Universitätskinderklinik Ulm
Sektion Molekularbiologie, Abteilung Kinderheilkunde II
Leiter: Prof. Dr. med. C.R. Bartram

Identifikation intrazellulärer Interaktionspartner der Rezeptortyrosinkinasen UFO und MET im Two-Hybrid-System

Dissertation

zur Erlangung
des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt
von
Jörg Benzing

aus
Berlin

2000

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. G. Gierschik
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. C. R. Bartram
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. Kubanek
Tag der Promotion:	18. Mai 2001

meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1. Einleitung

1.1. Tumorgene - Entstehung von Krebs auf molekularer Ebene 7
1.2. Signaltransduktion durch Rezeptortyrosinkinasen 9
1.3. Der Tyrosinkinaserezeptor UFO 11
1.4. Der Tyrosinkinaserezeptor MET 14
1.5. Das Two-Hybrid-System 15
1.6. Ziele dieser Arbeit 17

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborgerät 18
2.1.2. Computerprogramme 19
2.1.3. Einmalartikel 19
2.1.4. Molekularbiologische Materialien 19
2.1.5. Puffer und Lösungen 24
2.1.6. Chemikalien 25

2.2. Klonierungstechniken

2.2.1. Polymerase - Kettenreaktion (PCR) 26
2.2.2. Wahl geeigneter PCR - Primer 28
2.2.3. Aufreinigung von Oligonukleotiden 28
2.2.4. Restriktionsanalysen 29
2.2.5. Dephosphorylierung von Vektoren 30
2.2.6. DNA - Ligation 31
2.2.7. Transformation von Bakterien 32
2.2.8. Kolonie - Screening / Hybridisierungsverfahren 34
2.2.9. DNA – Plasmidpräparation 36
2.2.10. Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes 38
2.2.11. Agarosegel – Auftrennung von DNA 38
2.2.12. DNA – Extraktion aus Agarosegel 40
2.2.13. DNA – Präzipitation 40
2.2.14. Orientierungskontrolle von Plasmid - Inserts 41
2.2.15. DNA – Sequenzanalysen 41
2.2.16. Einfrieren von Bakterienkulturen 42

2.3. Methoden im Two-Hybrid-System

2.3.1. Herstellung „kompetenter“ Hefezellen 43
2.3.2. Vorbereitung geeigneter Carrier - DNA 44
2.3.3. Transformation von Hefezellen 44
2.3.4. Qualitative Bestimmung der Galaktosidase - Aktivität 46
2.3.5. Screening von cDNA - Bibliotheken 47
2.3.6. Isolierung von Plasmid - DNA aus Hefen 50
2.3.7. Herstellung elektrokompetenter Bakterien 50
2.3.8. Elektroporation 51
2.3.9. Einfrieren von Hefezellen 52

2.4. Proteinmethoden

2.4.1. Proteinextraktion aus Hefen 52
2.4.2. Westernblot Analysen 53

© Benzing J, 2000

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung des Two-Hybrid-Systems für UFO und MET

3.1.1. Plasmide der DNA – bindenden Domäne (GAL4) 57
3.1.2. Plasmide der Transkription – aktivierenden Domäne (GAL4) 58
3.1.3. Antikörpernachweis der DNA-bindenden Domänen der Rezeptorkonstrukte 60
3.1.4. (Auto) Phosphorylierung der Rezeptorkonstrukte 61
3.1.5. Einfluss von Kolbenform und –größe auf das Hefewachstum 62
3.1.6. *ade2* – Mutanten bei Adeninmangel 63
3.1.7. Potentielle hefespezifische Toxizität der Rezeptorkonstrukte 64
3.1.8. Optimales molekulares Gewicht von *salm sperm carrier* DNA 65
3.1.9 Kotransformationen der UFO - Konstrukte mit PLCγ, P85α und GRB2 66
3.1.10. Qualitative β-Galaktosidaseaktivität der Rezeptorkonstrukte 68

3.2. Screening von cDNA-Bibliotheken

3.2.1. Titration der Effizienz von cDNA-Bibliotheken 69
3.2.2. Einfluss von Dimethylsulfoxid auf die Transformationseffizienz prätransformierter Hefezellen mit bzw. ohne Selektionsdruck 71
3.2.3. Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bibliothek *human fetal liver* mit den Rezeptorkonstrukten UFO3' und TPR-UFO 73
3.2.4. Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bibliothek *rat embryo* mit dem Rezeptorkonstrukt TPR-UFO 73
3.2.5. Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bibliothek *thymus* mit dem Rezeptorkonstrukt TPR-UFO 76
3.2.6. Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bibliothek *rat embryo* mit dem Rezeptorkonstrukt TPR-MET 77

4. Diskussion 86

4.1. Identifikation intrazellulärer Bindungspartner von Rezeptortyrosinkinasen im Two-Hybrid-System 87

4.2. Bedeutung intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität für die Bindungsaffinität zu interagierenden Proteinen 88

4.3. Transformationseffizienz als entscheidendes Kriterium für die erfolgreiche Anwendung des Two-Hybrid-Systems 92

4.4. Identifikation und Ausschluss falsch positiver und *falsch negativer Interaktionen im Two-Hybrid-System* 94

4.5. Identifikation intrazellulärer Substrate der *Rezeptortyrosinkinase UFO im Two-Hybrid-System* 97

4.6. Nachweis intrazellulärer Substrate der *Rezeptortyrosinkinase MET im Two-Hybrid-System* 99

5. Zusammenfassung 105

6. Literatur 107

7. Danksagung 122

8. Erklärung 123

© Benzing J, 2000

9. Curriculum Vitae **124**

© Benzing J, 2000

Abkürzungen

A	Adenin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
3-AT	3-Aminotriazol
BICD	Bicaudal D
BSA	Bovines Serumalbumin
Bq	Bequerel
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
Ci	Curie (1Ci = 3,70 10^{10} Bq)
cDNA	kodierende DNA
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CORT	cloning of receptor targets
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphospat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphospat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphospat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuclein Säure
dNTP	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DOB	Dropout Broth
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphospat
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanidin
g	Erdbeschleunigung (= 9,81ms^2)
GAL4	Galaktosidase – Promoter
GAS6	growth arrest specific gene 6
GRB2	growth factor receptor binding protein 2
IPTG	Isopropylthio-β-Galaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	KiloDalton
LB – Medium	Luria Bertani Medium
LB1	human laminin B1
µ	mikro (= 10^{-6})
m	milli (= 10^{-3})
M	Mol
met	HGF = hepatocyte growth factor
min	Minute(n)
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin
n	nano (= 10^{-9})
OD	Optische Dichte
ONPG	o – nitrophenylgalaktosid
p	piko (= 10^{-12})

© Benzing J, 2000

PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PAGE	Polyacrylamid – Gel – Elektrophorese
pAS2	GAL4 binding domain / advanced selection
PBS/T	phosphate buffered saline / Tween
PEG	Polyethylenglycol
pGAD424	GAL4 activating domain
pGBT9	GAL4 binding domain / target
PLCγ	Phospholipase Cγ
PTB	phospho-tyrosine binding domain
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde(n)
SDS	Sodium – Dodecyl – Sulfat
SH2	src-homolgy 2
SNX2	sorting nexin 2
SSC	*salm sperm carrier*
T	Thymidin
taq	thermophilus aquarius (DNA - Polymerase)
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylamin
Tid56	tumorous imaginal disc protein 56
tpr	translocated promoter region
U	Einheit(n)
UAS	upstream activation sequence
ufo	unknown function of an oncogene
w/v	Wasseranteil am Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid
ZIP	zeta interacting protein

Bei einigen Begriffen wie z.B. Blot wurden in der vorliegenden Arbeit die englischen Fachtermini verwendet, da auch in der deutschsprachigen Literatur eine Übersetzung unüblich ist.

© Benzing J, 2000

1. Einleitung

1.1. Krebsgene – Entstehung von Krebs auf molekularer Ebene

Nahezu jedes Gewebe des Körpers kann maligne entarten. Die Weichen für eine solche Transformation werden bereits auf molekularer Ebene einer Einzelzelle gestellt. Mutationen der Erbinformation können das zelluläre Gleichgewicht empfindlich stören, wenn Menge oder Aktivität des kodierten Proteins modifiziert werden und sich Klone der mutierten Ursprungszelle ihrer physiologischen Wachstumskontrolle entziehen (BISHOP 1987).

Bei der jeweils zugrunde liegenden genetischen Veränderung kann es sich um Punktmutationen, Deletionen, Insertionen, Amplifikationen oder aber Translokationen genetischer Information handeln. So findet sich etwa bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) das sogenannte Philadelphia - Chromosom, eine reziproke Translokation von Chromosom 9 und Chromosom 22 (NOWELL & HUNGERFORD 1960; ROWLEY 1973), die zur Fusion der beiden Gene *bcr* und *abl* führt – eine genetische Läsion, die ursächlich mit der CML - Entstehung verbunden ist (BARTRAM 1995).

Der Ursprung von Krebs ist wesentlich auf Defekte in sogenannten Tumorgenen zurückzuführen. Diese Gene steuern normalerweise die Zellproliferation, die Gewebe - differenzierung, sowie den programmierten Zelltod (= Apoptose). Man unterscheidet zwei Klassen von Tumorgenen, die jeweils die Regulation solcher zellulärer Prozesse positiv oder negativ beeinflussen können: Onkogene und Tumorsuppressorgene.

Zur pathologischen Aktivierung von **Onkogenen** führt die Mutation nur eines einzigen Allels. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von dominanter Mutation mit Funktionsgewinn (= *gain of function*) - im Gegensatz zu vollständigem Funktionsverlust (= *loss of function*) der rezessiven Tumorsuppressorgene bei Mutation beider Allele.

Exemplarisch für die Onkogene sei die *ras*-Familie genannt. Drei homologe *ras*-Gene werden unterschieden: H-*ras*, K-*ras* und N-*ras*. Sie alle kodieren für sogenannte G-Proteine, die an der Zelloberfläche ankommende Signale in das Zellinnere weiterleiten. Spezifische Punktmutationen von *ras* führen zu dessen konstitutiver Aktivierung (BOLLAG *et al.* 1991). Mutierte RAS – Proteine lassen sich in einer Reihe von Tumoren, etwa des Kolons, der

© Benzing J, 2000

Lunge, der Brust oder der Blase nachweisen. Dies prädestiniert RAS – Proteine als mögliche Ziele neuer onkotherapeutischer Strategien.
Wildtypversionen von Onkogenen bezeichnet man als Proto – Onkogene. Hierzu zählen neben RAS auch bestimmte Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF = *platelet derived growth factor*), Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (z.B. MET, RET, SEA), Signalproteine (z.B. SRC, RAF, ABL, LCK) und Transkriptionsfaktoren wie z.B. ERB, FOS oder MYC (STASS & MIXSON 1997).

Auch Inaktivierung und der damit verbundene Funktionsverlust (= *loss of function*) der **Tumorsuppressorgene** kann Tumorentstehung begünstigen.
Der wohl bekannteste Vertreter der Tumorsuppressorgene ist *p53*, funktionell ein Transkriptionsfaktor, der DNA - Reparatur bzw. Apoptose (PAN *et al.* 1997) reguliert und dadurch wesentlich zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beiträgt (LEVINE *et al.* 1994; HINDS & WEINBERG 1994; AGARWAL *et al.* 1998).
Sporadische *p53* – Mutationen finden sich bei einer Vielzahl (nahezu 50%) humaner Tumoren (unter anderem von Leber, Darm, Brust, Lunge und Gehirn). Liegt hingegen eine erbliche Tumordisposition vor, so sind hier grundsätzlich alle Zellen des Körpers von der *p53* – Mutation betroffen, die Tumore manifestieren sich früher und grundsätzlich in mehreren Gewebearten. Heterozygote Träger einer *p53* -Keimbahnmutation entwickeln ein Li-Fraumeni Syndrom (MALKIN 1994), das mit einer Vielzahl unterschiedlicher Malignome assoziiert ist (SAWAN *et al.* 1992; CALLAHAN 1992; KAHLENBERG *et al.* 1996; JINZA *et al.* 1998; REINCKE 1998; CARUSO *et al.* 1999; DELAHUNT *et al.* 1999).
Als Prototyp vererbbarer Tumorerkrankungen gilt das Retinoblastom, ein kindlicher Augentumor, dem eine Deletion bzw. Mutation im Tumorsuppressorgen *rb* zugrunde liegt. Bei Funktionsverlust beider *rb1*-Allele entwickelt sich das Retinoblastom. Die Prädisposition der Anlageträger von *rb1*-Keimbahnmutationen ist jedoch auch für andere Tumoren, wie etwa für das Osteosarkom, deutlich erhöht. (LALANDE M. *et al.*, 1984; FRIEND *et al.* 1986 ; WEINBERG 1990).
Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen treten überwiegend sporadisch auf. Nur bei etwa 10 % aller Tumore findet sich eine entsprechende Keimbahnmutation im Sinne einer erblichen Tumordisposition. Erst jedoch die Akkumulation von mutierten und deregulierten Genen kann von der Zelle nicht mehr kompensiert werden, führt zunächst zur Bildung eines tumorigenen Zellklons und schließlich in mehreren, aufeinander

© Benzing J, 2000

folgenden Schritten zur Tumorentwicklung (KNUDSON 1971; CAVANEE *et al.* 1983; WEINBERG 1995).

1.2. Signaltransduktion durch Rezeptortyrosinkinasen

Zelluläre Signaltransduktion kann an der Zelloberfläche, an einem entsprechenden Rezeptor beginnen. Durch Bindung eines Liganden (z.B. eines Wachstumsfaktors) kommt es, nach Dimerisierung des Rezeptors, zu dessen Aktivierung durch Autophosphorylierung von Tyrosinresten (LEMMON & SCHLESSINGER 1994). In Folge können intrazelluläre Rezeptoranteile mit spezifischen zytoplasmatischen Proteinen interagieren – Schritt für Schritt wird so eine Signalkaskade von der Zellmembran bis hin zum Nukleus in Gang gesetzt. An jedem Punkt dieser Informationskette kann prinzipiell der Ursprung für die Entstehung eines Tumors liegen – sei es durch unterbrochene oder aber durch aberrante Aktivierung.

Viele der klassischen Wachstumsfaktoren binden an Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität: so etwa PDGF (= *platelet-derived growth factor*), EGF (= *epidermal growth factor*) und FGF (= *fibroblast growth factor*). Rezeptortyrosinkinasen spielen eine zentrale Rolle in Signaltransduktionsprozessen und bilden eine wichtige Untergruppe der Onkogene (HANKS *et al.* 1988).

Exemplarisch sei hier die Rezeptortyrosinkinase RET genannt, die in ursächlichem Zusammenhang steht mit der multiplen endokrinen Neoplasie (= MEN) Typ 2A und 2B, mit dem medullären Schilddrüsenkarzinom und dem Morbus Hirschsprung (PASINI *et al.* 1996; CHAKRAVARTI 1996; ENG & MULLIGAN 1997). Ein weiteres Onkogen, der Tyrosinkinaserezeptor MET, wird später detailliert beschrieben (siehe Abschnitt 1.4.).

Die Struktur dieser Rezeptoren besteht generell aus einem Ligand - bindenden, einem transmembranen und einem zytoplasmatischen Anteil. Als katalytische Domäne fungiert eine intrazellulär gelegene Tyrosinkinase. Die extrazellulären Rezeptoranteile bestehen aus einer oder mehreren typischen Domänen, wie Immunglobulin-*like*-, Fibronektin Typ III-*like*-, EGF-*like*-, Cystin-reiche oder aus anderen Domänen (FANTL *et al.*, 1993). Eine Übersicht über den Aufbau einiger Rezeptortyrosinkinasen gibt die folgende Grafik:

© Benzing J, 2000

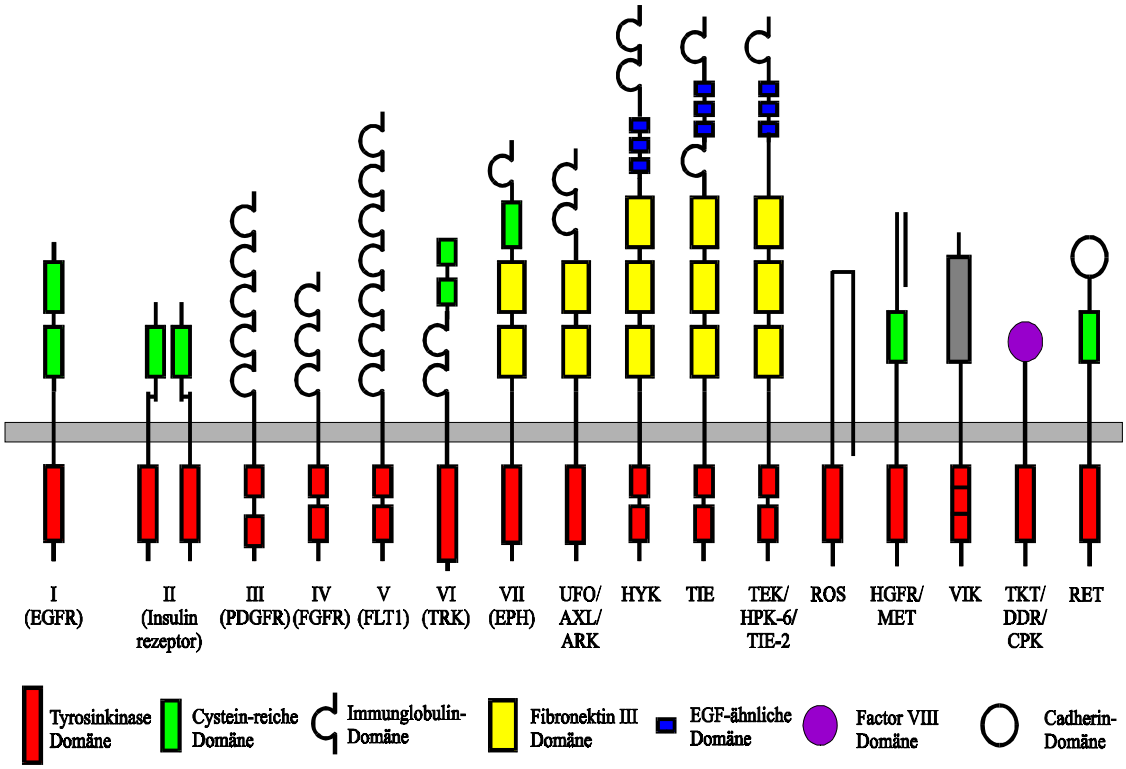


Abbildung 1: Struktur von Rezeptortyrosinkinasen (nach HELDIN 1995)

Die Aktivierung eines Tyrosinkinaserezeptors erfolgt meist durch Autophosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der Kinaseregion. Diese phosphorylierten Tyrosinreste fungieren als Bindungsplätze für SH2- Domänen von Signalmolekülen (HELDIN 1995; STASS & MIXSON 1997). Die etwa 100 Aminosäuren der SH2-Domänen (= ***s****rc-****h****omolgy **2***) sind wiederum strukturell dergestalt gefaltet, dass sie einen regelrechten Bindungssockel für phosphorylierte Tyrosinreste formen (PAWSON & SCHLESSINGER 1993). Die spezifische Erkennungssequenz für SH2-Domänen liegt hierbei C-terminal der phosphorylierten Tyrosinreste, während sich die Erkennungssequenz der PTB-Domänen (= ***p****hospho-****t****yrosine ****b****inding*) N-terminal davon befindet (KAVANAUGH & WILLIAMS 1994).

Zu den typischerweise von Rezeptortyrosinkinasen aktivierten Signalmolekülen gehören Phospholipase Cγ, Phosphatidylinositol 3-Kinase, GTPase - aktivierendes Protein, p21 RAS, RAF-1 Kinase, , PP60 $^{c\text{-}src}$ sowie die beiden MAP - Kinasen ERK-1 und ERK-2 (FANTL *et al.* 1993).

© Benzing J, 2000

1.3. Der Tyrosinkinaserezeptor UFO

Mit Hilfe des Tumorigenizitätsassays (BROWN *et al.* 1984; JANSSEN *et al.* 1999), konnte unsere Arbeitsgruppe aus Knochenmarkszellen eines Patienten mit myeloproliferativer Erkrankung die Rezeptortyrosinkinase UFO (= *unknown function of an oncogene*) als neues Onkogen isolieren (JANSSEN *et al.* 1991). Im gleichen Zeitraum gelang einem anderen Team mit derselben Methode die Identifikation des *axl* - Gens aus der DNA eines an chronisch myeloischer Leukämie (CML) erkrankten Patienten (O'BRYAN *et al.* 1991). Bei UFO und AXL handelt es sich um ein und dasselbe Onkogen.

UFO repräsentiert eine neue Familie von Rezeptortyrosinkinasen (RTK), charakterisiert durch seine besondere extrazelluläre Struktur (siehe Abbildung 2). Hier finden sich jeweils zwei Immunglobulin- und zwei Fibronektin Typ III - Domänen, wie dies typischerweise bei neuralen Zelladhäsionsmolekülen der Fall ist (WILLIAMS & BARCLAY 1988). Zwei weitere Vertreter dieser Klasse von RTK's sind ARK (RESCIGNO *et al.* 1991) und TYRO7 (LAI & LEMKE 1991). Für in *Drosophila* exprimiertes ARK – Protein konnte gezeigt werden, dass mehrere Rezeptoren dieses Typs in der Lage sind, homophil zu interagieren und diese Aggregation wiederum Grundlage ist für Aktivierung, d.h. Phosphorylierung des Rezeptors (BELLOSTA *et al.* 1995). Allerdings konnten NAGATA *et al.* (1996) dieses Phänomen in ihren Versuchen für UFO nicht nachweisen.

Das humane *ufo* – Gen (44 kb) ist aus insgesamt 20 Exons aufgebaut, wobei Exon 10 (27bp) offensichtlich alternativ gespleißt wird (SCHULZ *et al.* 1993). Die *ufo* – mRNA (3,2 kb bzw. 4,7 kb) wird in ein 894 AS – Protein translatiert, entsprechend einem Molekulargewicht von 140 kDa. Nach Translation können unter Umständen auch die extrazellulären Rezeptoranteile von UFO mittels Proteolyse abgespalten werden (O'BRYAN *et al.* 1991) – es entstehen in Folge UFO ^{p80} und UFO ^{p55} – Bruchstücke, die womöglich ihrerseits eine Rezeptoraktivierung initiieren.

Der UFO – Tyrosinkinaserezeptor wird in einer Vielzahl von Geweben (v.a. Mesoderm) bzw. Zellinien exprimiert (JANSSEN *et al.* 1991; O' BRYAN *et al.* 1991): starke Expression findet sich auch in normalem Knochenmark (allerdings nicht in peripheren Blutzellen) und in myeloischen, erythrozytären und megakaryozytären Leukämiezellen (FAUST *et al.* 1992; NEUBAUER *et al.* 1994). Stimulation und Aktivierung des UFO -Rezeptors führte in einer myeloischen Zellinie (32D-Zellen) zu maligner Transformation dieser Zellen (MC CLOSKEY *et al.* 1994).

© Benzing J, 2000

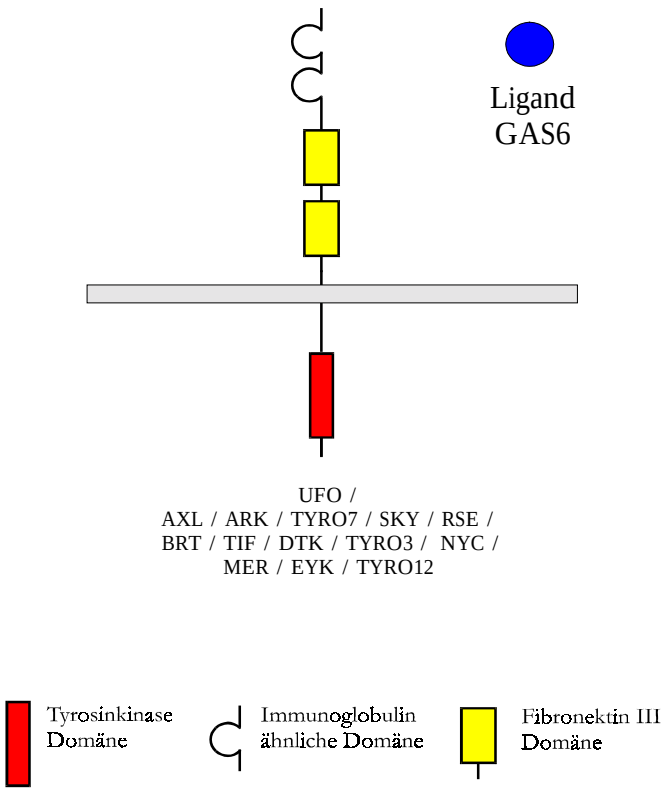


Abbildung 2: Struktur der Rezeptortyrosinkinase UFO

Dies legt nahe, dass UFO bei der Myelopoese eine entscheidende Rolle spielen könnte (CHALLIER *et al.* 1996). Darüber hinaus konnte erhöhte UFO – Expression in metastasierenden Zellen des Kolonkarzinoms (CRAVEN *et al.* 1995), sowie in murinen Stromazellen des Thymus nachgewiesen werden (RINKE DE WITT *et al.* 1996).

Mit Hilfe der CORT - Methode (= ***c****loning* ***o****f* ***r****eceptor* ***t****argets*) nach SKOLNIK *et al.* (1991) wurden von unserer Arbeitsgruppe verschiedene Expressionsbibliotheken nach möglichen intrazellulären Bindungspartnern für UFO durchmustert. Hierbei konnte Phospholipase Cγ (= PLCγ), sowie P85α und P85β - die beiden Untereinheiten der Phosphatidylinositol 3-Kinase - als potentielle Substrate identifiziert werden. Durch Koimmunpräzipitation und Westernblotanalysen ließen sich *in vitro* darüber hinaus GRB2, SRC und LCK als weitere Interaktionspartner ermitteln. In diesem Zusammenhang fiel auf, dass UFO an seinem C-terminalen Ende (Tyr 821-Position) eine multifunktionelle Bindungsstelle für alle oben erwähnten Substrate besitzt (BRAUNGER *et al.* 1997). Weitere Bindungsstellen befinden sich an den Positionen Tyr779 und Tyr866.

© Benzing J, 2000

Noch während der Versuche zur vorliegenden Arbeit konnte sowohl von VARNUM *et al.* (1995), als auch von STITT *et al.* (1995) GAS6 (= ***g****rowth* ***a****rrest* ***s****pecific gene 6*) als Ligand für die Tyrosinkinaserezeptoren der UFO – Familie identifiziert werden: Stimulation mit GAS6 führt zu deren intrinsischer Aktivierung (GORUPPI *et al.* 1997). GAS6 gilt als neuer Vertreter Vitamin K abhängiger Proteine und besitzt sehr große Ähnlichkeit mit Protein S, einem Inhibitor der plasmatischen Blutgerinnung (LUNDWALL *et al.* 1986; MANFIOLETTI *et al.* 1993).

Die Expression von GAS6 konnte sowohl in Zellen normaler als auch in solchen neoplastischer Hämatopoese nachgewiesen werden (AVANZI *et al.* 1997).

Wurde eine UFO exprimierende, myeloische Zellinie (32D) mit GAS6 stimuliert, so konnten MCCLOSKEY *et al.* (1997) die Aggregation dieser Zellen beobachten: Eine wichtige biologische Funktion der GAS6 - UFO Interaktion scheint folglich die Zell-Zell-Bindung zu sein.

Wachstumsstillstand durch Serummangel führt offensichtlich zu deutlich erhöhter GAS6 – Expression (MANFIOLETTI *et al.* 1993). Stimulation von NIH/3T3-Zellen mit GAS6 bewirkt bei Serummangel die Synchronisation des Zellzyklus und in Folge ein Fortschreiten der Proliferation. Hierbei kommt es durch die aktivierte Tyrosinkinase UFO zur wirksamen Hemmung der Apoptose (GORUPPI *et al.* 1996).

Darüber hinaus wird GAS6 in Zellen des Gefäßendothels exprimiert, genauso wie dies für UFO bereits bekannt ist. In diesem Kontext scheint GAS6 eine physiologische, antiinflammatorische Funktion zuzukommen, die jedoch bei Überwiegen von Entzündungsmediatoren (wie Interleukin IL-β oder Tumornekrosefaktor TNF-α) insuffizient wird (AVANZI *et al.* 1998). Andererseits kann durch die GAS6 - Wirkung das pathogene, proliferative Signal an Kalzium mobilisierenden Rezeptoren erheblich verstärkt werden (NAKANO *et al.* 1995). Neuere Veröffentlichungen deuten sogar darauf hin, dass GAS6 die UFO – vermittelte Chemotaxis von primären Gefäßmuskelzellen zu induzieren vermag und damit nicht unwesentlich in die Pathogenese von Arteriosklerose und arterieller Restenose involviert sein dürfte (FRIDELL *et al.* 1998).

© Benzing J, 2000

1.4. Der Tyrosinkinaserezeptor MET

Durch chemische und virale Agenzien war es gelungen, die humane Osteosarkom – Zellinie HOS in einen tumorigenen Phänotyp zu transformieren (RHIM *et al.* 1975). Mit Hilfe des NIH/3T3-Assays konnten COOPER *et al.* (1984) in diesem Zusammenhang die transformierende Sequenz *tpr-met* aus solchen HOS – Zellen isolieren, die vorher mit N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin (= MNNG) behandelt worden waren.

Das humane Proto-Onkogen c-*met* kodiert für den HGF-Rezeptor (= ***h****epatocyte* ***g****rowth* ***f****actor*), ein Zytokin, das invasives Wachstum in epithelialen Zellen triggert. Der MET – Tyrosinkinaserezeptor (siehe Abbildung 3) zeichnet sich – ebenso wie die beiden Rezeptoren RON und SEA – durch eine zytoplasmatische, multifunktionale Bindungsstelle aus, die in der Lage ist, die SH2 – Domänen einer Vielzahl intrazellulärer Signalproteine zu binden (BARDELLI *et al.* 1994).

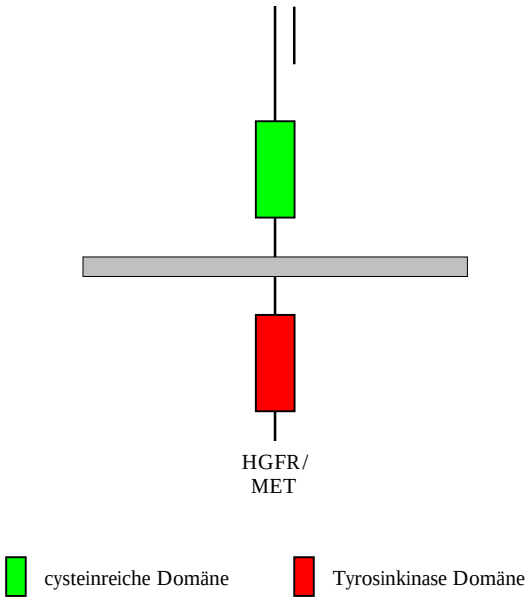


Abbildung 3: Struktur der Rezeptortyrosinkinase HGFR / MET (nach BARDELLI *et al.* 1997)

met ist auf Chromosom 7 lokalisiert. Durch Rearrangement mit *tpr* (***t****ranslocated* ***p****romoter* ***r****egion*) von Chromosom 1 kommt es zur Expression des Fusionsproteins TPR-MET, das nach Dimerisierung die zytoplasmatischen Anteile des MET – Rezeptors zu aktivieren vermag (DEAN *et al.* 1987; PARK *et al.* 1986). Hieraus resultiert das konstitutiv aktivierte Onkogen TPR-MET, dessen tumorigene Wirkung sich bei der Störung von Motilität bzw.

© Benzing J, 2000

Invasion extrazellulärer Matrix zeigen kann, sowie bei der Förderung von zelluläre Transformation und von Metastasierung; gleichzeitig kommt es zur Apoptose durch TPR-MET (RODRIGUES & PARK 1993; BESSER *et al.* 1997; BARDELLI *et al.* 1997).
Dies führte uns einerseits zu der Überlegung, dass man den auf diese Weise konstitutiv aktivierten Tyrosinkinaserezeptor TPR-MET dazu verwenden könnte, um mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems cDNA - Bibliotheken nach potentiellen Interaktionspartnern für MET zu durchsuchen.
Andererseits könnte es - durch Klonierung eines Fusionskonstruktes *tpr-ufo* - womöglich gelingen, die relativ schwache Tyrosinkinase UFO ausreichend zu aktivieren, um so beim Screening von cDNA – Bibliotheken mögliche intrazelluläre Substrate von UFO eher aufspüren zu können.

1.5. Das Two-Hybrid-System

Das Two-Hybrid-System ist eine molekulargenetische Methode, die es ermöglicht *in vivo* die kodierenden Gene für jene Proteine zu identifizieren, die spezifisch mit einem interessierenden Protein interagieren. Sie basiert auf der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae.* (FIELDS & SONG 1989; CHIEN *et al*. 1991; FIELDS 1993).
Methodischer Kern des von uns in der vorliegenden Arbeit verwendeten Two-Hybrid-Systems ist die funktionelle Rekonstitution des eukaryontischen Transkriptionsaktivators GAL4. Dieser besteht aus der DNA-bindenden (SILVER *et al.* 1984) und der Transkription aktivierenden Domäne (KEEGAN *et al.* 1986). Erst jedoch aus der spezifischen Wechselwirkung zweier separater Hybridproteine X und Y (jeweils fusioniert mit der DNA-bindenden bzw. der Transkription aktivierenden Domäne) resultiert die Rekonstitution des GAL4 – Proteins.
Nach Lokalisation des Nukleus (KALDERON *et al.* 1984; NELSON & SILVER 1989) und der räumlichen (non-kovalenten), spezifischen Annäherung des GAL4 – Proteins an die *UAS* (= *upstream activation sequence*) des *gal4* – Gens wird die Transkriptionsmaschinerie in Gang gesetzt (MA & PTASHNE 1988). In Folge dessen kommt es zur Aktivierung des bakteriellen Reportergens *lac*Z. Positive (= interagierende) Transformanten können aufgrund des nunmehr rekonstituierten Reportergens *lacZ* potentiell β-Galaktosidase-Aktivität

© Benzing J, 2000

entwickeln, ein Umstand, der später - in Anwesenheit des künstlichen Substrates X-Gal (= 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid) - auf der Agarplatte deren blauen Farbumschlag bewirkt und ihre Identifikation erheblich vereinfacht.

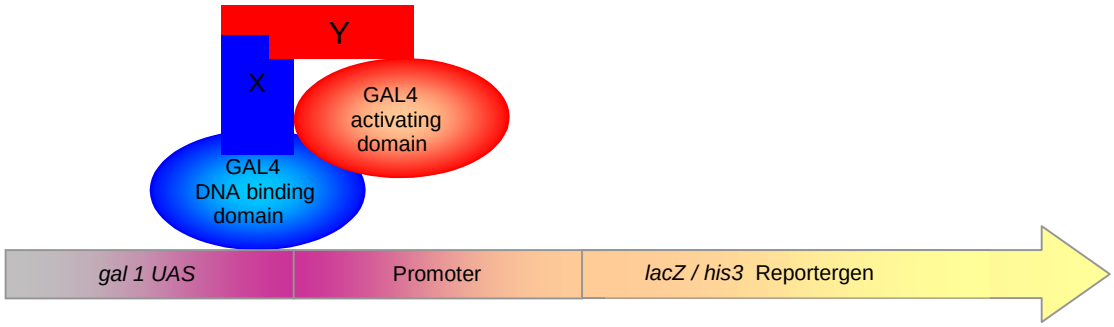


Abbildung 4: Funktionsweise des Two-Hybrid-Systems (nach BARTEL *et al.* 1993)

Mit Hilfe von Markern hefespezifischer Auxotrophie wie *his3*, *leu2* oder *trp* (die Hefezellen wachsen hier in Medium *ohne* Histidin, Leucin bzw. Tryptophan) lassen sich bereits im Vorfeld jene Hefezellen selektiv erfassen, die beide Hybridplasmide aufgenommen haben (*leu*$^-$ und *trp*$^-$ = Wachstum ohne Leucin und Tryptophan) und womöglich auch interagieren (*his*$^-$ = Wachstum ohne Histidin) (DURFEE *et al.* 1993; VOJTEK *et al.* 1993).

Einen ersten Beleg für das Funktionieren des Two-Hybrid-Systems erbrachten FIELDS & SONG (1989): Durch Interaktion der beiden Hefeproteine SNF1 und SNF4 kam es zur Rekonstitution der Transkriptionsaktivität von GAL4. Die Proteinkinase SNF1 war hierfür mit der DNA-bindenden Domäne von *gal4* fusioniert worden, während SNF4, ein mit SNF1 assoziiertes Protein, an die aktivierende Domäne von GAL4 gekoppelt war. Im anschließend durchgeführten Two-Hybrid-Assay konnte keines der beiden Hybridproteine isoliert die Transkription des Reportergens in Gang setzten. Lediglich bei Anwesenheit beider (interagierender) Proteine SNF1 und SNF4 in derselben Hefezelle kam es zu Transkriptionsaktivität.

Diese Erkenntnisse führten uns zu der Überlegung, in diesem neuen System nicht nur zwei bekanntermaßen interagierende Proteine (UFO und seine intrazellulären Substrate) *in vivo* zu untersuchen, sondern ganze cDNA - Bibliotheken systematisch nach potentiellen Interaktionspartnern von UFO und von MET zu durchmustern. Für unsere Arbeitsgruppe

© Benzing J, 2000

war es in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, dass sich speziell das Two-Hybrid-System womöglich zur weiteren Charakterisierung des Tyrosinkinaserezeptors UFO (JANSSEN *et al.* 1991; O' BRYAN *et al.* 1991) eignen könnte, da es bereits mehrfach gelungen war, neue intrazelluläre Interaktionspartner für Rezeptortyrosinkinasen mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems aufzudecken.

So gelang es etwa O'NEILL *et al.* (1994) mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems die zytoplasmatische Interaktion zwischen IRS-1 (=***I****nsulin* ***R****eceptor* ***S****ubstrate 1*) und dem Insulinrezeptor nachzuweisen. CUNNINGHAM *et al.* (1995) identifizierten mit dieser Methode die P85-Untereinheit der PI3-Kinase als potentielles Substrat des Tyrosinkinaserezeptors FLT-1 und KINOSHITA *et al.* (1995) entdeckten mit FRL-1 und FRL-2 sogar zwei neue Liganden des FGF-Rezeptors im Two-Hybrid-System.

1.6. Ziele dieser Arbeit

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, für die beiden Rezeptortyrosinkinasen UFO und MET unter Verwendung des Two-Hybrid-Systems *in vivo* intrazelluläre Interaktionspartner zu identifizieren.

Dazu war zunächst die Frage zu klären, ob sich die bereits beschriebenen Interaktionen zwischen UFO und den Signalproteinen GRB2, P85 und PLCγ auch in diesem System bestätigen ließen. In einem ersten Schritt sollte in entsprechenden Kotransformationen die Methodik des Two-Hybrid-Systems in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden.

In diesem Zusammenhang sollte auch überprüft werden, ob sich die – verglichen mit MET - relativ schwache Tyrosinkinaseaktivität des UFO - Rezeptors durch Kopplung an TPR möglicherweise erhöhen lässt.

Schließlich sollte in einem zweiten Schritt mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems der Versuch unternommen werden, geeignete cDNA – Bibliotheken nach Substraten des intrazellulären Anteils der beiden Rezeptortyrosinkinasen UFO und MET zu durchmustern.

© Benzing J, 2000

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborgerät

LaminAir HLB 2448	*Heraeus Instruments, Deutschland*
Centrifuge 5415C	*Eppendorf, Deutschland*
Cryofuge 8000	*Heraeus Instruments, Deutschland*
Varifuge RF	*Heraeus Instruments, Deutschland*
Ultrazentrifuge L8-M (Rotor T 50)	*Beckman, U.S.A.*
Biofuge A	*Heraeus Instruments, Deutschland*
Brutschrank Typ B 5060	*Heraeus Instruments, Deutschland*
Novaspec II Rapid	*Pharmacia, Schweden*
Spectrophotometer DU-50 Series	*Beckman, U.S.A.*
Incubator Shaker G25	*Scientific Co. Inc., U.S.A.*
Certomat R & H	*B.Braun, Deutschland*
Thermocycler 60	*bio-med GmbH, Deutschland*
Thermomixer 5436	*Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland*
Heizbad	*Köttermann Lab. Tech., Deutschland*
Vortex-Genie K550-GE	*Scientific Industries, U.S.A.*
Monitor LB 1210 D (Counter)	*Berthold, Deutschland*
Speed Vac Concentrator	*Bachhofer, Deutschland*
Refrigerated Condensation Trap	*Bachhofer, Deutschland*
pH-Meter pH 535	*wtw, Deutschland*
X-OMAT M35 Processor	*Kodak Inc.*
UV-Video Copy System	*Mitsubishi, Japan*
UV-Macrovue	*Pharmacia, Schweden*
UV-Stratalinker 2400	*Stratagene, U.S.A.*
Horizontale Elektrophorese Kammer,	*Bethesda Research Laboratories, U.S.A.*
Vertikale Elektrophorese Kammer	*Bethesda Research Laboratories, U.S.A.*
Power Supply GPS 200 / 400	*Pharmacia, Schweden*
Mini-Protean II, Dual Slab Cell	*BIORAD Laboratories, U.S.A:*
Mini-Trans-Blot, Electrophretic Transf. Cell	*BIORAD Laboratories, U.S.A.:*
Bunsenbrenner Labogaz 206	*ADG Paris, Frankreich*
Präzisionswaagen PM 4600 / PC 440	*Mettler Waagen GmbH, Deutschland*
Mikrowellengerät	*Bosch, Deutschland*
Slab Gel Dryer SE 1160	*Hoefer Scientific Instruments, U.S.A.*
Pipettus & Multipipette	*Becton & Dickinson Labware, U.S.A.*
Pipetten (0.5-10µl / 10-100µl / 100-1000µl)	*Eppendorf, Hamburg, Deutschland*
Qiavac Manifold 6S (Minipräp.-Apparatur)	*Qiagen, Deutschland*
Sonicator Cell Disruptor, W 185 F	*Ultrasonics Inc., U.S.A.*
E. coli Pulser Transformation Apparatus	*BIORAD Laboratories, U.S.A.:*
ALF express	*Pharmacia, Schweden*
PTC-200 DNA Engine	*Peltier, Frankreich / Biozym, Deutschland*
Orbital Shaker	*Forma Scientific, U.S.A.*
2 l Schikanekolben (Sonderanfertiguung)	*fisher scientific GmbH, Deutschland*
Ofen U 30	*Memmert*
Rotator Drive STR4	*Stuart Scientific*

© Benzing J, 2000

2.1.2. Computerprogramme

Word 6.0, Corel Draw 6.0	*Microsoft Corporation, U.S.A.*
GCG, Version 8.1-Unix	*Genetics Computer Group Inc., U.S.A.*
ALF win, version 1.0	*Pharmacia, Schweden*

2.1.3. Einmalartikel

Präzisa Skalpelle	*Dahlhausen Medizintechnik*
Parafilm	*American National Can*
Reaktionsgefäße 3810 (1,5ml)	*Eppendorf*
Pipettenspitzen (0.5-10 / 10-100 / 100-1000µl)	*Eppendorf*
PCR Tubes 0,2 ml	*Biozym*
ART = Aerosol Resistant Tips	*Molecular Bio Products Inc.*
Einmal Filterhalter Rotrand, 0,2 µm	Schleicher & Schuell
Pasteurpipetten, Glas	*Brand GmbH & Co.*
Petrischalen 94/16 mm	*Greiner Labortechnik*
Petrischalen 145/20 mm	*Greiner Labortechnik*
Kryoröhrchen, steril (8935)	*Greiner Labortechnik*
Röhrchen, steril 5 ml (12,0/75 mm)	*Greiner Labortechnik*
Röhrchen, steril 14 ml (17/100 mm)	*Greiner Labortechnik*
Falcon, Serological Pipets, 1ml	*Becton & Dickinson Labware*
Falcon, Serological Pipets, 5ml	*Becton & Dickinson Labware*
Falcon, Serological Pipets, 10ml	*Becton & Dickinson Labware*
Falcon, 14 ml - Röhrchen (steril)	*Becton & Dickinson Labware*
15ml Falcon, 50ml-Falcon	*Becton & Dickinson Labware*
Combitips (12,5ml)	*Eppendorf*
Qiagen 8-Plasmid Kit (MINI blau)	*Qiagen*
Qiagen 8-Plasmid Kit (MINI weiß)	*Qiagen*
QIA Quick PCR Purification Kit	*Qiagen*
Whatman Filter, (∅ 90 mm)	*Whatman Lab. Division*
Whatman Filter, (∅ 125 mm)	*Whatman Lab. Division*
Membranfilter BA 85 (0,45µm)	*Schleicher & Schuell*
Impfschlinge 10 µl, blau	*Greiner Labortechnik*
Impfschlinge 1 µl, natur	*Greiner Labortechnik*
Sterican Einmalkanülen Größe 1	*Braun*
Omnifix Einmalspritze 50 ml	*Braun*
Transferpipetten (3 ml)	*Becton & Dickinson Labware*

2.1.4. Molekularbiologische Materialien

2.1.4.1. Bakterienstämme

	Genotyp	Referenz
NM 522	▲*hsd*5 (r_k^- m_k^+), *sup*E, *thi*-1, (*lac-pro*AB), F'[*pro*AB, *lac*I^9 Z▲M15]	GOUGH & MURRAY 1983
HMS174	*F*, *rec*A,r_{k12-} ,m_{k12+} ,*Rif*	CAMPBELL *et al.* 1978

© Benzing J, 2000

HB 101	*supE*44, *hsdS*20 (r_B^- m_B^-) *recA*13, *ara* -14, *proA*2, lacY1, *gal*K2, *rpsL*20, xyl-5, *mtl*-1	BOLIVAR & BACKMAN 1979
XL1-Blue	*supE*44, *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*46, *thi*, *relA*1*lac*⁻ F' [*proAB*⁺, *lacI*^{q}, *lacZ* ▲M15Tn*10(tet*^{r}*)*]	BULLOCK *et al.* 1987

2.1.4.2. Hefestämme

	Genotyp	**Referenz**
SFY 526	*MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, can*^{r}*, gal4-524, gal80-538, URA3::GAL1*$_{UAS}$*-GAL1*$_{TATA}$*-lacZ*	HARPER *et al.* 1993
HF7c	*MATα, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS 2:: GAL1*$_{UAS}$*-GAL1*$_{TATA}$*-HIS3, URA3:: (GAL 17mers)*$_3$*-Cyc1*$_{TATA}$*-lacZ*	FEILOTTER *et al.* 1994
Y 190	*MATα, ura3-52, his3-▲200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4▲, gal80▲, URA3:: Gal1*$_{UAS}$*-GAL1*$_{TATA}$*-lacZ, cyh*^{r}*2, LY2:: GAL1*$_{UAS}$*-HIS3*$_{TATA}$*-HIS3*	HARPER *et al.* 1993
HY	= HF7c + Y187 *MATα, ura3-52, his3-▲200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, URA3::* **Gal1-lacZ**	LOUVET *et al.* 1997

2.1.4.3. Plasmide

pMOSBlue T - vector	*Amersham Life Science*
pT$_7$T$_3$-19U	*Pharmacia*
pSP 65	*Pharmacia*
pUC 13	*Pharmacia*
pAT	*Pharmacia*
pGAD 424	*Clontech*
pGBT 9	*Clontech*
pAS 2	*Clontech*
pTD 1	*Clontech*
pVA 3	*Clontech*

2.1.4.4. Aminosäuren

L-Isoleucin	I-7383, *Sigma*
L-Valin	V-0500, *Sigma*
L-Adenin, hemisulfat salt	A-9126, *Sigma*

© Benzing J, 2000

L-Arginin-HCl	A-5131, *Sigma*
L-Histidin HCl monohydrat	H-9511, *Sigma*
L-Leucin	L-1512, *Sigma*
L-Lysin HCl	L-1262, *Sigma*
L-Methionin	M-9625, *Sigma*
L-Phenylalanin	P-5030, *Sigma*
L-Threonin	T-8625, *Sigma*
L-Tryptophan	T-0254, *Sigma*
L-Tyrosin	T-3754, *Sigma*
L-Uracil	U-0750, *Sigma*

2.1.4.5. cDNA - Bibliotheken

human fetal liver	Oligo(dT), durch Zufallsprimer initiiert, in pGAD10, *Clontech*
rat embryo	Oligo(dT), durch Zufallsprimer initiiert, in pGADGH, *Netherlands Kanker Institut (NKI)*
human thymus	Oligo(dT), durch Zufallsprimer initiiert, in pGAD10, *Clontech*

2.1.4.6. Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden hergestellt von der Sektion Polymere, Universität Ulm bzw. vom DNA Synthese Service der Firma *Pharmacia*, Karlsruhe bezogen:

tpr-met 3'	[5'] GAGTTTCTCTAGCTCAAGCC [3']
tpr-met 5'	[5'] CGC**GGATCC**TA***ATG***GCGGCGGTGTTGCA [3'] Bam HI → *tpr-met...*
tpr 405	[5'] AGAGACTTGTGA**ATG**AAACCCG [3']
tpr-ufo -*bridge*	[5'] CTCCTTCTTTCGCCGGTG *TGTTAAGTATTCAAGTTCTTGAG* [3'] ← ufo-*tpr* →
ufo 1581r	[5'] GGCTGTTCAAGGTAGCTTCAG [3']
grb2.2 (3')	[5'] CGC**GGATCC**ATTGCTTCTTGACTCTTAGACG [3'] Bam HI
grb2 (5')	[5'] CG**GAATTC**GCGGAAGCCATCGCCAAATATG [3'] Eco RI
grb2 ($^1/_2$)	[5'] CAAACAGCGGCACGATGG [3']
ratUBC-9 (5')	[5'] CCG**GAATTC**TCGGGGATTGCCCTCAGCC [3'] Eco RI
ratUBC-9 (3')	[5'] CCG**GAATTC**CGCTGCTTATGAGGGGC [3'] Eco RI

© Benzing J, 2000

SalTPR/THS2 [5'] ACGC**GTCGAC**CATGGCGGCGGTGTTGCAG [3']
Sal I

SalUFO/THS2 [5'] ACGC**GTCGAC**CCACCGGCGAAAGAAGGAG [3']
Sal I

NotUFO/THS2 [5'] ATAAGAAT**GCGGCCGC**TCTCAGGCACCATCCTCCTG [3']
Not I

2.1.4.7. Radioisotope

Schwefel [^{35}S], *10µCu/µl*	*Amersham Life Science*
Phoshor [^{32}P], *10µCu/µl*	*Amersham Life Science*

2.1.4.8. Nukleotide

dATP (100mM)	27-2050-01, *Pharmacia*
dCTP (100mM)	27-2050-02, *Pharmacia*
dGTP (100mM)	27-2050-03, *Pharmacia*
dTTP (100mM)	27-2050-04, *Pharmacia*

2.1.4.9. Enzyme, Enzympuffer und Zusätze

Bam H I (20U/µl)	27-0868-04, *Pharmacia*
Bgl II (8U/µl)	27-0944-01, *Pharmacia*
Eco R I (25Uµl)	27-0854-04, *Pharmacia*
Hind III (18U/µl)	27-0860-02, *Pharmacia*
KpN I (15U/µl)	27-0908-02, *Pharmacia*
NotI (10U/µl)	27-0976-01, *Pharmacia*
Sal I (14U/µl)	27-0882-02, *Pharmacia*
Sma I (5U/µl)	27-0942-02, *Pharmacia*
Xho I (11U/µl)	27-0950-01, *Pharmacia*
10 x H - Puffer	1417991, *Boehringer Mannheim*
10 x M - Puffer	1417983, *Boehringer Mannheim*
One-phor-all buffer	27-0901, *Pharmacia*
100 x purified BSA, (200U/µl))	27-0870-03, *Pharmacia*
T_4-DNA-Ligase (400U/µl),	202 S, *New England Biolabs*
10 x Ligationspuffer (+10mM ATP)	
T_7 - DNA-Polymerase	27-0985-03, *Pharmacia*
vent-Polymerase (2000U/ml), 10xPuffer	254 S, *New England Biolabs*
pfu-Polymerase (2,5U/µl),	600154-61, *Stratagene*
10xPuffer	600153-82, *Stratagene*
Ampli-*taq*-DNA-Polymerase, 10xPuffer	N 808-0152, *Perkin Elmer*
Alkalische Phosphatase*(CIP)* 1U/µl	713.023, *Boehringer Mannheim*
Glykogen (1µg/µl):	901.393, *Boehringer Mannheim*

2.1.4.10. Referenzmarker

100bp DNA ladder	27-4001-01, *Pharmacia*
λ - DNA, Hind III Digest	27-4048-01, *Pharmacia*

© Benzing J, 2000

2.1.4.11. Antikörper

IgG goat anti mouse	170-6516, *Biorad*
p-Tyr (PY 20), mouse monoclonal	sc-508, *Santa Cruz*
Anti ufo	BRAUNGER J. *et al.*
Anti HA	*Boehringer*
Anti binding domain, mouse	5399-1, *Clontech*
Anti activating domain, mouse	5398-1, *Clontech*

2.1.4.12. Flüssige Nährmedien für Bakterien

Medium	**Zusammensetzung**
LB	10g / l Bacto Tryptone 5g / l Bacto Yeast Extract 10g /l NaCl pH 7,5 (NaOH - titriert) erst nach dem Autoklavieren, wenn < 48°C : 100 mg/l Ampicillin
BHI *(= brain heart infusion)*	37g BHI / l *aqua bidest* nur für 15 min autoklavieren erst danach, wenn < 48°C : 100 mg/l Ampicillin
M9 *Minimalmedium*	750ml *aqua bidest* erst nach dem Autoklavieren, wenn < 48°C : + 200 ml 5 x M9 Lösung + 20 ml 20% Dextrose + 76 mg CSM -Leu
5 x M9 Lösung	42,4 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ 15 g KH_2PO_4 2,5 g NaCl 5,0 g NH_4Cl
GYT *für elektrokompetente HB101*	10% Glycerol 0,125% Hefeextrakt 0,25% Trypton

2.1.4.13. Flüssige Nährmedien für Hefen

Die Medien für Hefen konnten als fertige Trockenpräparate von der Firma *Bio101, Inc.* bezogen werden. Nach Einwiegen des Pulvers gemäß Angaben des Herstellers wurde mit *aqua bidest* aufgefüllt und kurz autoklaviert (121°C ; 15 min). Das Selektionsmedium bestand aus DOB, dem entsprechenden Aminosäurenzusatz, sowie ebenfalls *aqua bidest*.

© Benzing J, 2000

Medium	**Zusammensetzung**
YPD *Vollmedium*	20 g/l Difco Peptone 10 g/l Yeast extract 2 % Dextrose + *aqua bidest*
YPDA *Vollmedium + Adenin*	Zusammensetzung wie YPD, erst nach dem Autoklavieren, wenn < 48°C : + 60 mg / l Adeninhemisulfat
DOB *Selektionsmedium*	pH 5,6 dazu je nach Bedarf: CSM -Leu (w/40mg/l Ade) CSM -Trp (w/20mg/l Ade) CSM -Leu, -Trp (w/40mg/l Ade) CSM -Leu, -Trp, -His (w/40mg/l Ade) CSM --Leu, -Trp, -His, -Ade

2.1.4.14. Feste Nährmedien für Bakterien und Hefen

Zum entsprechenden flüssigen Nährmedium für Bakterien bzw. Hefen wurden zusätzlich 15 g / l Medium Select Agar (*Life Technology*, 30391-023) eingewogen. Nach dem Autoklavieren (121°C ; 15 min) konnten die Agarplatten gegossen werden, sobald der Agar auf ca. 48°C abgekühlt war. Auch Zusätze wie Aminosäuren, Antibiotika oder etwa 3-AT durften erst unterhalb dieser Temperatur hinzugefügt werden.

M9 – Agarplatten	500 ml M9 Medium + 7,5 g Agar erst nach dem Autoklavieren, wenn < 48°C : + 40 µg / ml Prolin + 50 µg / ml Ampicillin + 1 mM Thiamin-HCl

2.1.5. Puffer & Lösungen

10 x Denhardt's	2% Ficoll Typ 400 2% BSA Fraktion V 2% Polyvinylpyrolidon Typ 360
Minipräp-Lösung I	50mM Glucose 10mM EDTA 25mM Tris pH 8,0
Minipräp-Lösung II	2% SDS 0,4M NaOH
Minipräp-Lösung III	3M Na-Acetat pH 4,8

© Benzing J, 2000

Denaturierungspuffer *Kolonie-Screening*	0,5M NaOH 1,5M NaCl pH > 14
Neutralisationspuffer *Kolonie-Screening*	0,5M Tris 3M NaCl pH 7,0
20 x SSC *Kolonie-Screening*	3M NaCl 0,3M NaCitrat pH 7,0
Hybridisierungsmix *Kolonie-Screening*	10x Denhardt's 10% Dextransulfat 0,1% SDS 3xSSC 50mg/l Salm DNA
3 x SSC-Waschmix *Kolonie-Screening*	3xSSC 0,1% SDS
Quickprime-Kit	27-9252-01, *Pharmacia*
E.Coli-Competitor	ca. 20µg/ml, *Pharmacia*
4x Proben-Puffer *Westernblot*	200mM Tris/HCl (pH 6,8) 8% SDS 0,4% Bromphenolblau 40% Glycerol
Stopmix	10mM Tris 0,1% SDS 25mM EDTA

2.1.6. Chemikalien

Agarose SEAKEM LE	50005, *FMC Bioproducts*
Albumin (BSA), Fraktion V	8076.3, *Carl Roth GmbH*
1M 3-Aminotriazol (3-AT)	A-8056, *Sigma*
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	00149, *FERAK Laborat. GmbH*
Ampicillin	A-9518, *Sigma*
BHI *(=brain heart infusion)*	0037-07-0, *Difco*
Bromphenolblau	4F 057, *Schmid GmbH & Co.*
Cäsium-Chlorid (CsCl), gereinigt	*Harshaw*
Canavanine	C-1625, *Sigma*
DMF	15440, *Riedel-de Haen*
DMSO	7033, *J. T. Baker, B. V.*
EDTA	E-5134, *Sigma*
Ethidiumbromid	*Merck*
Ficoll Typ 400	17-0400-02, *Pharmacia*
Formamid	*Merck*

© Benzing J, 2000

Glycerol	G-7757, *Sigma*
Lithium - Acetat	L-6883, *Sigma*
β-Mercaptoethanol	805740, *Merck*
MOPS	M-1254, *Sigma*
Na - Acetat	S-2889, *Sigma*
Na - Citrat	S-4641, *Sigma*
NaCl	*Merck*
Na_2HPO_4 $2H_2O$	30412, *Riedel-de Haen*
NaOH	0402, *J. T. Baker B. V.*
ONPG	N-1127, *Sigma*
P.E.G. 1450	P-5402, *Sigma*
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	156.2, *Carl Roth GmbH*
Polyvinylpyrolidon Typ 360	PVP-360, *Sigma*
Prolin	P-4655, *Sigma*
Tetracyclin	T-3258, *Sigma*
Select Agar	30391-023, *Gibco BRL*
SDS	A 1502, *AppliChem*
TRIS	T-8524, *Sigma*
Triton X-100	*Merck*
Tween 20	9127.1, *Carl Roth*
X-Gal	2315.4, *Carl Roth GmbH & Co*
Yeast Extract	0127-07-1, *Difco*
APS plusone	17-1311-01, *Pharmacia*
TEMED plusone	17-1312-01, *Phrmacia*
EDTA plusone disodium salt	17-1324-01, *Pharmacia*
Amberlite plusone	17-1326-01, *Pharmacia*
UREA plusone A.L.F. grade	17-0889-01, *Pharmacia*
TRIS plusone	17-1321-01, *Pharmacia*
Bind - Silane plusone	17-1330-01, *Pharmacia*
Boric Acid plusone	17-1322-01, *Pharmacia*

2.2. Klonierungstechniken

2.2.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode, die es ermöglicht, spezifische DNA-Sequenzen exponentiell zu amplifizieren (MULLIS *et al.* 1986). Drei verschiedene DNA - Komponenten bilden die Grundlage für das PCR - Prinzip: Die doppelsträngige, zu vervielfältigende DNA - Matrize (das Template) und flankierend zu deren 3 '- bzw. 5 '- Ende je ein einzelsträngiger Oligonukleotidprimer (siehe 2.2.2.). Außerdem werden der Reaktion DNA - Polymerase, ein darauf abgestimmter Puffer und dNTP's (eine Mischung der vier Nukleosid – Triphosphate) hinzugefügt.

© Benzing J, 2000

Ein PCR - Zyklus besteht aus drei Schritten: *Denaturierung* (92-95°C; 1min), *Annealing* (56-60°C; 1,5-2min) und *Extension* (72°C; 2min). Nach etwa 35 durchlaufenen Zyklen ist das gewünschte PCR - Produkt erfahrungsgemäß in ausreichender Menge amplifiziert worden.
PCR - Reaktionen wurden grundsätzlich in speziellen *PCR* - Reaktionsgefäßen (Safelock, *Eppendorf*) angesetzt, deren Deckel bei Denaturierung nicht aufspringen können und deren dünnere Wände einen optimalen Temperaturgradienten gewährleisten.
Um Kontamination auszuschließen wurden die PCR - Reaktionsgefäße mit Wasser, vor Zugabe der anderen Komponenten, für etwa 2 min mit UV-Licht (UV - Stratalinker 2400, *Stratagene*) bestrahlt. Außerdem fanden nur DNAse - freie Pipettenspitzen (Aerosol Resistant Tips, 2149P bzw. 2149E, *Molecular Bio Products Inc.*) Verwendung. Zum Aufdecken möglicher Verunreinigung wurde die PCR zusätzlich von einer Negativkontrolle durchlaufen - ohne Template, aber alle anderen Zusätze enthaltend. Vom Template wurden jeweils 20 - 100 ng eingesetzt. Bei relativ großen DNA - Matrizen (>10kb) wurde der PCR - Ansatz zu diesem Zeitpunkt kurz denaturiert (100°C; 10 min) und bis zum Start der PCR auf Eis gegeben, um die Denaturierung zu erleichtern. Die Oligonukleotid - Primer wurden in einer Konzentration von 10 bis 15 pmol/50µl eingesetzt, die Endkonzentration der dNTP's lag bei 0,2 mM. Schließlich wurden noch 1 bis 2 U DNA - Polymerase (*taq*-, *vent*-, bzw. *pfu*- Polymerase), sowie 10µl des jeweils adäquaten 10 x - PCR - Puffers dazugegeben. Um die für die DNA - Polymerase *taq* typischen Reaktionsfehler auszuschließen, wurde bevorzugt *pfu* – Polymerase (mit Korrekturlesefunktion) verwendet: die Fehlerquote von *vent*- bzw. *pfu*- Polymerase ist um ein Vielfaches geringer. Eine weitere, spezifische Eigenart der *taq* - Polymerase, das Anhängen eines einzelnen Adenosin - Nukleotids an das 3' - Ende doppelsträngiger DNA (CLARK 1988), konnte jedoch ausgesprochen arbeitserleichternd sein beim späteren (direkten) Klonieren des PCR - Produkts in einen T - Vektor (MARCHUK *et al.* 1991). War dies erwünscht, wurden nach den durchlaufenen 35 Zyklen jedem Ansatz der PCR - Reaktion je 2 U *taq* - Polymerase und 2µM dATP hinzugefügt, um für 10min die Synthese (72°C) der ATP's am 3' – Ende zu ermöglichen. Da es wiederum eine spezifische Eigenart der *pfu* – Polymerase ist, endständige Adenosin – Nukleotide nicht zuverlässig zu amplifizieren, war dieser letzte Schritt bei PCR – Versuchen mit *pfu* – Polymerase obligat.

© Benzing J, 2000

2.2.2. Wahl geeigneter PCR - Primer

PCR - Primer sind Oligonukleotide von bis zu 25 Nukleotiden, die möglichst exklusiv homolog sind zum 3 '- bzw. zum 5 ' - Ende der zu amplifizierenden Sequenz des eingesetzten DNA – Templates. Sollen bei einer PCR neue Restriktionsschnittstellen eingeführt, oder etwa der Leserahmen modifiziert werden, so enthalten die Primer zwangsläufig *nicht* - homologe Abschnitte (JUNG *et al.* 1990; SCHARF 1990). Die Anzahl jener "neuen" Nukleotide sollte so gering wie möglich gehalten werden. Der Anteil an Guanidin und Cytosin-Triphosphat sollte mindestens 50% , jener an Tymidin-Triphosphat mindestens 60% betragen; vor allem sollten optimale PCR-Primer genügend viele homologe Basen, jedoch keine komplementären Sequenzen beinhalten. Eine entscheidende Rolle bei der Wahl der Primerlänge spielt außerdem die sich ergebende Annealingtemperatur, die sich aus der Gesamtzahl der jeweiligen Oligonukleotide errechnen läßt: für jedes Guanidin-/Cytosinnukleotid addieren sich je 4°C, pro Adenin bzw. Thymidin je 2°C, bis man schließlich die theoretische Annealingtemperatur erhält - am günstigsten haben sich hier 58 $^{+}/_{-}$ 2°C erwiesen. Mit Hilfe sogenannter "bridging primer" ist es prinzipiell möglich, in einem einzigen PCR-Versuch zwei beliebige DNA-Abschnitte zu einem einzigen neuen DNA-Strang zu verbinden: der mittlere (Brücken-) Primer überlappt hierbei die Sequenzen der beiden Matrizen. Durch den Einsatz eines speziellen Computerprogramms (GCG, 8.1-Unix; *map* bzw. *mapplot*) ließen sich Schnittstellenkarten von bekannten DNA-Sequenzen erstellen, wodurch die Festlegung der PCR-Primer sehr erleichtert wurde.

2.2.3. Aufreinigung von Oligonukleotiden

Ein Teil der für diese Arbeit benötigten Oligonukleotide waren in der Sektion Polymere der Universität Ulm gemäß der sogenannten Phosphotriester - Methode (GAIT 1988) synthetisiert und schließlich an den synthetischen Träger in einer Kunststoffkartusche gebunden worden; sie bedurften jedoch vor Gebrauch zunächst der Aufreinigung:
Um Kontamination zu vermeiden, wurden bei der weiteren Aufarbeitung der Oligonukleotide ausschließlich autoklavierte Eppendorf - Reaktionsgefäße, sowie DNAse - freie Pipetten und Pipettenspitzen verwendet. Zur Entfernung der Schutzgruppen wurden

© Benzing J, 2000

in einem ersten Schritt zunächst 500µl Ammoniak (32%) zum Oligonukleotid gegeben, das dann in einem 15ml-Falcon - Parafilm versiegelt - über Nacht bei 55°C inkubiert wurde.
Am nächsten Tag wurden Parafilm und Falcon, die ein Verflüchtigen des Ammoniaks verhindern sollten, wieder entfernt. Nach Kondensation des Ammoniaks (etwa 30 min bei -20°C) wurde die Kartusche in ein erstes 1,5ml - Eppendorf - Röhrchen überführt und, nach Zugabe von 500µl 10TE-Puffer (10mMTris-HCl 0,1mM EDTA), bei 2700 x *g* abzentrifugiert. Die Kartusche kam in ein zweites und drittes Eppendorf – Röhrchen, jedesmal mit derselben Menge TE-Puffer und sich anschließender Zentrifugation. Die dabei gewonnenen drei Rückstände in den Eppendorf - Röhrchen wurden auf eine zuvor mit 5ml TE-Puffer gespülte Sephadex - Säule gegeben und eluiert.
Der DNA-Gehalt des auf diese Weise gewonnenen Oligonukleotids ließ sich nach photometrischer Messung der Optischen Dichte einer 1:150 mit *aqua bidest* verdünnten Probe bei λ = 260nm folgendermaßen berechnen:

$$\frac{1}{(A,G,T,C)} = \mu mol / OD_{\lambda=260} \times 150$$

wobei gilt: jedes A = 15,20 µmol^{-1}
C = 7,05 µmol^{-1}
G = 12,01 µmol^{-1}
T = 8,40 µmol^{-1}

Um den späteren Einsatz der Oligonukleotide als PCR - Primer zu vereinfachen, wurden sie bereits auf die hierfür benötigte Konzentration von 100 pmol/µl gebracht und bis zum Gebrauch bei - 20° C gelagert.
Oligonukleotide, die von der Firma *Pharmacia*, Karlsruhe bezogen worden waren, mußten nicht mehr weiter aufgereinigt werden. Durch Zugabe der entsprechenden Menge an sterilem *aqua bidest* wurde die präzipitiert vorliegende DNA lediglich gelöst (10 min ; 50°C) und gleichzeitig auf die gewünschte Endkonzentration von 100 pmol/µl verdünnt - sie waren danach ebenfalls bei - 20° C aufzubewahren.

2.2.4. Restriktionsanalysen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in der Lage sind, spezifische, doppelsträngige DNA - Sequenzen zu erkennen und hydrolytisch zu schneiden. Einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und deren DNA - Erkennungs - sequenzen gibt Tabelle 1.

© Benzing J, 2000

Wir verwendeten diese Enzyme in Konzentrationen von 3-10 U pro µg eingesetzter DNA, sowie die dazugehörigen Puffer gemäß untenstehender Tabellen (Tabelle 2 & 3). Dabei erleichterte oftmals der Zusatz von 2 mM Spermidin die enzymatische Reaktion. (FERRETTI & SGARAMELLA 1981).

Die Restriktion selbst erfolgte bei einer Temperatur von 37°C (*SmaI* bei 25°C) über eine Dauer von 1 bis zu 5 Stunden und wurde anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert.

Tabelle 1: DNA - Erkennungssequenz von Restriktionsenzymen (▼ = Schnittstelle)

Enzym	**DNA - Erkennungssequenz**
Bam H I	[5'] G▼GATCC [3']
Bgl II	[5'] A▼GATCT [3']
Eco R I	[5'] G▼AATTC [3']
Hind III	[5'] A▼AGCTT [3']
KpN I	[5'] GGTAC▼C [3']
Not I	[5'] GC▼GGCCGC [3']
Sal I	[5'] G▼TCGAC [3']
Sma I	[5'] CCC▼GGG [3']
Xho I	[5'] C▼TCGAG [3']

Tabelle 2: Restriktionsenzyme und Puffer

Enzyme	**Puffer**
Bam H I, Bgl II, Eco R I, Not I, Sal I,	H
Hind III, Xho I	M
KpN I, Sma I	KM

Tabelle 3: Pufferzusammensetzung
(Tab. 1 – 3 aus: Restriction Enzyme Buffer Usage Guide, *Pharmacia*)

	Tris pH7,5	**$MgCl_2$**	**NaCl**	**DTT**	**KCl**
M-Puffer	10mM	10mM	50mM	1mM	-
H-Puffer	50mM	10mM	100mM	1mM	-
KM-Puffer	10mM	-	-	1mM	50mM

2.2.5. Dephosphorylierung von Vektoren

Vektoren sind Plasmide, in die ein spezifisches DNA - Fragment (= Insert) eingesetzt werden kann, das sich so letztendlich durch Transformation (siehe 2.2.7.) in Zellen "transportieren" läßt. Vorher muß der Vektor jedoch zunächst mittels Restriktions-

© Benzing J, 2000

endonukleasen entsprechend der Schnittstellen des Inserts linearisiert werden. Um danach spontane Religierung der sogenannten *"sticky ends"* des Vektors auszuschließen, sind außerdem die Phosphatgruppen an dessen 5' - Ende zu entfernen (MANIATIS *et al.* 1989) - Enzym der Wahl hierfür ist CIP (= ***c****alf* ***i****ntestinal alkaline* ***p****hospatase*).

Phenolisierung

Dazu wurde zur DNA ein äquivalentes Volumen Phenol - Chloroform (1:1) gegeben, gut gemischt und anschließend für 5 min bei 12.000 x *g* zentrifugiert.
Der Überstand wurde vorsichtig (möglichst ohne Phenol) in neue 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, um mit Ethanol präzipitiert (siehe 2.2.13.) und schließlich in 90µl *aqua bidest* gelöst.

Phosphatasereaktion

Mit 1 U CIP-Phosphatase / µg DNA, sowie der entsprechenden Menge 10 x CIP-Puffer (500mM Tris - HCl pH 9.0, 10mM $MgCl_2$, 1mM $ZnCl_2$, 10mM Spermidin) wurde die DNA für eine Dauer von 30 min bei 37°C, nach weiterer Zugabe von CIP-Phosphatase (1U), dann erneut für 30min, diesmal jedoch bei 56°C inkubiert.
Gestoppt wurde die Dephosphorylierungsreaktion mit 2µl 0,5M EDTA (pH 8,0) für 10 min bei 68°C.
Nach erneuter Phenolextraktion (s.o.) wurde abschließend die Vektor - DNA mittels präparativer Gelextraktion aufgereinigt (siehe 2.2.12.), um Überschüsse an Enzym und Pufferbestandteile zu entfernen.

2.2.6. DNA - Ligation

Mit Hilfe der DNA - Ligase, einem Enzym aus mit T_4-Phagen infizierten *E. coli*, lassen sich zwei linearisierte DNA-Fragmente zwischen deren 3'- und 5'- Enden kovalent miteinander verknüpfen, passende Restriktionsschnittstellen vorausgesetzt (WEISS *et al.* 1968).

Bei einem Standard Ligationsansatz befanden sich in einem 1,5ml - Reaktionsgefäß jeweils 1x Ligationspuffer (50 mM Tris HCl, pH 7,8 , 10 mM $MgCl_2$, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg / ml BSA), 2 mM Spermidin, 100 - 200 ng Insert - DNA, sowie etwa 200-400 ng

© Benzing J, 2000

Vektor - DNA, schließlich 240 U T_4 - DNA – Ligase. Mit sterilem *aqua bidest* wurde auf ein Gesamtvolumen von 10µl aufgefüllt.
Um später den Hintergrund und damit andererseits die Effizienz einer Transformation bestimmen zu können, enthielt einer der Ligationsansätze keine Insert- , sondern nur Vektor - DNA. Die Ligation erfolgte über Nacht in einem 15°C - Wasserbad.

2.2.7. Transformation von Bakterien

Als Transformation wird grundsätzlich derjenige Mechanismus bezeichnet, bei dem Plasmid - DNA in kompetente Bakterienzellen (meist *Escherichia coli*) eingeschleust wird. Dieser nur vorübergehende Zustand von "Kompetenz" (d.h. einer für Plasmid - DNA durchlässigeren Membran) kann durch unterschiedlichste chemische/physikalische Behandlung der Bakterien herbeigeführt werden.
In der vorliegenden Arbeit fanden entweder die sogenannte DMSO - oder die P.E.G. - Methode Anwendung. In Einzelfällen wurden Transformationen auch mit Hilfe von kommerziellen (bereits kompetenten) *Epicurian Coli XL2-Blue*- bzw. p*MOSBlue*-Zellen durchgeführt, die in den gleichnamigen Kits enthalten waren.

DMSO - Methode

50 ml LB - Medium wurden mit 500µl einer Übernacht - Kultur NM 522- oder HMS 174-Zellen (-70°-Stock) angeimpft. Die Bakterienzellen sollten im Inkubator (37°C; 250 U/min) bis in die späte *log* - Phase ($OD_{\lambda=600\ nm}$ 0,4 bis 0,6) wachsen, bevor sie in 50ml - Falcon-Röhrchen bei 4°C pelletiert (15 min; 2700 x *g*) und der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde in 5ml TSB - Transformationspuffer (10% *w/v* PEG 1450; 10mM $MgCl_2$; 10 mM $MgSO_4$; 5% DMSO in LB - Medium) resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt.
Zu 200µl - Aliquots dieser Suspension (in sterilen eisgekühlten 5 ml-PE-Röhrchen (*Greiner*) kamen 2µl Plasmid - DNA aus einem Standard - Ligationsansatz (siehe 2.2.6.), bzw. 1µl pAT (0,25µg/ml) zur Positivkontrolle der Transformation. Auf Eis für 30 min, wurden die Röhrchen hin - und wieder vorsichtig geschüttelt.
Zur Induktion der Ampicillin-Resistenz waren jeweils 900µl TSB (+ 20mM Glucose) hinzugefügt worden. Der wurde Transformationsansatz 45 min lang im Inkubator bei 37°C geschüttelt (225rpm) und auf $Agar^{+amp}$ ausplattiert.

© Benzing J, 2000

P.E.G. - Methode

Alternativ wurde die Transformationsmethode nach GROTH *et al*. (1996) angewandt: Von einer Übernachtkultur Bakterien (NM 522 oder HMS174) wurden 500 µl in 50 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) angeimpft und bis zu einer $OD_{600} \approx 0{,}2$ im Inkubator bei 37°C und 250 U/min geschüttelt. Die Bakterienzellen wurden bei 4°C pelletiert (10 min; 2000 x *g*)und in 5 ml eiskaltem Transformationspuffer (10 % w/v P.E.G. 1450 und 30 mM $MgCl_3$ in LB-Medium, ohne Antibiotikum) resuspendiert. Die Zellsuspension war danach für 5 bis 20 min auf Eis zu belassen. Jeweils 100 µl solcher kompetenter Bakterien wurden - zusammen mit 2 µl DNA einer Standardligation - in ein eisgekühltes 5 ml - PE - Röhrchen (*Greiner*) pipettiert. Die Inkubation erfolgte in drei Schritten jeweils für 10 min: zunächst auf Eis, dann bei Raumtemperatur und abschließend erneut auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB - Medium wurden die transformierten Bakterien 1 Stunde lang bei 37°C im Inkubator geschüttelt (250 U/min) und konnten anschließend auf LB^{+amp} - Agar (100 µg/ml Ampicillin) plattiert werden.

pMOS Blue- bzw. Epicurian Coli XL2-Blue-Zellen (kommerzielle Kits)

Gemäß der den entsprechenden Kits beiliegenden Gebrauchsinformation wurden pro Transformation 20µl der kompetenten *pMOSBlue* - Zellen (-70°C-Stock) in ein 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (auf Eis) pipettiert und kurz suspendiert. Vom jeweiligen Standard - Ligationsansatz konnten 1 - 4 µl DNA direkt dazugegeben werden. Die Transformation wurde für 30 min auf Eis belassen, lediglich hin und wieder leicht geschüttelt - zur besseren Durchmischung von Zellen und Plasmid. Für exakt 40 s einem Hitzeschock (42°C-Wasserbad) ausgesetzt, wurden die Zellen anschließend erneut für 2 min auf Eis gestellt. Jedem Transformationsansatz wurden 80µl des im Kit bereits enthaltenen SOC - Mediums hinzugefügt, bevor er 60 min lang im Inkubator (37°C; 250rpm) geschüttelt wurde. Die Transformation von *Epicurian Coli XL2-Blue*-Zellen erfolgte prinzipiell nach dem gleichen Protokoll, wobei hier jedoch β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 25 mM) zur Steigerung der Transformationseffizienz eingesetzt wurde.

Blau/Weiß - Selektion

Ob der Vektor nach Transformation das gewünschte Insert enthält, läßt sich mittels der sogenannten Blau/Weiß - Selektion überprüfen: der *LacZ* - Promotor (*E. coli*) ermöglicht es nämlich Bakterien, Galaktose enzymatisch zu spalten.

© Benzing J, 2000

Bei erfolgreich mit Vektor *und* Insert transformierten Bakterien wird die für *LacZ* kodierende Sequenz allerdings durch das eingefügte Insert unterbrochen, d.h. positive Transformanten können keine Galaktosidaseaktivität mehr entwickeln. Beim Ausplattieren der Transformation schließlich wird anstelle von herkömmlichem Milchzucker das künstliche, aber strukturverwandte Substrat X-Gal (= 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid) zugegeben, das bei enzymatischer Aufspaltung durch Galaktosidase zu deutlicher Blaufärbung jener Kolonien führt, die nicht das entsprechende Insert enthalten.

Ausplattieren

Pro LB - Agarplattte (∅ 9mm) wurden hierfür zu je 500 µl transformierten Bakterienzellen folgende Zusätze pipettiert: 1 bis 2 µl Ampicillin (50mg/ml) bzw. das für das verwendete Plasmid spezifische Antibiotikum, 2 µl IPTG (500mM), sowie 50 µl X-Gal (2,5% - Lösung in DMF). Die nach der DMSO - bzw. der P.E.G. - Methode transformierten Bakterien wurden auf LB^{+amp} - Platten (50µg/ml Ampicillin) plattiert, *Epicurian Coli XL2-Blue*-bzw. *MOSBlue*-Zellen jedoch auf $LB^{+amp/+tetra}$ -Platten (50µg/ml Ampicillin; 15µg/ml Tetrazyklin). Die Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Positive Kolonien mit einer sterilen Impföse aufgepickt werden: als positiv galten alle völlig *weißen* Kolonien. Diese wurden in je 4 ml BHI - Medium (+100µg/ml Ampicillin) angeimpft und in 15ml - Falcon - Röhrchen über Nacht bei 37°C im Inkubator geschüttelt (225 U/min). Am darauffolgenden Tag konnten von diesen Bakterienkulturen DNA - Plasmidpräparationen (siehe 2.2.9.) angefertigt werden.

2.2.8. Kolonie – Screening / Hybridisierungsverfahren

Diese Methode erlaubt es, erfolgreich mit einem gewünschten Insert ligierte Plasmide sehr sensitiv von Hintergrundkolonien (= ohne dieses Insert) zu unterscheiden. Hierzu wird eine Probe des zur Transformation verwendeten DNA – Inserts radioaktiv markiert, um damit anschließend Replikafilter der ausplattierten Transformation zu hybridisieren. Bei Kenntnis der ursprünglichen Filterposition auf den Agarplatten lassen sich so exakt diejenigen Kolonien bestimmen, deren Plasmide das gewünschte Insert beinhalten (HANAHAN & MESELSON 1980).

Zu diesem Zweck wurde die Transformation bereits auf Nitrozellulosefilter (Protran BA 85, *Schleicher & Schuell*) ausplattiert. Der Originalfilter mit den Bakterienkolonien wurde

© Benzing J, 2000

vom Agar vorsichtig abgenommen, ein neuer Filter (bereits auf einer anderen Agarplatte angefeuchtet und vorgewärmt) deckungsgleich aufgelegt und mittels einer sterilen Kanüle (3-4 kleine Löcher genügten) konnte die Position beider Filter zusammen markiert werden. Durch Anpressen der Filter gegeneinander wurden Teile der Bakterienkolonien auf den Replikafilter "kopiert", der wiederum auf einer neuen Agarplatte plaziert wurde. Für etwa 2 bis 5 Stunden konnten die Replikakolonien im Brutschrank (37°C) in den Filter einwachsen. Die Originalplatten wurden, nach kurzer Inkubation (37°C; 2 Stunden), mit Parafilm versiegelt und bei 4°C verwahrt. Nacheinander wurden die Zellen auf den Replikafiltern in den entsprechenden Pufferlösungen nun für jeweils 5 min erst denaturiert (0,5M NaOH; 1,5M NaCl), dann *neutralisiert* (0,5M Tris; 3M NaCl; pH 7,0). In 3 x Waschpuffer (3x SSC; 0,1 % SDS) wurden Zellreste der Bakterien mittels eines sauberen Papiertuchs von der Filtermembran gewaschen. Anschließend kurz in 3 x SSC geschwenkt, mußten die Replikafilter noch für etwa zwei Stunden bei 80°C gebacken werden, um so die DNA in der Nitrozellulose zu fixieren.

Zum Vorhybridiseren wurden die Filter erneut in 3 x SSC angefeuchtet und im Hybridisierungsmix (10X Denhardt's; 10% Dextransulfat; 0,1% SDS; 3x SSC; 50mg/l Salm-DNA; 20µg *E. coli* - Competitor) im 63°C-Wasserbad langsam schüttelnd inkubiert. Etwa 20 - 100ng der radioaktiv zu markierenden Probe (= Insert-DNA) wurden mit *aqua bidest* auf 36µl Gesamtvolumen aufgefüllt, 5 min lang bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Bei Verwendung des T_7 Quickprime-Kits (*Pharmacia*) wurden der Probe 10µl Reagent-Mix, 1µl T_7-Polymerase (8,5U/µl), 1,5µl radioaktives α-[^{32}P]-dCTP und gegebenenfalls 1µl Spermidin (100mM) bei einem Totalvolumen von 50µl hinzugefügt, kurz abzentrifugiert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Aufreinigung der DNA-Sonde wurden 1ml-Elutionssäulen (10T 0,1E-Puffer getränkt) mit Sephadex G50 befüllt. Für jede DNA-Probe waren fünf 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen bereitzustellen. In Röhrchen #1 wurden die radioaktive Probe, sowie nacheinander 80µl, 130µl und nochmals 130µl 10T 0,1E-Puffer über die Säule eluiert, danach ebenso je 130µl 10T 0,1E-Puffer in die Röhrchen #2 bis #5. Die gereinigte DNA-Sonde befand sich schließlich in den Eppendorf-Röhrchen #2 und #3, kürzere DNA-Fragmente der Probe im vierten und einzelne, freie Nukleotide im fünften Röhrchen.

Mit Hilfe eines Geigerzählers (Monitor LB1210D, *Berthold*) konnte das Ergebnis der Säulenelution grob quantifiziert werden: die höchste Radioaktivität mußte sich bei Messung der Röhrchen #2 und #3 ergeben. Deren beider Inhalt wurde mit insgesamt 100µl Salm-

© Benzing J, 2000

DNA (25-50mg/ml) zusammenpipettiert, für 15 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gestellt.

Die radioaktiv markierte DNA-Sonde konnte nun zu den vorhybridisierten Replikafiltern gegeben werden und über Nacht, langsam schüttelnd, im 63°C-Wasserbad inkubieren. Weiterhin im Wasserbad, wurde abschließend womöglich unspezifisch gebundene DNA von den Filtern gewaschen: 3 bis 4 mal jeweils 20 min lang mit 3 x Waschmix (3x SSC; 0,3% SDS), sowie 1 bis 2 mal ebenfalls für 20 min mit 1 x Waschmix (1x SSC; 0,1 % SDS). Die Filtermembranen wurden anschließend - angefeuchtet mit etwas 3 x SSC und in Folien aus Polypropylen eingeschweißt - mit einem Film (X-OMAT DS, *Eastman-Kodak*) in Screen-Kassetten (*intensifier screens*) bei -70°C für 2 bis 3 Stunden (bei > 20 Bq) oder über Nacht (bei entsprechend niedrigerer Radioaktivität der Filter) eingelegt. So erhielt man ein autoradiographisches Abbild der Kolonien positiver Transformanten. Mit Hilfe der Lochmarkierungen auf Original - und Replikafiltern, die auf den Film entsprechend zu übertragen waren, ließen sich nun positive Kolonien auf den Originalplatten identifizieren und für weitere Analysen isolieren.

2.2.9. DNA - Plasmidpräparation

Die DNA - Plasmidpräparationen wurden mit Hilfe des QIAwell 8 Plasmid Kits (17124 bzw. 27144, *Qiagen*) vorgenommen, basierend auf dem modifizierten Prinzip alkalischer Lyse (nach BIRNBOIM & DOLY 1979; ISH-HOROWICZ & BURKE 1981) und auf der Adsorption von DNA an ein Silikagel in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (VOGELSTEIN & GILLESPIE 1979).

Minipräparationen

Die Bakterienkulturen entstammten einzeln aufgepickten Kolonien und waren über Nacht in je 4ml BHI- oder LB - Medium (100µg/ml Ampicillin) bei 37°C im Inkubator (225 U/min). gewachsen.

Gemäß den Vorgaben des Herstellers wurde das bei 10.000 x *g* gewonnene Zellpellet zunächst jeweils mit 250µl Lösung P1 (RNAse A enthaltend) resuspendiert, um anschließend mit 250µl Lösung P2 für die Dauer von 5 min bei Raumtemperatur lysiert zu werden. Nach Zugabe von 500µl Lösung N3 wurde die Zellsuspension zur Neutralisation

© Benzing J, 2000

und Präzipitation für 10 min auf Eis gestellt. Im Kühlraum (4°C) erfolgte 20 min lang die Pelletierung der Zelltrümmer durch Zentrifugieren bei 10.000 x *g*.

Auf die Silikagel - Membranen der QIAvac-Manifold 6S-Apparatur pipettiert, wurde der Überstand mit den Puffern PB und PE unter Vakuumsog gewaschen. Nach etwa 5 min, nach vollständigem Abtrocknen der Membranen, konnte die Vakuumpumpe abgestellt werden. Abschließend wurde die DNA mit jeweils 120µl *aqua bidest* (nur bei -20°C längere Zeit haltbar) oder mit 120µl 10mM Tris/HCl (0,1 mM EDTA, pH 8,5) in die Sammelröhrchen eluiert.

Die in Mini - Präparationen gewonnene DNA konnte bei Ligationen, Transformationen, Restriktions- und Sequenzanalysen eingesetzt werden.

Maxipräparationen

Zur Isolierung größerer Plasmide wurde eine sogenannte Maxi – Präparation nach der Caesium – Chlorid – Methode durchgeführt (MANIATIS *et al.* 1989). Mittlerweile werden hierfür ebenfalls kommerzielle Kits angeboten.

Eine Ösenspitze der zu vermehrenden rekombinanten Bakterien war jeweils in 500ml BHI Medium (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft worden und konnte über Nacht bei 37°C im Inkubator (225 U/min) wachsen.

Am nächsten Tag wurden die Zellen auf zwei 250ml-Becher aufgeteilt und für 20 min bei 5000 x *g* pelletiert, der Überstand verworfen. Das bakterielle Sediment wurde zunächst mit je 20 ml Lösung I (50mM Glucose; 10mM EDTA; 25mM Tris/HCl, pH 8,0) sowie einer Spatelspitze Lysozym versetzt und auf dem Vortexer vollkommen suspendiert. Lösung II (2 % SDS und 0,4 M NaOH im Verhältnis 1:1) wurde unmittelbar vor seiner Anwendung angesetzt. Zur optimalen Durchmischung schüttelte man vorsichtig Zellen und jeweils 40ml dieses Lysepuffers für 5 min bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von je 20 ml Lösung III (3M NaAc, pH 4,8) wurde die Neutralisation von Lösung I und II, sowie die Präzipitation von zellulären Proteinen und zellulärer DNA auf Eis erreicht – hierbei bleibt jedoch die Plasmid – DNA in Lösung. Es folgte erneut vorsichtiges Durchmischen und anschließende Zentrifugation bei 5000 x *g* für 20 min bei einer Temperatur von 4°C, sowie für 30 min erneutes Zentrifugieren der filtrierten und (in je 48 ml Isopropanol) gefällten Nukleinsäuren des Plasmids - der verbleibende Überstand wurde verworfen.

Das getrocknete DNA – Sediment in den Zentrifugenbechern wurde in je 6,5 ml *aqua bidest* resuspendiert und mit je 10,5 g CsCl, sowie 1 ml EtBr (5 mg/ml) versetzt. Für die

© Benzing J, 2000

Ultrazentrifugation (Rotor TI-50) wurde die DNA in spezielle Zentrifugenröhrchen (Quickseal-Tubes, *Beckman*) abgefüllt, die dann exakt austariert und zugeschweißt wurden: Zentrifugation in der Ultrazentrifuge L8-M, *Beckman* bei 40.000 rpm für mindestens 40h bei etwa 25°C – bei niedrigeren Temperaturen hätte womöglich CsCl ausfallen und den Rotor beschädigen können.
Anschließend konnten die Plasmidbanden aus dem auf diese Weise gewonnenen Gradienten extrahiert, gefällt und in 500 µl 10 TE 0,1 EDTA gelöst werden. Nach Phenolisierung, Präzipitation und Waschen (70% Ethanol) wurde die Plasmid-DNA erneut gelöst und die Konzentration der Proben photometrisch gemessen werden.

2.2.10. Photometrische Bestimmung des DNA - Gehaltes

Im UV - Bereich eines Spektralphotometers (Beckman DU-50) ließ sich mittels Extinktionsmessung der Nukleinsäuregehalt von DNA - Präparationen bestimmen: Dazu wurde die entsprechende Probe 100-fach mit *aqua bidest* (= Referenz) in einer Quarzküvette verdünnt. Eine Extinktion ($OD_{\lambda=260}$) von 1 entsprach hierbei einer Nukleinsäure-konzentration von 50µg/ml. Die Güte der DNA-Präparationen (beeinträchtigt etwa durch zelluläre Proteine) ließ sich darüber hinaus überprüfen, indem eine weitere Messung der Probe im Wellenlängen-bereich von λ=280nm vorgenommen wurde: In diesem Spektralbereich wirken insbesondere Tryptophan, Tyrosin und Phenylanalin absorbierend. Der Quotient von $OD_{\lambda=260}$ und $OD_{\lambda=280}$ sollte möglichst nicht weniger als 1,8 betragen (MANIATIS *et al.* 1989).

2.2.11. Agarosegel - Auftrennung von DNA

Durch Agarosegel - Elektrophorese lassen sich Nukleinsäurefragmente ihrer molekularen Größe nach auftrennen und später, z.B. bei Zugabe von Ethidiumbromid, unter UV - Licht sichtbar machen.

10 x Laufpuffer:

10 x TBE:

900mM Tris
900mM H_3-Borat
25mM EDTA

© Benzing J, 2000

5 x Ladepuffer:
10mM Tris/HCl
Orange G (1mg/ml)
20% Ficoll
pH 7,5

10 - 20 µl der entsprechenden DNA - Proben (etwa aus einem Restriktionsansatz) wurden mit 0,2 Vol. Ladepuffer versetzt. Als Größenreferenz für die DNA-Fragmente konnte beispielsweise der 100 bp - Marker dienen, ebenfalls entsprechend mit Ladepuffer versehen. Zur Herstellung des Gels wurde, gemäß Tabelle 4, Select Agarose in 1x TBE gelöst.

Tabelle 4: wirksame DNA-Auftrennung
(MANIATIS T., SAMBROOK J., FRITSCH E.F., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989, Abschnitt 6.5.)

% Agarose	wirksame DNA - Auftrennung (kb)
0,3	60 - 5,0
0,6	20 - 1,0
0,7	10 - 0,8
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 - 4
2,0	0,1 - 3

Nach kurzem Aufkochen der Agarose in einem Mikrowellengerät wurde $^{1}/_{10.000}$ des Volumens an Ethidiumbromid (EtBr – Stock: 5 mg/ml) hinzu gegeben - EtBr interkaliert zwischen die Doppelhelix und bildet mit Nukleinsäure auf diese Weise fluoreszierende Komplexe, die unter UV-Licht sichtbar sind.
Ethidiumbromid ist in höchstem Maße karzinogen – daher sind beim Umgang mit EtBr unbedingt Handschuhe zu tragen !

Das noch flüssige Gel wurde in einen passenden Schlitten gegossen und mit einem Kamm versehen. Sobald das Gel fest war, konnte der Kamm vorsichtig wieder entfernt werden. Das Gel wurde in eine Elektrophorese - Apparatur eingelegt, vollständig mit 1 x TBE - Laufpuffer bedeckt und mit Marker und Proben “beladen” und für durchschnittlich 1h einer Spannung von 120V ausgesetzt. Später konnten Verlauf und Ergebnis der Elektrophorese unter UV - Licht (UV Macrovue, *Pharmacia*) begutachtet und fotografisch dokumentiert bzw. gespeichert werden (UV Video Copy System, *Mitsubishi*).

© Benzing J, 2000

2.2.12. DNA - Extraktion aus Agarosegel

Um DNA – Inserts nach Behandlung mit Restriktionsendonukleasen oder nach PCR - Reaktionen von Enzym, Puffer bzw. Nukleotiden zu befreien, wurden sie zunächst in Agarosegel aufgetrennt und später aus diesem extrahiert. Für diese Anwendung existieren kommerzielle Kits, wie etwa Qia-Ex (Gelextraction Kit II, *Qiagen*).

Qia-Ex

Die gewünschten DNA - Fragmente wurden mit Hilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in 1,5 ml - Eppendorf - Reaktionsgefäße portioniert und gewogen. Abhängig vom Molekulargewicht der zu extrahierenden DNA wurden zum Lösen des Gels ≥ 300 µl QX_1 - Puffer / 100 mg Gel und ≥ 10 µl QX_2 - Suspension (enthält DNA – bindende Silikabeads) dazugegeben. Bei 50°C konnte so das Gel - wiederholt gut durchmischt - innerhalb von ca. 10 min vollständig aufgelöst werden. Um eine optimale DNA - Ausbeute (pH=8,5) zu gewährleisten, ist der QX_1 - Puffer zusätzlich mit einem pH - Indikator (gelb) versehen. Bei Farbumschlag der Suspension vom Gelblichen ins Rötliche war deshalb titrierend mit 3 M NaAc (pH=5,2) entsprechend zu korrigieren.
Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die gewonnene DNA, gebunden an die Silikabeads, einmal mit 500 µl QX_1 - Puffer, sowie zweimal mit je 500µl PE-Puffer gewaschen. In dem getrockneten Pellet (15 min unter der Vakuum-Glocke) konnte die gewünschte DNA mit 20µl *aqua bidest* oder aber mit 20µl TE (pH 8,5) gelöst werden. Dies geschah, je nach Größe der DNA, bei Raumtemperatur oder bei 50°C (DNA > 5 kb) für die Dauer von 15 min. Erneutes, kurzes Zentrifugieren trennte schließlich die restlichen Silikabeads von der gelösten DNA im Überstand, welcher vorsichtig in ein neues 1,5 ml - Eppendorf - Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Um die Ausbeute der so gewonnenen DNA abschätzen zu können, wurden etwa 1 bis 2 µl der Probe auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.13. DNA - Präzipitation

Die zu präzipitierende DNA wurde zunächst phenolisiert (siehe 2.2.5.). Nach Zugabe von 0,2 Vol. 3M Natrium - Acetat und von 0,6 Vol. Isopropanol wurde jeweils gut gemischt. Jedem Ansatz wurde 1µl Glykogen (1ml/µl) hinzugefügt - dadurch lassen sich auch kleine

© Benzing J, 2000

Mengen DNA besser fällen. Die solchermaßen vorbehandelte DNA wurde für 15 - 30 min bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugation (20.000 x g) bei 4°C für eine Dauer von 30 min, wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit jeweils 100 - 200µl 70% Ethanol (-20°C kalt) gewaschen und abschließend unter Vakuum für 5 - 10 min getrocknet. Die auf diese Weise präzipitierte DNA konnte in sterilem *aqua bidest* (längere Haltbarkeit nur bei - 20°C), oder aber in 10 mM Tris/HCl (0,1 mM EDTA, pH 7,0 bis 8,5) gelöst werden - dies geschah bei Raumtemperatur, oder bei 50°C (Molekulargewicht >5 kb).

2.2.14. Orientierungskontrolle von Plasmid - Inserts

Besitzt ein DNA - Insert identische Schnittstellen an seinem 3'- und 5'- Ende, so kann es nach Ligation prinzipiell in zwei verschiedenen Richtungen orientiert sein. Für Konstrukte jedoch, die später etwa der intrazellulären Proteinexpression dienen sollen, ist die richtige Orientierung von entscheidender Bedeutung.
Zur Orientierungskontrolle werden Vektor und Insert mit einer anderen Restriktionsendonuklease behandelt, als derjenigen, die ursprünglich zum Klonieren verwendet wurde. Das Enzym sollte das Insert hierbei möglichst asymmetrisch schneiden, so dass das Produkt des Verdaus, je nach Orientierung (A oder B) des Inserts, entsprechend unterschiedlich große Fragmente ergibt (siehe Abbildung 5).

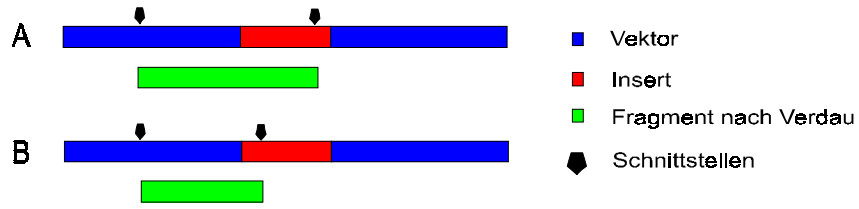


Abbildung 5: Orientierungskontrolle eines DNA - Inserts

2.2.15. DNA - Sequenzanalysen

Um die Sequenz spezifischer DNA - Abschnitte exakt bestimmen zu können, bedienten wir uns der enzymatischen Didesoxymethode nach SANGER *et al.* (1977). Die zu analysierende DNA liegt hierbei als einzelsträngige Matrize vor und eine DNA –

© Benzing J, 2000

Polymerase synthetisiert den neuen DNA–Strang. Zusätzlich zu ^{35}S-markierten Nukleotiden (dNTP's) enthält der Ansatz jedoch sogenannte Didesoxynukleotide (ddNTP's), die in der Lage sind, einerseits an ihrem 5' – Ende Phosphodiesterbrücken zum vorangehenden Nukleotid auszubilden und andererseits die Polymerasereaktion zu limitieren, da ihrem 3' – Ende die entscheidende Hydroxylgruppe zur Kettenverlängerung fehlt. Die Sequenzierung wird in vier parallelen, basenspezifischen Reaktionen mit Hilfe eines Oligonukleotidprimers durchgeführt, der komplementär ist zum 3'- oder 5'- Ende der DNA–Matrize. Diese Sequenzreaktionen wurden anschließend mittels Elektrophorese auf einem denaturierendem (Harnstoff) Acrylamidgel aufgetrennt und autoradiografisch sichtbar gemacht. Damit wird die exakte Basenabfolge solcher definierter Einzelstrang - DNA - Kopien als DNA - Sequenz lesbar.
Alternativ kamen mit Fluoreszenzfarbstoff markierte dNTP's (WILSON *et al.* 1990) zum Einsatz: Das Lesen der vier Sequenzreaktionen geschieht hierbei mit Hilfe eines Lasers in einem computergesteuerten Sequenzierautomat (ALFexpress, *Pharmacia*). Das Computerprogramm *BLAST* (ALTSCHUL *et al.* 1997) ermöglichte uns schließlich die gelesenen DNA-Sequenzen online mit eventuell bekannten Sequenzen in der Gen-Datenbank des NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH zu vergleichen.

2.2.16. Einfrieren von Bakterienkulturen

Um wichtige Plasmide bzw. Konstrukte in Bakterien über einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können, wurden entsprechende Übernachtkulturen im Verhältnis 9 : 1 mit 10 x HFM gut durchmischt und in sterilen Kryoröhrchen (*Greiner*) bei - 70°C eingefroren.

10 x Hogness modified freezing medium:
(10 x HFM)

6,30 g	K_2HPO_4
0,45 g	Na - Citrat
0,09 g	$MgSO_4$
0,90 g	$(NH_4)_2SO_4$
1,80 g	KH_2PO_4
44,00 g	Glycerol
ad 100 ml	*aqua bidest*
	autoklaviert bei 125°C

© Benzing J, 2000

2.3. Methoden im Two-Hybrid-System

2.3.1. Herstellung kompetenter Hefezellen

Um Hefezellen möglichst effizient transformieren zu können, müssen diese zunächst in ausreichender Zelldichte zur Verfügung stehen und sich in der mittleren *log* - Phase ihres Wachstums befinden. Mit Hilfe der sogenannten Lithium-Acetat-Polyethylenglycol-Methode (KLEBE *et al.* 1983; ITO 1983; GIETZ & SCHIESTL 1995) gelingt es, gewünschte DNA-Konstrukte in diese kompetenten Hefezellen einzuschleusen.

PEG 3350:	*für 50ml:*	**LATE:**	*für 50ml:*
	40ml 50% P.E.G. 4000		40ml aqua bidest
	+ 5ml 10x LiAc (pH 7,5)		+ 5ml 10x LiAc (pH 7,5)
	+ 5 ml 10x TE-Puffer		+ 5 ml 10x TE-Puffer
	→ *steril filtriert*		

Fünf Einzelkolonien der jeweiligen Hefe wurden in 1ml Vollmedium (=YPD) bzw. in 1ml des kompatiblen Selektionsmediums inokuliert und zum Wachsen über Nacht bei 260 - 300 U/min im Inkubator (30°C) - bei ausreichender Belüftung - geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die beiden homogensten dieser Kulturen (OD_{600} = $^{+}/_{-}$ 1 bis 1,5) in je 12 ml Gesamtvolumen desselben Mediums wie am Vortag verdünnt, um am dritten Tag erneut verdünnt zu werden: diesmal in 50-100 ml Medium auf die sogenannte Start-$OD_{\lambda=600nm}$ von 0,18 bis 0,25. Unter gleichen Wachstumsbedingungen wurde so die mittlere *log* - Phase ($OD_{\lambda=600nm}$ von 0,5 bis 0,8 entsprechend ca. 15 x 10^6 Hefezellen) nach 4 bis 6 h erreicht. Die solchermaßen gewachsenen Hefezellen wurden für 3 min in sterilen 50ml-Falcons™ abzentrifugiert (2300 rpm; 4° C) und die Pellets zweimal mit jeweils 20ml sterilem *aqua bidest* und einmal mit jeweils 20ml sterilem LATE gewaschen, der Überstand konnte verworfen werden. Abschließend wurden die Zellen möglichst vorsichtig (pipettierend, jedoch keinesfalls per Vortexer) in 1,2ml LATE resuspendiert. Gelagert bei 4°C blieben die Hefezellen bis zu 8 Tagen kompetent.

Um allerdings möglichst hohe Transformationseffizienz, etwa beim Screenen von cDNA-Bibliotheken, zu erreichen, verwendeten wir frisch kompetente Zellen.

© Benzing J, 2000

2.3.2. Vorbereitung geeigneter Carrier - DNA

Erst durch Verwendung denaturierter Carrier - DNA von großem Molekulargewicht läßt sich eine hohe Transformationseffizienz erreichen (SCHIESTL & GIETZ 1989).

Salmon testes DNA (D-1626, *Sigma*) wurde in 1 x TE Puffer (pH 8,0) in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Dies geschah meist über Nacht bei 4°C, unter leichtem Schwenken (Rotator Drive STR4, *Stuart Scientific*). Um das Molekulargewicht der DNA a primo zu bestimmen, wurde 1 µg davon auf ein Agarosegel (0,6%), beispielsweise gegen λ - HindIII aufgetragen. Als ideal für eine möglichst hohe, resultierende Transformationseffizienz wird eine Größenverteilung der Carrier - DNA zwischen 2 und 15 kb angesehen, wobei der mengenmäßig größte Anteil bei ≈ 7 kb liegen sollte (siehe 3.3.4.). Bei Bedarf wurde die Probe solange sonifiziert (Sonicator Cell Disruptor, *Ultrasonics*) bis sie die gewünschte Größe aufwies. Nach 1:1 Phenol / Chloroform - Extraktion (gesättigt in 10 mM Tris, pH 7,5 - 8,0; 1 mM EDTA) wurde die DNA mit 0,1 Vol 3 M Natrium - Acetat (pH 5,2) und mit 2,5 Vol eiskaltem 100% Ethanol präzipitiert. Das durch Zentrifugation gewonnene Pellet war in 1 x TE - Puffer bis zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml zu resuspendieren. Abschließend wurde die so vorbereitete Carrier - DNA für etwa 5 min bei 95°C denaturiert, kurz im Eisbad gekühlt und auf Einzelportionen à 200 µg aufgeteilt. Die Proben wurden bei - 20°C gelagert.
Seit einiger Zeit kann die für Transformation von Hefen geeignete Carrier - DNA auch kommerziell bezogen werden (K 1606-A, *Clontech*): Diese besitzt bereits bei Lieferung die gewünschte molekulare Größenverteilung, ist aufgereinigt und denaturiert.

2.3.3. Transformation von Hefezellen

Voraussetzung für die erfolgreiche Transformation von Hefezellen ist erneut, dass diese in ausreichender Zelldichte (ca. 15 x 10^6 Hefezellen) vorliegen und sich in der in der mittleren *log* - Phase ihres Wachstums befinden: Durch Behandlung mit Lithium-Acetat und Polyethylenglycol werden sie schließlich “kompetent”, die gewünschten DNA-Konstrukte aufzunehmen (BEGGS 1978; KLEBE *et al.* 1983; ITO 1983; GIETZ & SCHIESTL 1995). Die Transformation von Hefezellen läßt sich durch den Einsatz von DMSO (siehe 3.5.2.) zusätzlich unterstützen (HILL *et al.* 1991). Offensichtlich können darüber hinaus ein kurzer

© Benzing J, 2000

Temperaturschock von 42°C, sowie die Hefe - RNA selbst fördernden Einfluß auf diesen Prozeß nehmen (GIETZ & SCHIESTL 1995).

(Frisch) kompetente Hefezellen (in *sterilem* 50 ml Falcon) wurden zunächst in einem 30°C-Wasserbad für 15 min inkubiert und dabei langsam schüttelnd (130 U/min) in Suspension gehalten. In der Zwischenzeit wurde geeignete Carrier-DNA (siehe 2.3.2) erst 15 min lang bei 95°C denaturiert, danach kurz (1 min) auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Für jede geplante Transformation/Kotransformation, sowie die notwendigen Kontrollen war im Folgenden jeweils ein eigenes, steriles 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen bereitzustellen: Zu je 5 µl Carrier-DNA (≈ 50 µg) wurden bei Transformationen 2 µg des gewünschten Plasmids, sowie bei Cotransfektionen außerdem 2 µg des entsprechenden zweiten Plasmids pipettiert - vorsichtig durchmischt mit 50 µl der kompetenten Hefezellen. Es folgte eine Inkubation von 10 min Dauer im 30°C - Thermoblock, bevor die Transformation mit jeweils 350 µl P.E.G. 3350 pipettierend durchmischt und für 45 min bei 30°C geschüttelt wurde (200 U/min). Nach Zugabe von je 40 µl DMSO (= 10% des Volumens) und Durchmischung, erfolgte ein 15-minütiger Temperaturschock im 42°C-Wasserbad - anschließend Abkühlen auf Eis für etwa 1 min. Nach Pelletierung (4000 U/min; 2 min) - die Überstände (v.a. P.E.G.) wurden verworfen - mußten die Transformationsansätze in je 3ml adäquatem Selektionsmedium resuspendiert werden.
Optional wurde den Hefezellen vor dem Ausplattieren (100 - 500 µl auf entsprechenden Selektionsagar) eine gewisse Erholungszeit gewährt: erneute Inkubation für 1 bis 2 Stunden im Schüttler (30°C; 300 U/min).
Nach etwa 2 bis 3 Tagen Inkubation im 30°C-Brutschrank konnte, bei makroskopisch sichtbarem Wachstum der Hefen die etwaige β-Galaktosidaseaktivität der transformierten Hefeklone qualitativ bestimmt werden (siehe 2.3.4.). Dieser sogenannte X-Gal-Asay war jedoch möglichst durchzuführen, bevor die Aminosäure Adenin im Agar aufgebraucht war und die Hefezellen sich deshalb rötlich färbten; denn diese an Substratmangel leidenden Zellen - sogenannte *ade2*-Mutanten (siehe 3.3.2.) - eigneten sich nur noch eingeschränkt für den X-Gal-Assay.

© Benzing J, 2000

2.3.4. Qualitative Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität

Nach der *"freeze and thaw"*- Methode von SCHNEIDER *et al.* (1996) lassen sich Hefezellwände in flüssigem Stickstoff schnell und effektiv lysieren, wodurch eine qualitative Bestimmung ihrer β-Galaktosidaseaktivität möglich wird. Aufgrund seiner hohen Sensitivität bietet sich hier X-Gal (*Carl Roth GmbH & Co*) als Substrat für die β-Galaktosidase an. Deshalb wird in der Literatur auch oft vom "X-Gal-Assay" gesprochen.

Mit Hilfe einer sterilen Impföse wurden zu untersuchende Hefeklone auf einen Whatman–Filter (∅ 90mm bzw. ∅ 125mm) übertragen, welcher wiederum auf einer entsprechendem Selektionsagarplatte lag. Um Kontamination durch Bakterien oder durch Schimmelpilze zu vermeiden waren diese Filter unmittelbar vorher von beiden Seiten jeweils für 2 min mit UV-Licht bestrahlt worden (UV-Stratalinker 2400, *Stratagene*). Nach ausreichendem Aufwachsen der Hefen im Brutschrank bei 30°C wurde der X-Gal-Assay durchgeführt:

1 x Z - Puffer:	10,68 g/l	Na_2HPO_4 x $2H_2O$
	5,5 g/l	NaH_2PO_4 x H_2O
	0,75 g/l	KCl
	0,246 g/l	$MgSO_4$ x $7H_2O$
		pH 7,0 – *autoklavieren*
X - Gal Stocklösung:	100 mg/ml	X-Gal, gelöst in DMF, sterilfiltriert, lichtgeschützt bei -20°C gelagert

Hierzu wurde der Filter mit einer Pinzette von der Platte abgehoben, für etwa 1 min vollständig in flüssigen Stickstoff getaucht und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde der Filter (mit den Kolonien nach oben) auf einem weiteren, mit X-Gal und Z-Puffer getränkten Whatman - Filter in einer Petrischale plaziert, möglichst ohne Luftblasen dazwischen einzuschließen. Die Mischung von X-Gal, Z-Puffer und β-Mercaptoethanol war jedes Mal erst kurz vor Gebrauch hergestellt worden: X-Gal - Lösung wurde dazu 1:100 in Z-Puffer verdünnt und mit 2,7 µl β-Mercaptoethanol /ml versetzt. Im X-Gal-Assay genügten für kleine Whatman - Filter (∅ 90mm) jeweils 3 ml, für große Filter (∅ 125mm) je 5 ml von dieser Lösung. Mit Parafilm versiegelt - um übermäßige Verflüchtigung zu vermeiden - wurden die beiden Filter für bis zu 8 h bei 30°C inkubiert und anschließend bei 80°C für etwa 30 min getrocknet.

© Benzing J, 2000

Alternativ konnten Hefekolonien direkt im sogenannten "*filter lift assay*" (BREEDEN & NASMYTH 1985) auf ihre β-Galaktosidaseaktivität hin analysiert werden. Ein ebenfalls vorbestrahlter Whatman – Filter (s.o.) wurde hierzu auf die Originalkolonien gelegt und seine Position mit einer sterilen Kanüle mehrfach markiert. Mit dem vorsichtig abgehobenen Filter wurde dann der oben beschriebene X-Gal-Assay durchgeführt. Die „Mutterplatte" wurde über Nacht erneut bei 30°C im Brutschrank inkubiert, um ein Wiederanwachsen der Originalkolonien zu gewährleisten.

2.3.5. Screening von cDNA - Bibliotheken

Um mit Hilfe des Two Hybrid Systems ganze cDNA-Bibliotheken nach potentiellen Interaktionspartnern eines bereits bekannten Proteins zu durchmustern, bedarf es folgender Vorbereitungen:
In einem vorangehenden Transformationsschritt wurde zunächst der Hefestamm mit dem interessierenden Plasmid prätransformiert (siehe 2.3.3.): Für das hierbei exprimierte Zielprotein sollten in cDNA-Bibliotheken intrazelluläre Bindungspartner gesucht werden; in der vorliegenden Arbeit für UFO bzw. für MET, beide kloniert in einen Expressionsvektor der *binding domain* (pGBT9 oder pAS2). Das macht im weiteren Verlauf jedoch kontinuierlichen Selektionsdruck (hier in DOB^{-T} Medium) erforderlich, denn nur so kann gewährleistet werden, dass diese prätransformierten Hefekulturen auch weiterhin dieses gewünschte Konstrukt (=*bait plasmid*) enthalten. Die Richtigkeit der Proteinexpression dieser Klone muß bereits im Vorfeld auf DNA - bzw. Proteinebene (durch Sequenzanalysen, siehe 2.2.15. bzw. durch Westernblot, siehe 2.4.2.) überprüft werden.

Zur Abschätzung der zu erwartenden Transformationseffizienz der jeweiligen cDNA-Bibliothek ist es schließlich sinnvoll, diese anhand weniger Einzeltransformationen mit kompetenten, prätransformierten (mit *bait plasmid*) Hefezellen zu titrieren: Wir hatten für eine solche Titration jeweils unterschiedliche Mengen der Bibliothek (0,5µg, 1µg, 2µg, 5µg und 10µg) eingesetzt und sind gemäß Abschnitt 2.3.3. verfahren – ausplattiert wurden jedoch lediglich Bruchteile (10^{-3} und 10^{-4}) der betreffenden Transformation. Nach etwa 2 bis 3 Tagen Inkubation im 30°C- Brutschrank wurden die gewachsenen *n* Kolonien gezählt

© Benzing J, 2000

und die Effizienz ε für die eingesetzte Menge cDNA - Bibliothek bestimmt. Unter Beachtung der Tatsache, dass unsere Gesamtscreens einer Bibliothek später aus 15 Einzeltransformationen bestehen würden, ergab sich daraus die zu erwartende potentielle Effizienz ε_p für jene Menge an eingesetzter cDNA - Bibliothek:

$$\varepsilon_p = n \times 10^4 \times 15 \qquad \text{[für die } 10^{-4} \text{ - Verdünnung]}$$

Fünf Einzelkolonien eines solchen prätransformierten Hefeklons wurden in 1ml kompatiblem Selektionsmedium (DOB^{-T}) inokuliert und zum Wachsen über Nacht bei 260 - 300 U/min im Inkubator (30°C) - bei ausreichender Belüftung - geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die beiden homogensten dieser Kulturen (OD_{600} = $^{+}/_{-}$ 1 bis 1,5) in je 12 ml Gesamtvolumen desselben Selektionsmediums wie am Vortag verdünnt, um am dritten Tag erneut verdünnt zu werden: diesmal in 100 ml Medium auf die sogenannte "Start-$OD_{\lambda=600nm}$" von 0,18 bis 0,25. Unter gleichen Wachstumsbedingungen wurde so die mittlere *log* - Phase ($OD_{\lambda=600nm}$ von 0,5 bis 0,8 entsprechend ca. 15 x 10^6 Hefezellen) nach 5 bis 8 h erreicht - deutlich verbesserte Belüftung der Hefekulturen konnte hierbei mit sogenannten Schikanekolben erzielt werden (siehe 3.3.1.). Die solchermaßen gewachsenen Hefenkulturen wurden für 3 min in sterilen 50ml-Falcons sedimentiert (2300 U/min; 4° C) und die resultierenden Pellets zweimal mit jeweils 20 ml sterilem *aqua bidest* , sowie einmal mit jeweils 20 ml sterilem LATE gewaschen, der Überstand konnte verworfen werden. Abschließend wurden die Zellen möglichst vorsichtig (pipettierend, jedoch keinesfalls mit einem Vortexer) in 1,2ml LATE resuspendiert.. Nun waren diese prätransformierten Hefezellen "kompetent" und wurden in einem 30°C-Wasserbad für 15min inkubiert und dabei langsam schüttelnd (130 U/min) in Suspension gehalten. In der Zwischenzeit wurde geeignete Carrier-DNA (siehe 2.3.2) erst 15 min lang bei 95°C denaturiert, danach kurz (1 min) auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert.

Für jeden Gesamtscreen pipettierten wir zunächst 15 Einzeltransformationen (cDNA-Bibliothek + prätransformierte Hefezellen) in bereitgestellte sterile 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen: Die notwendige Menge an einzusetzender cDNA-Bibliothek - ermittelt in einem gesonderten Vorversuch (siehe auch 3.5.1.) - wurde zu jeweils 10 µl Carrier-DNA (≈ 100 µg), sowie zu 100 µl kompetenten Hefezellen pipettiert und vorsichtig durchmischt. Es folgte eine Inkubation von 10 min Dauer im 30°C - Thermoblock, bevor die

© Benzing J, 2000

Transformation mit jeweils 700 µl P.E.G. 3350 pipettierend durchmischt und für 45 min bei 30°C geschüttelt wurde (200 U/min).

Nach Zugabe von je 80 µl DMSO (= 10% des Volumens) und Durchmischung, erfolgte ein 15-minütiger Temperaturschock im 42°C-Wasserbad, dabei konnte leichtes Schwenken des Transformationsansatzes die Effizienz deutlich verbessern - anschließend Abkühlen auf Eis für etwa 1 min. Nach Pelletierung (4000 U/min; 2 min) - die Überstände (v.a. P.E.G.) konnten werden verworfen - wurden alle Einzeltransformationen der Bibliothek gemeinsam in insgesamt 100 ml Selektionsmedium DOB^{-LTH} resuspendiert. Anschließend wurde den Hefezellen vor dem Ausplattieren eine Erholungszeit von 2-3 Stunden gewährt: Inkubation im 500ml-Erlenmeier - Kolben bei 30°C im Schüttler (300 U/min). In der Zwischenzeit konnten die benötigten Selektionsagarplatten (DOB^{-LTH}) aufgedeckt im 30°-Brutschrank für ca. 1 Stunde trocknen. Zur Kontrolle der Effizienz ε des durchgeführten Sceens wurden der 100ml-Kultur 10µl entnommen und mit etwas DOB^{-LT} Medium auf eine DOB^{-LT} Agarplatte ausplattiert: nach etwa 2 bis 3 Tagen Inkubation im 30°C-Brutschrank konnten *n* Kolonien gezählt werden:

$$\varepsilon = n \times 10^4$$ [ε = Transformanten der cDNA-Bibliothek]

Wünschenswert waren hierbei solche Transformationseffizienzen von $\varepsilon > 10^6$ oder mehr. Der Rest der 100ml-Kultur der transformierten Bibliothek wurde à 2 ml auf DOB^{-LTH} Agarplatten verteilt: Dabei hatten sich große Petrischalen (145/20 mm, *Greiner*) bewährt, da hier eine Differenzierung einzelner Kolonien makroskopisch leichter gelingt. Bei Verwendung des Hefestamms HF7c mußten die Agarplatten zusätzlich 25-50 mM 3-AT enthalten, um das mögliches Wachstum falsch positiver "Transformanten" zu unterdrücken (siehe 4.4.).

Nach 6 bis 10 Tagen Inkubation im 30°C-Brutschrank wurden gut angewachsene Kolonien (∅ > 2mm) mit einer sterilen Impföse aufgepickt und auf eine frische Platte mit Selektionsagar (DOB^{-LTH}) übertragen. Kolonien dieser sogenannten "Mutterplatte" wurden im Hinblick auf ihre β-Galaktosidaseaktivität (siehe 2.3.4.) untersucht, die DNA hierbei positiver (=blauer) Klone für weitere Analysen extrahiert (siehe 2.3.6.).

Die in dieser Arbeit verwendeten diektional klonierten cDNA – Bibliotheken waren uns vom NEDERLANDS KANKER INSTITUUT (NKI) zur Verfügung gestellt (*rat embryo*) bzw. kommerziell von der Firma *Clontech* (*human fetal liver, thymus*) bezogen worden.

© Benzing J, 2000

2.3.6. Isolierung von Plasmid - DNA aus Hefen

Zur genaueren Charakterisierung (X-Gal -) positiver Hefeklone im Two-Hybrid-System war es notwendig, die Plasmid - DNA aus diesen Hefen zu isolieren. Dies erfolgte nach HOFFMAN & WINSTON (1987). Da sich die nach dieser Methode gewonnene DNA allerdings noch nicht für Restriktions- oder Sequenzanalysen eignete – sie enthielt noch genomische Hefe – DNA - folgte auf diesen Zwischenschritt die Elektroporation (siehe 2.3.8.) mit einer abschließenden Standardpräparation der Plasmid - DNA jener (elektroporierter) Bakterien.

Yeast Lysis Solution
2 % Triton X-100
1 % SDS
100 mM NaCl
10 mM Tris (pH 8,0)
1,0 mM EDTA

Eine Einzelkolonie des jeweiligen Hefeklons wurde in 2 ml adäquatem Medium angeimpft und über Nacht im 30°- Schüttler inkubiert (250 – 300 U/min). Am folgenden Tag wurden die Zellen der Hefekultur in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen abzentrifugiert (2min; 5000 U/min), der Überstand verworfen und das Pellet mit Hilfe eines Vortexers resuspendiert. Es folgte die Zugabe von je 200µl *Yeast Lyis Solution* (s.o.), 200µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), sowie ca. 300µg *glassbeads* (G-8772, *Sigma*). Optimale Durchmischung erfolgte wiederum mit einem Vortexer für die Dauer von 2 min. Der durch erneutes Abzentrifugieren gewonnene Überstand wurde jeweils in sterile 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Die enthaltene DNA wurde zunächst bei –70°C für 20 min eingefroren und anschließend in 0,1 Vol. 3M NaAc und 2,5 Vol. 100% Ethanol präzipitiert. Das zurückbleibende DNA-Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 20 bis 25 µl *aqua bidest* gelöst.

2.3.7. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Voraussetzung für erfolgreiche Elektroporation von Bakterien ist das Kultivieren entsprechend kompetenter Bakterien. Wir verwendeten den Bakterienstamm HB101 und bedienten uns der Methode nach LEE & CHANG (1994), sowie nach SIGURET und

© Benzing J, 2000

Mitarbeitern (1994). Der Bakterienstamm HB101 ist auxotroph für Leucin und lässt so eine einfache Selektion der *activating domain* - Plasmide zu.

Zunächst wurde 1 ml einer Übernachtkultur des Bakterienstammes HB101 in 100 ml LB - Medium (*ohne* Ampicillin) angeimpft und bei 37°C unter kräftigem Schütteln (250 U/min) inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 - 0,6 (innerhalb von etwa 2 - 3 h) wurden die Bakterien bei 4°C pelletiert (4000 U/min; 15 min), auf Eis gestellt und zweimal mit eiskaltem 10% Glycerol gewaschen. Letzteres eignet sich einerseits gut als Medium für die Elektroporation und vermag andererseits die kompetenten Bakterien vor Gefrierschäden zu schützen.

GYT - Medium: 10% Glycerol
0,125% Hefeextrakt
0,25% Trypton

Abschließend wurden die Bakterienzellen in etwa 200 µl GYT - Medium (TUNG & CHOW 1995) resuspendiert, aliquotiert (à 40 µl) und umgehend bei -70°C eingefroren; sie waren so mindestens für 6 Monate haltbar und elektrokompetent.
Erst kurz vor Gebrauch wurde die jeweils benötigte Menge an Einzelportionen dieser kompetenten BH101 - Bakterien in einem Eisbad aufgetaut und bis zur eigentlichen Elektroporation auch auf Eis belassen.

2.3.8. Elektroporation

Mit Hilfe dieser effektiven Methode werden dafür geeignete, kompetente Bakterienzellen (hier: HB101) mit der gewünschten Plasmid - DNA gemischt, einem Stromstoß großer elektrischer Feldstärke ausgesetzt und so transformiert (DOWER *et al.* 1988). In der vorliegenden Arbeit geschah dies mit jener Plasmid - DNA, die vorher aus Hefezellen gewonnen worden war. Wir verwendeten dafür den E.coli Pulser Transformation Apparatus, (*BIORAD Laboratories, U.S.A.*). Die Einstellungen der elektrischen Parameter erfolgten präzise nach den Angaben des Herstellers.
Die gewünschte Anzahl Aliquots elektrokompetenter Bakterien (siehe 2.3.7.) wurde vorsichtig bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. Dort waren auch die

© Benzing J, 2000

speziellen, sterilen Elektroporationskuvetten und der Kammerschlitten vor Gebrauch zunächst für 5 bis 10 min zu kühlen. Von der Plasmid - DNA wurden 1 bis 2 µl zu jeweils 40 µl Bakterien pipettiert, gut durchmischt und erneut für etwa 1 min eisgekühlt. Bei der verwendeten DNA - Lösung war zu beachten, dass deren Salz- bzw. Ionenkonzentration nicht zu hoch sein durfte - wir haben hierbei die besten Erfahrungen mit in *aqua bidest* gelöster DNA gemacht. Die DNA - / Zellsuspension wurde vorsichtig in eine der kühlen Kuvetten transferiert, die in den Elektroporationsschlitten eingepaßt und zwischen die Elektroden geschoben wurde. Bei den von uns verwendeten Kuvetten (0,1 cm) war ein Spannungsimpuls von 1,80 kV zu applizieren, dessen Dauer vom Gerät - anhand des Gesamtwiderstandes - automatisch errechnet und gesteuert wurde. Sofort im Anschluß an die Elektroporation wurden die Bakterienzellen vorsichtig in warmem (37°C) 1 ml LB-Medium (+ 100µg/ml Ampicillin) resuspendiert, in ein 15 ml - PE - Röhrchen (*Greiner*) überführt und für 1 h im Inkubator (37°C) bei 225 U/min geschüttelt. Abschließend wurden 100 bis 500 µl der Bakterien auf M9 - Agar ausplattiert.
Am darauffolgenden Tag konnten Transformanten gepickt und, nach Plasmidpräparation, weitergehend untersucht werden: etwa in Restriktions - bzw. Sequenzanalysen.

2.3.9. Einfrieren von Hefezellen

Einzelkolonien eines zu verwahrenden Hefeklons wurden in 2 ml adäquatem Selektions- bzw. Vollmedium angeimpft und zum Wachsen über Nacht bei 260 - 300 U/min im Inkubator (30°C) - bei ausreichend Belüftung - geschüttelt. Am folgenden Tag konnten die Hefezellen, 1:1 mit autoklaviertem 50% Glycerol vermischt (25 % Endkonzentration), in sterilen Kryoröhrchen (*Greiner*) bei - 70° C eingefroren werden.

2.4. Proteinmethoden

2.4.1. Proteinextraktion aus Hefen

Eine Einzelkolonie entsprechend transformierter Hefezellen wurde in 10 ml Selektions - medium angeimpft und zum Wachsen über Nacht bei 260 - 300 U/min im Inkubator (30°C) - bei ausreichender Belüftung - geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die

© Benzing J, 2000

Hefezellen pelletiert (2200 U/min; 4°C) und mit eiskaltem 1 x TE - Puffer (0,1 M Tris - HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5) gewaschen. Das Resuspendieren des Pellets erfolgte mit Hilfe eines Vortexers in 1 ml 1 x TE - Puffer. Diese Zellsuspension wurde in 1,5 ml - Eppendorf Reaktionsgefäße portioniert und bei 14.000 U/min pelletiert, der Überstand abgenommen.

4 x Proben - Puffer:	200mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	8 %	SDS
	0,4 %	Bromphenolblau
	40 %	Glycerol
vor Gebrauch zum 1 x Puffer:	100mM	DTT

Das Pellet wurde resuspendiert (130 µl 1 x TE - Puffer, 50 µl 4 x Proben - Puffer, 20 µl DTT), für 10 min aufgekocht (95°C) und auf Eis abgekühlt. Diese Denaturierung hatte jedes Mal vor Gebrauch der Probe zu erfolgen.
Die Proteinextrakte konnten entweder direkt bei - 20°C oder, nach Zugabe von etwas Vollmedium, in Glycerol (25 % Endkonzentration) bei - 70°C eingefroren werden.

2.4.2. Westernblot - Analysen

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich spezifische Antigene durch mono- bzw. polyklonale Antikörper eindeutig identifizieren. Synonym findet sich daher in der Literatur häufig auch der Begriff Immunoblot (BURNETTE 1981). Proteinproben werden hierfür gelöst, elektrophoretisch nach molekularem Gewicht aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter übertragen (= Blotting). An die membran-gebundenen Proteine schließlich binden die verwendeten primären und sekundären Antikörper spezifisch, während unspezifische Bindungen der Antikörper durch Milchprotein blockiert werden (GILLESPIE *et al.* 1991; BRONSTEIN *et al.* 1992). In einem letzten Schritt können diese Antigen - Antikörperreaktionen radiographisch visualisiert werden.
Wir verwendeten bei unseren Versuchen Elektrophorese- und Blotkammer, sowie Zubehör der Firma *Hoefer*. Alle Glasplatten und Abstandshalter waren zuvor möglichst mit 70% Ethanol zu reinigen. Zunächst wurde die beiden Gele (s.o.) zur elektrophoretischen Auftrennung der interessierenden Proteine gegossen:

© Benzing J, 2000

[ml]	**10% Resolving Gel**	**5% Stacking Gel**
H_2O	4,0	2,1
Acrylamid 30%	3,3	0,5
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	--
1,0 M Tris (6,8)	--	0,38
10% SDS	0,1	0,03
Polymerisation:		
10% APS	0,1	0,03
TEMED	0,004	0,003

Auf das untere *resolving gel* wurde etwas Isobutanol gegeben. Nach Polymerisation wurde die Oberkante des Gels mit *aqua bidest* ausgespült. Darüber wurde das *stacking gel* gegossen und ein passender Kamm plaziert.

Laufpuffer: (*für 2,5 l*)
37.75g Tris
235g Glycin
62,5 ml 20% SDS
→ mit *aqua bidest* auf 2.5 *l* auffüllen

Nach Polymerisation (ca. 10 bis 20 min) auch des *stacking gel* konnte der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingepaßt werden. Letztere wurde mit etwa 800 ml Laufpuffer aufgefüllt. Die einzelnen Slots waren mit Laufpuffer gut auszuspülen. Größenmarker (z.B. SDS-7B, *Sigma*) und Proteinproben (in 1 x Probenpuffer) wurden bei 95°C für 10 min denaturiert und auf Eis gestellt, bevor 10 bis 30 µl davon in das Gel geladen werden konnten. Wegen der einfacheren Handhabung zwischen den sehr eng stehenden Glasplatten verwendeten wir zum Laden der Proben anstelle einer Pipette meist eine sogenannte *Hamilton* - Spritze.

Nach Anlegen einer Spannung von 150V an die vertikale Elektrophorese - Apparatur lief das Bromphenolblau des Probenpuffers nach ca. 1 Stunde unten aus dem Gel heraus: Die beiden Gele wurde aus der Apparatur entfernt und mit einem scharfen Skalpell getrennt – das *stacking gel* konnte verworfen werden. Das *resolving gel*, vier in Größe des *resolving gel* zugeschnittene Whatman - Filter, sowie eine ebenso große, Methanol - getränkte Blotmembran (*Schleicher & Schuell*) wurden wie folgt „sandwichartig“ in der Blotapparatur plaziert (Abbildung 6).

© Benzing J, 2000

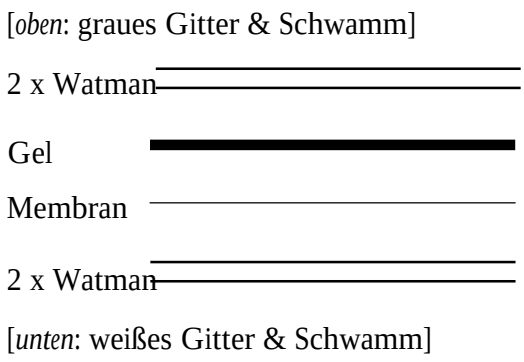


Abbildung 6: Aufbau eines Blot – "Sandwich"

Whatmanfilter und Schwämme waren zuvor in Transferpuffer getränkt und überschüssiger Puffer mit Hilfe einer darüber gerollten Pasteurpipette aus dem "Sandwich" entfernt worden.

Bei 100V angelegter Spannung konnte schließlich innerhalb von ca. 2 Stunden der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf die Membran im Kühlraum (4°C) erfolgen. Auf der zum Gel gerichteten Seite der Membran wurden die Banden des Größenmarkers mit Kugelschreiber markiert.

Die Membran wurde anschließend zum Blockieren in TSB/T-Puffer, 5% Magermilchpulver enthaltend, eingelegt und über Nacht im Kühlraum (4°C) langsam geschüttelt. Nach Zugabe des ersten, spezifischen Antikörpers (0,1 bis 0,2µg/ml TSB/T), leicht schüttelnd im Kühlraum (4°C) für 2 Stunden inkubiert, wurde die Blotmembran zweimal für 10 min in TBS/T-Puffer und anschließend zweimal für 5 min in TBS-Puffer gewaschen.

Vom zweiten Antikörpers wurde der Membran 1µg/ml TSB hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation von 1 Stunde, leicht schüttelnd im Kühlraum (4°C). Die Blotmembran wurde nunmehr zweimal für 10 min in TBS/T-Puffer und anschließend zweimal für 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Abschließend konnten die Antigen - Antikörperreaktionen mittels Chemo-Immuno-Lumineszenz autoradiographisch sichtbar gemacht werden.

Transferpuffer:

2.9g Glycin
5.8g Tris
3.7ml 10% SDS
200ml Methanol

→ mit *aqua bidest* auf 1 *l* auffüllen

© Benzing J, 2000

TSB-Puffer:	22g NaCl 25ml 1M Tris (pH 7.5) → mit *aqua bidest* auf 2,5 *l* auffüllen, auf pH 7,5 einstellen 5% BSA *erst kurz vor Gebrauch*
TSB/T-Puffer:	TSB-Puffer + 0.2% Tween20

Wir verwendeten hierfür den kommerziell zu beziehenden Kit ECL RPN 2106 der Firma *Amersham* und gingen gemäß der Instruktionen des Herstellers vor:
In der Dunkelkammer wurden je 3 ml von Lösungen A und B gemischt und die Blotmembran damit für etwa 1 min inkubiert: Durch Kopplung der sekundären Antikörper mit Meerettichperoxidase fand nunmehr eine Lichtreaktion bei Umsetzung von Luminol statt, die in Form schwarzer Banden auf einem Film (X-OMAT-AR, *Kodak*) autoradiografisch dokumentiert werden konnte. Die Lichtexposition variierte zwischen 30s und 15 min - auf ausreichende Markierung der Position der Blotmembran war zu achten.

© Benzing J, 2000

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung des Two-Hybrid-Systems für UFO und MET

3.1.1. Plasmide der DNA - bindenden Domäne (GAL4)

Für unsere Versuche im Two-Hybrid-System verwendeten wir überwiegend pGBT9 als Vektor der DNA – bindenden Domäne. Die Rezeptorkonstrukte *tpr-met* bzw. *tpr-ufo* klonierten wir zusätzlich in den Expressionsvektor pAS2. Durch das dominante *CHY2*-Allel ist dieser Vektor sensitiv für Cycloheximid und es gelingt so durch einen weiteren Selektionsschritt eher, beim Screening von cDNA Bibliotheken falsch positive Kolonien zu eliminieren – allerdings nur bei Verwendung des Hefestamms HF7c^{chy2}. Darüber hinaus bietet pAS2 den Vorteil möglicherweise höherer Proteinexpression (siehe 3.2.2.).

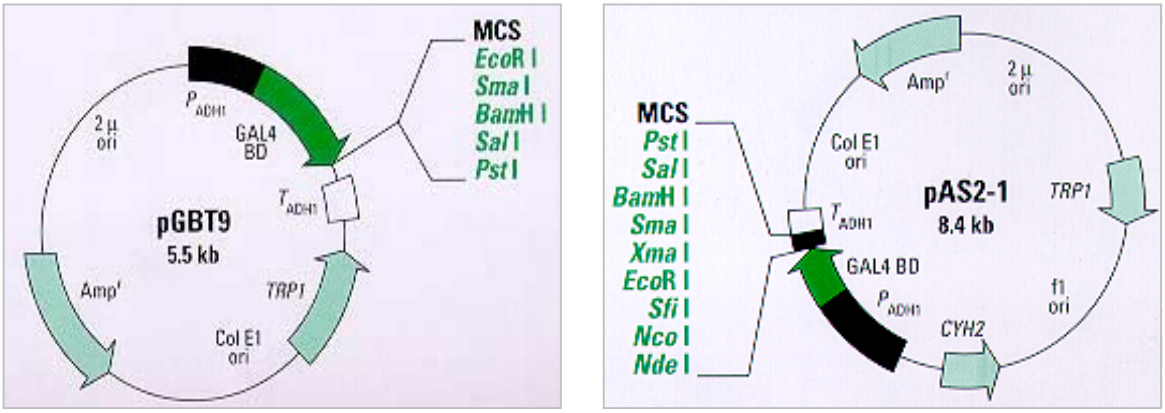


Abbildung 7 a,b: Vektorkarten von pGBT9 und pAS2 mit Schnittstellen der ***M****ultiple* ***C****loning* ***S****ite* (aus: *Clontech* Katalog 98/99)

T = transcription termination sequence

▲ = GAL4 nuclear localization signal

Zunächst wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) die gewünschten Plasmid Inserts amplifiziert. Diese enthielten bereits die passenden Restriktionsschnittstellen. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotid - Primer finden sich unter 2.1.4.6.

Um das Two-Hybrid-System später mittels zweier unabhängiger Konstrukte etablieren zu können, hatten wir als PCR – Matrize hierfür nicht nur den zytoplasmatischen Anteil (= *ufo3'*) der Rezeptortyrosinkinase UFO, sondern auch die beiden Fusionskonstrukte *tpr-ufo* und *tpr-met* gewählt. Die amplifizierten Inserts wurden wie folgt in die MCS (= ***m****ultiple* ***c****loning* ***s****ite*) des jeweiligen Vektors ligiert:

© Benzing J, 2000

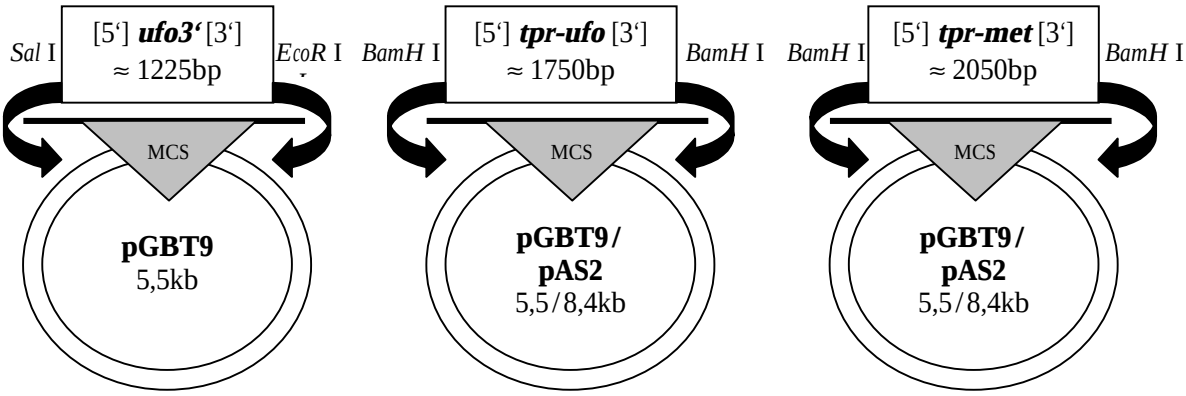


Abbildung 8: pGBT9 / pAS2 - Konstrukte der DNA – bindenden Domäne (GAL4)

Dazu waren die Vektoren vorher dephosphoryliert worden, um spontanes Religieren (ohne Insert) zu verhindern. Schließlich wurden mit den ligierten Plasmiden Bakterien transformiert und die hierbei positiven Klone durch Kolonie - Screening mittels einer radioaktiven Sonde für die erwünschte cDNA - Sequenz ermittelt. Zur Orientierungskontrolle jener Inserts mit identischer Schnittstelle am amino- und carboxyterminalen Ende erfolgte eine Restriktionsanalyse. Um eventuelle Punktmutationen und Verschiebungen des Leserahmens ausschließen zu können, wurden die Two-Hybrid-Konstrukte inklusive der Schnittstellen zwischen Vektor und Insert sequenziert.
Für die Versuche im Two-Hybrid-System erschien es uns günstig, diese überprüften Konstrukte in möglichst hohen DNA-Konzentrationen zur Verfügung zu haben. Deshalb fertigten wir entsprechende DNA-Maxipräparationen an.

3.1.2. Plasmide der Transkription - aktivierenden Domäne (GAL4)

Als Vektor der Transkription – aktivierenden Domäne diente uns pGAD424. In diesen Vektor wurden die kodierenden Sequenzabschnitte dreier bekannter Interaktionspartner der Rezeptortyrosinkinase UFO kloniert, um so bereits im Vorfeld die Sensitivität des Two-Hybrid-Systems bezüglich seiner Interaktion mit anderen Signalmediatoren zu überprüfen.

© Benzing J, 2000

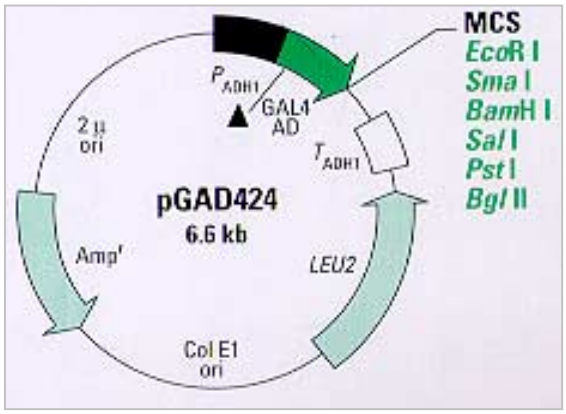


Abbildung 9: Vektorkarte von pGAD424 mit Schnittstellen der ***M****ultiple* ***C****loning* ***S****ite* (aus: *Clontech* Katalog 98/99)

T = transcription termination sequence

▲ = GAL4 nuclear localization signal

Wir wählten hierfür das Adapterprotein GRB2, die Phospholipase C-γ (= PLC-γ) und die α-Untereinheit der Phosphatinositol-3–Kinase, P85α (siehe Abbildung 10).

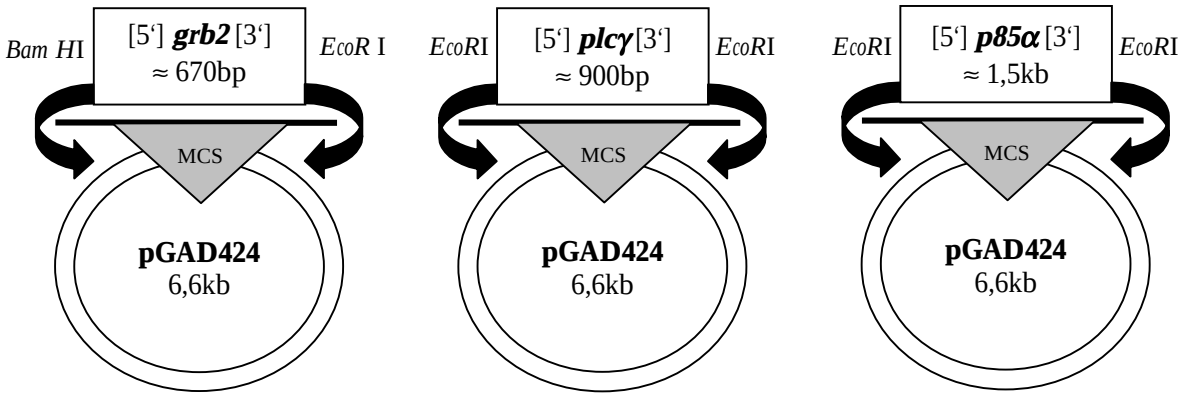


Abbildung 10: pGAD424 - Konstrukte der Transkription aktivierenden Domäne (GAL*4*)

Die Vorgehensweise für PCR-Amplifikation und Gelextraktion der gewünschten Inserts entsprach der oben für pGBT9 / pAS2 beschriebenen Strategie.

© Benzing J, 2000

3.1.3. Antikörpernachweis der DNA – bindenden Domänen der Rezeptorkonstrukte

Essentiell für die erfolgreiche Durchführung von Versuchen im Two-Hybrid-System ist die korrekte und quantitativ ausreichende Expression jener Proteine, die untersucht werden sollen.

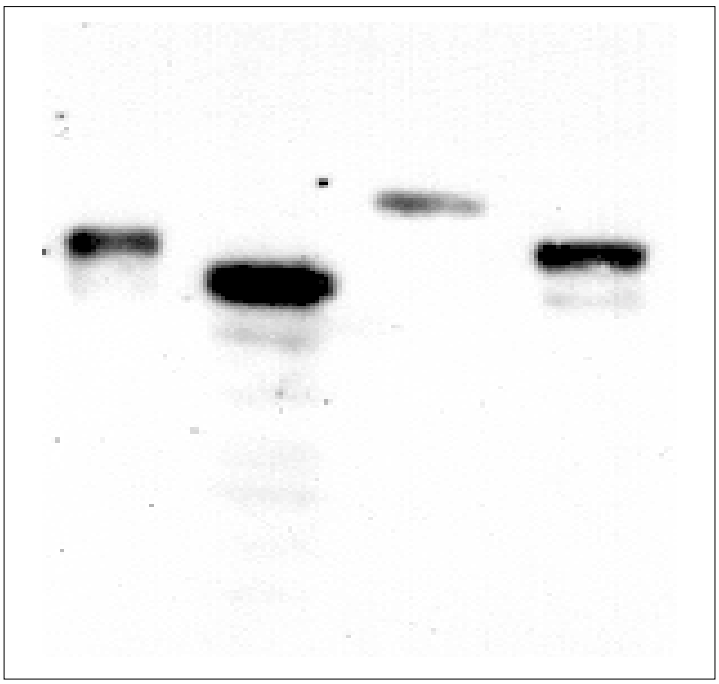


Abbildung 11: Antikörpernachweis von Fusionsprodukten der DNA – bindenden Domäne: pGBT9 [*tpr-met*]: 67kDa, pGBT9 [*ufo 3'*]: 54 kDa, pGBT9 [*tpr-ufo*]: 71 kDa und pAS2 [*tpr-met*]: 67kDa

Lösliche Proteinextrakte aus Hefezellen, die vorher mit den entsprechenden Konstrukten transformiert worden waren, wurden mittels Elektrophorese (8%-Gel) aufgetrennt und auf Blotmembranen transferiert. Unspezifischer Proteinhintergrund wurde mit 5% Carnation Pulver, 0,2 % Tween und PBS für 3 h blockiert. Wir inkubierten die Blotmembran 1 : 1000 mit dem monoklonalen Antikörper *GAL4 DNA-BD mAb* (*Clontech*), sowie 1: 1000 mit dem polyklonalen *Gout Anti Mouse* - Antikörper (*Santa Cruz*). Anschließend wurde zweimal

© Benzing J, 2000

mit PBST gewaschen. Nach Zugabe der ECL - Reagenzien wurde die Membran für etwa 30 s einem Film exponiert (siehe Abbildung 11).

Die DNA-bindenden Domänen aller drei Rezeptorkonstrukte konnten mit Hilfe des entsprechenden Antikörper (*GAL4 DNA-BD mAb*) erfolgreich nachgewiesen werden. Die quantitative Proteinexpression von TPR-MET durch die Vektoren pGBT9 und pAS2 war nahezu identisch.

3.1.4. (Auto-) Phosphorylierung der Rezeptorkonstrukte

Erst nach Aktivierung bzw. Phosphorylierung einer Rezeptortyrosinkinase ist die Bindung intrazellulärer Interaktionspartner möglich. Um das Ausmaß der (Auto-) Phosphorylierung der Two Hybrid Konstrukte pGBT9 [*ufo 3'*] bzw. pGBT9 [*tpr-ufo*] zu überprüfen, wurden α-Phosphotyrosin Blots durchgeführt (siehe Abbildung 12).

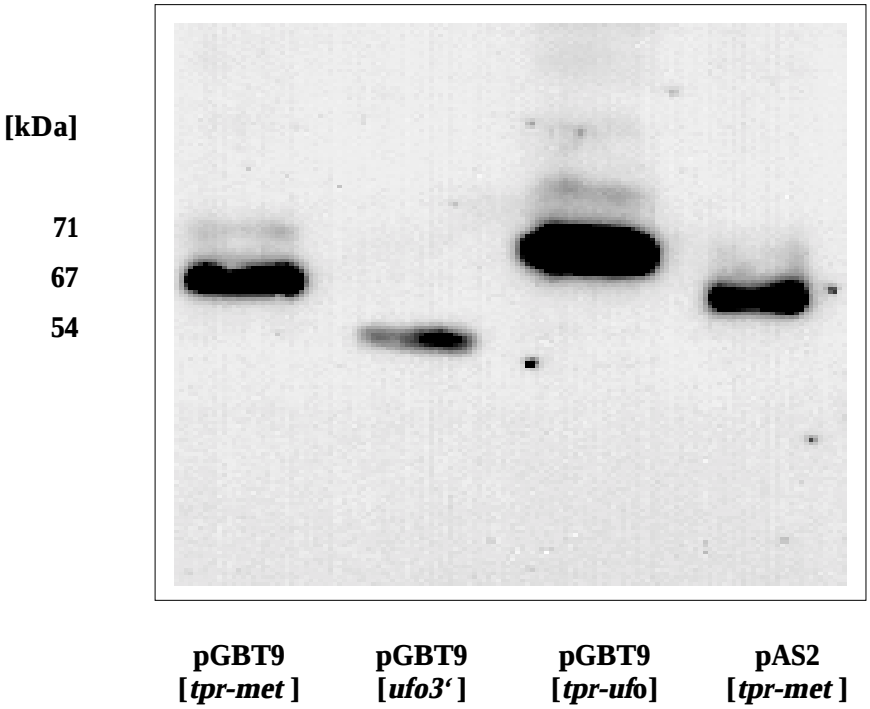


Abbildung 12: α-Phosphotyrosin Blot zum Nachweis der (Auto) Phosphorylierung von pGBT9 [*tpr-met*]: 67kDa, pGBT9 [*ufo 3'*]: 54 kDa, pGBT9 [*tpr-ufo*]: 71 kDa und pAS2 [*tpr-met*]: 67kDa

© Benzing J, 2000

Die Proteinextrakte der entsprechenden Konstrukte wurden mittels Elektrophorese aufgetrennt und auf Blotmembranen transferiert. Der unspezifische Proteinhintergrund wurde mit 5% Carnation Pulver, 0,2% Tween und PBS für 3 h geblockt.

Als Antikörper kamen 20 µg/ml *α-Phosphotyrosin pγ mouse* zum Einsatz. Anschließend wurde zweimal mit PBST gewaschen. Nach Zugabe der ECL - Reagenzien wurde die Membran für 30 s einem Film exponiert (siehe Abbildung 12). Hierbei zeigte das pGBT9 [*ufo 3'*] - Protein Autophosphorylierung. Die Phosphorylierung für das pGBT9 [*tpr-ufo*] - , das pGBT9 [*tpr-met*] - und das pAS2 [*tpr-met*] - Protein fiel deutlich stärker aus, was der Kinase aktivierenden Eigenschaft von *tpr* zuzuschreiben sein dürfte. Die quantitative Phosphorylierung von TPR-MET in den beiden Vektoren pGBT9 und pAS2 war identisch.

3.1.5. Einfluss von Kolbenform und -größe auf das Hefewachstum

Um dem hohen Sauerstoffbedarf wachsender Hefen Rechnung zu tragen, wurden Hefekulturen im Schüttler bei möglichst hohen Umdrehungszahlen von bis zu 300 U/min inkubiert - lediglich während der Transformationen wurde von dieser Regel abgesehen. Generell wurden für eine 10 ml Kultur große Kolben verwendet, etwa solche mit 300 ml Fassungsvermögen.

Zusätzlich stellte sich heraus, dass sogenannte Schikanekolben (Sonderanfertigung des Glasbläsers der Universität Heidelberg aus 2000 ml Kolben, *Fisher Scienrific GmbH*) einen positiven Effekt auf die Wachstumsbedingungen für Hefen haben mussten, wie folgender Versuch veranschaulicht: Von derselben Agarplatte wurden zwei Einzelkolonien des Hefestamms HY: pGBT9 [*ufo3'*] in je 100 ml Selektionsmedium (DOB $^{-T}$) als Übernachtkulturen angeimpft und bei 250 U/min geschüttelt. Dies geschah einmal in einem Kolben ohne und einmal in einem Kolben mit drei Schikanen. Beide Kolben hatten ein identisches Fassungsvermögen von 2000 ml. Am nächsten Tag wurde mikroskopisch (Zählkammer) die Zelldichte einer Verdünnung (1 : 10.000) in zwei unabhängigen Messungen bestimmt (Abbildung 13).

© Benzing J, 2000

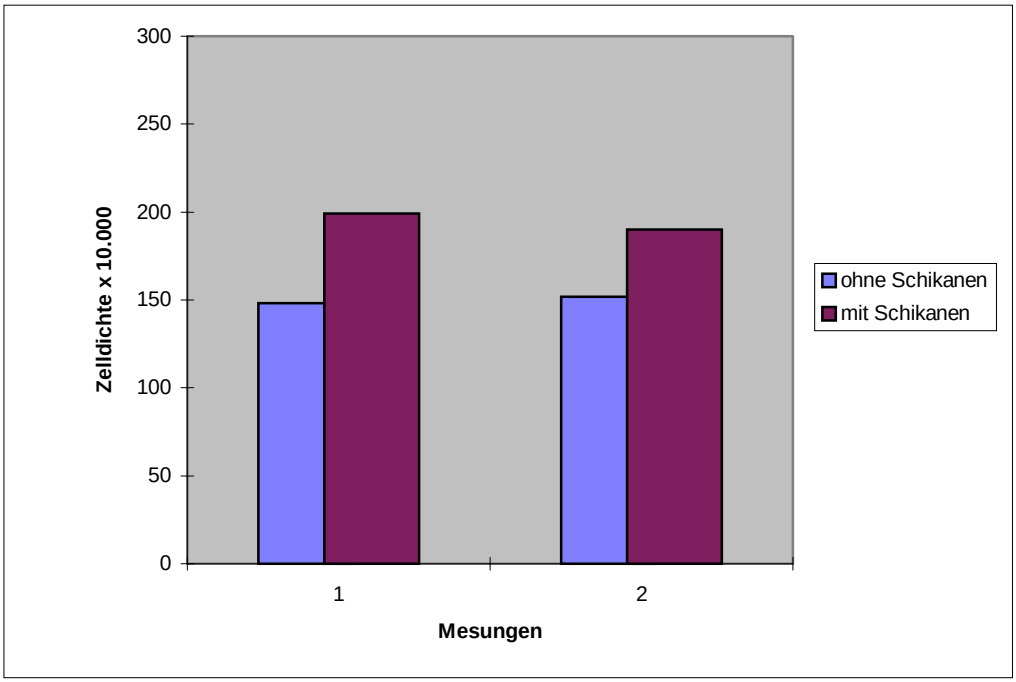


Abbildung 13: Zelldichte von Hefekulturen bei Wachstum in Kolben mit / ohne Schikanen

Die Hefekultur in Schikanekolben waren um etwa 25 bis 34 % dichter gewachsen, als diejenige in Kolben ohne Schikanen. Aus diesem verwandten wir nach Möglichkeit ausschließlich Schikanekolben für unsere Hefekulturen.

3.1.6. *ade2* - Mutanten bei Adeninmangel

Bei der Kultur von Hefezellen stellte sich heraus, dass sich deren Kolonien nach einer bestimmten Zeit rötlich verfärbten (siehe Abbildungen 14 a und b). Dabei geschah dieser Farbumschlag um so schneller, je größer die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen war: Hefen in Vollmedium etwa waren früher davon betroffen als mit Plasmid-DNA transformierte Hefezellen, die unter Selektionsdruck wuchsen.
Grund dafür war der jeweils früher oder später eintretende Adeninmangel im Medium, der zur sogenannten *ade2* - Mutation der Hefen führen konnte. Dadurch wurden insbesondere spätere X - Gal Analysen erschwert (siehe Abbildung 15).

© Benzing J, 2000



Abb. 14a: Hefekolonien bei ausreichendem Adenin – Angebot

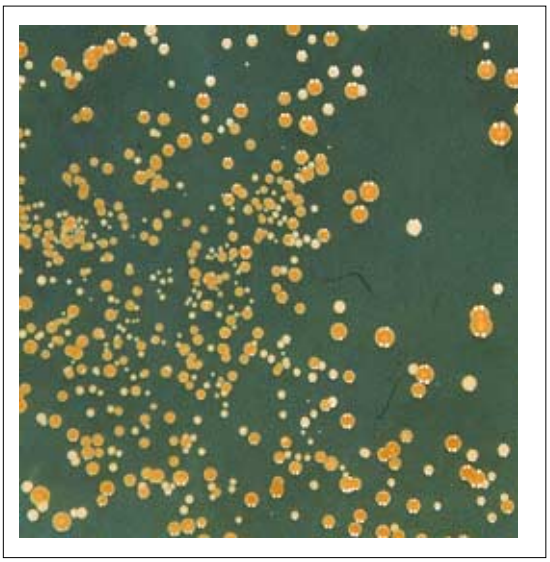


Abb. 14b: Hefekolonien bei Adeninmangel = *ade2* - Mutanten



Abbildung 15: X-Gal Assay der Positivkontrolle pVA3 / pTD1 (Hefestamm HY)
links: unter normalen Wachstumsbedingungen; rechts: bei Adeninmangel

Um dem vorzeitigen Verbrauch von Adenin zu begegnen, wurde vorsorglich in allen festen und flüssigen Hefemedien zusätzlich Adenin hinzugefügt: 15 ml 0,2% Adenin-Hemisulfat / 1000 ml Medium, nach Abkühlen des autoklavierten Mediums auf ca. 55°C.

3.1.7. Potentielle hefespezifische Toxizität der Rezeptorkonstrukte

Vor weiteren Transformationen, insbesondere vor dem Durchmustern von cDNA-Bibliotheken, war es notwendig zu überprüfen, ob das jeweilige Konstrukt, das in Hefezellen eingebracht werden sollte, aufgrund hefespezifischer Toxizität nachteilige Wachstumseffekte zeigt.

© Benzing J, 2000

Dazu wurden Hefezellen einmal mit dem gewünschten kompletten Two-Hybrid-Konstrukt, und zum Vergleich lediglich mit dem zugehörigen Vektor (ohne Insert) transformiert und deren Wachstumsverlauf verglichen (siehe Abbildung 16).

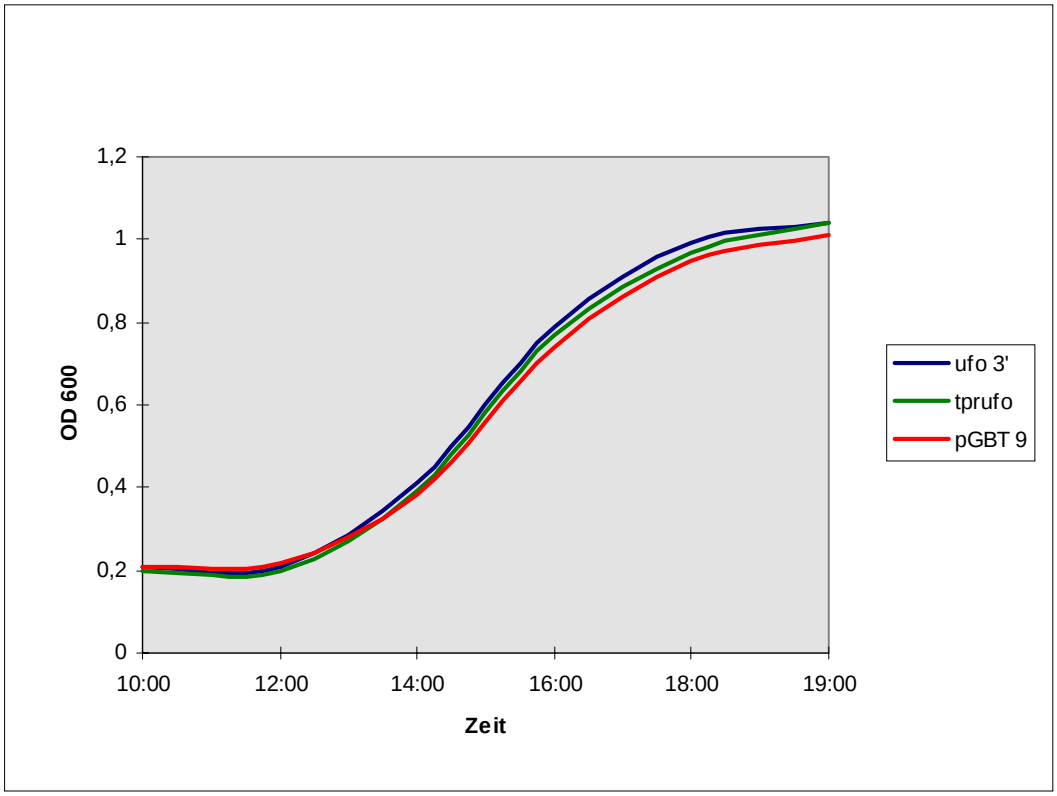


Abbildung 16: Wachstumsvergleich der Two-Hybrid-Konstrukte pGBT9 [*tpr-ufo*] bzw. pGBT9 [*ufo 3'*] mit pGBT9 [- -] im Hefestamm HY

Wir konnten in unseren Messungen weder für pGBT9 [*tpr-ufo*], noch für pGBT9 [*ufo 3'*] einen toxischen Einfluß auf das Wachstum der Hefen nachweisen

3.1.8. Optimales molekulares Gewicht von *salm sperm carrier* DNA

Geeigneter *salm sperm carrier* DNA kommt bei der Transformation von Hefezellen, insbesondere beim Screenen von cDNA – Bibliotheken, große Bedeutung zu. Um das Molekulargewicht der DNA zu bestimmen, wurde etwa 1 µg der Probe auf ein Agarosegel (0,6%) gegen λ - Hind III als Größenmarker aufgetragen. Als günstig erwies sich im

© Benzing J, 2000

Verlauf unserer Versuche eine Größenverteilung der *salm sperm carrier* DNA zwischen 2 und 15 kb mit maximalem Anteil bei ≈ 7 kb (siehe Abbildung17).

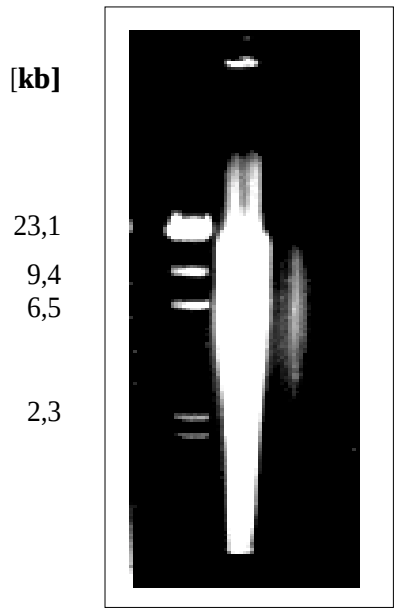


Abbildung 17: Optimale Größenverteilung von *salm sperm carrier* DNA für effiziente Transformation von Hefezellen (Größenmarker λ Hind III)

3.1.9. Kotransformationen der UFO-Konstrukte mit PLCγ, P85α und GRB2

Durch Kotransformationen konnte zunächst die Sensitivität des Two-Hybrid-Systems, im Hinblick auf die Rezeptortyrosinkinase UFO, evaluiert und diese Methode damit in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden.

Wir wählten als Kotransformanten für unsere Rezeptorkonstrukte *ufo3'* bzw. *tpr-ufo*, kloniert in pGBT9 bzw. pAS2 (= *binding domain*) drei der bereits bekannten, intrazellulären Interaktionspartner: nämlich PLCγ, P85α und GRB2; letztere waren kloniert in den *activating domain* - Vektor pGAD424.

Dabei zeigte sich, dass GRB2 stark interagiert (kräftiges Blau), während P85α zu deutlich schwächerer und PLCγ zu kaum mehr nachweisbarer Blaufärbung im qualitativen β - Galaktosidase-Assay führen (siehe Abbildung 18).

© Benzing J, 2000

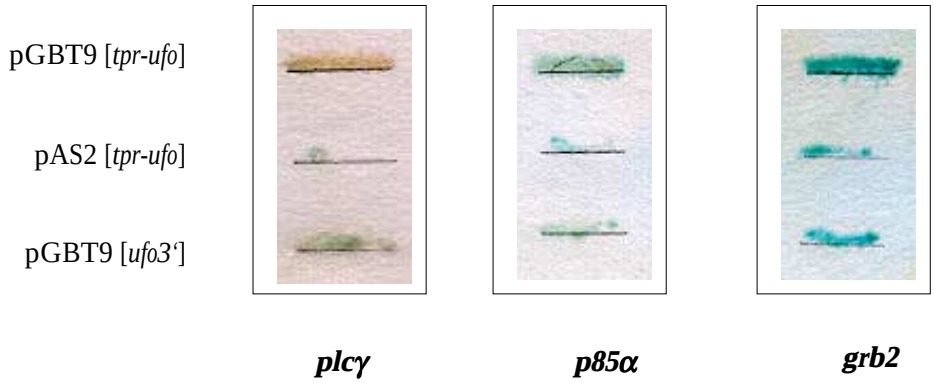


Abbildung 18: Kotransformation der *binding domain* pGBT9 [*tpr-ufo*] / pAS2 [*tpr-ufo*] / pGBT9 [*ufo 3'*] mit der *activating domain* pGAD424 [*plcγ*] / [*p85α*] / [*grb2*]

Als Positivkontrolle dieser Transformation wurden unter identischen Versuchsbedingungen pVA3 (murines *p53* in pGBT9) und pTD1 (SV40 *large antigen* in pGAD) kotransformiert. Diese Interaktion ließ sich im qualitativen β-Galaktosidase-Assay sehr gut belegen (siehe Abbildung 19).

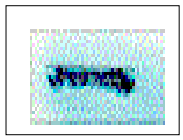


Abbildung 19: Positivkontrolle der Kotransformation mit pTD1 und pVA3

Zur Negativkontrolle der Kotransformation wurden im gleichen Versuch die Konstrukte *plcγ, p85α* und *grb2*, jeweils im *activating domain* - Vektor pGAD424, kotransformiert mit *pLam5'*, kloniert in den *binding domain* - Vektor pGBT9 (siehe Abbildung 20).



Abbildung 20: Kotransformation von pGAD424 [*plcγ*], pGAD424 [*p85α*] und pGAD424 [*grb2*] mit pGBT9 [*pLam5'*] als Negativkontrolle

© Benzing J, 2000

pLam5‘ (= cDNA des humanen Lamin C) generiert die Fusion eines damit kotransformierten Plasmids mit der DNA - bindenden Domäne von GAL4 ; werden hier positive Resultate im X-Gal-Assay erzielt, ist der potentiell positive Interaktionspartner in Wirklichkeit in der Lage, autonom, d.h. ohne die Promotor rekonstituierende Wirkung des Plasmids der *binding domain* (hier *ufo3‘* oder *tpr-ufo* in pGBT9, bzw. *tpr-ufo* in pAS2), die Transkription zu aktivieren.

Es war uns in mehrfacher Wiederholung dieser Kotransformationen (Negativkontrollen mit *pLam5‘* waren hierbei jedes Mal negativ) eindeutig gelungen, die drei bereits bekannten Protein-Protein-Wechselwirkungen sowohl für *ufo3‘*, als auch für das Fusionskonstrukt *tpr-ufo* im Two-Hybrid-System *in vivo* zu bestätigen. Allerdings war die Bindungsaffinität von *plcγ* und *p85α* zu den Rezeptorkonstrukten deutlich niedriger als diejenige von *grb2* , wie sich aus der resultierenden β-Galaktosidaseaktivität schließen lässt (siehe Abbildung 18). Auffällig war außerdem, dass pGBT9 [*tpr-ufo*] in Kultur offensichtlich besser gewachsen war als pAS2 [*tpr-ufo*], so dass sich nach der gleichen Zeitspanne hier größere Kolonien für (dadurch) bessere Ergebnisse im X-Gal-Assay gewinnen ließen. Dies führte uns schließlich zu der Entscheidung, in folgenden Versuchen ausschließlich die pGBT9 – Konstrukte zu verwenden, zumal bei zu langen Wachstumszeiten der Hefekulturen das Problem des Adeninmangels auftrat (siehe Abschnitt 3.1.6.).

3.1.10. Qualitative β-Galaktosidaseaktivität der Rezeptorkonstrukte

Bei Kotransformation von pGBT9 [*tpr-ufo*], pGBT9 [*tpr-met*] bzw. pGBT9 [*ufo3‘*] mit pGAD424 [*grb2*] ergab sich die stärkste β-Galaktosidaseaktivität im qualitativen X-Gal-Assay für die Interaktion von *grb2* mit *tpr-met* , während *tpr-ufo* hier nur eine geringfügig höhere β-Galaktosidaseaktivität entfaltete als *ufo3‘* (siehe Abbildung 21).

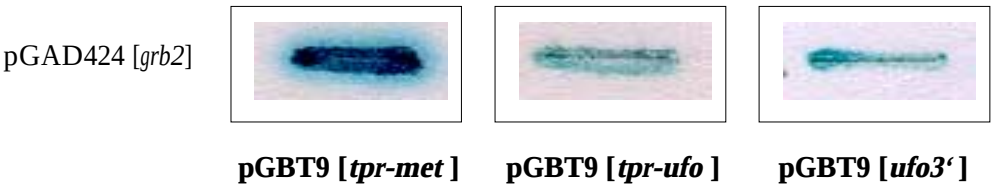


Abbildung 21: Qualitative β-Galaktosidaseaktivität von pGBT9 [*tpr-met*], pGBT9 [*tpr-ufo*], bzw. pGBT9 [*ufo3‘*], kotransformiert mit pGAD 424 [*grb2*]

© Benzing J, 2000

Offensichtlich ist die Tyrosinkinaseaktivität und damit die Bindungsaffinität von TPR-MET um ein Vielfaches höher als diejenige von UFO3', aber auch deutlich höher als jene des Fusionskonstruktes TPR-UFO, obwohl wir hier TPR an die ohnehin relativ schwache Tyrosinkinase UFO gekoppelt hatten.

3.2. Screening von cDNA – Bibliotheken

3.2.1. Titration der Effizienz von cDNA – Bibliotheken

Vor dem ersten Screening von cDNA - Bibliotheken erschien es sinnvoll, die potentielle Transformationseffizienz derselben repräsentativ zu erfassen. Dazu wurden kompetente Hefezellen, bereits ein Two-Hybrid-Konstrukt pGBT9 [*tpr-ufo*] bzw. pGBT9 [*ufo3'*] enthaltend, jeweils mit verschiedenen Mengen der zwei in Frage kommenden cDNA Bibliotheken *human fetal liver* und *rat embryo* transformiert. Bei der Auswahl der cDNA Bibiliotheken orientierten wir uns hierbei am in der Einleitung zu dieser Arbeit beschriebenen Expressionsmuster der Rezeptortyrosinkinase UFO (Abbildung 22).

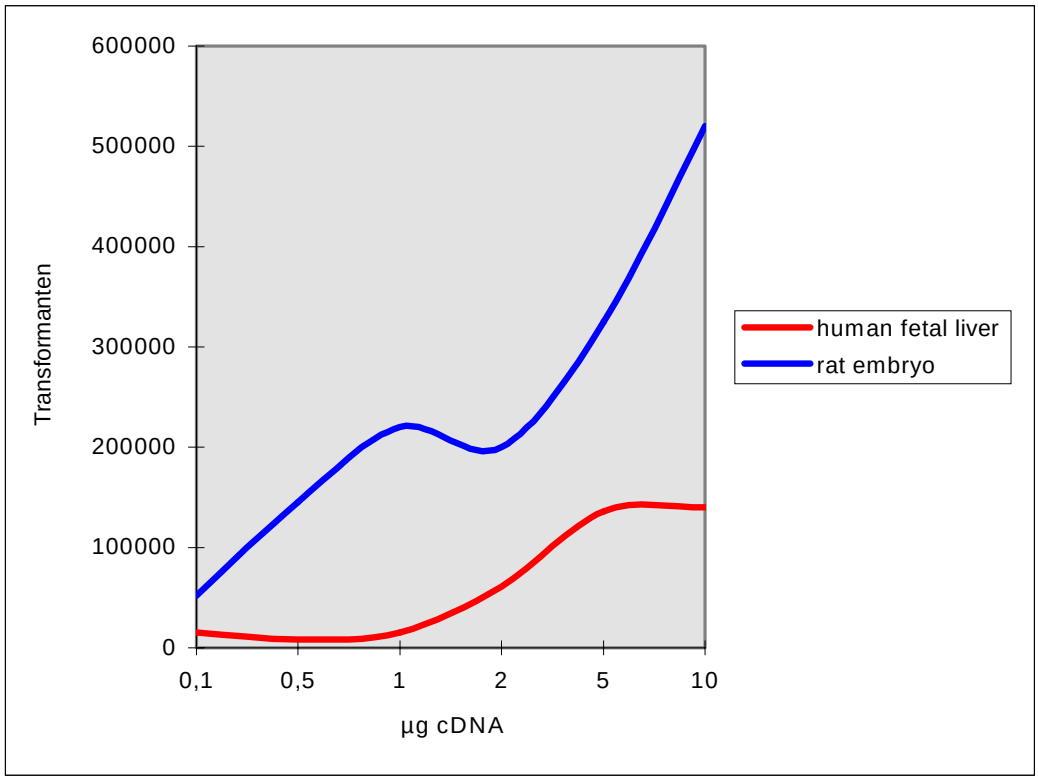


Abbildung 22: Absolute Transformationseffizienz der cDNA Bibliotheken *human fetal liver* und *rat embryo*

© Benzing J, 2000

Je mehr cDNA eingesetzt wurde, desto mehr Transformanten resultierten erwartungsgemäß. Allerdings zeigte sich bei Darstellung der relativen Zahl an Transformanten (bezogen auf die Menge an eingesetzter cDNA), dass weniger cDNA in der einzelnen Transformation zu einer höheren, relativen Effizienz/µg cDNA führte, als dies mit entsprechend größeren Mengen cDNA der Fall gewesen wäre (Abbildung 23).

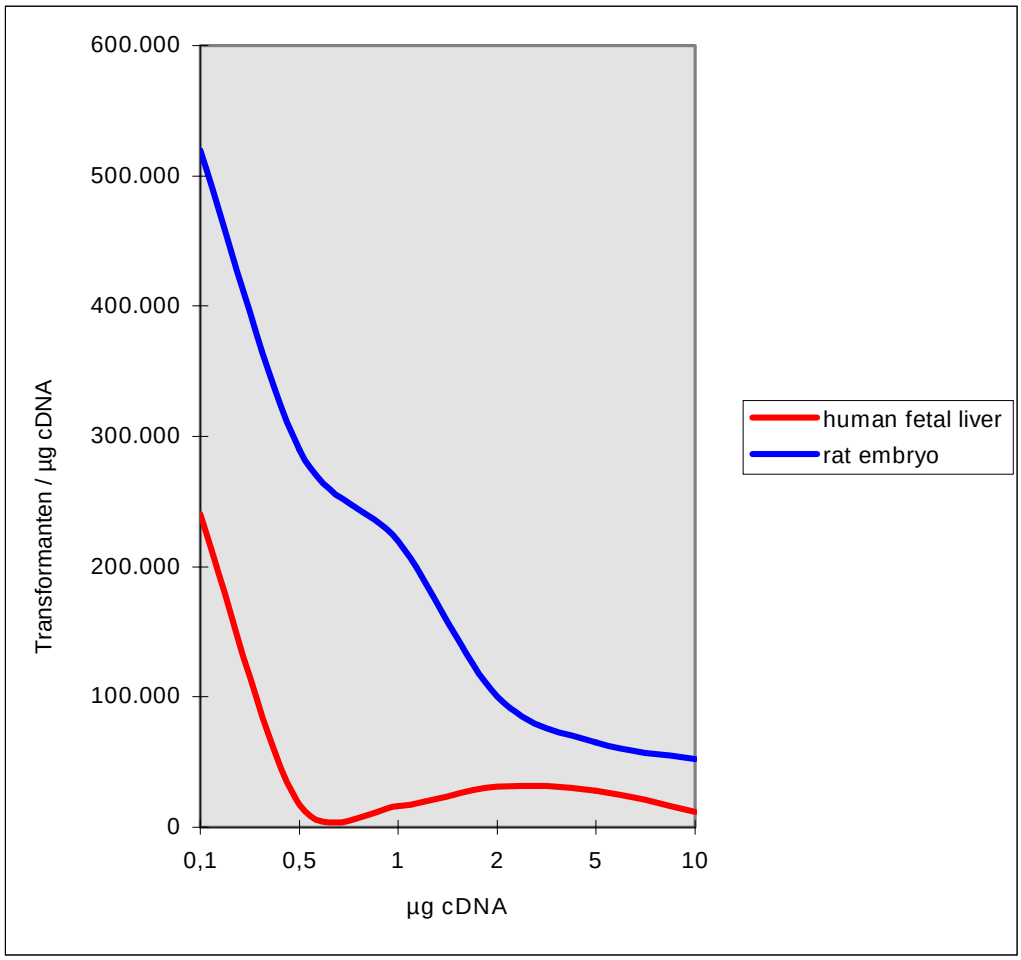


Abbildung 23: Relative Transformationseffizienz (bezogen auf die eingesetzte Menge cDNA) der cDNA Bibliotheken *human fetal liver* und *rat embryo*

Ein kompletter Screen mit der jeweils geringsten (und maximal effizienten) Menge an cDNA wäre jedoch nicht praktikabel gewesen - dazu hätte man erhebliche Stückzahlen an Agarplatten verwenden müssen. Um dennoch die erwünschte absolute Menge unabhängiger cDNA‘ s im geplanten Screening zu erfassen, wurde deshalb ein sogenannter 10 bis 60-facher *scale up* (Durchführung von 10 bis 60 Einzeltransformationen, die vor dem

© Benzing J, 2000

Ausplattieren wieder vereinigt wurden) durchgeführt. Die Titration der Transformationseffizienz von Fusionsbibliotheken - bereits im Vorfeld des eigentlichen Screenings - ermöglichte uns so den optimalen Einsatz vorhandener cDNA.

3.2.2. Einfluß von Dimethylsulfoxid auf die Transformationseffizienz prätransformierter Hefezellen mit bzw. ohne Selektionsdruck

Um einen möglichen Einfluß von Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die resultierende Effizienz bei der Transformation prätransformierter Hefezellen mit bzw. ohne Selektionsdruck zu quantifizieren, wurden vier Einzeltransformationen durchgeführt. Wir transformierten hierfür den Hefestamm HY, prätransformiert mit pGBT9 [*tpr-ufo*], mit den beiden cDNA Bibliotheken pGAD10 *thymus* bzw. pGAD10 *human fetal liver*.

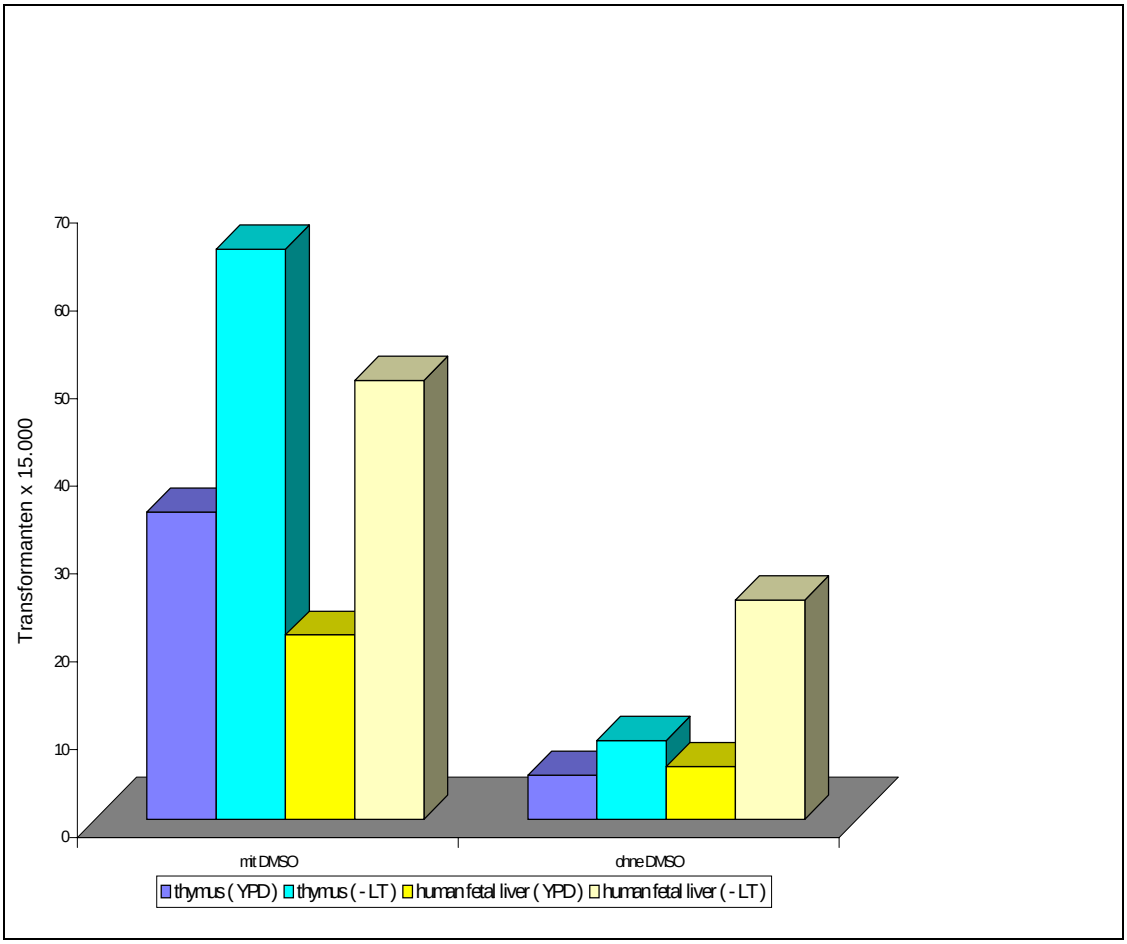
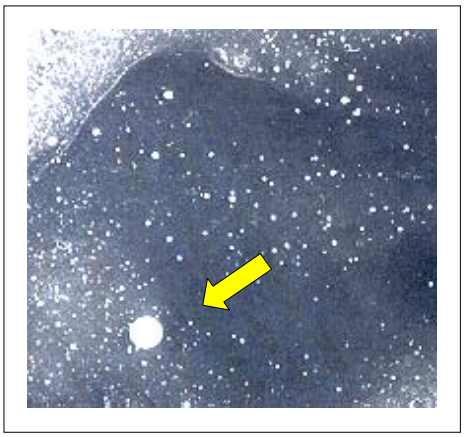


Abbildung 24: Transformationseffizienz mit bzw. ohne DMSO für die beiden cDNA-Bibliotheken *thymus* und *human fetal liver* unter Selektionsdruck (- LT) bzw. ohne Selektionsdruck (YPD)

© Benzing J, 2000

Nach dem Schritt der Inkubation, jedoch noch vor dem Hitzeschock (42°C), fügten wir jeweils der Hälfte der Ansätze 10% des Volumens an DMSO (*Sigma*) hinzu. Von 5 ml jeder Einzeltransformation wurden schließlich 10 µl auf Selektionsagar (- LTH) ausplattiert und die Transformanten nach 2 Tagen Inkubation im Brutschrank ausgezählt (Abbildung 24). Unter dem Einfluß von DMSO war in mehreren Versuchsreihen durchschnittlich eine um den Faktor 7 höhere Transformationseffizienz zu erzielen als ohne DMSO, weshalb in späteren Transformationen, insbesondere beim Screening von cDNA Bibliotheken, jedes Mal DMSO in der oben angegebenen Menge verwandt wurde. Unter identischen Bedingungen waren die Vorkulturen für die Versuchsansätze jeweils in Vollmedium (YPD) bzw. in Selektionsmedium, d.h. ohne Leucin und ohne Tryptophan (- LT) bis zu einer photometrisch bestimmten Zelldichte von OD_{600} = 1,0 gewachsen. Die resultierende Transformationseffizienz war sowohl mit als auch ohne DMSO für Vorkulturen unter ständigem Selektionsdruck deutlich höher ausgefallen. Ursache dafür könnte der Verlust des prätransformierten Plasmids pGBT9 [*tpr-ufo*] bei einem Teil der Vorkulturen in Vollmedium sein, so dass hier nach nur zwei Tagen Inkubationszeit makroskopisch deutlich mehr Hintergrundkolonien unter den ausgezählten Transformanten waren. Aus diesem Grund wurden von uns Vorkulturen für das Screening von cDNA Bibliotheken generell unter größtmöglichem Selektionsdruck kultiviert.

Signifikante Größendifferenzen zwischen den positiven Transformanten einer cDNA Bibliothek (Durchmesser ∅ > 2mm) und den Hintergrundkolonien waren erst nach einer Inkubationszeit von mehr als 5 Tagen zuverlässig zu erkennen (Abbildung 25).



∅ ca. 7 mm

Abbildung 25: Two-Hybrid-Screening einer cDNA Bibliothek **-** Unterscheidung der Hintergrundkolonien von potentiell positiven Kolonien [⇦] , hier nach 6 Tagen Inkubation

© Benzing J, 2000

3.2.3. Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bibliothek *human fetal liver* mit den Rezeptorkonstrukten UFO3‘ und TPR-UFO

In fünf unabhängigen Versuchen durchmusterten wir mit den Methoden des Two-Hybrid-Systems die cDNA Bibliothek pGAD 10 *human fetal liver* (*Clontech*) mit pGBT9 [*tpr-ufo*]. Bei einer durchschnittlichen Transformationseffizienz von 1,1 x 10^6 Transformanten pro Screening wurden über Nährstoff - Selektion (DOBA $^{-LTH}$) insgesamt 323 große Kolonien (> 2 mm) aufgepickt. 15 dieser Kolonien (= 4,6 %) zeigten in wiederholten qualitativen X-Gal-Assays deutliche β-Galaktosidase Aktivität. Mit der aus diesen potentiell positiven Hefeklonen extrahierten Plasmid-DNA wurden HB101-Bakterien mittels Elektroporation transformiert, um aus diesen wiederum die enthaltene Plasmid-DNA zu extrahieren. Die Resriktionsanalyse (*EcoR*I / *EcoR*I) ergab schließlich drei Plasmid-Gruppen von unterschiedlichem Molekulargewicht. Die anschließend durchgeführte Retransfektion dieser drei DNA – Proben mit pGBT9 [*tpr-ufo*] bzw. pGBT9 [*ufo3‘*] im Two-Hybrid-System bestätigte zunächst die potentiell vorliegenden Interaktionen. Negativkontrollen waren hierbei stets negativ, Positivkontrollen positiv. Nach *sense* - Sequenzierung jener drei Proben fand sich neben mitochondrialem Protein und Proteasomen-Untereinheiten (meist *falsch* positiv aufgrund inadäquater zellulärer Lokalisation) bei Analyse der Sequenz von Probe 2 hochgradige Homologie (>90 %) für die mRNA-Sequenz von *grb2* (= *Homo sapiens epidermal* ***g****rowth factor* ***r****eceptor-****b****inding protein*). Mit diesem Ergebnis war der Interaktionspartner GRB2 für die Rezeptorkinase UFO beim Durchmustern der Fusionsbibliothek pGAD GH *human fetal liver* identifiziert und bestätigt worden.

3.2.4. Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bibliothek *rat embryo* mit dem Rezeptorkonstrukt TPR-UFO

Da die in unseren Vorversuchen durch Titration ermittelte Transformationseffizienz der cDNA-Bibliothek *rat embryo* erheblich höher ausgefallen war, als jene der cDNA-Bibliothek *fetal liver*, führten wir nun ein Two-Hybrid-Screening der cDNA Bibliothek pGAD GH *rat embryo* durch. Wir verwendeten hierfür das Plasmid pGBT9 [*tpr-ufo*] aufgrund seiner höheren intrinsischen Aktivität.

In vier unabhängigen Versuchen durchmusterten wir die cDNA-Bibliothek *rat embryo* mit dem mit den Methoden des Two-Hybrid-Systems. Bei einer durchschnittlichen Trans-

© Benzing J, 2000

formationseffizienz von 1,8 x 10^6 Transformanten pro Screening wurden über Nährstoff - Selektion (DOBA $^{-LTH}$) insgesamt 158 große Kolonien (> 2 mm) aufgepickt. Sechs dieser Kolonien (= 3,8 %) zeigten in wiederholten, sich anschließenden qualitativen X-Gal-Assays deutliche β-Galaktosidase Aktivität (Abbildung 26 a und b) - Kolonie 68 allerdings erst nach einer Gesamtinkubationszeit von > 5 Stunden.



Abbildung 26a,b: Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bibliothek pGAD GH *rat embryo* mit dem Hefestamm HY: pGBT9 [*ufo3'*]: Dritter X – Gal Assay positiv [➡] für Kolonie 3, 20, 62, 111 und 136 – bei längerer Inkubationszeit (> 5h) auch für Kolonie 68; unten jeweils zweifache Positivkontrollen P mit pTD1 / pVA3

Mit der aus jenen potentiell positiven Hefeklonen extrahierten Plasmid-DNA wurden HB101-Bakterien mittels Elektroporation transformiert, um aus diesen wiederum die enthaltene Plasmid-DNA zu extrahieren. Nach Resriktionsanalyse (*EcoR*I / *Xho*I) wurde die Retransformation dieser sechs DNA-Proben mit pGBT9 [*tpr-ufo*] bzw. pGBT9 [*ufo3'*] im Two-Hybrid-System durchgeführt und bestätigte zunächst die potentiell vorliegenden

© Benzing J, 2000

Interaktionen. Bei *sense* - Sequenzierung (GADs, *Clontech*) jener sechs Plasmide fanden sich neben den kodierenden Sequenzen für (falsch positives) mitochondriales und ribosomales Protein, für die beiden Plasmide 62, 136 hochgradige Homologie von > 87% bzw. > 90 % mit der mRNA-Sequenz von GRB2. Für die Plasmide 20 und 111 zeigten die Sequenzanalysen eine Übereinstimmung von > 85% für die mRNA-Sequenz von UBC-9 (= *human ubiqitinin conjugating enzyme 9*).

Mit diesem Ergebnis ließ sich der Interaktionspartner GRB2 für die Rezeptortyrosinkinase UFO - diesmal beim Durchmustern der cDNA-Bibliothek *rat embryo* - identifizieren und bestätigen.

Der zunächst vermutete Interaktionspartner UBC-9 (Expressionsvektor pGAD424) erwies sich jedoch in wiederholten Kotransformationen mit pGBT9 [*pLam5'*] – als falsch positiv, denn pLam5' (cDNA für humanes Lamin C) generiert die Fusion eines damit kotransformierten Plasmids mit der DNA bindenden Domäne von GAL4 : werden hier positive Resultate im X-Gal-Assay erzielt, ist der potentiell positive Interaktionspartner in Wirklichkeit in der Lage, autonom, d.h. ohne die Promotor rekonstituierende Wirkung des Plasmids der *binding domain* (hier *ufo3'* in pGBT9), die Transkription zu aktivieren. GRB2 hingegen induzierte keine erhöhte β-Galaktosidase Aktivität (Abbildung 27).



Abbildung 27: Kotransformation von pGBT9 [*pLam5'*] mit pGAD424 [*grb2*] bzw. pGAD424 [*ubc-9*] zum Ausschluss falsch positiver Interaktionspartner

Ein weiterer Beleg für die autonome Transkriptionsaktivität von UBC-9 war die Tatsache, dass UBC-9, kloniert in den *activating domain* -Vektor pGAD424, auch ohne einen Kotransformationspartner der DNA - *bindinng domain* von GAL4 (nach Kultur in DOB^{-L} Medium) spontan β-Galaktosidaseaktivität entwickeln konnte, während GRB2 im gleichen Versuch keinen entsprechenden Effekt zeigte (Abbildung 28).

© Benzing J, 2000

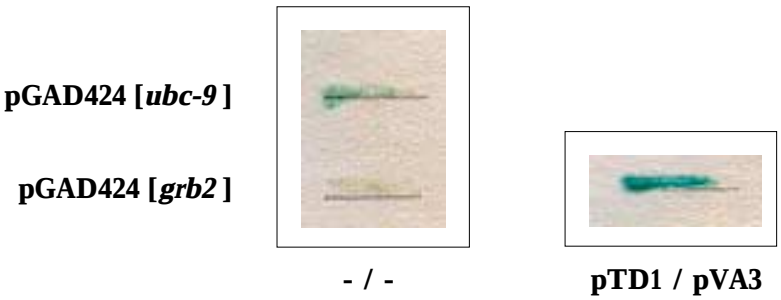


Abbildung 28: links: Transformation von pGAD424 [*ubc-9*] und pGAD424 [*grb2*] zum Nachweis autonomer Transkriptionsaktivität im Two-Hybrid-System.
rechts: Positivkontrolle der Transformation mit pTD1 / pVA3

3.2.5. Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bibliothek *thymus* mit dem Rezeptorkonstrukt TPR-UFO

Gemäß des eingangs erwähnten UFO – Expressionsmusters führten wir vier weitere, voneinander unabhängige Two-Hybrid-Versuche durch, indem wir diesmal die cDNA Bibliothek pGAD10 *thymus* nach Interaktionen mit dem Zielplasmid pGBT9 [*tpr-ufo*] durchmusterten. Bei einer durchschnittlichen Transformationseffizienz von nur 5,7 x 10^5 Transformanten pro Screening wurden über Nährstoff - Selektion (DOBA $^{-LTH}$) insgesamt 29 große Kolonien (> 2mm) aufgepickt.

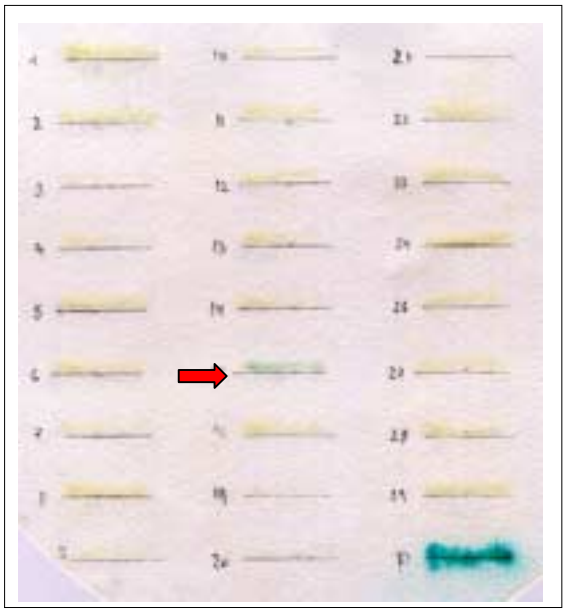


Abbildung 29: Two-Hybrid-Screening der cDNA Bibliothek pGAD10 *thymus* mit dem Hefestamm HY: pGBT9 [*ufo3'*]: X – Gal-Assay positiv [➡] für Klon 15
unten rechts: Positivkontrolle P der Transformation mit pTD1 / pVA3

© Benzing J, 2000

Eine dieser Kolonien (= 3,5 %) zeigte in wiederholten, qualitativen X-Gal-Assays bereits bei relativ kurzen Inkubationszeiten von 2 Stunden deutliche β-Galaktosidase Aktivität (Abbildung 29).
Mit der aus Hefeklon 15 extrahierten Plasmid-DNA wurden HB101-Bakterien mittels Elektroporation transformiert, um aus diesen wiederum die enthaltene Plasmid-DNA zu gewinnen. Nach Restriktionsanalyse (*EcoR*I / *EcoR*I) fand sich bei anschließender Sequenzierung (GADs, *Clontech*) für dieses Plasmid hochgradige Homologie (> 90 %) mit der mRNA-Sequenz von GRB2.

Damit konnte GRB2 als Interaktionspartner für die Rezeptortyrosinkinase UFO auch beim Durchmustern einer dritten cDNA Fusionsbibliothek (pGAD10 *thymus*) identifiziert und bestätigt werden, allerdings keine neuen Protein-Protein-Wechselwirkungen.

3.2.6. Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bibliothek *rat embryo* mit dem Rezeptorkonstrukt TPR-MET

Bei Überprüfung der quantitativen Proteinexpression und der Fähigkeit zur (Auto-) Phosphorylierung der Two-Hybrid-Konstrukte *tpr-ufo* bzw. *tpr-met* im Hefevektor pGBT9 hatte sich bei unseren Vorversuchen herausgestellt, dass sich die onkogenen Proteinprodukte von u*fo3'* bzw. *met* durch Kopplung an *tpr* verstärkt (auto-) phosphorylieren lassen. Darüber hinaus fiel in diesem Zusammenhang die (Auto-) Phosphorylierung von TPR-MET deutlich stärker aus, als diejenige von TPR-UFO.

Da sich die Transformationseffizienz der cDNA-Bibliothek *rat embryo* nach Titration zudem als am höchsten erwiesen hatte, entschlossen wir uns, ein weiteres Two-Hybrid-Screening der cDNA Fusionsbibliothek *rat embryo* durchzuführen – diesmal jedoch mit dem Rezeptorkonstrukt TPR-MET. Bei einer überdurchschnittlichen Transformations-effizienz von 9×10^6 Transformanten des Screenings wurden über Nährstoffselektion (DOBA $^{-LTH}$) insgesamt 290 große Kolonien (> 2 mm) aufgepickt.

© Benzing J, 2000

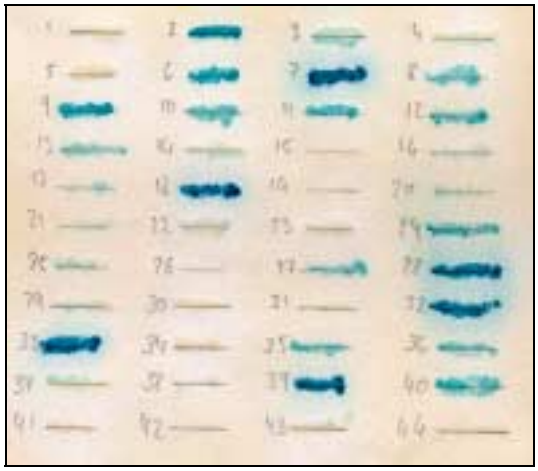


Abb. 30a: Klon 1 - 44



Abb. 30b: Klon 45 - 91



Abb. 30c: Klon 92 - 143



Abb. 30d: Klon 144 - 200

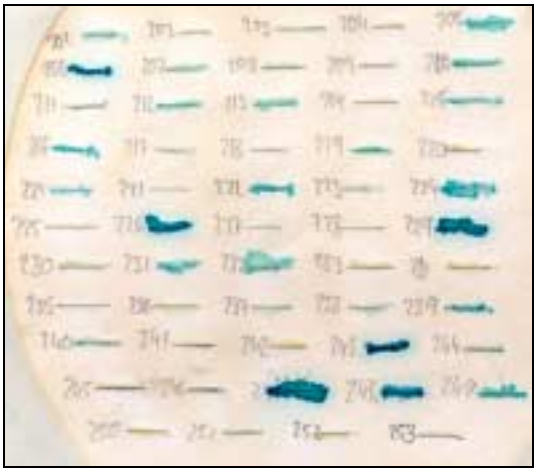


Abb. 30e: Klon 200 - 253

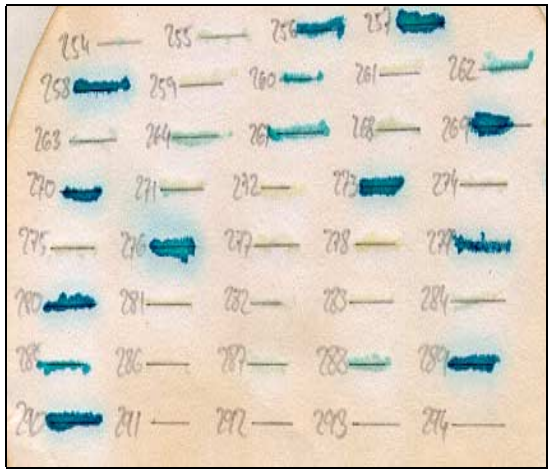


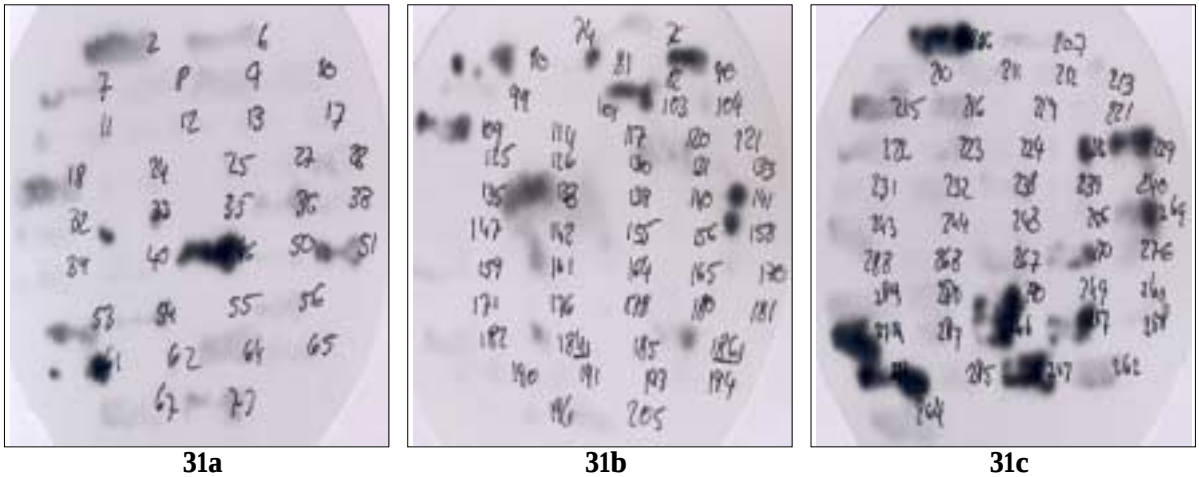
Abb. 30f: Klon 254 - 290

Abbildungen 30a-f: X-Gal-Assay des Two-Hybrid-Screening der cDNA Bibliothek *rat embryo* mit dem Hefestamm HY: pGBT9 [*tpr-met*]

© Benzing J, 2000

47 dieser Kolonien (= 16,2 %) zeigten in wiederholten qualitativen X-Gal-Assays deutliche, 31 (= 10,7 %) nur mäßige bis geringe β-Galaktosidase Aktivität (Abbildungen 30a-f).

Um hierbei GRB2 als besonders häufiges Substrat von Rezeptortyrosinkinasen identifizieren zu können, hybridisierten wir in einem Zwischenschritt diese 47 Klone mit starker β-Galaktosidase Aktivität zunächst mit einer cDNA – Probe für GRB2: Es zeigte sich hierbei, dass 25 (= 53 %) dieser 47 Hefekolonien offensichtlich Anteile der *grb2* – Sequenz enthielten (Abbildungen 31a-c).



31a **31b** **31c**

Abbildungen 31a-c: Hybridisierung der X-Gal positiven Klone mit einer *grb2* – cDNA – Probe Positiv, d.h. *grb2* – Teilsequenzen enthaltend, waren z.B. Klon 2, 18, 40 und 61 (Abb. 31a), Klon 90, 109, 138 und 141 (Abb. 31b), Klon 206, 229 und Klon 267 (Abb. 31c)

Mit der aus den insgesamt 73 X-Gal-positiven Hefeklonen extrahierten Plasmid - DNA wurden HB101-Bakterien mittels Elektroporation transformiert, um aus diesen später die enthaltenen *activating domain* - Plasmide zu extrahieren. Nach Resriktionsanalyse (*Eco*RI / *Xho*I) wurden die Plasmide sequenziert (GADs, *Clontech*).

Zur Verifizierung einer potentiellen Interaktion mit TPR-MET wurden die Plasmide anschließend retransformiert: Einmal als Positivkontrolle in Kotransformation mit dem Rezeptorkonstrukt pGBT9 [*tpr-met*] und einmal zum Ausschluss eventueller autonomer Transkriptionsaktivität (= Negativkontrolle) in Einzeltransformation (Tabelle 5).

© Benzing J, 2000

Tabelle 5: X-Gal positive Klone nach Screening der cDNA – Bibliothek *rat embryo* mit dem Zielprotein TPR-MET: Häufigkeit, Transkript und Ergebnis der Retransformation

		Retransformation	
Klon	**Transkript / Häufigkeit**	**mit pGBT9 [tpr-met]**	**alleine**
002	Homo sapiens SNARE associated protein SNAPAP / 1 x		
006	tissue factor pathway inhibitor / 1 x		
007	rat protease inhibitor / 1 x		
008	ribosomales Protein S10 / 1 x		
009	mitochondriale Fumarase / 1 x		
010	humanes Laminin LB1 / 1 x		
011	KIAA0699-Protein / 2 x		
012	ribosomales Protein S23 / 1 x		
018	Major β Globulin / 1 x		
024	gooisecoid homeobox Protein / 2 x		
027	Skelettmuskel – Troponin / 2 x		
028	mitochondriale Cytochrom C Oxidase, Untereinheiten I, II / 3 x		
054	β - Crystallin / 1 x		
056	Unbekannt 3 / 1 x		
067	Unbekannt 4 / 1 x		
073	Zinc finger / 2 x		
101	Sorting nexin 2 SNX2 / 1 x		
109	Calcium binding protein pp52 LSP1 / 1 x		

© Benzing J, 2000

Klon	Transkript / Häufigkeit	Retransformation mit pGBT9 [tpr-met]	Retransformation alleine
133	Mitosis specific chromosome segregation protein SMC1 / 1 x		
155	ZIP Kinase / 1 x		
182	Bicaudal D BICD1 / 3 x		
184	GRB2 / 25 x		
185	IGF-BP3 / 4 x		
191	Unbekannt 5 / 1 x		
193	translation initiation factor 3 / 1 x		
194	Unbekannt 6 / 1 x		
196	Pro - α 2 (I) Collagen / 5 x		
205	Unbekannt 7 / 1 x		
216	centromeric protein / 1 x		
289	tumorous imaginal disc protein (= Tid56 homolog) / 5 x		

Bei insgesamt 21 (= 29 %) der 73 anfangs X-Gal-positiven Hefeklonen ließ sich das Ergebnis des ersten X-Gal-Assays zwar noch bei einem zweiten X-Gal-Assay, nach Retransformation allerdings überhaupt nicht mehr oder nur sehr schwach reproduzieren: *tissue factor pathway inhibitor* (Klon 6), ribosomales Protein S10 (Klon 8), KIAA0699-Protein (Klon 11 u.a.), ribosomales Protein S23 (Klon 12), *major β Globulin* (Klon 18), Unbekannt 3 (Klon 56), *Calcium binding protein pp52* LSP1 (Klon 109), *pro – alpha 2 (I) collagen* (Klon 196 u.a.), IGF-BP3 (Klon 185 u.a.), Unbekannt 5 (Klon 191), *translation initiation factor 3* (Klon 193), Unbekannt 7 (Klon 205), *centromeric protein* (Klon 216).

Als eindeutig falsch positiv stellten sich vier (= 5 %) der ursprünglich 73 X-Gal positiven Klone heraus, da sie in Einzeltransformation, d.h. ohne das komplementäre GAL4 Hybridprotein (in diesem Fall TPR-MET) autonome Transkriptionsaktivität entwickelten:

© Benzing J, 2000

Skelettmuskel - Troponin T (Klon 27 und Klon 170) und das DNA – bindende *gooisecoid homeobox protein* (Klon 24 und Klon 260).

Aufgrund zellulärer Lokalisation und Funktion kann darüber hinaus echte Wechselwirkung folgender zehn Proteine (= 14 %) mit dem Tyrosinkinaserezeptor MET nahezu ausgeschlossen werden: *Homo sapiens* SNARE *associated protein* SNAPAP (Klon 2), *rat protease inhibitor* (Klon 7), mitochondriale Fumarase (Klon 9), mitochondriale C Oxydase Untereinheiten I und II (Klon 28 u.a.), β-Crystallin (Klon 54), *Zinc finger* (Klon 73 u.a.) und *mitosis specific chromosome segregation protein* SMC1 (Klon 133).

Bei Retransformation mit unserem Zielplasmid pGBT9 [*tpr-met*] erwiesen sich immerhin 38 (= 52 %) der anfangs 73 X-Gal-positiven bzw. 13 % jener ursprünglich 290 großen Kolonien (> 2 mm) dieses Two-Hybrid-Sceenings als positiv. Mit Hilfe des Computerprogramms *BLAST* erfolgte online ein Vergleich der DNA-Sequenzen dieser Klone mit eventuell bekannten Sequenzen der Gen-Datenbank des NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (Abbildung 32a-h). Hierbei konnten wir, neben dem bereits bekannten GRB2 (Klon 184 u.a.), die Teilsequenzen folgender, potentiell neuer Substrate für TPR-MET identifizieren: *human laminin* LB1 (Klon 10), *Sorting nexin 2* (Klon 101), ZIP Kinase (Klon 155), *bicaudal-D* BICD1 (Klon 182 u.a.) und *tumorous imaginal disk protein Tid56 homolog* (Klon 289 u.a.).

Außerdem ließen sich kodierende Teilsequenzen von insgesamt fünf bisher noch nicht näher charakterisierten Genen isolieren. Lediglich zwei dieser Kandidaten (Klon 67 und Klon 194) entwickelten allerdings deutliche β-Galaktosidaseaktivität nach Retransformation, weshalb auch nur diese für eventuell weitergehende Untersuchungen in Frage kommen dürften.

```
10:     170 gactggaaggagaggtgcgctcactccttaaggacataagtgagaaagttgccgtttaca 229
            |||||||||||||  ||  ||  ||||||||  |||||  |||||   ||||||||||  ||  ||  |
LB1:   5405 gactggaaggagaagtccgttcactcctaaaggatataagccagaaagttgctgtgtata 5464

10:     230 gcacctgcttataacagagga 250
            ||||  |||||  ||||||||||
LB1:   5465 gcacatgcttgtaacagagga 5485
```

Abbildung 32a: Homologie zwischen den DNA-Sequenzen von Klon 10 und von *human laminin* LB1 mRNA: 69 von 81 Basen homolog (= 85 %).

© Benzing J, 2000

```
101:  21  gactttcttggtttgcatagcaaattagcaagcaaatatttacatgttggttacattgtd 80
          |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
SNX2: 585 gactttcttggtttgcacagcaaattagcaagcaaatatttacatgttggttatattgtg 644

101:  81  ccaccagctccagaaaagagcatagtaggtatgaccaaggtcaaagtaggtaaagaagac 140
          |||||||||||||||||| |||||||| |||||||||||||||| ||||||||||||
SNX2: 645 ccaccagctccagaaaagagtatagtagggatgaccaaggtcaaagtgggtaaagaagac 704

101:  141 tcatcgtccactgagtttgtagaaaaacgaagagc 175
          ||||| |||||||||||||||||||| |||||
SNX2: 705 tcatcatccactgagtttgtagaaaaacggagagc 739
```

Abbildung 32b: Homologie zwischen den DNA-Sequenzen von Klon 101 und von SNX2: 147 von 155 Basen homolog (= 94 %). `d` = *ambiguity code* für die Nukleotide `agt`

```
155:   52 gtacagtctcaagtcgcactcaagcatgccgcgaaacacgagctacgccagcttcgagcg 111
          |||||| |||||||| ||||| |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
ZIP:  906 gtacagcctcaagtcccactcgagcatgccgcgcaacacgagctacgccagcttcgagcg 965

155:  112 cttctcgcgcgtgctggaggacgtggcggcsgcggagcaggggctgcgcgagctgcagcg 171
          |||||| |||||||||||||||||||| || |||||||||||||||||||||||||||
ZIP:  966 cttctcacgcgtgctggaggacgtggcggcggcagagcaggggctgcgcgagctgcagcg 1025
```

Abbildung 32c: Homologie zwischen den DNA-Sequenzen von Klon 155 und von ZIP Kinase: 113 von 120 Basen homolog (= 94 %). `s` = *ambiguity code* für die Nukleotide `cg`

```
182:     95 gataaggacaaggaagcactcatggaggagatcctcaagctgaagtcactgctgagtacc 154
            ||||| |||||||||||  | ||||| ||||||||||||||| ||||| |||||||| |||
BICD1: 2071 gataaagacaaggaagccttaatggaagagatcctcaagctaaagtccctgctgagcacc 2130

182:    155 aagagggaacagatcaccaca 175
            ||   ||||  |||||| |||||
BICD1: 2131 aaacgggagcagatcgccaca 2151
```

Abbildung 32d: Homologie zwischen den DNA-Sequenzen von Klon 182 und von BICD1 (*Homo sapiens Bicaudal D homolog 1)* : 69 von 81 Basen homolog (= 85 %).

```
184:     37 tagaaatgaaaccacatccgtggtttttggcaaaatccccagagcaaaggcagaagaaa 96
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
GRB2:   238 tagaaatgaaaccacatccgtggtttttggcaaaatccccagagccaaggcagaagaaa 297

184:     97 tgcttagcaaacagcggcatgacggggccttcctgatccgagagagcgagagcgctcctg 156
            |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GRB2:   298 tgctcagcaaacagcggcatgacggggccttcctgatccgagagagcgagagcgctcctg 357

184:    157 gggatttctccctgtcagtcaagtttggaaatgatgtacagcacttcaa 205
            |||| |||||||||| |||||||||||||||||| ||||||||||
GRB2:   358 gggacttctccctgtccgtcaagtttggaaatgatgtgcagcacttcaa 406
```

Abbildung 32e: Homologie zwischen den DNA-Sequenzen von Klon 184 und von GRB2 : 164 von 169 Basen homolog (= 97 %).

© Benzing J, 2000

```
289:      77 tgtgtggtctgcagaggagcaggacaagccaagcagaagaagcgagtgacagtccctgtg 136
             ||||||||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||
TID56:   896 tgtgtggtctgcaggggagcaggacaagccaagcagaaaaagcgagtgatgatccctgtg 955

289:     137 cctgcaggagttgaagatggccagactgtaaggatgcctgtkggaaaacgagaaattttt 196
             |||||||||| || |||||||||| || |||||||||| |||||| | ||||||||
TID56:   956 cctgcaggagtcgaggatggccagaccgtgaggatgcctgtgggaaaaagggaaattttc 1015

289:     197 gtcacattcagggtgcagaagagccctgtgttccggagggacgg 240
               | || ||||||||||||| |||||||||||||||||||||||
TID56:  1016 attacgttcagggtgcagaaaagccctgtgttccggagggacgg 1059
```

Abbildung 32f: Homologie zwischen den DNA-Sequenzen von Klon 289 und von TID56 (*Human tumorous imaginal disc protein 56*) 147 von 164 Basen homolog (= 89 %).
k = *ambiguity code* für die Nukleotide gt

```
67:       14 ggttgacgccagaggagaggagccagcttattcctgacttgaaagcagcagggtggtcg 203
             |||||||  |||||||||||| |||   ||| | |||| | |||||||||||| ||||||
??:    77513 ggttgactgcagaggagaggaaccaagctatacttgaccttaaagcagcaggatggtcg 77571

67:      204 gagttgagcgagagagacgccatctacaaagagttctccttc 245
             || || || |||||||| |||||||||||||| |||||||||
??:    77572 gaattaagtgagagagatgccatctacaaagaattctccttc 7761
```

Abbildung 32g: Homologie zwischen den DNA-Sequenzen von Klon 67 und P1 - Klon 254f11 auf humanem Chromosom 5 (LBNL H62): 85 von 101 Basen homolog (= 84 %).

```
194:      95 ttcagctcttttatggaagcatgcgtaaaattaccctgtcagtgattggagaattcagag 154
             |||||||||||||||||||||||| ||||||||| || ||||| ||||||||||||||||
??:      264 ttcagctcttttatggaagcatgtgtaaaattatacttcagtaattggagaattcagag 323

194:     155 attccatttgtagcaga 171
             ||| ||||| |||||||
??:      324 attgcatttctagcaga 340
```

Abbildung 32h: Homologie zwischen den DNA-Sequenzen von Klon 194 und von *Homo sapiens* cDNA FLJ10352 fis, (clone NT2RM2001152):
70 von 77 Basen homolog (= 90 %).

In Abbildung 32a-h sind die DNA-Sequenzen der oben erwähnten positiven Klone parallel zu denjenigen Sequenzen dargestellt, die bei einer *BLAST* - Suche in der Gen-Datenbank des NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH maximale Übereinstimmung ergeben hatten. Die Sequenzhomologie kommt jeweils grau unterlegt zur Darstellung. Der bei einigen Sequenzen angegebene *ambiguity code* bezeichnet verschiedene, an dieser Stelle in Frage kommende Nukleotide: Hier war dem Sequenzierautomat *ALF express* bei der computergestützten DNA – Analyse offenbar keine eindeutige Zuordnung gelungen.

© Benzing J, 2000

Beim Screening der Fusionsbibliothek *rat embryo* mit unserem Zielplasmid pGBT9 [*tpr-met*] konnten wir somit einerseits das Adapterprotein GRB2 als intrazelluläres Substrat des Tyrosinkinaserezeptors MET mehrfach *in vivo* bestätigen. Andererseits war es uns gelungen, mehrere möglicherweise neue Protein-Protein-Wechselwirkungen des Onkogens TPR-MET aufdecken.

© Benzing J, 2000

4. Diskussion

Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen bilden die Grundlage fast aller biologischen Prozesse, wie etwa der Signaltransduktion, der Transkription, der Replikation oder der Sekretion. Eine der zentralen Fragestellungen biomedizinischer Forschung ist es daher, spezifische Protein-Interaktionen aufzudecken – man spricht in diesem Zusammenhang auch von „Proteomics“. Auf dem Gebiet der Onkogene haben entsprechende Erkenntnisse entscheidend zum besseren Verständnis von Zell-differenzierung, Zellwachstum und programmiertem Zelltod beigetragen und so neue Ansätze für Diagnostik und Therapie der klinischen Onkologie eröffnet.

Ein typischer biochemischer Ansatz, solche Proteininteraktionen zu studieren, ist die Koimmunopräzipitation. Assoziierte Proteine werden hierbei mittels eines Antikörpers gegen ein bereits bekanntes Protein präzipitiert. Oft ist es allerdings schwierig, ausgehend von dem so gewonnenen, stabilen Proteinkomplex die kopräzipitierten Proteine zu isolieren und die kodierende Sequenz zu ermitteln. Außerdem darf der verwendete Antikörper die Bindungsdomänen dieser Proteininteraktion nicht blockieren.
Ein weiteres Verfahren stellt die CORT – Methode (= ***c****loning* ***o****f* ***r****eceptor* ***t****argets*) dar: mit einem entsprechend markierten, rekombinanten Protein lassen sich Phagenlysate von cDNA - Expressionsbibliotheken *in vitro* nach interagierenden Peptiden eines Rezeptors durchmustern (SKOLNIK *et al.* 1991). Auf diese Weise konnten kürzlich in unserer Arbeitsgruppe Phospholipase Cγ (= PLCγ), sowie P85α und P85β, die beiden Unter-einheiten der Phosphatinositol-3-Kinase als potentielle Substrate der Rezeptortyrosinkinase UFO identifiziert werden (BRAUNGER *et al.*, 1997).
Sowohl Koimmunopräzipitation als auch CORT - Methode erlauben jedoch nur begrenzte Aussagen über die tatsächliche Funktion eines Proteins, die womöglich erst *in vivo*, d.h. im physiologischen Kontext der interagierenden Proteine entfaltet werden kann.

Das Two-Hybrid-System schließlich ist eine molekularbiologische Methode, die auf der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* basiert. Sie ermöglicht es, *in vivo* kodierende Gene für jene Proteine zu identifizieren, die spezifisch mit einem interessierenden Protein interagieren (FIELDS & SONG 1989; CHIEN *et al*. 1991).

© Benzing J, 2000

Methodischer Kern des von uns in der vorliegenden Arbeit verwendeten Two-Hybrid-Systems ist die funktionelle Rekonstitution des eukaryontischen Transkriptionsaktivators GAL4. Dieser besteht aus der DNA-bindenden (SILVER *et al.* 1984) und der Transkription aktivierenden Domäne (KEEGAN *et al* 1986). Erst jedoch aus der spezifischen Wechselwirkung zweier separater Hybridproteine X und Y (jeweils fusioniert mit der DNA-bindenden bzw. der Transkription aktivierenden Domäne) resultiert die Rekonstitution des GAL4 – Proteins. Nach Transfer in den Nucleus (KALDERON *et al.* 1984; NELSON & SILVER 1989) und der raümlichen (non-kovalenten), spezifischen Annäherung des GAL4 – Proteins an die UAS (= *upstream activation sequence*) wird die Transkriptionsmaschinerie in Gang gesetzt (MA *et al.* 1988): In Folge dessen kommt es zur Aktivierung des bakteriellen Reportergens *Lac*Z. Mit Hilfe von Genmarkern hefespezifischer Auxotrophie wie *leu2* oder *trp* lassen sich im Vorfeld jene Hefezellen selektiv erfassen, die beide Hybridplasmide aufgenommen haben (DURFEE *et al.* 1993; VOJTEK *et al.* 1993).

Nach ähnlichem Prinzip funktioniert eine weitere Variante des Two-Hybrid-Systems, basierend auf der Rekonstitution von LEXA, anstelle von GAL4 (EBINA *et al.* 1983; GYURIS *et al.* 1993; ESTOJAK *et al.* 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des GAL4 - Two-Hybrid-Systems auf Proteinebene Wechselwirkungen mit der zytoplasmatischen Domäne der beiden Rezeptortyrosinkinasen UFO bzw. MET untersucht. Zu diesem Zweck klonierten wir die zytoplasmatischen Anteile dieser beiden Rezeptortyrosinkinasen in Hefeexpressions-vektoren und identifizierten zunächst in Kotransformationen bereits bekannte, später beim Screenen von cDNA-Bibliotheken auch neue Substrate von UFO bzw. MET.

4.1. Identifikation intrazellulärer Bindungspartner von Rezeptor-tyrosinkinasen im Two-Hybrid-System

Eine zentrale Rolle bei der Übermittlung inter- und intrazellulärer Signale kommt den Rezeptortyrosinkinasen zu: Sie stellen eine wichtige Untergruppe der Onkogene dar (HANKS *et al.* 1988).

Durch extrazelluläre Bindung eines spezifischen Liganden kommt es - nach Dimerisierung des Rezeptors - zu dessen Aktivierung durch Autophosphorylierung von Tyrosinresten (LEMMON & SCHLESSINGER 1994). In Folge können intrazelluläre Rezeptoranteile mit

© Benzing J, 2000

spezifischen zytoplasmatischen Proteinen interagieren – Schritt für Schritt wird so eine Signalkaskade von der Zellmembran bis hin zum Nukleus in Gang gesetzt. Wichtige Voraussetzung für die Identifikation neuer potentieller Interaktionspartner der zytoplasmatischen Domäne von Rezeptortyrosinkinasen im Two-Hybrid-System ist die grundsätzliche Fähigkeit des Rezeptor – Hybridproteins, nach Aktivierung mitsamt den phosphoylierten Tyrosinresten, die Nukleusmembran der Hefezellen passieren zu können. (TEZUKA *et al.* 1996).

Mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems fanden sich bisher eine ganze Reihe zytoplasmatischer Proteine, die als Substrate von Rezeptortyrosinkinasen fungieren: P85, die Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase, konnte beispielsweise als Interaktionspartner des Tyrosinkinaserezeptors FLT-1 (CUNNINGHAM *et al.* 1995), SHC (= *src homology and collagen protein*) und IRS-1 (= *insulin receptor substrate*) als Substrate des Insulinrezeptors IR (O'NEIL *et al.* 1994; CRAPARO *et al.* 1995), GRB10 bzw. GRB10/IR – SV 1 (= GRB10/GRB-IR *splice variant 1*) als Bindungspartner des *insulin-like growth factor receptor* IGF-I (MORRIONE *et al.* 1996) von IR (O' NEILL *et al.* 1996), sowie von BCR-ABL (BAI *et al*. 1998) und schließlich die beiden SH2-Proteine SHD und SHE als intranukleäre Substrate der Tyrosinkinase c-ABL identifiziert werden. (ODA *et al.* 1997).

Zunächst waren jedoch grundsätzliche Voraussetzungen zu schaffen, um möglicherweise neue intrazelluläre Interaktionspartner auch für die Rezeptortyrosinkinasen UFO und MET im Two-Hybrid-System identifizieren zu können. Ein erster Schritt war die optimale Etablierung einer funktionsfähigen, ausreichend sensitiven, gleichzeitig aber spezifischen Two-Hybrid-Methodik in unserer Arbeitsgruppe. Des weiteren galt es, als eine der zentralen Fragen zu klären, ob es notwendig sein würde, die Tyrosinkinaseaktivität unserer Rezeptorkonstrukte „künstlich" zu induzieren.

4.2. Bedeutung intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität für die Bindungsaffinität zu interagierenden Proteinen

Physiologischerweise führt erst die extrazelluläre Bindung von Liganden an einen Tyrosinkinaserezeptor zu dessen Dimerisierung und schließlich zur Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste (SCHLESSINGER & ULLRICH 1992; FANTL *et al.* 1993). Die Tyrosinkinase fungiert quasi als „Schalter": in aktiviertem (= phosphoryliertem) Zustand binden die SH2 - Bindungsdomänen bestimmte Signalproteine spezifisch an diese

© Benzing J, 2000

Tyrosinreste und an carboxyterminal davon gelegene Aminosäuren, wie dies bereits für mehrere Rezeptortyrosinkinasen, wie etwa EGFR, MET, PDGFR, UFO und die BCR-ABL-Tyrosinkinase belegt werden konnte (PAWSON & SCHLESSINGER 1993, ANDERSON & MLADENOVIC 1996). Ausreichend intrinsische Aktivität ist somit ein entscheidender Faktor bei der Signaltransduktion von (Rezeptor-) Tyrosinkinasen.

Wie gezeigt werden konnte, erfolgt die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase UFO über Bindung des Liganden GAS6 (= ***g****rowth* ***a****rrest* ***s****pecific gene 6*), indem dadurch die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität von UFO (STITT *et al.* 1995; VARNUM *et al.* 1995).
Da uns GAS6 als Ligand für UFO zunächst noch nicht zur Verfügung stand, erst die Tyrosinkinaseaktivität jedoch zur Bindung intrazellulärer Substrate führt, mußten wir alternative Wege zur Aktivierung des Rezeptors erwägen. Eine Möglichkeit, Rezeptor-tyrosinkinasen zu aktivieren, wurde bereits verschiedentlich erfolgreich angewandt: Koppelt man beispielsweise intrazelluläre UFO-Anteile mit extrazellulären Anteilen des EGF - Rezeptors zur sogenannten EGFR-UFO-Chimäre, lassen sich letztere mit dem verfügbaren EGF (= ***E****pidermal* ***G****rowth* ***F****actor*) stimulieren (MCCLOSKEY *et al.* 1994; BRAUNGER *et al.* 1997).

Für die Two-Hybrid-Experimente mit UFO verwandten wir die Onkogen aktivierenden Eigenschaften von TPR (= *translocated promotor region*). Die transformierende Sequenz *tpr-met* konnte im Rahmen eines NIH/3T3-Assays aus HOS-Zellen isoliert werden, die mit MNNG (= N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidin) vorbehandelt waren (COOPER *et al.* 1984). Später zeigte sich, dass es durch Rearrangement von *tpr* (***t****ranslocated* ***p****romoter* ***r****egion*) auf Chromosom 1 mit dem Proto-Onkogen *met* auf Chromosom 7 zur Expression des Fusionsproteins TPR-MET gekommen war. TPR-MET-Dimere aktivieren konstitutiv die zytoplasmatischen Anteile des MET-Rezeptors (DEAN *et al.* 1987; PARK *et al.* 1986) und setzen so die onkogene Potenz dieses Fusionsgens frei, die sich in pathologischer Motilität und Invasion extrazellulärer Matrix, der zellulären Transformation, der Inhibition von Apoptose und der Förderung von Metastasierung äußert (RODRIGUES & PARK 1993; BESSER *et al.* 1997; BARDELLI *et al.* 1997). Teilsequenzen von *tpr* fanden sich in weiteren Transfektionsexperimenten, unter anderem fusioniert an die Tyrosinkinasedomäne von TRK (= *nerve growth facor receptor*) - isoliert aus Onkogenen des humanen papillären Schilddrüsenkarzinoms (GRECO *et al.* 1992), sowie am aminoterminalen Ende einer

© Benzing J, 2000

onkogenen Form der RAF/Threonin Kinase (KING *et al.* 1988). Das *tpr*-Gen ist als Fusionsprotein offensichtlich verantwortlich für Phosphorylierung und onkogene Aktivierung etlicher Tyrosinkinasen.

Wir klonierten die UFO-Rezeptorkonstrukte für die Verwendung im Two-Hybrid-System deshalb in Anlehnung an die Struktur des TPR-MET-Onkogens: Der für die Tyrosinkinase kodierende Anteil der UFO-cDNA wurde, unter Beachtung des korrekten Leserahmens, direkt an das carboxyterminale Ende jener *tpr*-Sequenz (425bp) gekoppelt, die sich auch aminoterminal vom Bruchpunkt des chromosomal rearrangierten TPR-MET-Onkogens (DEAN *et al.* 1987) befindet und in die Hefeexpressionsvektoren pGBT9 bzw. pAS2 (*Clontech*) der DNA-bindenden Domäne des GAL4-Gens kloniert. Die beiden hieraus resultierenden Rezeptorkonstrukte werden in der vorliegenden Arbeit als pGBT9 [*tpr-ufo*] bzw. pAS2 [*tpr-ufo*] bezeichnet.

Bei Wechselwirkungen zwischen IRS-1 (= ***I****nsulin* ***R****eceptor* ***S****ubstrate 1*) mit dem Insulinrezeptor IR (O' NEILL *et al.* 1994) und der Interaktion von P85β mit der ECK-Rezeptortyrosinkinase (PANDEY *et al.* 1994) kam es jedoch *in vivo* zu spontaner Autophosphorylierung dieser Tyrosinkinasen im Two-Hybrid-System – auch ohne eine zusätzliche Aktivierung – offenbar aufgrund eigener intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Für die zytoplasmatische Tyrosinkinase SRC konnte ebenfalls gezeigt werden, dass schon allein die Expression dieses Gens in Hefezellen zu Autophosphorylierung führen kann (JOVE *et al.* 1987).
Daher klonierten wir ein weiteres UFO-Rezeptorkonstrukt für unsere Versuche im Two-Hybrid-System: der für die Tyrosinkinase kodierende Anteil von *ufo* wurde dafür ohne die Onkogen aktivierende Sequenz *tpr* in den Hefeexpressionsvektor pGBT9 (*Clontech*) der DNA bindenden Domäne des GAL4-Gens kloniert. Das entsprechende Rezeptor-konstrukt wird in der vorliegenden Arbeit als pGBT9 [*ufo3'*] bezeichnet.

Für unsere MET – Rezeptorkonstrukte im Two-Hybrid-System klonierten wir die kodierende Region (1670bp) des onkogenen Zielproteins TPR-MET (DEAN *et al.* 1987) in den Hefeexpressionsvektor pGBT9 bzw. pAS2 (*Clontech*) der DNA bindenden Domäne des GAL4-Gens. Diese beiden MET-Konstrukte erhielten von uns die Bezeichnungen pGBT9 [*tpr-met*] bzw. pAS2 [*tpr-met*].

© Benzing J, 2000

Nach Sequenzierung dieser drei Rezeptorkonstrukte überprüften wir deren Proteinexpression bzw. Autophosphorylierung im Two-Hybrid-System (siehe 3.1.3. bzw. 3.1.4.). Alle unsere Konstrukte ließen sich in Hefezellen erfolgreich als Proteine *in vivo* exprimieren und (auto-) phosphorylieren. Hierbei zeigte sich, dass die Proteinexpression durch pGBT9 für UFO3' deutlich stärker ausfiel, als diejenige für TPR-UFO, während es sich bei der (Auto-) Phosphorylierung dieser beiden Konstrukte erwartungsgemäß umgekehrt verhielt. Dies belegt einerseits, dass sich die Tyrosinkinaseaktivität von UFO durch TPR nachweislich erhöhen läßt, dass sie sich jedoch andererseits *in vivo* auch spontan entfaltet - wenn auch in deutlich geringerem Maße.
Überraschend war außerdem, dass die quantitative Proteinexpression des Rezeptorkonstruktes TPR-MET durch die Hefevektoren pGBT9 und pAS2 in unseren Versuchen nahezu identisch war. Denn eigentlich sollte pAS2, eine Variante von pGBT9, zu deutlich stärkerer Proteinexpression führen (HARPER *et al.* 1993; FEILOTTER *et al.* 1994; JAMES *et al.* 1996). Unsere Ergebnisse bezüglich der relativ schwachen und darüber hinaus sehr instabilen Proteinexpression durch pAS2 wurde aber schon bald von LOUVET *et al.* (1997) bestätigt, der pODB8, eine vom Molekulargewicht her kleinere und verbesserte Version von pAS2 klonierte und verfügbar machte. Dieser Vektor fand allerdings, aufgrund der ansonsten notwendigen neuerlichen Klonierung, für unsere bereits fortgeschrittenen Versuche keine Verwendung mehr. Wir beschränkten uns daher in den weiteren Versuchen auf die pGBT9 – Konstrukte.

Zum Vergleich der qualitativen β-Galaktosidaseaktivität, die aus spezifischer Interaktion der Rezeptorkonstrukte pGBT9 [*tpr-met*], pGBT9 [*tpr-ufo*] und pGBT9 [*ufo3'*] mit einem identischen Substrat (in diesem Fall GRB2) resultierte, führten wir mehrere entsprechende Kotransformationen durch (siehe 3.1.9.): Für die Wechselwirkung zwischen TPR-MET und GRB2 ergab sich in diesem Zusammenhang die stärkste β-Galaktosidaseaktivität, während die GRB2-Interaktion mit TPR-UFO bzw. UFO3' hier geringere, jedoch nahezu identische qualitative β-Galaktosidaseaktivität entfaltete. Offenbar ist die zugrundeliegende Tyrosinkinaseaktivität von TPR-MET deutlich höher als diejenige von TPR-UFO, selbst wenn letztere ja zusätzlich durch TPR induziert wurde.
Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Tyrosinkinaseaktivität der Rezeptortyrosinkinase UFO und damit deren Bindungsaffinität zu intrazellulären Substraten als relativ schwach anzusehen ist (VARNUM *et al.* 1995; BRAUNGER *et al.* 1997).

© Benzing J, 2000

4.3. Transformationseffizienz als entscheidendes Kriterium für die erfolgreiche Anwendung des Two-Hybrid-Systems

Von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Anwendung des Two-Hybrid-Systems ist die Transformationseffizienz, die sich in ausreichender Expression des jeweiligen Zielproteins und letztendlich in effizienter Ausnutzung der eingesetzten cDNA beim Durchmustern von Fusionsbibliotheken nach potentiellen intrazellulären Substraten äußert (GIETZ *et al.* 1992).

Wir konnten in unseren Vorversuchen zur Optimierung der Kulturbedingungen von Hefen unter anderem zeigen, dass sowohl Form als auch Größe der verwendeten Kulturkolben erheblichen Einfluß auf das Wachstum von Hefezellen haben: Bei Verwendung von großen (2000 ml), speziell geformten *Erlenmeier* -Kolben (sogenannten „Schikanekolben“) ließen sich um bis zu 34 % höhere Zellzahlen bestimmen als in Hefekulturen, die unter identischen Bedingungen in konventionellen Kolben (= ohne Schikanen) gewachsen waren. Ein entscheidender Aspekt war hierbei der erhöhte Sauerstoffbedarf von Hefezellen in deren exponentieller Wachstumsphase. In Schikanekolben wird offensichtlich eine bessere Belüftung dieser Hefekulturen gewährleistet.

Eine der zentralen Voraussetzungen für optimales Hefewachstum stellt darüber hinaus die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen dar. Sobald nämlich das Substrat Adenin im zur Verfügung stehenden Medium nahezu aufgebraucht war, zeigte sich bei einem Großteil zunächst weißer Hefekolonien eine rötliche Verfärbung. Grund hierfür ist die *ade2-101* Mutation (POULTER & RIKKERINK 1983), die bei vielen Hefestämmen zu finden ist. Dieser Farbumschlag trat bei stärkerem Hefewachstum - insbesondere in Vollmedium - schneller auf, stand folglich in direkt proportionalem Zusammenhang mit der Wachstumsgeschwindigkeit. *ade2*-Mutanten ließen sich außerdem etwa bezüglich ihrer β-Galaktosidaseaktivität erheblich schlechter untersuchen als Hefetransformanten ohne Adeninmangel (siehe 3.1.6.) – das mögliche Auftreten falsch negativer Ergebnisse wäre somit zu erwarten gewesen (siehe 4.4.). Um dieser Problematik des vorzeitigen Verbrauchs von Adenin zu begegnen, fügten wir fortan allen unseren flüssigen und festen Hefemedien nach deren Zubereitung und Abkühlung auf ca. 55°C weitere 15 ml 0,2% Adenin - Hemisulfat hinzu.

Schließlich galt es, eine potentiell vorhandene, hefespezifische Toxizität unserer Two-Hybrid-Konstrukte auszuschließen (siehe 3.1.7.). Abgesehen vom daraus resultierenden

© Benzing J, 2000

schlechteren Wachstum, wären davon womöglich auch Proteinwechselwirkungen nachteilig beeinflusst worden. Hierzu wurde von uns das quantitative Wachstum von Hefen verglichen, die einerseits mit einem „leeren“ Expressionsvektor und andererseits mit einem Insert enthaltenden Expressionsvektor transformiert worden waren. Unter identischen Kulturbedingungen konnten wir hierbei jedoch für keines unserer Rezeptorkonstrukte einen hemmenden (= toxischen) Effekt auf das Hefewachstum nachweisen.

Neben den oben erwähnten, verbesserten Kulturbedingungen im Two-Hybrid-System, hatte insbesondere die optimale Durchführung der Hefetransformation wesentlichen Einfluß auf die resultierende Effizienz. In der nun vorliegenden Arbeit wurde überwiegend die Transformationsmethode nach ITO und Mitarbeitern (1983), später modifiziert von SCHIESTL & GIETZ (1989) verwandt.
Basis hoch effizienter Hefetransformationen war in diesem Zusammenhang vor allem die Verwendung von *sonifizierter salm sperm carrier* DNA (= *sssc*-DNA) von einem Molekulargewicht zwischen 2 und 15kb, mit maximalem Anteil bei ca. 7kb (GIETZ *et al.* 1992). Daher bestimmten wir vor jeder geplanten Transformation, insbesondere aber jedem Screening von cDNA – Bibliotheken, zunächst die molekulare Größenverteilung der *sssc*-DNA (siehe 3.3.4.) und optimierten sie im Bedarfsfall entsprechend (siehe 2.3.2.).

Außerdem versuchten wir die Effizienz von Transformationen im Two-Hybrid-System durch den Einsatz von Dimethylsulfoxid (= DMSO) weiter zu erhöhen. Um dies zu verifizieren, hatten wir identische Transformationen von pGBT9 [*tpr-ufo*] und den cDNA - Bibliotheken pGAD10 *thymus* und pGAD 10 *human fetal liver* einmal ohne und einmal mit DMSO durchgeführt (siehe 3.2.2.). Unter dem Einfluß von DMSO war die in unseren Versuchen resultierende Transformationseffizienz durchschnittlich siebenmal höher als ohne DMSO. Dieses Ergebnis bestätigt HILL und Mitarbeiter (1991), die einen ähnlich positiven Effekt von DMSO auf die Effizienz bei Transformation intakter Hefezellen beschrieben hatten.

Die sogenannte Titration von cDNA Bibliotheken (GIETZ *et al.* 1992) schließlich birgt den Vorteil, dass sich bereits im Vorfeld eines durchzuführenden Screenings dieser Bibliotheken, die zu erwartende Transformationseffizienz bei Einsatz einer bestimmten Menge cDNA rechnerisch abschätzen läßt (siehe 3.2.1.).

© Benzing J, 2000

Mit Hilfe der von uns in diesem Zusammenhang durchgeführten Einzeltransformationen konnten wir gewährleisten, dass später nur genau diejenige Menge an cDNA-Plasmid von - oft genug sehr unterschiedlich effizienten - Bibliotheken eingesetzt wurde, die zum Erreichen der erwünschten Effizienz (> 1.000.000 Transformanten/ Screening) notwendig war. Die Transformation der cDNA Bibliotheken wurde von uns in zwei getrennten Schritten durchgeführt: Ein Hefestamm wurde zunächst mit dem Plasmid für das Zielprotein transformiert und solange kultiviert, bis es möglich wurde, daraus kompetente Hefezellen zu gewinnen (siehe 2.3.1.). In diese solchermaßen prätransformierten Hefen wurde anschließend die entsprechende (durch Titration ermittelte) Menge der cDNA Bibliothek transformiert. Dadurch konnte nämlich, ohne nachteiligen Einfluß auf die selektive Expression der Prä-Transformanten, die Gesamteffizienz noch einmal zusätzlich deutlich gesteigert werden.

Die Transformationseffizienz des diploiden Hefestamm HY (fusioniert aus HF7c und Y187, *Clontech*) fällt offensichtlich deutlich höher aus (LOUVET *et al.* 1997) als für den Hefestamm HF7c (FEILOTTER *et al.* 1994) - insbesondere in Kombination mit pODB8; deshalb verwendeten wir später für das Screening von cDNA-Bibliotheken ausschließlich den Hefestamm HY.

Unsere Daten belegen, dass nur unter optimalen Wachstums- und Transformations-bedingungen von Hefezellen die ausreichende Replikation transformierter Plasmide und eine entsprechend hohe Transformationseffizienz beim Screening von Fusionsbibliotheken im Two-Hybrid-System zu erwarten sind.

4.4. Identifikation und Ausschluss falsch positiver und falsch negativer Interaktionen im Two-Hybrid-System

Im Two-Hybrid-System erfolgt die Identifikation positiver Klone in drei Schritten: Über Nährstoffselektion *ohne* Leucin bzw. Tryptophan (Expression der Reportergene *leu2* bzw. *trp*) und bei echter Interaktion der Proteine über Nährstoffselektion *ohne* Histidin (Expression des rekonstituierten Reportergens HIS3). Der dritte Schritt besteht im positiven Nachweis von β-Galaktosidaseaktivität, die erst durch Expression eines rekonstituierten *gal1-lacZ*-Reportergens ermöglicht wird (BARTEL *et al.* 1993).

© Benzing J, 2000

Falsch positive Klone im Two-Hybrid-System sind in der Regel klein (∅ < 2mm). Sie entsprechen dem sogenannten „Hintergrund“, Transformanten, deren HIS3 – Expression nicht aktiviert wurde, weil die enthaltenen Hybridproteine nicht interagieren. Als potentiell positive Hefekolonien isolierten wir lediglich solche mit einem Durchmesser von > 2 mm. Diese nur bedingt zuverlässige Differenzierung war erst nach einer Inkubationszeit von mehr als sechs Tagen möglich, wenn ein entsprechend signifikanter Größenunterschied vorgelegen hatte (siehe 3.2.2.).
Da die HIS3 - Selektion für den Hefestamm HF7c nicht zuverlässig funktionierte (Mitteilung des Herstellers *Clontech*), stand uns zwischenzeitlich nur der Ersatzstamm Y190 zur Verfügung. Für Y190 war indes beschrieben worden, dass bei Verwendung des Expressionsvektors pAS2 eine gewisse Durchlässigkeit der HIS3 - Expression („*leakyness*“) auftreten würde (HARPER *et al.* 1993), mit dem Effekt, dass auch nicht - positive Kolonien in näherer Umgebung potentiell positiver Klone trotz Selektionsdruck wachsen konnten. Zur Unterdrückung des Wachstums dieser falsch positiven Kolonien mußte 3-Aminotriazol (= 3-AT, *Sigma*), ein enzymatischer HIS3 – Inhibitor, dem Medium zugesetzt werden (IWABUCHI *et al.* 1993). Die genaue Konzentration von 5 bis 20 mM war in entsprechenden Vorversuchen mittels Titration zu bestimmen. Aufgrund der bereits beschriebenen, instabilen und unzureichenden Proteinexpression durch pAS2, verwandten wir im weiteren Verlauf unserer Versuche jedoch ohnehin bevorzugt den Expressionsvektor pGBT9, sowie den Hefestamm HY (LOUVET *et al.* 1997) - der titrierte Zusatz von 3-AT erübrigte sich.

Nach Extraktion der cDNA aus HIS3 - und LacZ - positiven Klonen und Elektroporation in HB101-Bakterien ließ sich eine womöglich vorliegende Interaktion mit dem Zielprotein mittels verschiedener Retransformationen verifizieren. Zum einen wurde in Einzeltransformationen der so gewonnenen Plasmide in den Vektor der *actvating domain* (pGAD424) und anschließendem X-Gal-Assay sichergestellt, dass keine autonome Aktivierung der Transkription vorlag, d.h. β-Galaktosidaseaktivität ohne *bait plasmid* (= DNA-bindende Domäne von GAL4 inklusive Rezeptorkonstrukt), wie dies etwa bei Transkriptionsfaktoren der Fall sein kann. Nach demselben Prinzip lassen sich falsch positive Klone auch mit Hilfe *pLam5‘* (= *human Lamin C*) , kloniert in den Vektor der *binding domain* pGBT9 eliminieren. Denn wird *pLam5‘* mit dem Plasmid der *activating domain* eines zunächst HIS3– und LacZ - positiven Interaktionspartners kotransformiert und führt der X-Gal-Assay zu

© Benzing J, 2000

einem positiven Resultat, liegt auch hier der Proteinwechselwirkung autonome Transkriptionsaktivität zugrunde (BARTEL *et al.* 1993b).

Auf diese Weise hatten wir UBC-9 (= *human* ***ub****iquitin* ***c****onjugating enzyme*) zunächst als falsch positiven Interaktionspartner der Rezeptortyrosinkinase UFO identifiziert. Beim Durchmustern der cDNA Bibliothek pGAD GH *rat embryo* (siehe Abschnitt 3.5.3.2.) konnten wir die cDNA eines überaus stark *LacZ*-positiven Interaktionspartners für unsere beiden Zielproteine pGBT9 [*tpr-ufo*] und pGBT9 [*ufo3*‘] isolieren, dessen Sequenzanalyse Homologien von > 85% für die kodierende Sequenz von UBC-9 ergab. In Einzeltransformationen von UBC-9 alleine und in Kotransformationen mit Lamin C – wie oben beschrieben - fand sich für UBC-9 jedoch eindeutig autonome, Transkription induzierende Aktivität. Ubiquitinierung stellt die Vorbereitung zum Proteinabbau im Proteasomenkomplex dar und ist Bestandteil einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Genexpression, DNA - Reparatur, Stressantwort, Zellzyklus, Signaltransduktion und programmiertem Zelltod (HERSHKO 1988; CIECHANOVER 1994; HOCHSTRASSER 1995). UBC-9 kontrolliert den Zellzyklus beim Übergang von der G_2- in die M-Phase und reguliert die Degradation von Zyklinen in *Saccharomyces cerevisiae* (SEUFERT *et al.* 1995). Eine Reihe von Publikationen beschreibt indes spezifische Interaktionen von Ubiquitin konjugierenden Enzymen (UBC) im Two-Hybrid-System. So fand sich unter anderem für FAP, einem Homolog von UBC-9, starke Assoziation mit dem humanen FAS-Protein (WRIGHT *et al.* 1996). Fehlerhafte Expression von FAS, einem Oberflächenmolekül (CD95), zugehörig zur Familie von Tumornekrosefaktor und Nervenwachstumsfaktor, ist eine der möglichen Ursachen für die Entstehung des Lymphoproliferativen Syndroms beim Menschen. Hier scheint FAS offensichtlich eine entscheidende, Apoptose induzierende Rolle für autoreaktive Lymphozyten zu spielen (FISHER *et al.* 1993; RIEUX-LAUCAT *et al.* 1995).

Unsere Ergebnisse stehen jedoch zu diesen und anderen identifizierten Interaktionen von UBC-9 in klarem Widerspruch. UBC-9 hatte in unseren Versuchen eindeutig eigene intrinsische Aktivität entwickelt, so wie dies auch von Transkriptionsfaktoren bekannt ist. Um aufzuklären, welche Funktion UBC-9 tatsächlich bezüglich UFO und anderer Proteine hat, bedarf es sicherlich anderer, vom Two-Hybrid-System unabhängiger Methoden, wie etwa der Immunpräzipitation.

Neben UBC-9 fanden wir beim Screening von cDNA Bibliotheken mit UFO- bzw. MET-Rezeptorkonstrukten im Two-Hybrid-System weitere falsch positive Proteinwechselwirkungen. Im Wesentlichen handelte es sich bei den beteiligten Proteinen um jene

© Benzing J, 2000

mitochondrialen und ribosomalen Ursprungs. Einen guten Überblick über diese und andere falsch positive Interaktionspartner, die bis dato im Two-Hybrid-System gefunden wurden, findet sich im Internet (http://www.fccc.edu/labs/golemis/ind.html) auf der Homepage des Labors von GOLEMIS und Mitarbeitern.

Potentiell positive Interaktionspartner, die mittels des Two-Hybrid-Systems identifiziert und isoliert werden, sollten sich darüber hinaus mit einer zweiten, unabhängigen Methode, etwa der Immunpräzipitation bestätigen lassen.

Falsch negative Ergebnisse im Two-Hybrid–System ergeben sich, wenn die Identifikation von *in vivo* tatsächlich interagierenden Proteinen mißlingt. Dies kann einerseits daran liegen, dass sich eines der exprimierten Hybridproteine toxisch auf das Wachstum von Hefezellen auswirkt. Diesen Effekt konnten wir zumindest für unsere Rezeptorkonstrukte der *binding domain* im Vorfeld ausschließen (siehe 3.1.7.). Andererseits kann ungenügende oder instabile, transiente Expression der Hybridproteine in den Hefen möglicherweise dazu führen, dass *in vivo* tatsächlich stattfindende Protein-Protein-Wechselwirkungen nicht aufgedeckt werden können. Aus diesem Grund zogen wir den pGBT9 dem Expressionsvektor pAS2 vor.

Womöglich werden durch kovalente Bindung der Transkription aktivierenden Domäne an die DNA-bindende Domäne von GAL4 ausgerechnet die spezifischen Bindungssequenzen für intrazelluläre Substrate des Zielproteins blockiert.

Trotz Berücksichtigung der vorgenannten Parameter ist es manchmal nicht möglich, Interaktionen von bestimmten Proteinen im Two-Hybrid-Systems nachzuweisen.

4.5. Identifikation intrazellulärer Substrate der Rezeptortyrosinkinase UFO im Two-Hybrid-System

Die kodierenden Regionen der bekanntermaßen mit dem Tyrosinkinaserezeptor UFO interagierenden Proteine GRB2, P85α (FRIDELL *et al.* 1996), sowie Phospholipase Cγ (BRAUNGER *et al.* 1997) hatten wir in den Hefeexpressionsvektor pGAD424 (*Clontech*), die cDNA-Fusionsbibliotheken dagegen in die Vektoren pGAD GH bzw. pGAD10 (*Clontech*) kloniert, allesamt also in Expressionsvektoren der Transkription aktivierenden Domäne von GAL4. Während wir das Rezeptorkonstrukt der entsprechenden DNA – bindenden Domäne von GAL4, pGBT9 [*tpr-ufo*] zum Screening der Bibliotheken verwandten, bestätigten wir mögliche Interaktionen in späteren Re-Transformationen mit Hilfe des

© Benzing J, 2000

Konstruktes pGBT9 [*ufo3*‘], um so leichter zwischen Protein-Protein-Interaktionen mit TPR und solchen mit der zytoplasmatischen UFO-Domäne zu differenzieren. Wir konnten in vivo die Wechselwirkung von UFO mit diesen Substraten durch Kotransformation im Two-Hybrid-System erfolgreich bestätigen (siehe 3.1.9.).

Der folgende Schritt allerdings, die Identifikation und Isolierung intrazellulärer Interaktionspartner von UFO beim Durchmustern von cDNA Bibliotheken, gelang uns jedoch nur im Falle des Adapterproteins GRB2 (= *growth factor receptor bound protein 2*). Wir konnten GRB2 aus drei unterschiedlichen Untersuchungen (*human fetal liver*, *rat embryo* und *thymus*) als Bindungspartner für UFO isolieren.

Die Tatsache, dass es uns dabei nicht möglich war, weitere - zumindest die bekannten - Substrate von UFO zu isolieren, könnte der relativ schwachen Tyrosinkinase-aktivität von UFO zuzuschreiben sein (VARNUM *et al.* 1995; BRAUNGER *et al.* 1997), die in unseren Versuchen selbst durch zusätzliche Aktivierung mit TPR nicht mehr erheblich gesteigert werden konnte (siehe 3.4.2.).

Die zunächst von unserer Arbeitsgruppe im CORT-Screening (= *Cloning of receptor targets*) identifizierte Wechselwirkung von GRB2 mit dem UFO-Rezeptor konnte jedoch andererseits nunmehr mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems *in vivo* mehrfach bestätigt werden. Ursache der Interaktion von GRB2 ist bekanntermaßen eine relativ hohe Bindungsaffinität der enthaltenen SH2-Domänen zu spezifischen Phosphotyrosinresten und carboxyterminal davon gelegenen Aminosäuren auf dem zytoplasmatischen Anteil des autophosphorylierten Rezeptors, in diesem Falle von UFO. Dies könnte einer der Gründe sein, warum es uns zwar lediglich in Kotransformationen gelungen ist, P85 und PLCγ als Substrate von UFO nachzuweisen, nicht aber beim Durchmustern von cDNA-Bibliotheken, wenn die Substrate um ihre Bindungsstellen quasi konkurrieren müssen. Andererseits könnte bei unseren entsprechenden Versuchen im Two-Hybrid-System die in Frage kommende Bindungsdomäne des Tyrosinkinaserezeptors UFO bevorzugt durch GRB2 besetzt worden und damit für P85, PLCγ und andere potentielle Substrate bereits blockiert gewesen sein.

Das mit GRB2 strukturverwandte Adapterprotein GRB10 ließ sich mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems als neues intrazelluläres Substrat sowohl für IGF-IR (*Insulin-like Growth Factor I Receptor*) (MORRIONE *et al.* 1996), als auch für die Rezeptortyrosinkinase RET (PANDEY *et al.* 1995) identifizieren. Andere Publikationen berichten indes über die Identifikation von P85 als Substrat des FLT-1 Tyrosinkinaserezeptors (CUNNINGHAM *et al.*

© Benzing J, 2000

1995) oder aber über Interaktionen von PLCγ und PI3-Kinase mit dem M-CSF-Rezeptor im Two-Hybrid-System (BOURETTE *et al.* 1997).

4.6. Nachweis intrazellulärer Substrate der Rezeptortyrosinkinase MET im Two-Hybrid-System

Die cDNA-Fusionsbibliothek *rat embryo* war in den Hefeexpressions-vektor 3‘ der Transkription aktivierenden Domäne des GAL4-Gens (= *activating domain*) pGAD GH kloniert worden. Das Rezeptorkonstrukt pGBT9 [*tpr-met*] der DNA-bindenden Domäne des GAL4-Gens verwandten wir zum Screenen dieser Bibliothek. Wir konnten hierbei 25 mal GRB2 als bekannten Interaktionspartner von MET bestätigen. Unter den übrigen X-Gal-positiven Klonen ließen sich nach Sequenzierung die kodierenden Abschnitte der fünf folgenden, potentiell neuen Substrate von TPR-MET identifizieren:

1.) **SNX2** (=*Sorting nexin 2*) umfasst 519 Aminosäuren und gehört neben SNX1, SNX3 und SNX4 zu einer Familie von hydrophilen Molekülen, die unter anderem in *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae* isoliert werden konnten. Die Mitglieder der SNX-Familie werden in verschiedensten Geweben exprimiert und finden sich, trotz ihrer hydrophilen Natur, zumindest teilweise mit zellulären Membranen assoziiert; ihre Funktion besteht – soweit bekannt – in der Koordination lysosomaler Degradation von Tyrosinkinaserezeptoren. So bindet etwa SNX1 an den EGF-Rezeptor (= *Epidermal Growth Factor*) und bewirkt seine lysosomale Degradation. Überexpression von SNX1 führte in diesem Zusammenhang zu deutlich reduzierter EGFR-Expression auf der Zelloberfläche aufgrund konstitutiver, ligandvermittelter Degradation (KURTEN *et al.* 1996). Bei Ko-immunopräzipitation in COS7-Zellen konnte zudem die Bindung von SNX1, von SNX1A (= Spleißvariante von SNX1), SNX2 und SNX4 an die Tyrosinkinaserezeptoren für EGF, PDGF und Insulin gezeigt werden (HAFT *et al.* 1998).
Mit diesen Befunden stimmt auch die von uns nachgewiesene Interaktion von SNX2 mit der Rezeptortyrosinkinase MET überein.

2.) Als **ZIP-Kinase** (= ***z****eta* ***i****nteracting* ***p****rotein*) wird eine neue Serin/Threoninkinase bezeichnet, die wahrscheinlich eine zentrale Rolle bei Vermittlung der Apoptose spielt (KOGEL *et al.* 1998; KAWAI *et al.* 1998). ZIP interagiert mit PKC-*zeta*, einer atypischen

© Benzing J, 2000

Proteinkinase C (PULS *et al.* 1997). Das ZIP-Gen konnte mittlerweile anhand von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf Chromosom 19q 13.3 lokalisiert werden (SAITO *et al.*, 1998). Carboxyterminal findet sich ein sogenannter *Leucin–Zipper*, am aminoterminalen Ende der ZIP-Kinase hingegen eine Kinasedomäne. Die ZIP-Kinase bindet durch Interaktion der jeweils enthaltenen *Leucin–Zipper* an ATF4, das zur ATF/CREB-Familie (= ***a****ctivating* ***t****ranscription* ***f****actors/* ***c****yclic AMP-****r****esponsive* ***e****lement-****b****inding protein*) gerechnet wird. Der *Leucin-Zipper*–Region kommt hierbei offensichtlich entscheidende Bedeutung zu, da sie notwendig ist für Homodimerisierung der ZIP-Kinase und so Kinase aktivierend wirkt. Dass diese intrinsische Kinaseaktivität verantwortlich sein könnte für die Induktion des programmierten Zelltodes (= Apoptose), läßt sich u.a. daraus schließen, dass Überexpression intakter, nicht jedoch katalytisch inaktiver *ZIP*-Kinase zu apoptotischen Veränderungen in NIH/3T3 Zellen führt (KAWAI *et al.* 1998). Der strukturelle Aufbau der katalytischen Domäne der ZIP-Kinase ähnelt darüber hinaus stark demjenigen der DAP-Kinase (= ***d****eath-****a****ssociated* ***p****rotein kinase*), die nach γ-Interferon-Induktion ebenfalls als Mediator der Apoptose agieren kann (DEISS *et al.* 1995).
Immunhistochemische Untersuchungen belegen jedoch, dass die ZIP-Kinase im Nukleus loakalisiert sein muß (KOGEL *et al.* 1998), was zwar unspezifische Interaktionen mit TPR zulassen, jedoch solche mit der zytoplasmatischen Domäne des Tyrosinkinase-rezeptors MET praktisch ausschließen würde. Um zu klären, ob die ZIP-Kinase tatsächlich mit TPR in Wechselwirkung tritt, sind weitere Versuche notwendig.

3.) Das Tumorsuppressorgen **TID56** (= *tumorous imaginal disc protein*) war ursprünglich aus *Drosophila melanogaster* isoliert worden (KURZIK-DUMKE *et al.* 1995) und weist hohe Homologie auf zu den evolutionär hochkonservierten DNAJ–Proteinen von Bakterien, Hefen und des Menschen. Die DNAJ-Proteine scheinen verantwortlich zu sein für die Einschleusung von Proteinen in die Mitochondrien, sowie außerdem für die strukturelle Faltung dieser Proteine (TERADA *et al.* 1997). DNAJ-Proteine modulieren im Zusammenspiel mit den DNAK-Proteine etwa die Aktivität des mitochondrialen HSP70 -Proteins (= ***h****eat* ***s****hock* ***p****rotein*) bzw. die Proteinreparatur (TOMOYASU *et al.* 1998) und damit die primäre Stressantwort der Zelle. Die hohe Substratspezifität und –sensitivität basiert hierbei auf den sogenannten „J- Domänen“ (KELLEY 1999).
hTid1, das kürzlich klonierte, humane Homolog des *Drosophila* Tumorsuppressorgens *Tid56*, besitzt ein weites mRNA-Expressionsspektrum, so auch in der HPV 18-positiven

© Benzing J, 2000

Zellinie HeLa (humanes Zervixkarzinom) und in humanen Genital-Keratinozyten. Der Genlokus für *hTid1* liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 (SYKEN *et al.* 1999). TID1 interagiert mit dem Onkoprotein E7 des humanen Papillomavirus 16 (SCHILLING *et al.* 1998). In diesem Kontext erscheint es interessant, dass die sogenannten *large tumor* – Antigene von Polyomaviren für jene funktionellen „J- Domänen" kodieren, die sowohl Bedeutung für die virale Replikation selbst, als auch für die zelluläre Transformation besitzen (PIPAS 1998). Durch Interaktion viraler Onkogene mit DNAJ-Proteinen werden diese befähigt, vermutlich mit Hilfe der „J- Domänen", Einfluß zu nehmen auf zelluläre Regelkreise. *hTid1* kodiert für zwei Proteine der mitochondrialen Matrix, nämlich für hTID1(L) und hTID2(S). Beide sind hochkonservierte Mitglieder der DNAJ-Proteinfamilie. Offensichtlich vermittelt hTID1(L) Apoptose, induziert sowohl durch Mitomycin C, als auch durch Tumornekrosefaktor TNF-α, während hTID1(S) apoptotische Effekte zu inhibieren vermag - Mitochondrien stellen zentrale Regulatoren der Apoptose dar. Somit wirken diese beiden Genprodukte von *Tid1* offenbar als positive und negative Effektoren der Signaltransduktion im Kontext von Apoptose und mitochondrialer Matrix (SYKEN *et al.* 1999). Außerdem konnte in synovialem Gewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis starke Expression des humanen Homologs von TID56 nachgewiesen werden: ein kausaler Zusammenhang mit der autoimmunen Pathogenese der rheumatoiden Arthritis wird hier vermutet (KURZIK-DUMKE *et al.* 1999; CHUKWUOCHA *et al.* 1999).

Sollte sich das humane Homolog des Tumorsuppressorgens TID56 als echtes Substrat der Rezeptortyrosinkinase MET bestätigen, wäre damit ein neuer Schritt der MET-Signal - transduktionskaskade bekannt, sowie ein weiterer Beleg dafür erbracht, dass MET tumorigenes Potential besitzt und die Apoptose transformierter Zellen unterdrückt.

4.) Das *bicaudal-D* – Gen in *Drosophila* kodiert für das Protein **BICD**, das charakterisiert ist durch fünf α-Helix-Domänen (*coiled coil*) und einem *Leucin Zipper*-Motiv. BICD ist Bestandteil des Zytoskeletts und vermittelt die Differenzierung der *Drosophila*-Oozyten (THEURKAUF *et al.* 1993), sowie die dorsal - ventrale bzw. anterior - posteriore Achsenausrichtung während der Oogenese (STEWARD & NÜSSLEIN-VOLLARD 1986; SUTER & STEWARD 1991). Das humane Homolog BICD1 ist lokalisiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (BAENS & MARYNEN 1997) und wird vor allem in Muskel- und Gehirngewebe exprimiert.

© Benzing J, 2000

Ob BICD tatsächlich als neues Substrat von TPR oder aber MET in Frage kommt oder aber unseren Ergebnissen eine unspezifische Interaktion zugrunde liegt, wird in den sich anschließenden Untersuchungen zu klären sein.

5.) *Human laminin B1 chain* mRNA kodiert für das Protein **LB1**. Das Glycoprotein Laminin B1 stellt eine wesentliche Komponente der Basalmembran dar. Die kodierende Sequenz ist auf Chromosom 7q22 lokalisiert und enthält cysteinreiche Wiederholungsmotive, globuläre Regionen und Helixstrukturen (PIKKARAINEN *et al.* 1987). LB1 spielt eine zentrale Rolle bei der Determinierung der extrazellulären Matrix während der Embryogenese (REING *et al.* 1992). Die Messenger-RNA für Laminin B1 wird vor allem von Fibroblasten und endothelialen Zellen exprimiert (SOINI *et al.* 1993). Darüber hinaus ist LB1 offenbar in der Lage, sowohl Zellen des Endothels, als auch Tumorzellen zu binden und auf diese Weise Angiogenese und Tumorwachstum zu regulieren (GRANT *et al.* 1994). Mittlerweile ist es mit Hilfe von synthetischen Laminin-Antagonisten gelungen, bei Nacktmäusen das Wachstum von Knochen- und Lungenmetastasen erfolgreich zu hemmen (NAKAI *et al.* 1992).
Interessanterweise finden sich deutliche Homologien zwischen Laminin B1 und dem aminoterminalen Ende der *aktivierten* Rezeptortyrosinkinase MET (CHAN *et al.* 1987). Da es sich bei der aktivierten Form von MET jedoch um das rearrangierte Fusionsprotein TPR-MET handelt (DEAN *et al.* 1987; PARK *et al.* 1986), belegen unsere Ergebnisse am ehesten eine Interaktion von Laminin B1 mit TPR – etwa über einen sogenannten *Leucin-Zipper*. Gegenwärtig wird untersucht, ob wir mit LB1 tatsächlich ein neues Substrat von TPR isoliert haben.

Bei unserem Screening der Fusionsbibliothek pGAD GH *rat embryo* mit dem Zielplasmid pGBT9 [*tpr-met*] fanden sich darüber hinaus kodierende Teilabschnitte von insgesamt fünf, bisher nicht näher charakterisierter Genen. Lediglich zwei davon (Abbildung 32g-h) entwickelten allerdings deutliche β-Galaktosidaseaktivität nach Retransformation, so dass auch nur diese für eventuell weitergehende Analysen von deren Sequenz bzw. deren Homologie zu bereits bekannten Proteinen in Frage kommen dürften.

Aufgrund Lokalisation und Funktion im zellulären Kontext konnten wir in diesem Zusammenhang jedoch echte Wechselwirkung mit dem Tyrosinkinaserezeptor MET für

© Benzing J, 2000

folgende 14 % der Proteine ausschließen, die im X-Gal-Assay primär positiv reagiert hatten: Homo sapiens SNARE associated protein SNAPAP, rat protease inhibitor, mitochondriale Fumarase, mitochondriale C Oxydase Untereinheiten I und II, β-Crystallin, Zinc finger und SMC1 (mitosis specific chromosome segregation protein). Unsere Überlegungen diesbezüglich orientierten sich unter anderem an der von GOLEMIS E. und Mitarbeitern im Internet publizierten Liste (http://www.fccc.edu/labs/golemis/ind.html), die einen aktuellen Überblick über jene falsch positiven Interaktionspartner gibt, die bisher mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems gefunden worden sind.

Als eindeutig falsch positiv stellten sich in unserem Two-Hybrid-Screening der cDNA Bibliothek *rat embryo* mit pGBT9 [*tpr-met*] etwa 5 % der ursprünglich 73 X-Gal positiven Klone heraus, da sie in Einzeltransformation, d.h. ohne das komplementäre GAL4 - Hybridprotein (in diesem Fall TPR-MET) autonome Transkriptionsaktivität entwickelten. Diese Klone enthielten cDNA von Skelettmuskel-Troponin T und vom DNA-bindendem *gooisecoid homeobox protein*.

Bei insgesamt 29 % der anfangs X-Gal-positiven Hefeklone ließ sich das Ergebnis des ersten X-Gal-Assays zwar noch bei einem zweiten X-Gal-Assay, nach Retransformation allerdings überhaupt nicht mehr oder nur sehr schwach reproduzieren: *tissue factor pathway inhibitor*, ribosomales Protein S10, KIAA0699-Protein, ribosomales Protein S23, *major β Globulin*, Unbekannt 3, *Calcium binding protein pp52* LSP1, *pro – alpha 2 (I) collagen*, IGF-BP3, Unbekannt 5, *translation initiation factor 3*, Unbekannt 7, *centromeric protein*.

Es bedarf im Anschluss an die vorliegende Arbeit nunmehr einer zweiten, vom Two-Hybrid-System unabhängigen Methode, um die mögliche Interaktion der Proteine Tid56, ZIP Kinase, SNX2, BICD und LB1 mit unserem Zielprotein TPR-MET zu verifizieren, etwa mit Hilfe der Immunpräzipitation. Auf diese Weise ließe sich auch zwischen Wechselwirkungen dieser Substrate mit der zytoplasmatischen Domäne des Tyrosinkinaserezeptors MET bzw. solchen mit TPR differenzieren.

Die Kenntnis solcher und anderer Protein-Interaktionen kann letztendlich dazu beitragen, sowohl die physiologische, als auch die pathologische Funktion von Genen im Kontext zu verstehen und damit der klinischen Medizin langfristig gezieltere Optionen in Diagnostik

© Benzing J, 2000

und Therapie eröffnen. Voraussichtlich im Jahr 2003 wird das ehrgeizige *Human Genome Project* endgültig abgeschlossen sein - eine internationale Zusammenarbeit mit dem Ziel, die etwa 3 Milliarden Basenpaare der humanen Erbinformation von schätzungsweise 100.000 Genen zu entschlüsseln (MIKLOS & RUBIN 1996). Doch allein die Sequenz von Genen verrät nur wenig über deren tatsächliche biologische Funktion. Erst proteinchemische Methoden wie das Two-Hybrid-System werden es uns ermöglichen, die physiologische Bedeutung und das feine Zusammenspiel dieser Vielfalt an Genen und der von ihnen kodierten Proteine verstehen zu lernen. „Proteomics“ wird so zum Schlüsselbegriff der biomedizinischen Forschung der nächsten Jahrzehnte.

© Benzing J, 2000

5. Zusammenfassung

Das Two-Hybrid-System ist eine relativ neue molekularbiologische Methode, die es erlaubt, Wechselwirkungen von Proteinen *in vivo* zu studieren und auf diese Weise bekannte und womöglich neue Substrate eines Zielproteins zu identifizieren.
Hauptziel der hier vorliegenden Arbeit war es, zu prüfen, ob sich das Two-Hybrid-System dazu eignen würde, intrazelluläre Interaktionspartner der beiden Rezeptortyrosinkinasen UFO (= *unknown function of an oncogene*) bzw. MET (= HGF = *hepatocyte growth factor*) näher zu charakterisieren und beim Durchmustern von Fusionsbibliotheken neue Substrate für diese beiden Onkogene identifizieren.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt die Klonierung der intrazellulären Anteile der beiden Rezeptoren in Hefeexpressionsvektoren der DNA bindenden Domäne pGBT9 (= *GAL4 DNA binding domain with target protein*) bzw. pAS2 (= *GAL4 DNA binding domain with advanced selection*) sowie den Nachweis erfolgreicher Proteinexpression und (Auto-) Phosphorylierung aller Konstrukte *in vivo*. Um die relativ schwache Tyrosinkinaseaktivität von UFO und die damit eingeschränkte Fähigkeit zur Bindung von Substraten zu erhöhen, verwendeten wir das Fusionskonstrukt TPR-UFO (= *translocated promoter region*). Es zeigte sich, dass das Rezeptorkonstrukt TPR-UFO stärker autophosphoryliert wurde als UFO. Außerdem wurden unsere Konstrukte im Vektor pGBT9 quantitativ ähnlich stark, aber deutlich stabiler exprimiert als im Vektor pAS2. Entsprechende Publikationen während dieses Zeitraumes bestätigten dieses Ergebnis. Wir verwendeten daher im weiteren Verlauf ausschließlich pGBT9-Konstrukte. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass sich die zu erwartende Transformationseffizienz durch Kultur der Hefezellen in sogenannten Schikanekolben unter maximalem Selektionsdruck, durch erhöhten Adenin-Gehalt der Kulturmedien, durch Verwendung hochmolekularer Carrier-DNA und von DMSO (= *Dimethylsulfoxid*) bei der Transformation von Hefen, sowie durch die Titration von cDNA-Bibliotheken deutlich steigern lässt. Die Transformationseffizienz kann als entscheidendes Kriterium für die erfolgreiche Durchführung des Two-Hybrid-Systems angesehen werden. Durch Kotransformationen konnten wir drei bereits bekannte Interaktionspartner der Rezeptortyrosinkinase UFO, nämlich Phospholipase Cγ, P85α (= eine Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase) und GRB2 (= *growth factor receptor binding protein 2)* im Two-Hybrid-System bestätigen.

© Benzing J, 2000

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit dem Durchmustern von Fusionsbibliotheken nach neuen Interaktionspartnern für die beiden Rezeptortyrosinkinasen UFO und MET. Für den in unserer Arbeitsgruppe entdeckten und klonierten Tyrosinkinaserezeptor UFO konnten in verschiedenen cDNA-Bibliotheken (*rat embryo*, *human fetal liver* und *thymus*) zwar mehrfach Interaktionen mit GRB2 bestätigt, aber keine neuen Substrate isoliert werden. Beim Screening der Fusionsbibliothek *rat embryo* mit unserem zweiten Zielprotein TPR-MET konnten wir neben dem bereits erwarteten GRB2 auch die Proteine SNX2 (= *sorting nexin 2*), ZIP Kinase (= *zeta interacting protein*), Tid56 (= *tumorous imaginal disc protein 56*), BICD (= *bicaudal D*) und LB1 (= *human lamin B1*), sowie darüber hinaus die kodierenden Teilsequenzen von zwei bisher unbekannten, noch nicht näher charakterisierten Genen, als neue Interaktionspartner ermitteln.

In nachfolgenden Untersuchungen wird derzeit der Versuch unternommen, mögliche Wechselwirkungen zwischen SNX2, Tid56 bzw. BICD und den beiden unbekannten Proteinen mit der zytoplasmatischen Domäne des Tyrosinkinaserezeptors MET zu verifizieren, um darüber neue Einsichten in die MET - vermittelte Signalkaskade zu gewinnen.

© Benzing J, 2000

6. Literatur

AGARWAL ML, TAYLOR WR, CHERNOV MV, CHERNOVA OB & STARK GR: The p53 Network. *J. Biol Chem* **273**: 1-4 (1998)

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W & LIPMAN DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402 (1997)

ANDERSON SM & MLADENOVIC J: The BCR-ABL oncogene requires both kinase activity and src-homology 2 domain to induce cytokine secretion. *Blood* **87**: 238-244 (1996)

AVANZI GC, GALLICCHIO M, CAVALLONI G, GAMMAITONI L, LEONE F., ROSINA A, BOLDORINI R, MONGA G, PAGORARO L, VARNUM B & AGLIETTA M: GAS6, the ligand of Axl and Rse receptors, is expressed in henatopoetic tissue but lacks mitogenic activity. *Exp. Hematol.* **25**: 1219-1226 (1997)

AVANZI GC, GALLICHIO M, BOTTAREL F, GAMMAITONI L, CAVALLONI G, BUONFIGLIO D, BRAGARDO M, BELLOMO G, ALBANO E, FANTOZZI R, GARBARINO G, VARNUM B, AGLIETTA M, SAGLIO G, DIANZANI U & DIANZANI C: GAS6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells. *Blood* **91**: 2334-40 (1998)

BAENS M & MARYNEN P: A human Homologue (BICD-1) of the Drosophila bicaudal-D gene. *Genomics* **45**: 601-606 (1997)

BAI RY, JAHN T, SCHREM S, MUNZERT G, WEIDNER KM, WANG JY & DUYSTER J: The SH2-containing adapter protein Grb10 interacts with Bcr-Abl. *Oncogene* **17**: 941-948 (1998)

BARDELLI A, PONZETTO C & COMOGLIO PM: Identification of multifunctional domains in the hepatocyte growth factor and its receptor by molecular engineering. *J. Biotechnol.* **37**: 109-122 (1994)

BARDELLI A, PUGLIESE L & COMOGLIO PM: "Invasive-growth" signalling by the Met/HGF receptor – the hereditary renal carcinoma connection. *Biochim Biophys Acta* **1333**: M41-51 (1997)

BARTEL PL, CHIEN CT, STERNGLANZ R & FIELDS S: Using the two hybrid system to detect protein-protein interactions. In: *Cellular interactions in development: A practical approach* (Herausgeber: HARTLEY DA), 153-179 (1993a)

BARTEL PL, CHIEN CT, STERNGLANZ R & FIELDS S: Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid-system. *BioTechniques* **14**: 920-924 (1993b)

BARTRAM CR: The molecular basis of chronic myelogenous leukemia. In: *Molecular Biology in Cancer Medicine* (Herausgeber: Kurzrock R, Talpaz M & Dunitz M), 129-142 (1995)

BEGGS JD: Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* **275**: 104-109 (1978)

© Benzing J, 2000

BELLOSTA P, COSTA M, LIN DA & BASILICO C: The receptor tyrosine kinase *ARK* mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 614-625 (1995)

BERG JM: Potential metal-binding domains in nucleic acid binding protein. *Science* **232**: 485-487 (1986)

BESSER D, BARDELLI A, DIDICHENKO S, THELEN M, COMOGLIO PM, PONZETTO C & NAGAMINE Y: Regulation of the urokinase-type plasminogen activator gene by the oncogene Tpr-Met involves GRB2. *Oncogene* **14**: 705-711 (1997)

BIRNBOIM HC: A rapid alkaline extraction procedure for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**: 243-255 (1983)

BIRNBOIM HC & DOLY JA: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523 (1979)

BISHOP JM: Viral oncogenes. *Cell* **42**: 23-48 (1985)

BISHOP JM: The molecular genetics of cancer. *Science* **249**: 305-311 (1987)

BOLIVAR F & BACKMAN: Plasmid of Escherichia coli as cloning vectors. *Methods Enzymol.* **68**: 245 (1979)

BOLLAG G & MCCORMICK F: Regulations and effections of ras proteins. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**: 602-632 (1991)

BOURETTE RP, MYLES GM, CHOI JL & ROHRSCHNEIDER LR: Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase and phosholipase C-γ2 by the M-CSF receptor is necessary for differentiation signalling. *EMBO* 16: 5880-5893 (1997)

BRAUNGER J, SCHLEITHOFF L, SCHULZ AS, KESSLER H, LAMMERS R, ULLRICH A, BARTRAM CR & JANSSEN JWG: Intrazellular signalling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene* **14**: 2619-2631 (1997)

BREEDEN L & NASMYTH K: Regulation of the Yeast HO Gene. *Cold Spring Harbour Symposium Quant. Biol.* **50**: 643-650 (1985)

BRONSTEIN I, VOYTA JC, MURPHY OJ, BRESNICK L & KRICKA LJ: Improved chemi - luminescent Western blotting procedure. *BioTechniques* **12**: 748-753 (1992)

BROWN R, BRADY G, MATTERN J & SCHÜTZ G: An alternative assay system for the detection of transforming genes. *Carcinogenesis* **5**: 1323-1328 (1984)

BULLOCK WO, FERNANDEZ JM, SHORT JM: XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376 (1987)

BURNETTE WN: Western Blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiografic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203 (1981)

© Benzing J, 2000

CALLAHAN R: P53 mutations, another breast cancer prognostic factor. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* **84**: 826-827 (1992)

CAMPBELL JL, RICHARDSON CC & STUDIER FW: Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 2276-2280 (1978)

CARUSO ML & VALENTINI AM: Overexpression of p53 in a large series of patients with hepatocellular carcinoma: a clinicopathological correlation. *Anticancer Res.* **19**: 3853-3856 (1999)

CAVANEE WK, DRYJA TP, PHILLIPS RA, BENEDICT WF, GODBOUT R, GALLIE BL, MURPHREE AL, STRONG LC & WHITE RL: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* **2**: 779-784 (1983)

CHAKRAVARTI A : Endothelin receptor-mediated signalling in hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* **5**: 303-307 (1996)

CHALLIER C, UPHOFF CC, JANSSEN JWG & DREXLER HG: Differential expression of the ufo/axl oncogene in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* **10**: 781-787 (1996)

CHAN AM, KING HW, TEMPEST PR, DEAKIN EA, COOPER CS & BROOKES P: Primary structure of the met protein tyrosine kinase domain. *Oncogene* **1**: 229-233 (1987)

CHIEN CT, BARTEL PL, STERNGLANZ R & FIELDS S: 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**: 9578-9582 (1991)

CHUKWUOCHA RU, ZHANG B, LAI CJ, SCAVULLI JF, ALBANI S, CARSON DA & CHEN PP: Isolation of an IgG monoclonal anti-fnaJ antibody from an immunglobulin combinatorial library from a patient with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **26**: 1439-1445 (1999)

CIECHANOVER A: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**: 13-21 (1994)

CLARK JM: Novel nontemplated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerises. *Nucleic Acids Res.* **16**: 9677-9686 (1988)

COOPER CS, PARK M, BLAIR DG, TAINSKY MA, HUEBNER K, CROCE CM & VAN DE WOUDE GF: Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* **311**: 29-33 (1984)

CRAPARO A, O'NEILL TJ, GUSTAFSON TA: Non-SH2 domains within the insulin receptor substrate-1 and SHC mediate their phospothyrosine-dependent Interaction with the motif of the insulin-like growth factor I receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 15639-15643 (1995)

CRAVEN RJ, XU L, WEINER TM, FRIDELL YW, DENT GA, SRIVASTAVA S, VARNUM B, LIU ET & CANCE WG: Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int. J. Cancer* **60**: 791-797 (1995)

© Benzing J, 2000

CUNNINGHAM SA, WAXHAM NM, ARRATE PM & BROCK TA: Interaction of the Flt-1 Tyrosine Kinase Receptor with the p85 subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* **270**: 20254-20257 (1995)

DEAN M, PARK M & VAN DE WOUDE GF: Characterisation of the rearranged *tpr-met* Onkogene Breakpoint. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 921-924 (1987)

DEISS LP, FEINSTEIN E, BERISSI H, COHEN O & KIMICHI A: Identification of a novel serine/threonine kinase ans a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes & Dev.* **9**: 15-30 (1995)

DELAHUNT B, EBLE JN, NACEY JN & GREBE SK: Sarcomatoid carcinoma of the prostate: progression from adenocarcinoma is associated with p53 over-expression. *Anticancer Res* **19**: 4279-4283 (1999)

DOWER WJ, MILLER JF & RAGSDALE WW: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145 (1988)

DURFEE T, BECHERER K, CHEN PL, YEH SH & YANG Y: The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase Type I catalytic subunit. *Genes Dev.* **7**: 555-569 (1993)

EBINA Y, TAKAHARA Y, KISHI F & NAKAZAWA A: LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene. *J. Biol. Chem.* **258**: 13258-13261 (1983)

ENG C & MULLIGAN LM: Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours, and hirschsprung disease. *Hum. Mutat.* **9**: 97-109 (1997)

ESTOJAK J, BRENT R & GOLEMIS EA: Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements. *Mol. Cell Biol.* **15**: 5820-5829 (1995)

FAUST M, EBENSPERGER C, SCHULZ AS, SCHLEITHOFF L, HAMEISTER H, BARTRAM CR & JANSSEN JWG: The murine *ufo* - receptor: molecular cloning, chromosomal localisation and *in situ* expression analysis. *Oncogene* **7**: 1287-1293 (1992)

FANTL WJ, JOHNSON DE & WILLIAMS LT: Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 453-481 (1993)

FEIG LA: Strategies for suppressing the funktion on oncogenic ras protein tumors. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* **85**: 1266-1268 (1993)

FEILOTTER HE, HANNON GJ, RUDDELL CJ, BEACH D: Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1502 - 1503 (1994)

FERRETTI L & SGARAMELLA V: Specific and reversible inhibition of the blunt end joining activity of the T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Res* **9**: 3695-3705 (1981)

© Benzing J, 2000

FIELDS S & SONG OK: A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246 (1989)

FIELDS S: The Two Hybrid System to detect Protein-Protein Interactions. *Methods Enzymol.* **5**: 116-124 (1993)

FIELDS S & STERNGLANZ R: The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetics* **10**: 286-291 (1994)

FISHER GH, ROSENBERG FJ, STRAUS SE, DALE JK, MIDDLETON LA, LIN AY, STROBER W, LENARDO MJ & PUCK JM: Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**: 935-946 (1995)

FRIDELL YW, VILLA J JR, ATTAR EC & LIU ET: GAS6 indces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 7123-7126 (1998)

FRIEND SH, BERNARDS R, ROGELI S, WEINBERG RA, RAPAPORT JM, ALBERT DM & DRYJA TP: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**: 643-646 (1986)

GAIT MJ: Oligonucleotid synthesis, a practical approach. *IRL Press Limited*, Oxford (1988)

GIETZ RD, ST. JEAN A, WOODS RA & SCHIESTL R H: Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20** : 1425 (1992)

Gietz RD & Schiestl RH: Transforming Yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology* **5**: 255 - 269 (1995)

GILLESPIE PG & HUDSPETH AJ: Chemiluminescence detection of proteins from single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 2563-2567 (1991)

GORUPPI S, RUARO E & SCHNEIDER C: Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibriblasts. *Oncogene* **12**: 471-480 (1996)

GORUPPI S, YAMANE H, MARCANDALLI P, GARCIA A, CLOGSTON C, GOSTISSA M, VARNUM B & SCHNEIDER C: The product of a Gas6 splice variant allows the release of the domain responsible for Axl tyrosine kinase receptor activation. *FEBS Lett.* **415**: 59-63 (1997)

GOUGH JA & MURRAY NE: Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **166**: 1-19 (1983)

GRANT DS, KIBBEY MC, KINSELLA JL, CID MC & KLEINMAN HK: The role of basement membrane in angiogenesis and tumor growth. *Pathol. Res. Pract.* **190**: 854-853 (1994)

GRECO A, PIEROTTI MA, BONGARZONE I, PAGLIARDINI S, LANZI C & DELLA PORTA G: TRK-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* **7**: 237-242 (1992)

© Benzing J, 2000

GROTH D, RESZKA R, SCHENK JA: Polyethylene glycol-mediated transformation of Escherichia coli is increased by room temperature incubation. *Anal - Biochem.* **240**: 302 -304 (1996)

GYURIS J, GOLEMIS E, CHERTKOV H & BRENT R: Cdi I, a human G1 und S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**: 791-803 (1993)

HAFT CR, DE LA LUZ SIERRA M, BARR VA, HAFT DH & TAYLOR SI: Identification of a family of sorting nexin molecules and characterisation of their association with receptors. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 7278-7287 (1998)

HANAHAN D & MESELSON M: Plasmid screening at high colony density. *Gene* **10**: 63-67 (1980)

HANKS SK, QUINN AM & HUNTER T: The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the katalytic domains. *Science* **241**: 42-52 (1988)

HARPER JW, ADAMI GR, WEI N, KEYOMARSI K & ELLEDGE SJ: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805 - 816 (1993)

HELDIN CH: Dimerization of cell surface receptors in signaltransduction. *Cell* **80**: 213-223 (1995)

HERSHKO A: Ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Biol. Chem.* **263**: 15237-40 (1988)

HILL J, DONALD KA & GRIFFITHS DE: DMSO - enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5791-5791 (1991)

HINDS PW & WEINBERG RA: Tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **4**: 135-41 (1994)

HINNEN A, HICKS JB, FINK GR: Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **75**: 1929-1933 (1978)

HOCHSTRASSER M: Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**: 215-223 (1995)

HOFFMAN CS & WINSTON F: A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. *Gene* **57**: 267-272 (1987)

HOLLENBERG SM, STERNGLANZ R, CHENG PF & WEINTRAUB H: Identification of a new familiy of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid-system. *Mol. and Cell. Biol.* **15**: 3813-3822 (1995)

ISH-HOROWICZ D & BURKE JF: Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989 (1981)

ITO H, FUKUDA Y, MURATA K & KIMURA A: Transformations of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168 (1983)

© Benzing J, 2000

IWABUCHI K, LI B, BARTEL PL & FIELDS S: Use of the two-hybrid-system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* **8**: 1693-1696 (1993)

JACKS T, REMINGTON L, WILLIAMS BO, SCHMITT EM, HALACHMI S, BRONSON RT & WEINBERG RA: Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* **4**: 1-7 (1994)

JAMES P, HALLADAY J, & CRAIG EA: Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two – hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425 - 1436 (1996)

JANSSEN JWG, SCHULZ AS, STEENVOORDEN ACM, SCHMIDBERGER M, STREHL S, AMBROS PF & BARTRAM CR: A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* **6**: 2113 - 2120 (1991)

JANSSEN JWG, BRAUNGER J, BALLAS K, FAUST M, SIEBERS U, STEENVOORDEN ACM & BARTRAM CR: Spectrum of transforming sequences detected by tumorigenicity assay in a large series of human neoplasms. *Int. J. Cancer* **80**: 857 – 862 (1999)

JINZA S, TAKANO Y, IKI M, NOGUCHI S & MASUDA M: Prognostic significance of p53 protein overexpression in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Urol. Int.* **60**: 147-151 (1998)

JOVE R, KORNBLUTH S & HANAFUSA H: Enzymatically inactive p60c-src mutant with altered ATP-binding site is fully phosphorylated in iistcarboxy-terminal regulatory region. *Cell* **50**: 937-943 (1987)

JUNG V, PESTKA SB & PESTKA S: Efficient cloning of the PCR-generated DNA containing terminal restriction endonuclease sites. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6156 (1990)

KAHLENBERG MS, STOLER DL, BASIK M, PETRELLI NJ, RODRIGUEZ-BIGAS M & ANDERSON GR: P53 tumor suppressor gene status and the degree of genomic instability in sporadic colorectal cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**: 1665-1670 (1996)

KALDERON D, ROBERTS BL, RICHARDSON WD & SMITH AE: A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**:499-509 (1984)

KAVANAUGH WM & WILLIAMS LT: An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* **266**: 1862-1865 (1994)

KAWAI T, MATSUMOTO M, TAKEDA K, SANJO H & AKIRA S: *ZIP* kinase, a novel serine / threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 18: 1642-1651 (1998)

KEEGAN L, GILL G & PTASHNE M: Separation of the DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**:699-704 (1986)

KELLEY WL: Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s. *Curr. Biol.* **9**: R305-8 (1999)

© Benzing J, 2000

KING HW, TEMPEST PR, MERRIFIELD KR & RANCE AJ: tpr homologues activat met and raf. *Oncogene* **2**: 617-619 (1988)

KINOSHITA N, MINSHULL J & KIRSCHNER MW: The identification of two novel ligands of the FGF receptor by a yeast screening method and their activity in Xenopus development. *Cell* **83**: 621-630 (1995)

KLEBE RJ, HARRISS JV, SHARP ZD, DOUGLAS MG: A general method for polyethylene-glycol - induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**: 333 - 341 (1983)

KNUDSON AG JR: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**: 820-823 (1971)

KOGEL D, PLOTTNER O, LANDSBERG G, CHRISTIAN S & SCHEIDTMANN KH: Cloning and chacterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is thightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. *Oncogene* **17**: 2645-2654 (1998)

KURTEN RC, CADENA DL GILL GN: Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science* **17**: 1008-1010 (1996)

KURZIK-DUMKE U, SCHICK C, RZEPKA R & MELCHERS I: Overexpression of human homologs of the bacterial DnaJ chaperone in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **42**: 210-220 (1999)

LAI C & LEMKE G: An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron* **6**: 691-704 (1991)

LALANDE M, PRYJA TP, SCHREICH RR, SHIPLEY J, FLINT A & LATT SA: Isolation chromosomes and potentially linked to retinoblastoma locus. *Cancer Genet. Cytogenet.* **13**: 283-295 (1984)

LEE SY & CHANG HN: Generation of bacteriophage lambda lysogens by electroporation. *BioTechniques* **16**: 206-208 (1994)

LEMMON MA & SCHLESSINGER J: Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biol. Sci.* **19**: 459-463 (1994)

LEVINE AJ, CHANG A DETMER D, NOTTERMAN DA, SILVER A, THORN K, WELSH D & WU M: The p53 tumorsuppressor gene. *J. Lab. Clin. Med.* **123**: 817-823 (1994)

LOUVET O, DOIGNON F & CROUZET M: Stable DNA-Binding Yeast Vector Allowing High-Bait Expression for Use in the Two Hybrid System. *BioTechniques* **23**: 816 - 819 (1997)

LUNDWALL A, DACKOWSKI W, COHEN E, SHAFFER M, MAHR A, DAHLBACK B, STENFLO J & WYDRO R: Isolation and sequence of the cDNA for human protein S, a regulator of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 6716-6720 (1986)

MA J & PTASHNE M: Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* **55**: 443-446 (1988)

© Benzing J, 2000

MALKIN D: p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Biochim Biophys Acta*. **1198**: 197-213 (1994)

MANFIOLETTI G, BRANCOLINI C, AVANZI G & SCHNEIDER C: The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6)is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in blood coagulation cascade. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4976-4985 (1993)

MANIATIS T, SAMBROOK J, FRITSCH EF: Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)

MARCHUK D, DRUMM M, SAULINO A & COLLINS FS: Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1154 (1991)

MC CLOSKEY P, PIERCE J, KOSKI RA, VARNUM B & LIU ET: Activation of the axl receptor tyrosine kinase induces mitogenesis and transformation in 32D-cells. *Cell Gr. Diff.* **5**:1105-1117 (1994)

MC CLOSKEY P, FRIDELL YW, ATTAR E, VILLA J, JIN Y, VARNUM B & LIU ET: GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl. *J. Biol. Chem.* **12**: 23285-91 (1997)

MIKLOS GL & RUBIN GM: The role of the Genome project in determining gene function. *Cell* **86**: 521-529 (1996)

MORRIONE A, VALENTINIS B, LI S, OOI YT, MARGOLIS B & BASERGA R: Grb10: A new substrate of the insulin-like Growth Factor I Receptor. *Cancer Research* **56**: 3165-3167 (1996)

MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G & EHRLICH H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbour, *Symp. Quan. Biol.* **51**: 263-273 (1986)

NAGATA K, OHASHI K, NAKANO T, ARITA H, ZONG C, HANAFUSA H & MIZUNO K: Identification of the product of growth arrest specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky and Mer receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **271**: 30022-30027 (1996)

NAKAI M, MUNDY GR, WILLIAMS PJ, BOYCE B & YONEDA T: A synthetic antagonist to laminin inhibits the formation of osteolytic metastases by human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res.* **52**: 5395-5399 (1992)

NAKANO T, HIGASHINO K, KIKUCHI N, KISHINO J, NOMURA K, FUJITA H, OHARA O & ARITA H: Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors. *J. Biol. Chem.* **270**: 5702-5705 (1995)

NEUBAUER A, FIEBELER A, GRAHAM DK, O'BRYAN JP, SCHMIDT CA, BARCKOW P, SERKE S, SIEGERT W, SNODGRASS HR, HUHN D & LIU ET: Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoeiesis. *Blood* **84**: 1931-1941 (1994)

© Benzing J, 2000

NELSON M & SILVER P: Cotext affairs nuclear protein localization in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 9: 384-389 (1989)

NOWELL PC & HUNGERFORD DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **132**: 1497 (1960)

O' BRYAN JP, FRYE RA, COGSWELL PC, NEUBAUER A, KITCH B, PROKOP C, ESPINOSA III R, LE BEAU MM, EARP HS & LIU ET: *Axl*, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5016-5031 (1991)

O' BRYAN JP, FRIDELL YW, KOSKY R, VARNUM B & LIU ET: The transforming receptor tyrosine kinase, *axl*, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage. *J. Biol. Chem* **270**: 551-557 (1995)

ODA T, KUJOVICH J, REIS M, NEWMAN B & DRUKER BJ: Identification and characterization of two novel SH2 domain-containing proteins from a yeast two hybrid screen with the ABL tyrosine kinase. *Oncogene* **15**: 1255-1262 (1997)

O' NEIL TJ, CRAPARO A & GUSTAFSON TA: Characterisation of an Interaction between Insulin Receptor Substrate 1 and the Insulin Receptor by Using the Two Hybrid System. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6433-6442 (1994)

O' NEIL TJ, ROSE DW, PILLAY TS, HOTTA K, OLEFSKY JM & GUSTAFSON TA Interaction of a GRB-IR Splice Variant (a human GRB10 Homolog) with the Insulin and Insulin-like Growth Factor I Receptor. *J. Biol. Chem.* **271**: 22506-22513 (1996)

PAN H, YIN C & VAN DYKE T: Apoptosis and cancer mechanisms. *Cancer Surv.* **29**: 305-327 (1997)

PANDEY A, DUAN H, DI FIORE PP & DIXIT VM: The *RET* receptor protein Tyrosine Kinase associates with the SH2-containing Adapterprotein Grb10. *J. Biol. Chem.* **270**: 21461-21463 (1995)

PANDEY A, LAZAR DF, SALTIEL AR & DIXIT VM: Activation of the *Eck* Receptor Protein Tyrosine Kinase stimulates Phosphatidylinositol 3-Kinase activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 30154-30157 (1994)

PARK M, DEAN M, COOPER CS, SCHMIDT M, O'BRIEN SJ, BLAIR DG & VANDE WOUDE GF: The mechanism of met oncogene avtivation. *Cell* **45**: 895-904 (1986)

PASINI B, CECCHERINI I & ROMEO G: RET mutations in human disease. *Trends Genet.* **12**: 138-144 (1996)

PAWSON T & SCHLESSINGER J: SH2 und SH3 domains. *Curr. Biol.* **3**: 434-442 (1993)

PIKKARAINEN T, EDDY R, FUKUSHIMA Y, BYERS M, SHOWS T, PIHLAJANIEMI T, SARASTE M & TRYGGVASON K: Human laminin B1 chain. A multidomain protein with gene LAMB1 locus in the q22 region of chromosome 7. *J. Biol. Chem.* **5**: 10454-10462 (1987)

© Benzing J, 2000

PIPAS JM: Molecular chaperone function of the SV40 large T antigen. *Dev. Biol. Stand.* **94**: 313-319 (1998)

POULTER RT & RIKKERINK EH: Genetic analysis of red, adenine-requiring mutants of Candida albicans. *J. Bacteriol* **156**: 1066-1077

PULS A, SCHMIDT S, GRAWE F & STABEL S: Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 6191-6196 (1997)

REINCKE M: Mutations in adrenocortical tumors. *Horm. Metab. Res.* **30**: 447-455 (1998)

REING J, DURKIN ME & CHUNG AE: Laminin B1 expression is required for laminin deposition into the extracellular matrix of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 23143-23150 (1992).

RESCIGNO J, MANSUKHANI A & BASILICO C: A putative receptor tyrosine kinase with unique struktural topology. *Oncogene* **6**: 1909-1913 (1991)

RHIM JS, PARK DK, ARNSTEIN P, HEUBNER RJ & WEISBURGER EK: Transformation of human cells in culture by N-methyl-N'-nitrosoguanidine. *Nature* **258**: 121-125 (1975)

RIEUX-LAUCAT F, LE DEIST F, HIVROZ C, ROBERTS IAG, DEBATIN KM, FISCHER A & DE VILLARTAY JP: Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**: 1347-1349 (1995)

RINKE DE WITT TF, IZON DJ, REVILLA C, OOSTERWEGEL M, BAKKER AQ, VAN EWIJK W & KRUISBEEK AM: Expression of tyrosine kinase genes mouse thymic stroma cells. *Int. Immunology* **8**: 1787-1795 (1996)

RODRIGUEZ GA & PARK M: Dimerization mediated through a Leucine Zipper activates the oncogenic potential of the *met* receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6711-6722 (1993)

ROWLEY JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**: 290-293 (1973)

SAITO T, SEKI N, OHIRA M, HAYASHI A, KOZUMA S, HATTORI A & HORI T: Assignment of the ZIP kinase gene to human chromosome 19p13.3 by somatic hybrid analysis and fluorescence in-situ hybridization. *J. Hum. Genet.* **43**: 209-211 (1998)

SANGER F, NICKLEN S & COULSON AR: DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463 (1977)

SAWAN A, RANDALL B, ANGUS B, WRIGHT C, HENRY JA, OSTROWSKI J, HENNESSEY C, LENNERD TW, CORBETT I, & HORNE CH: Retinoblastoma and p53 gene expression related to relapse and survival in human breast cancer: an immmunohistochemical study. *J. Pathol.* **168**: 23-28 (1992)

© Benzing J, 2000

SCHARF SJ: PCR Protocols - A guide to methods and applications: Cloning with PCR. Herausgeber: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, *Academic Press Inc.*, San Diego; 84-91 (1990)

SCHIESTL RH & GIETZ RD: High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**: 339-346 (1989)

SCHILLING B, DE-MEDINA T, SYKEN J, VIDAL M & MUNGER K: A novel human DnaJ protein, hTid-1, a homolog of the Drosophila tumor suppressor protein Tid56 can interact with the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology* **247**: 74-85 (1998)

SCHLESSINGER J & ULLRICH A: Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**: 383-391 (1992)

SCHNEIDER S, BUCHERT M & HOVENS CM: An in vitro assay of ß-galactosidase from yeast. *BioTechniques* **20**: 960-962 (1996)

SCHULZ AS, SCHLEITHOFF L, FAUST M, BARTRAM CR & JANSSEN JWG: The genomic structure of the human *ufo*-receptor. *Oncogene* **8**: 509-513 (1993)

SEUFERT W, FUTCHER B & JENTSCH S: Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* **373**: 78-81 (1995)

SIGURET V, RIBBA AS, CHEREL G, MEYER D & PIETU G: Effect of plasmid size on transformation efficiency by electroporation of Escherichia coli DH5 alpha. *Biotechniques* **16**: 422-426 (1994)

SILVER PA, KEEGAN LP & PTASHNE M: Amino Terminus of the Yeast GAL4 gene product is sufficient for nuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 5951-5955 (1984)

SILVER PA, CHIANG A & SADLER I: Mutations that alter both and localization and production of a yeast nuclear protein. *Genes Dev.* **2**: 707-717 (1988)

SKOLNIK EY, MARGOLIS B, MOHAMMADI M, LOWENSTEIN E, FISHER R, DREPPS A, ULLRICH A & SCHLESSINGER J: Cloning of PI3 kinase associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell* **65**: 83-90 (1991)

SOINI Y, PAAKO P & AUTIO-HARMAINEN H: genes of laminin B1 chain, alpha 1 (IV) of type IV collagen, and 72-kd type IV collagenase are mainly expressed by the stromal cells of lung carcinomas. *Am. J. Pathol.* **142**: 1622-1630 (1993)

STASS SA & MIXSON AJ:Oncogenes and Tumor Suppressor Genes: Therapeutic Implications. *Clin. Canc. Res.* **3**: 2687-2695 (1997)

STEWARD R & NÜSSLEIN-VOLLARD C: The genetics of the dorsal-Bicaudal-D region of Drosophila melanogaster. *Genetics* **113**: 665-678 (1986)

© Benzing J, 2000

STITT TN, CONN G, GORE M, LAI C, BRUNO J, RADZIEJEWSKI J, MATTSSON K, FISHER J, GIES DR, JONES PF, MASIAKOWSKI P, RYAN TE, TOBKES NJ, CHEN DH, DISTEFANO PS, LONG GL, BASILICO C, GOLDFARB MP, LEMKE G, GLASS DJ & YANCOPOULOS GD: The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas 6, are ligands for the Tyr 3-/Axl-family of receptor tyrosine kinases. *Cell* **80**: 661-670 (1995)

SUTER B & STEWARD R: Requirement for phosphorylation and localization of the Bicaudal-D protein in Drosophila oocyte differentiation. *Cell* **67**: 917-926 (1991)

SYKEN J, DE-MEDINA T & MUNGER K: Tid1, a human homolog of the Drosophila tumor suppressor I(2)tid, encodes two mitochondrial modulators of apoptosis with opposing functions. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **96**: 8499-8504 (1999)

TERADA K, KANAZAWA M, BUKAU B & MORI M: The human DnaJ homologue dj2 facilitates mitochondrial protein import and luciferase refolding. *J. Cell. Biol.* **139**: 1089-95 (1997)

TEZUKA T, UMEMORI H, FUSAKI N, YAGI T, TAKATA M, KUROSAKI T & YAMAMOTO T: Physical and functional Association of the cbl Protooncogene Product with an *src*-familiy protein tyrosine kinase, $p53/56^{lyn}$, in the B cell antigen receptor-mediated signaling. *J. Exp. Med.* **185**: 675-680 (1996)

THEURKAUF WE, ALBERTS BM, JAN YN & JONGENS TA: A central role for microtubules in the differentiation of Drosophila oocytes. *Development* **118**: 1169-1180 (1993)

TOMOYASU T, OGURA T, TATSUTA T & BUKAU B: Levels of Dank and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* **30**: 567-581 (1998)

TUNG WL & CHOW KC: A modified medium for efficient elektrotransformation of E. coli. *Trends in Genetics* **11**: 128-129 (1995)

VARNUM BC, YOUNG C, ELLIOTT G, GARCIA A, BARTLEY TD, FRIDELL YW, HUNT RW, TRAIL G, CLOGSTON C, TOSO RJ, YANAGIHARA D, BENNET L, SYLBER M, MEREWETHER LA, TSENG A, ESCOBAR E, LIU ET & YAMANE HK: *Axl* receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* **373**: 623-626 (1995)

VOGELSTEIN B & GILLESPIE D: Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 615-619 (1979)

VOJTEK AB, HOLLENBERG SM & COOPER JA: Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**: 205-214 (1993)

WEISS B, JACQUEMIN-SABLON, LIVE TR, FAREED GC, RICHARDSON CC: Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *Biol. Chem.* **243**: 4543 (1968)

© Benzing J, 2000

WEINBERG RA: The retinoblastoma gene & cell groth control. *Trends in Biochem. Sci.* **15**: 199-202 (1990)

WEINBERG RA: The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann. NY Acad. Sci.* **758**: 331-338 (1995)

WILLIAMS AF & BARCLAY AN: The immunglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **6**: 381-405 (1988)

WILSON RK, CHEN C, AVDALOVIC N, BURNS J & HOOD L: Development of an automated procedure for fluorescent DNA sequencing. *Genomics* **6**: 626-634 (1990)

WRIGHT DA, FUTCHER B, GHOSH P & GEHA RS: Association of Human Fas (CD95) with a Ubiquitin-conjugating Enzyme (UBC-FAP). *J. Biol. Chem.* **271**: 31037-31043 (1996)

YANG M, MAY WS & ITO T: JAZ requires the double-stranded RNA-binding zinc finger motifs for nuclear localization. *J. Biol. Chem.* **24**: 27399-27406 (1999)

ZHANG Y, MUKHOPADHYAY T, DOVEHOWER LA, GEROGES RN & ROTH J: Retroviral vector-mediated transduction of k-ras antisense RNA in human being cancer cells inhibits expression of malignant phenotype. *Hum. Gene Ther.* **4**: 451-460 (1993)

Diplomarbeiten, Dissertationen & Habilitationen

BRAUNGER J: „Intrazelluläre Signalvermittlung über die *Ufo/Axl* Rezeptortyrosinkinase.“ Inaugural - Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlichen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (1997)

FRANKE B: “The Hunt for TIAM 1 interacting proteins.” - Report of a $7^1/_2$ months training period at the department of Cell Biology at the Netherlands Kanker Institut (NKI) under the supervision of Dr. G.A.M. Michiels (1994)

FUGMANN SD: „Interaktionen der Faktoren des V(D)J-Rekombinasekomplexes und Mutationsanalysen der γ_c-Ketten und *XRCC4*-Gene bei Patienten mit schweren kombinierten Immundefekten.“ Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm (1997)

JANSSEN JWG: „Funktionelle Charakterisierung von Onkogenen des Menschen nach Isolation mittels DNA Transfektion.“ Habilitationsschrift zur Erlangung der venia legendi für das Fach Molekulare Humangenetik der Hohen Medizinischen Fakultät Heidelberg der Ruprecht-Karls-Universität (1999)

SCHLEITHOFF L: „Der *Ufo* - Tyrosinkinaserezeptor und seine Interaktionspartner in der zellulären Signaltransduktion.“ Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen (1994)

© Benzing J, 2000

Nützliche Webseiten im Internet

http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/
Detaillierte genomische Informationen über *Saccharomyces cerevisiae*

http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/human_genetics/gietz/Trafo.html
Aktuelle Protokolle zur Transformation von Hefen

http://www.fccc.edu/labs/golemis/ind.html
Aktuelle Protokolle zur Transformation von Hefen und aktualisierte Liste bisher mit dem Two-Hybrid-System gefundener, falsch positiver Interaktionspartner

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/XREFdb/
Online - Datenbank zum Vergleich von in Hefe gefundenen mit humanen Genen

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
Online - Datenbank zum Auffinden homologer DNA – Sequenzen zu einer zunächst unbekannten DNA – Sequenz

© Benzing J, 2000

7. Danksagung

Herrn PROF. DR. C. R. BARTRAM möchte ich für Möglichkeit danken, unter seiner Betreuung meine medizinische Dissertation anzufertigen. Er hatte stets ein „offenes Ohr“ für alle meine diesbezüglichen Fragen. Die Möglichkeit, darüber hinaus als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Humangenetik der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg die notwendigen Arbeiten hierzu fortführen zu können, betrachte ich als außerordentliches Privileg.

Bei Herrn Privatdozent DR. J. W. G. JANSSEN bedanke ich mich für die intensive, fachliche Betreuung meiner Experimente in den Labors in Ulm und Heidelberg. Ich habe Hochachtung vor seinen reichhaltigen molekularbiologischen Erfahrungen und seinem Ideenreichtum auf diesem Gebiet. Besonders hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang den überaus freundschaftlichen Umgangston im Labor.

Den Herren DR. ERICH WANKER (Max Planck Institut für molekulare Genetik, Berlin) und DR. DETLEV BANASCH (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) bin ich dankbar für die intensiven Gespräche, die wertvollen methodischen Hinweise und den Erfahrungsaustausch in Sachen Two-Hybrid-System.

Bei Herrn DR. OLIVIER LOUVET (Universität Bordeaux) möchte ich mich für die freundliche Überlassung des Hefestammes HY, beim NEDERLANDS KANKER INSTITUUT für die Verfügbarkeit der cDNA - Bibliothek pGAD GH *rat embryo* bedanken.

Frau DR. KIRN PARASHER (Universitätskinderklinik, Freie Universität Berlin) danke ich herzlich für das Durchsehen des Manuskriptes zu meiner Dissertation.

Bei Frau MTA MAGDALENA DIETL (Institut für Humangenetik, Universität Heidelberg) möchte ich mich ausdrücklich bedanken für ihren unermüdlichen Enthusiasmus beim Erlernen und der professionellen Anwendung der Two-Hybrid-Methode.

Für die überaus freundliche und entspannte Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei allen meinen Mitarbeitern in Ulm und Heidelberg.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und all meinen Freunden, die mich in dieser langen Zeit in der richtigen Art & Weise zu ermutigen wußten und entsprechend Geduld hatten.

© Benzing J, 2000

8. Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe keine Promotionsversuche an anderen Universitäten unternommen.
Es laufen keine Strafverfahren gegen mich.

Hamburg im Oktober 2000

© Benzing J, 2000

9. Curriculum Vitae



geboren		28. September 1968 in Berlin
wohnhaft		Bussestraße 1, 22299 Hamburg
Familienstand		ledig, eine Tochter
Eltern		Dr. med. Sonja Benzing, Ärztin Klaus Benzing, Journalist († 1976)
Schule	9/76 - 8/80	Grundschule Mönchsdeggingen
	29.6.88	Abitur & allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Donauwörth
Dienst	7/88 - 12/88	Bundeswehr, Sanitätskompanie 210, Kempten
	3/89 - 4/90	Zivildienst, Kreiskrankenhaus Donauwörth (Unfallchirurgie)
Studium	ab 10/90	Studium der Medizin, Universität Ulm
	30.3.93	Ärztliche Vorprüfung
	24.3.94	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2.9.96	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
		Praktisches Jahr (PJ) :
	10/96 - 1/97	*Chirurgie*, Medical University of South Africa, Pretoria
	2/97 - 5/97	*Kinderheilkunde*, Great Ormond Street Hospital, London
	6/97 - 9/97	*Innere Medizin*, Elisabethenkrankenhaus, Ravensburg
	14.10.97	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Klinik	10/97 - 6/98	Wissenschaftlicher Mitarbeiter (AiP) bei Prof. Dr. med. C.R. Bartram, Institut für Humangenetik, Universität Heidelberg
	7/98 – 7/99	Arzt im Praktikum (AiP) bei Prof. Dr. med. H. Versmold, Kinderklinik (Schwerpunkt Neonatologie), Freie Universität Berlin
	22.7.99	Approbation als Arzt gemäß § 3 BÄO
	seit 11/99	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. med. K. Ullrich, Kinderklinik der Universität Hamburg - Eppendorf
Promotion		Doktorand bei Prof. Dr. med. C.R. Bartram:
	9/94 – 3/96	Sektion Molekularbiologie, Kinderheilkunde II, Universität Ulm
	10/97 - 6/98	Institut für Humangenetik, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
	18.5.01	Promotion zum Doktor der Medizin (*magna cum laude*) an der medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Kontakt ✉ benzing@uke.uni-hamburg.de

© Benzing J, 2000