß ziehen, dass eIF-4AI die für die Proliferation entscheidende Form ist, während Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase hauptsächlich eIF-4All zur Translation nutzen. 9 Jahre später gelang es, diese Schlussfolgerung zu beweisen. Es wurde gezeigt, dass auch Neurone und Zellen der Niere, wenn sie maligne transformiert sind und in Zellkultur gehalten werden, ein ähnliches eIF-4AI zu eIF-4All Verhältnis erreichen wie Zellen proliferierender Organe *in vivo*. Wurden diese Zellen jedoch in ihrem Wachstum gestoppt, so konnte ein 3,5-facher Anstieg der eIF-4All Expression festgestellt werden. Die Expression von eIF-4AI ging in diesem Fall leicht zurück. Nach erneuter Stimulation dieser Zellen stieg die eIF-4AI Konzentration wieder an und erreichte genau am Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase ein Maximum. Dies zeigt, dass eIF-4AI die für die Proliferation notwendige Isoform ist (Williams-Hill et al. 1997). Ein sehr eindrucksvolles Experiment über die Bedeutung von eIF-4A für die Proliferation gelang Galloni und Edgar (Galloni und Edgar 1999). Sie untersuchten verschiedene im Wachstum gestörte Drosophila Mutanten, um Gene, die für die Zellteilung relevant sind, zu entdecken. 4 der untersuchten Mutanten hatten Veränderungen im 1. oder 2. Intron von eIF-4A. Die 4 Mutationen hatten unterschiedlich starke Auswirkungen auf die DNS Replikation der betroffenen Larven. In einem Fall war diese stark, in 2 Fällen mittelmäßig und in einem Fall leicht eingeschränkt. Ließ man nun E2F-DP1 in diesen Zellen überexprimieren, so kam es sogar bei den stark replikationseingeschränkten Zellen zu einer sehr deutlichen Zunahme der DNS Replikation. Dies zeigte, dass der Replikationsnachteil nicht durch die generell verminderte Proteintranslation erklärbar war, da die Zellen annähernd normal proliferieren konnten, sobald E2F-DP1 im Überschuß vorhanden war. Die Autoren kamen zu dem Schluß, dass quantitative Unterschiede der eIF-4A Expression der ausschlaggebende Faktor für das unterschiedliche Verhalten der Mutanten war. Eine suboptimale Menge an eIF-4A könnte sich nachteilig auf die Translation bestimmter Regulationsgene, jedoch nicht auf die Translation derer

Zielgene auswirken. Wenn CRP2 mit eIF-4A1, das in proliferierenden Geweben die entscheidende Isoform zu sein scheint, unter cGKI Kontrolle einen Komplex einginge, könnte dies zu einer suboptimalen Menge von eIF-4A führen. So wäre der antiproliferative Effekt der cGKI zu erklären. Steigt man am Ende der Signalkaskade ein, indem man E2F-DP1 im Überschuß zugibt, so dass es nicht mehr vom Retinoblastom Protein gebunden werden kann, so geht die Replikation vonstatten. Dies legt nahe, dass Gene, die oberhalb dieses Punktes in der Signalkaskade liegen - möglicherweise weil sie besonders komplexe helikale Strukturen in der 5'UTR besitzen - ,von dieser eIF-4A vermittelten Translationsverminderung besonders betroffen sind. Galloni und Edgar führen als möglicherweise betroffenes System das CyclinD/cdk4-System an, da auch das Protein CLN3, das Cyclin D Analogon der Hefe auf Translationsebene reguliert wird (Polymenis und Schmidt 1997). Wie bereits oben erwähnt, wird der antiproliferative Effekt von cGMP genau mit diesem System in Verbindung gebracht. Als die Arbeitsgruppe von Gao, Neufeld und Pan den Einfluss des Tumorsuppressorgens PTEN auf die Ontogenese von Drosophila Organen untersuchte, machte sie eine interessante Entdeckung. Die Tiere mit mutiertem PTEN Gen wiesen eine Organomegalie auf. Dies lag sowohl an einer erhöhten Zellzahl der Organe (Hyperplasie), als auch an vergrößerten Einzelzellen (Hypertrophie). Die Autoren benutzten nun die von Galloni und Edgar (siehe oben) beschriebenen eIF-4A-Mutanten, um das Verhalten von PTEN/eIF-4A-Doppelmutanten zu studieren. Es zeigte sich, dass der hyperproliferative Effekt des mutierten PTEN-Gens bei gleichzeitigem Vorliegen einer eIF-4A-Mutante abgeschwächt bzw. aufgehoben wurde. Ein Einfluss auf die Hypertrophie der Zellen ließ sich nicht nachweisen (Gao et al. 2000). Dies untermauert die Feststellung, dass eIF-4A-Defizienz die Translation verschiedener Proteine in unterschiedlichem Maß einschränkt. Des weiteren lässt sich feststellen, dass das PTEN Gen wahrscheinlich über die gleiche Kaskade Einfluß auf den Zellzyklus nimmt wie eIF-4A und cGKI. Eine weitere Arbeit stützt die Hypothese über den Einfluss strukturell auffälliger 5'UTRs auf die eIF-4A-abhängige Translation. Daga und Jimenez untersuchten das Verhalten von Hefezellen mit veränderter eIF-4A-Aktivität. In ihrem Versuchsaufbau waren die Autoren in der Lage, die eIF-4A Expression kontrolliert zu dosieren, indem sie unterschiedliche Mengen einer funktionslosen eIF-4A Mutante exprimieren ließen und so den Wildtyp eIF-4A verdrängten. Vollkommen eIF-4A-defiziente Hefen waren nicht lebensfähig, während Zellen mit einer leichten Reduktion des Initiationsfaktors

zwar normales Wachstum aufwiesen, aber einem sehr effektiven Zellzyklus-Block in der G<sub>2</sub>-Phase unterlagen. Es konnte festgestellt werden, dass die 50-100 häufigsten Proteine der Hefezelle in ihrem Expressionsmuster unverändert waren. Allerdings zeigte sich, dass das Protein cdc25, welches dosisabhängig die Mitose induziert, kaum mehr exprimiert wurde. Cdc25 besitzt eine besonders lange 5'UTR mit ungewöhnlicher Struktur. Nachdem diese 5'UTR stark verkürzt wurde, zeigten die Zellen trotz verminderter eIF-4A-Aktivität normale cdc25-Expression und eine Wiederherstellung der Proliferationsfähigkeit. Auffallend war, dass die Zellen nach der Änderung der 5'UTR sich früher teilten. Es schien, als ob die normale 5'UTR zur Auswahl des richtigen Zeitpunktes für die Mitose nötig wäre. Man könnte sich vorstellen, dass ein Protein, das sehr schlecht translatiert wird, als Sensor für die generelle Proteintranslation dient. Wenn sogar das schlecht translatierbare Protein cdc25 in ausreichender Menge vorliegt, kann man davon ausgehen, dass generell genügend Proteinsynthese betrieben wurde und eine Mitose dann sinnvoll ist (Daga et al. 1999).

In den Geweben mit der wohl stärksten Proliferation überhaupt – Malignomen – wurde ebenfalls eine erhöhte eIF-4A Expression gefunden (Eberle et al. 1997; Shuda et al. 2000). Shuda und Kollegen analysierten ein ganzes Set verschiedener Initiations- und Elongationsfaktoren der Proteintranslation bei Hepatozellulären Karzinomen. Dabei war eIF-4A der am stärksten erhöhte Faktor und war um das 2,6-fache im Vergleich zu den umliegenden nicht malignen Leberzellen erhöht. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die cGMP Signalkaskade Einfluss auf die Proliferation maligner Zellen nimmt. Pitari et al. stellten einen cytostatischen Effekt von cGMP auf Colon Karzinom Zellen dar. Durch Stimulation der enterischen Guanylatzyklase C (GC-C) mit hitzestabilem Enterotoxin bzw. dem physiologischen GC-C Agonisten Uroguanylin konnte eine beeindruckende Verlängerung der G<sub>1</sub>-Phase der malignen Zellen erreicht werden (Pitari et al. 2001). Andere Arbeitsgruppen konnten eine Induktion der Apoptose maligner Colon Carcinom Zellen durch Hemmung des Abbaus von cGMP über Phosphodiesterasen Inhibition zeigen (Soh et al. 2000; Thompson et al. 2000). Diese Befunde sind insbesondere im Bezug auf die hohe Expression von CRP2 im Colon von Interesse. Möglicherweise lässt sich dieser Effekt über die Interaktion von CRP2 und eIF4A auf molekularer Ebene erklären. Beim Menschen ist CRP2 auf dem Chromosom 14q32.3 lokalisiert (Karim et al. 1996; Tsui et al. 1996). Dies ist deshalb von besonderem Interesse, da

das Chromosom 14 häufig in Translokationen involviert ist (Hofker et al. 1990). Durch solche Translokationen gehen häufig Gene verloren, was im Fall von Tumorsuppressorgenen zur Tumorgenese führen kann. Bei T-Zell- und B-Zell-Lymphomen ist das Chromosom 14 das am häufigsten von Translokationen betroffene Chromosom (Freedman und Nadler 1998). Über eine Beteiligung von CRP2 an der Entstehung dieser Neoplasien wurde schon länger spekuliert (Tsui et al. 1996). Durch den Verlust des cGKI Substrates CRP2 bei einer derartigen Translokation könnte es gleichzeitig zum Verlust des antiproliferativen Effekts des NO-cGMP-cGKI-Signalwegs kommen. Sowohl für den NO-cGMP-cGKI-Signalweg, als auch für CRP2, als auch für eIF4A1 ist also eine Beteiligung bei der Entstehung maligner Erkrankungen beschrieben. Im Zusammenhang mit der von Huber et al. dargestellten cGKI/CRP2 Interaktion und der in dieser Arbeit gezeigten Interaktion von CRP2 und eIF4A1 kann man von einer antineoplastischen „Signalkette“ sprechen. Fällt ein Glied dieser Kette aus, so könnte es durch Überwiegen von eIF4A1 zum Auftreten von malignen Tumoren kommen.

Aussagen über eine Interaktion von CRP2 mit eIF-4A11 sind derzeit spekulativ. Bei der in dieser Arbeit verwendeten cDNS-Bibliothek ist eIF4A11 mit hoher Wahrscheinlichkeit vertreten. In dem durchgeführten Zwei-Hybrid-Screen konnte keine Interaktion von CRP2 mit eIF4A11 gezeigt werden, es bleibt jedoch offen, ob sich eine solche Interaktion mit anderen Systemen nachweisen lässt.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion cGKI-CRP2 genauer zu charakterisieren, das Expressionsmuster von CRP2 darzustellen und neue Interaktionspartner von CRP2 zu finden, um Aussagen über dessen Funktion treffen zu können.

Zusammenfassend wurden folgende Resultate erhalten: Für die Interaktion mit CRP2 scheint die Isoform cGKI $\alpha$  der bedeutendere Interaktor zu sein. Das Protein CRP2 wird, wie in der Literatur beschrieben, nahezu ubiquitär exprimiert. Als neuer Interaktionspartner mit CRP2 konnte der Translations-Initiationsfaktor eIF-4A1 mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nachgewiesen werden. EIF-4A1 kommt vor allem eine Bedeutung bei der Proliferationskontrolle zu. In physiologisch stark proliferierenden und maligne entarteten Zellen findet sich im Gegensatz zu schwach proliferierenden Zellen eine sehr hohe eIF-4A1 Expression. Es scheint, als ob sich die beiden funktionell sehr ähnlichen eIF-4A Isoformen ergänzen, indem die Isoform I in den Zellen mit häufiger Zellteilung die Translation steuert, während die Isoform II in den ruhenden Zellen diese Funktion übernimmt. Die Helikase-Aktivität von eIF-4A scheint besonders wichtig für die Translation von Genen mit besonders langer und strukturell komplexer 5'UTR zu sein. Solche 5'UTRs finden sich bei einigen den Zellzyklus steuernden Genen. Besonders mit der Steuerung des CyclinD/cdk4-Systems wurde eIF-4A in Zusammenhang gebracht. Interessanterweise scheint auch der NO-cGMP-cGK Signalweg Einfluss auf dieses System zu nehmen. So erlaubt die Verknüpfung der cGMP-Signalkaskade über CRP2 mit eIF-4A1 die Aufstellung des folgenden hypothetischen Modells:

NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase, was zu einem intrazellulären Anstieg von cGMP führt. Dadurch kommt es zur Aktivierung der cGKI, die nun ihre Substrate phosphoryliert. Unter anderem wird auch CRP2 phosphoryliert und so möglicherweise aktiviert. Über die Zinkfingerstruktur von CRP2 könnte nun eine

Bindung an eIF-4A1 erfolgen. Diese Bindung könnte zur Folge haben, dass nun weniger freier eIF-4A1 zur Verfügung steht. Wie oben erwähnt, muss eIF-4A1 zur Translationsinitiation aus dem freien Zustand in den Komplex eIF-4F aufgenommen werden. Zur Translation von mRNS-Molekülen mit komplexer 5'UTR-Struktur ist jedoch eine ausreichende Menge eIF-4A notwendig. Man könnte sich vorstellen, dass durch die Bindung an CRP2 die jetzt zur Verfügung stehende Menge an eIF-4A nicht ausreicht und so beispielsweise CyclinD vermindert translatiert wird. Ist wiederum zu wenig CyclinD vorhanden, so wird cdk4 nicht aktiviert. Das Retinoblastom Protein kann so nicht phosphoryliert werden und hält auf diese Weise E2F weiterhin gebunden. E2F kann keine Bindung mit DP1 eingehen und der *Restriction Point*, der die Zelle irreversibel von der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase bringt, kann nicht überschritten werden. Geht CRP2 beispielsweise durch eine Translokation verloren, so kann dieser Weg der Proliferationsbeschränkung nicht mehr beschritten und auf diese Weise die Entstehung maligner Tumoren erleichtert werden. So könnte die seit langem offen stehende Frage nach dem molekularen Weg der Einflussnahme der NO-cGMP-cGKI Signalkaskade auf die Proliferation beantwortet werden (Abb. 5-1). Sollte sich dieses Modell als korrekt herausstellen, so ergäben sich neue möglicherweise nebenwirkungsarme molekulare Angriffspunkte zur pharmakologischen Therapie maligner Erkrankungen.

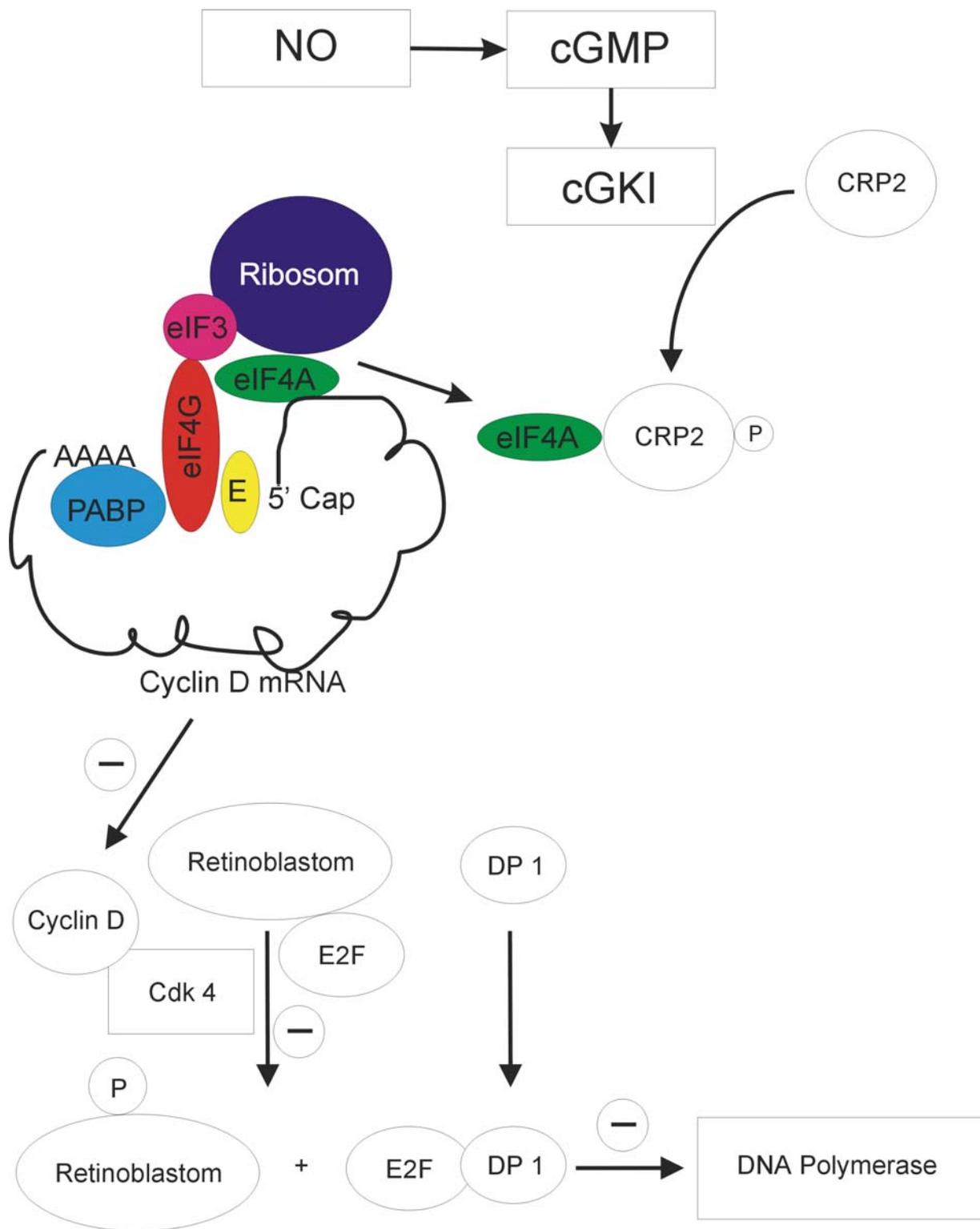


Abb. 5-1 Hypothetisches Modell über die Verknüpfung der NO/cGMP Signalkaskade mit der Proteintranslation und dadurch der Steuerung der Proliferation über die cGKI und die Interaktion CRP2-eIF4A. Bei verminderter freier eIF4A Menge kann Cyclin D nicht mehr translatiert werden und eine Phosphorylierung des Retinoblastom Proteins ermöglichen, was ein Überschreiten des „Restriction Point“ unmöglich macht und die Zelle an einem Verlassen der G<sub>1</sub>-Phase hindert

# 6 Anhang

## 6.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-inoylphosphat
BK <sub>Ca</sub>	Maxi Kalium Kanal
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
c	Centi
C	Celsius
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNS	Kodierende Desoxyribonukleinsäure
cdk	Cyclin abhängige Kinase
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cGK	cGMP abhängige Proteinkinase
CM	Komplettes Medium
cpm	“Counts” pro Minute
CRP	Cystein-reiches Protein
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDRF	Endothel abstammender Relaxationsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
eIF	Eukaryontischer Initiationsfaktor
g	Gramm
Gal	Galaktose
GC	Guanylatzyklase
h	Stunde
His	Histidin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IRAG	IP <sub>3</sub> -Rezeptor-assozierte-cGKI-Substrat
k	Kilo
kDa	Kioldalton

L	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
Lsg.	Lösung
m	Meter oder Milli
M	Molar
μ	Mikro
MAPK	Mitogen abhängige Proteinkinasen
min	Minute
mind.	Mindestens
MLK	Leichte Ketten des Myosin
MLKK	Myosin leichte Ketten Kinase
MLKP	Myosin leichte Ketten Phosphatase
MOPS	3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure
n	Nano
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
ONPG	Ortho-nitrphenyl-galactopyranosid
p	Piko
PABP	Polyadenin bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Plättchen abstammender Wachstumsfaktor
PdVF	Polyvinylidenfluorid
PEG	Polyethylenglycol
Raff	Raffinose
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S	Svedberg Einheit
SDS	Sodiumduodecylphosphat
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
s.o.	Siehe oben
sog.	Sogenannt
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSC	Natrium-Chlorid-Natrium-Zitrat Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-Borat Natrium-Chlorid Puffer mit Tween
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Trp	Tryptophan
U/l	Units(Einheiten) pro Liter
Ura	Uracil
UTR	Unübersetzte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid
YNB	Hefe-Stickstoff-Basis
YPAD	Hefeextrakt-Pepton-Adenin-Dextrose Medium
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Dextrose Medium

## 6.2 Kurzschreibweise der Aminosäuren

<u>Aminosäure</u>	<u>Ein-Buchstaben-Code</u>	<u>Drei-Buchstaben-Code</u>
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

## 6.3 Literaturverzeichnis

- Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P., Toro, L. (1998).  
“The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo.” J Biol Chem **273**(49): 32950-6.
- Anderson, P. G., Boerth, N. J., Liu, M., McNamara, D. B., Cornwell, T. L., Lincoln, T. M. (2000).  
“Cyclic GMP-dependent protein kinase expression in coronary arterial smooth muscle in response to balloon catheter injury.” Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(10): 2192-7.
- Arber, S., Halder, G., Caroni, P. (1994).  
“Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation.” Cell **79**(2): 221-31.
- Arber, S., Hunter, J.J., Ross, J., Jr., Hongo, M., Sansig, G., Borg, J., Perriard, J. C., Chien, K. R., Caroni, P. (1997).  
“MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure.” Cell **88**(3): 393-403.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1995).  
Current protocols in molecular biology. New York, John Wiley & Sons Inc.
- Biel, M., Sautter, A., Ludwig, A., Hofmann, F., Zong, X (1998).  
“Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes.” Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **358**(1): 140-4.
- Birnboim, H. C. und Doly J. (1979). “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.” Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Carvajal, J. A., Germain, A.M., Huidobro-Toro, J. P., Weiner, C. P. (2000).  
“Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation.” J Cell Physiol **184**(3): 409-20.
- Chen, L., Daum, G., Forough, R.; Clowes, M.; Walter, U.; Clowes, A. W. (1998).  
“Overexpression of human endothelial nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells and in balloon-injured carotid artery.” Circ Res **82**(8): 862-70.
- Chiche, J. D., Schlutsmeyer, S.M., Bloch, D. B., de la Monte, S. M., Roberts, J. D., Jr., Filippov, G., Janssens, S. P., Rosenzweig, A., Bloch, K. D. (1998).  
“Adenovirus-mediated gene transfer of cGMP-dependent protein kinase increases the sensitivity of cultured vascular smooth muscle cells to the antiproliferative and pro-apoptotic effects of nitric oxide/cGMP.” J Biol Chem **273**(51): 34263-71.
- Chien, C. T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., Fields, S. (1991).  
“The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest.” Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9578-82.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A.E., MacDonald, R. J., Rutter, W. J. (1979).  
“Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.” Biochemistry **18**(24): 5294-9.
- Chitaley, K., Weber, D., Webb, R. C. (2001).  
“RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension.” Curr Hypertens Rep **3**(2): 139-44.

- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987).  
 "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Daga, R. R. und Jimenez, J. (1999).  
 "Translational control of the cdc25 cell cycle phosphatase: a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth." J Cell Sci **112 Pt 18**: 3137-46.
- de Jonge, H. R. (1981).  
 "Cyclic GMP-dependent protein kinase in intestinal brushborders." Adv Cyclic Nucleotide Res **14**: 315-33.
- Draijer, R., Vaandrager, A. B., Nolte, C., de Jonge, H. R., Walter, U., van Hinsbergh, V. W. (1995).  
 "Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin." Circ Res **77**(5): 897-905.
- Eberle, J., Krasagakis, K., Orfanos, C. E. (1997).  
 "Translation initiation factor eIF-4A1 mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cells in vitro." Int J Cancer **71**(3): 396-401.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983).  
 "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal Biochem **132**(1): 6-13.
- Feuerstein, R., Wang, X., Song, D.; Cooke, N. E.; Liebhaber, S. A. (1994).  
 "The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10655-9.
- Freedman, A. S. und Nadler, L. M. (1998). Malignancies of Lymphoid Cells. New York, Mc Graw-Hill.
- Fukao, M., Mason, H. S., Britton, F. C., Kenyon, J. L., Horowitz, B., Keef, K. D. (1999).  
 "Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072." J Biol Chem **274**(16): 10927-35.
- Fukumoto, S., Koyama, H., Hosoi, M., Yamakawa, K., Tanaka, S., Morii, H., Nishizawa, Y. (1999).  
 "Distinct role of cAMP and cGMP in the cell cycle control of vascular smooth muscle cells: cGMP delays cell cycle transition through suppression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 activation." Circ Res **85**(11): 985-91.
- Furukawa, K., Barger, S. W., Blalock, E. M., Mattson, M. P. (1996).  
 "Activation of K<sup>+</sup> channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein." Nature **379**(6560): 74-8.
- Galloni, M. und Edgar B. A. (1999).  
 "Cell-autonomous and non-autonomous growth-defective mutants of *Drosophila melanogaster*." Development **126**(11): 2365-75.
- Gambaryan, S., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Jarchau, T., Walter, U., Haase, W., Kurtz, A., Lohmann, S. M. (1996).  
 "Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression." J Clin Invest **98**(3): 662-70.
- Gao, X., Neufeld, T. P., Pan, D (2000).  
 "Drosophila PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways." Dev Biol **221**(2): 404-18.
- Garbers, D. L. und Lowe D. G. (1994).  
 "Guanylyl cyclase receptors." J Biol Chem **269**(49): 30741-4.

- Garg, U. C. und Hassid A. (1989).  
 "Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells." J Clin Invest **83**(5): 1774-7.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., Schiestl, R. H. (1992).  
 "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells." Nucleic Acids Res **20**(6): 1425.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., Woods, R. A. (1995).  
 "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS- DNA/PEG procedure." Yeast **11**(4): 355-60.
- Gingras, A. C., Raught, B. Sonenberg, N. (1999).  
 "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." Annu Rev Biochem **68**: 913-63.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., Brent, R. (1993).  
 "Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2." Cell **75**(4): 791-803.
- Hamad, A. M. und Knox, A. J. (2001). "Mechanisms mediating the antiproliferative effects of nitric oxide in cultured human airway smooth muscle cells." FEBS Lett **506**(2): 91-6.
- Haug, L. S., Jensen, V., Jensen, V., Hvalby, O., Walaas, S. I., Ostvold, A. C.(1999).  
 "Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ." J Biol Chem **274**(11): 7467-73.
- Hofker, M. H., Smith, S., Nakamura, Y., Teshima, I., White, R., Cox, D. W. (1990).  
 "Physical mapping of probes within 14q32, a subtelomeric region showing a high recombination frequency." Genomics **6**(1): 33-8.
- Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W., Ruth, P. (1992).  
 "Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase." Biochim Biophys Acta **1135**(1): 51-60.
- Huber, A., Neuhuber, W. L., Klugbauer, N., Ruth, P., Allescher, H. D. (2000).  
 "Cysteine-rich protein 2, a novel substrate for cGMP kinase I in enteric neurons and intestinal smooth muscle." J Biol Chem **275**(8): 5504-11.
- Huber, A., Trudrung, P.; Storr, M., Franck, H., Schusdziarra, V., Ruth, P., Allescher, H. D. (1998).  
 "Protein kinase G expression in the small intestine and functional importance for smooth muscle relaxation." Am J Physiol **275**(4 Pt 1): G629-37.
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., Wood, K. S. (1987).  
 "Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical." Circ Res **61**(6): 866-79.
- Jain, M. K., Fujita, K. P., Hsieh, C. M., Endege, W. O., Sibinga, N. E., Yet, S. F., Kashiki, S., Lee, W. S., Perrella, M. A., Haber, E., Lee, M. E.(1996).  
 "Molecular cloning and characterization of SmLIM, a developmentally regulated LIM protein preferentially expressed in aortic smooth muscle cells." J Biol Chem **271**(17): 10194-9.
- Joyce, N. C., DeCamilli, P.; Lohmann, S. M.; Walter, U. (1986).  
 "cGMP-dependent protein kinase is present in high concentrations in contractile cells of the kidney vasculature." J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res **11**(3): 191-8.
- Karim, M. A., Ohta, K., Egashira, M., Jinno, Y., Niikawa, N., Matsuda, I., Indo, Y. (1996).

- “Human ESP1/CRP2, a member of the LIM domain protein family: characterization of the cDNA and assignment of the gene locus to chromosome 14q32.3.” Genomics **31**(2): 167-76.
- Katsuki, Arnold, W., Mittal, C., Murad, F. (1977).  
 “Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine.” J Cyclic Nucleotide Res **3**(1): 23-35.
- Keilbach, A., Ruth, P., Hofmann, F. (1992).  
 “Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies.” Eur J Biochem **208**(2): 467-73.
- Kleppisch, T., Pfeifer, A., Klatt, P., Ruth, P., Montkowski, A., Fassler, R., Hofmann, F. (1999).  
 “Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase.” J Neurosci **19**(1): 48-55.
- Komalavilas, P. und Lincoln, T. M. (1996).  
 “Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta.” J Biol Chem **271**(36): 21933-8.
- Komatsu, S., Miyazaki, K., Tuft, R. A., Ikebe, M. (2002).  
 “Translocation of telokin by cGMP signaling in smooth muscle cells.” Am J Physiol Cell Physiol **283**(3): C752-61.
- Laemmli, U. K. (1970).  
 “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.” Nature **227**(259): 680-5.
- Lewin, B. (2000).  
 Initiation of Transcription. Genes. B. Lewin. New York, Oxford University Press Inc.: 641.
- Li, Q., Imataka, H., Morino, S., Rogers, G. W., Jr., Richter-Cook, N. J., Merrick, W. C., Sonenberg, N. (1999).  
 “Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII.” Mol Cell Biol **19**(11): 7336-46.
- Lincoln, T. M., Dey, N. B., Boerth, N. J., Cornwell, T. L., Soff, G. A. (1998).  
 “Nitric oxide--cyclic GMP pathway regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation: implications in vascular diseases.” Acta Physiol Scand **164**(4): 507-15.
- Lincoln, T. M., Pryzwansky, K. B., Cornwell, T. L., Wyatt, T. A., MacMillan, L. A. (1993).  
 “Cyclic-GMP-dependent protein kinase in smooth muscle and neutrophils.” Adv Second Messenger Phosphoprotein Res **28**: 121-32.
- Lloyd-Jones, D. M. und Bloch, K. D. (1996).  
 “The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis.” Annu Rev Med **47**: 365-75.
- Lohmann, S. M., Walter, U., Miller, P. E., Greengard, P., De Camilli, P. (1981).  
 “Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain.” Proc Natl Acad Sci U S A **78**(1): 653-7.
- Loscalzo, J. und Welch, G. (1995).  
 “Nitric oxide and its role in the cardiovascular system.” Prog Cardiovasc Dis **38**(2): 87-104.

- Louis, H. A., Pino, J. D., Schmeichel, K. L., Pomies, P., Beckerle, M. C. (1997). "Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression." J Biol Chem **272**(43): 27484-91.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin Phenol reagent." J Biol Chem **193**: 265-75.
- Mancini, L., Moradi-Bidhendi, et al. (2000). "The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent." Biochem Biophys Res Commun **274**(2): 477-81.
- Markert, T., Vaandrager, A. B., Gambaryan, S., Pohler, D., Hausler, C., Walter, U., De Jonge, H. R., Jarchau, T., Lohmann, S. M. (1995). "Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." J Clin Invest **96**(2): 822-30.
- McLaughlin, C. R., Tao, Q., Abood, M. E. (1994). "Isolation and developmental expression of a rat cDNA encoding a cysteine-rich zinc finger protein." Nucleic Acids Res **22**(24): 5477-83.
- Mancini, L., Moradi-Bidhendi, N., Becherini, L., Martinetti, V., MacIntyre, I. (2000). "The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent." Biochem Biophys Res Commun **274**(2): 477-81.
- Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Pestova, T. V., Sonenberg, N. (2000). "Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap- dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region." Mol Cell Biol **20**(2): 468-77.
- Nielsen, P. J., McMaster, G. K., Trachsel, H. (1985). "Cloning of eukaryotic protein synthesis initiation factor genes: isolation and characterization of cDNA clones encoding factor eIF-4A." Nucleic Acids Res **13**(19): 6867-80.
- Nielsen, P. J. und Trachsel, H. (1988). "The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed." Embo J **7**(7): 2097-105.
- Okano, I., Yamamoto, T., Kaji, A., Kimura, T., Mizuno, K., Nakamura, T. (1993). "Cloning of CRP2, a novel member of the cysteine-rich protein family with two repeats of an unusual LIM/double zinc-finger motif." FEBS Lett **333**(1-2): 51-5.
- Pandey, K. N., Nguyen, H. T., Li, M., Boyle, J. W. (2000). "Natriuretic peptide receptor-A negatively regulates mitogen-activated protein kinase and proliferation of mesangial cells: role of cGMP- dependent protein kinase." Biochem Biophys Res Commun **271**(2): 374-9.
- Peiper, U. (1996). Muskulatur. Lehrbuch der Physiologie. R. Klinke and S. Silbernagel. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 86-87.
- Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F., Fassler, R. (1996). "Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP- dependent protein kinase II." Science **274**(5295): 2082-6.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P., Hofmann, F. (1999). "Structure and function of cGMP-dependent protein kinases." Rev Physiol Biochem Pharmacol **135**: 105-49.
- Pitari, G. M., Di Guglielmo, M. D., Park, J., Schulz, S., Waldman, S. A. (2001). "Guanylyl cyclase C agonists regulate progression through the cell cycle of human colon carcinoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7846-51.

- Polymenis, M. und E. V. Schmidt (1997).  
 "Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast." Genes Dev **11**(19): 2522-31.
- Pryzwansky, K. B., Kidao, S., Wyatt, T. A., Reed, W., Lincoln, T. M. (1995).  
 "Localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in human mononuclear phagocytes." J Leukoc Biol **57**(4): 670-8.
- Qian, Y., Chao, D. S., Santillano, D. R., Cornwell, T. L., Nairn, A. C., Greengard, P., Lincoln, T. M., Bredt, D. S (1996).  
 "cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons." J Neurosci **16**(10): 3130-8.
- Ruth, P., Pfeifer, A., Kamm, S., Klatt, P., Dostmann, W. R., Hofmann, F. (1997).  
 "Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase Ialpha." J Biol Chem **272**(16): 10522-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989).  
Molecular cloning. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977).  
 "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S. M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P., Loirand, G. (2000).  
 "Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle." J Biol Chem **275**(28): 21722-9.
- Schagger, H. und von Jagow, G. (1987).  
 "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-79.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., Ruth, P. (2000).  
 "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta." Nature **404**(6774): 197-201.
- Schmeichel, K. L. und Beckerle, M. C. (1994).  
 "The LIM domain is a modular protein-binding interface." Cell **79**(2): 211-9.
- Sherr, C. J. (1996).  
 "Cancer cell cycles." Science **274**(5293): 1672-7.
- Shuda, M., Kondoh, N., Tanaka, K., Ryo, A., Wakatsuki, T., Hada, A., Goseki, N., Igari, T., Hatsuse, K., Aihara, T., Horiuchi, S., Shichita, M., Yamamoto, N., Yamamoto, M. (2000).  
 "Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma." Anticancer Res **20**(4): 2489-94.
- Soh, J. W., Mao, Y., Kim, M. G., Pamukcu, R., Li, H., Piazza, G. A., Thompson, W. J., Weinstein, I. B. (2000).  
 "Cyclic GMP mediates apoptosis induced by sulindac derivatives via activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1." Clin Cancer Res **6**(10): 4136-41.
- Somlyo, A. P., Wu, X., Walker, L. A., Somlyo, A. V. (1999).  
 "Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases." Rev Physiol Biochem Pharmacol **134**: 201-34.
- Sonnenburg, W. K. und Beavo, J. A. (1994).  
 "Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis." Adv Pharmacol **26**: 87-114.

- Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M.; Lincoln, T. M., Mendelsohn, M. E. (1999).  
 "Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I $\alpha$ ." Science **286**(5444): 1583-7.
- Thompson, W. J., Piazza, G. A., Li, H., Liu, L., Fetter, J., Zhu, B., Sperl, G., Ahnen, D., Pamukcu, R. (2000).  
 "Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin." Cancer Res **60**(13): 3338-42.
- Tsui, S. K., Chan, P. P., Cheuk, C. W., Liew, C. C., Waye, M. M., Fung, K. P., Lee, C. Y. (1996).  
 "A novel cDNA encoding for a LIM domain protein located at human chromosome 14q32 as a candidate for leukemic translocation." Biochem Mol Biol Int **39**(4): 747-54.
- Vaandrager, A. B. und de Jonge, H. R. (1996).  
 "Signalling by cGMP-dependent protein kinases." Mol Cell Biochem **157**(1-2): 23-30.
- Waldmann, R., Bauer, S., Gobel, C., Hofmann, F., Jakobs, K. H., Walter, U. (1986).  
 "Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets." Eur J Biochem **158**(1): 203-10.
- Weiskirchen, R. und Bister, K. (1993).  
 "Suppression in transformed avian fibroblasts of a gene (crp) encoding a cysteine-rich protein containing LIM domains." Oncogene **8**(9): 2317-24.
- Weiskirchen, R., Pino, J. D., Macalma, T., Bister, K., Beckerle, M. C. (1995).  
 "The cysteine-rich protein family of highly related LIM domain proteins." J Biol Chem **270**(48): 28946-54.
- Wernet, W., Flockerzi, V., Hofmann, F. (1989).  
 "The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase." FEBS Lett **251**(1-2): 191-6.
- Williams-Hill, D. M., Duncan, R. F., Nielsen, P. J., Tahara, S. M. (1997).  
 "Differential expression of the murine eukaryotic translation initiation factor isogenes eIF4A(I) and eIF4A(II) is dependent upon cellular growth status." Arch Biochem Biophys **338**(1): 111-20.
- Wu, X., Haystead, T. A., Nakamoto, R. K., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P. (1998).  
 "Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase." J Biol Chem **273**(18): 11362-9.
- Yoder-Hill, J., Pause, A., Sonenberg, N., Merrick, W. C. (1993).  
 "The p46 subunit of eukaryotic initiation factor (eIF)-4F exchanges with eIF-4A." J Biol Chem **268**(8): 5566-73.
- Yu, S. M., Hung, L. M., Lin, C. C. (1997).  
 "cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway." Circulation **95**(5): 1269-77.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Peter Ruth danke ich ganz herzlich für die Betreuung und die Finanzierung der Arbeit, das große Engagement auch nach seinem Ruf nach Tübingen und den steten Glauben an einen positiven Ausgang der Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann, der die Durchführung der Arbeit in seinem Institut ermöglichte und durch sein Interesse und kritische Anmerkungen zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Hanns-Dieter Allescher bedanke ich mich für die Mitfinanzierung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Andrea Huber, die mir während der praktischen Zeit der Arbeit tagtäglich mit Rat und Tat zur Seite stand, die cDNA Bibliothek zur Verfügung stellte und auch nach ihrem Ausscheiden aus der Arbeitsgruppe ein stets offenes Ohr hatte.

Frau Simone Kamm bin ich für die aufmunternden Worte und ihre Expertise bei methodisch anspruchsvollen Versuchen zu großem Dank verpflichtet.

Frau Angela Koller danke ich besonders für ihr Proteinelektrophorese „Know-How“, nützliche Diskussionsbeiträge, die cGKI Vektorkonstrukte und die Hilfe bei der Bewältigung der zahlreichen Hefeklone.

Bei Frau Dr.rer.nat. Claudia Arntz möchte ich mich für die moralische Unterstützung, die Hilfe beim ausplattieren der Hefeklone und die Apfelzimt-Muffins bedanken.

Meinen Eltern gilt mein Dank für ihre finanzielle und moralische Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle nicht erwähnten Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für ihre Kollegialität und das angenehme Arbeitsklima.

