

Protein-Protein-Interaktionen des G-CSFR

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Diplom-Biologin Andrea Mohr
geboren am 13.2.1972 in Brackenheim

2000

Referent: Herr Prof. Dr. W. Müller

Korreferent: Herr Prof. Dr. K. Welte

Tag der Promotion: 21.11.2000

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Das Verständnis der Signaltransduktion des G-CSFR ist bis heute bedeutend lückenhafter im Vergleich mit anderen Rezeptorsystemen. Daher war das Ziel dieser Arbeit Wechselwirkungspartner des G-CSFR ausfindig zu machen:

Einen Ausblick über seine Bindeproteine wurde mittels ³⁵S-metabolischer Markierung zweier Zelllinien gewonnen. Dabei konnte gezeigt werden, daß in FDC-P1 mac11-Zellen mehr Wechselwirkungspartner des G-CSFR existieren, als in 32D.C10 Zellen. Dies deutet auf eine zelltypische Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege hin und bietet eine Erklärungsmöglichkeit, weshalb FDC-P1-Zellen bei G-CSF Stimulation verstärkt proliferieren und andere Zellen, wie z.B. 32D-Zellen zu granulozytären Zellen differenzieren.

Mittels Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen wurde gezeigt, daß Grb2 an den tyrosinphosphorylierten G-CSFR bindet. Durch den Einsatz von verschiedenen G-CSFR-Mutanten wurde die Grb2-Bindungsstelle näher charakterisiert: das Signalmolekül bindet an den phosphorylierten Tyrosinrest 764 des G-CSFR. Grb2 fungiert dabei als Adaptermolekül zwischen dem aktivierten Rezeptor und dem Ras/MAPK-Signaltransduktionsweg und führt somit zur Übermittlung proliferativer Signale. Mit dem Wissen um Grb2 als Bindeprotein der „Differenzierungsdomäne“ des G-CSFR konnte seine funktionale Einteilung in Subdomänen in Frage gestellt werden.

Ein Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening erlaubte die Identifikation eines spezifischen Wechselwirkungspartners, 112, des inaktiven, d.h. des nicht-phosphorylierten G-CSFR. Eine Antisense mRNA zu 112 wurde in dem murinen OGFR sowie in weiteren Transkripten der Maus, der Ratte und des Menschen detektiert. Interessanterweise konnte die Sequenz 112 in ihrer ursprünglichen Leserichtung in keinem der untersuchten Gewebe nachgewiesen werden. Folglich codiert 112 für einen Proteinabschnitt, der durch seine Interaktion mit dem G-CSFR die Bindung weiterer Signalmoleküle verhindern könnte. Die Proteindomäne 112, könnte als potentieller Inhibitor des G-CSFR von therapeutischem Nutzen sein. Vorstellbar wäre, daß aus 112 ein Peptid abgeleitet wird, das den G-CSFR auf Tumorzellen hemmt und somit Proliferation und Metastasierung verhindert.

Summary

Until today the understanding of G-CSFR signal transduction lags significantly behind that of other receptor systems. Therefore it was the aim of this Ph.D. thesis to identify interaction partners of the G-CSFR:

By ³⁵S-metabolic cell labelling of two different cell lines it was possible to gain a preview of its binding proteins. It could be shown that FDC-P1 mac 11 cells reveal more binding partners than 32D.C10 cells do. This points out that a cell specific activation of different signal transduction pathways might exist. This consequently offers a possible explanation for the observation that FDC-P1 mac 11 cells increasingly proliferate in contrast to other cell lines, e.g. 32D cells, which differentiate after G-CSF treatment.

It was shown via GST-pull-down-assays that Grb2 binds to the tyrosine phosphorylated G-CSFR. By using different mutants of the G-CSFR it was possible to further characterize the Grb2 binding site: the signalling molecule binds to the phosphorylated tyrosine residue 764 of the G-CSFR. Grb2 acts as an adaptor molecule leading to the transduction of mitogenic signals. With the investigation of Grb2 binding to the “differentiation subdomain” of the G-CSFR, the functional division of the cytoplasmic domain of the G-CSFR was called into question.

A yeast two-hybrid screening allowed the identification of the specific interaction partner 112 of the unphosphorylated, thus inactive, G-CSFR. The anti-sense mRNA of 112 was detected in the murine OGFR and in further transcripts of the mouse, rat, and human. Surprisingly, it was impossible to detect the sequence 112, corresponding to its original reading direction, in the investigated tissues. Therefore, 112 codes for a part of a protein which could inhibit the binding of further signalling molecules via its interaction with the G-CSFR. The protein domain 112 could be a putative inhibitor of the G-CSFR being of therapeutic importance. The generation of a peptide of 112 could be conceivably inhibit the G-CSFR expressed on tumour cells and consequently blocking proliferation and metastasis.

Schlagworte

- G-CSFR
- Protein-Protein-Interaktion
- Hefe Zwei-Hybrid System

Keywords

- G-CSFR
- protein-protein-interaction
- yeast two-hybrid system

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Aminocaprinsäure	6-Amino-n-Hexansäure
AML	akute myeloische Leukämie
amp	Ampicillin
b	Base(n)
bidest	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
C	Cystein
c-	zellulär
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute (engl. counts per minute)
CRH	Zytokinrezeptor homologe Region
D	Asparaginsäure
d.h.	das heißt
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoetin
Erk2	extracellular signal regulated kinase
et al.	und andere (lat. et alii)
etc.	und so weiter (lat. et cetera)
F	Phenylalanin
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl. fluorescence activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum
FDC-P	factor dependent cell Paterson

g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor
G-CSFR	G-CSF Rezeptor
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GH	growth hormone
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
gp	Glykoprotein
Grb2	growth factor receptor binding protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	high-performance liquid chromatography
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
JAK	Januskinase (just another kinase)
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kD	kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria broth
Leu	Leucin
LIF	leukemia inhibitory factor
m	Milli-
M	molar
MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPK	MAP Kinase
MAPKK	MAPK Kinase
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
Met	Methionin
min	Minute(n)
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
μ	mikro
n	nano
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
OGFR	opioid growth factor receptor
p	Pico-
P	Prolin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
pfu	plaquebildende Einheit (engl. plaque-forming unit)
PMSF	Phenylisothiocyanat

Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfophenylazo)phenylazo]-2-7-naphthalindisulfonsäure
PRL	Prolaktin
Q	Glutamin
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
S	Svedberg (Einheit des Sedimentationskoeffizienten)
s	Sekunde
s.	siehe
Sam68	Src associated in mitosis, 68 kd
SCF	stem cell factor
SCN	severe congenital neutropenia
SDS	Natrium (engl. ‚sodium‘)dodecylsulfat
SH2	Src homology
SHIP	SH2-containing Inositol 5'-Phosphatase
SHP-2	SH2-containing protein tyrosine phosphatase-2
SOS	Son of sevenless
SSC	Natriumcitrat
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
tet	Tetracyclin
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Units
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
W	Tryptophan
w/v	Masse/Volumen (engl. weight/volume)
WT	Wildtyp
X	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Hämatopoese	1
1.2 Zytokine der Hämatopoese	1
1.3 G-CSF und Granulopoese	2
1.4 Expression des G-CSFR	4
1.5 Die Struktur des G-CSFR	4
1.6 G-CSFR Isoformen	6
1.7 Die Bedeutung des G-CSFR bei SCN	7
1.8 Signaltransduktion des G-CSFR	8
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Enzyme und ihre Puffer	15
2.1.3 Antikörper	15
2.1.4 Radioaktive Substanzen	16
2.1.5 Sonstige Materialien	16
2.1.6 Geräte	17
2.1.7 Puffer	18
2.1.8 Nährmedien	20
2.1.9 Verwendete Mikroorganismen	23
2.1.10 Verwendete Zelllinien	23
2.1.11 Verwendete Plasmide	24
2.2 Methoden	29
2.2.1 Arbeiten mit DNA	29
2.2.2 Arbeiten mit RNA	40
2.2.3 Arbeiten mit Bakterien	44
2.2.4 Arbeiten mit Proteinen	46
2.2.5 Arbeiten mit Zellkulturen	51
2.2.6 Arbeiten mit Hefen	55
3 ERGEBNISSE	61
3.1 Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening	61
3.1.1 Erstellung der LexA Konstrukte	61
3.1.2 Überprüfung der generierten LexA-Konstrukte	62
3.1.3 Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening	64
3.1.4 Sequenzierung von VP16-112	67
3.1.5 Bestätigung der Interaktion in-vitro	69
3.1.6 Expression von 112	71
3.1.7. Screening der Mouse Kidney 5'-Stretch Plus cDNA Library	76
3.2 Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen	81
3.2.1 Erstellung der GST-Konstrukte	81
3.2.2 Überprüfung der generierten GST-Konstrukte	82
3.2.3 GST-pull-down-Experimente	84
3.3 Metabolische Markierung von Zellen mit Tran-³⁵S-Label	88

4 DISKUSSION 91

4.1 Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening 91

- 4.1.1 Der Proteinabschnitt 112 ist ein Interaktionspartner des G-CSFR..... 93
- 4.1.2 Die Sequenz 112 wird in allen getesteten murinen Geweben exprimiert..... 94
- 4.1.3 Die Sequenz 112 konnte auch in myeloiden Zellen nachgewiesen werden 95
- 4.1.4 Die murine Sequenz 112 besitzt ein humanes Homolog 96
- 4.1.5 Expression des G-CSFR in verschiedenen Geweben 96
- 4.1.6 Das DNA-Fragment 112 ist Teil der cDNA des murinen OGFR 97
- 4.1.7 Existiert das DNA-Fragment 112 in seiner ursprünglichen Leserichtung?..... 102
- 4.1.8 Ist 112 ein potentieller Inhibitor des G-CSFR und dadurch von therapeutischem Nutzen?..... 103

4.2 Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen..... 105

- 4.2.1 Überprüfung verschiedener Signalmoleküle auf ihre Interaktion mit dem G-CSFR 106
- 4.2.2 Grb2 bindet an Tyrosinrest 764 des G-CSFR 108
- 4.2.3 Sind weitere Bindeproteine des G-CSFR zu erwarten? 109

5 LITERATURVERZEICHNIS 111

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Unter Hämatopoese versteht man den streng kontrollierten Prozeß der Entstehung reifer Blutzellen, d.h. die Bildung der Erythrozyten und der Leukozyten. Zu den Leukozyten zählen hämatopoetische Zellen ohne Hämoglobingehalt: dazu gehören Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Als Erythrozyten werden Blutzellen mit Hämoglobin bezeichnet. Da hämatopoetische Zellen eine begrenzte Lebensdauer haben, müssen sie ständig neu gebildet werden (Fuchs & Segre 2000). Normale Bildungsraten bewegen sich beim Erwachsenen in einer Größenordnung von $2,5 \times 10^{11}$ Erythrocyten und $1,5 \times 10^{10}$ Leukozyten pro Tag. Reife Blutzellen stammen von einer vorwiegend im Knochenmark ruhenden Population pluripotenter Stammzellen ab. Diese teilt sich im Zuge der Hämatopoese asymmetrisch in eine pluripotente Stammzelle und in eine multipotente Vorläuferzelle. Diese multipotenten Vorläuferzellen differenzieren entlang bestimmter Linien, z.B. der erythrozytären-, megazytären-, granulozytären-, monozytären- oder lymphozytären Linie und bringen schließlich die funktionell verschiedenen Zelltypen des Blutes hervor (Kondo *et al.* 1997; Fuchs & Segre 2000). Die Differenzierung ist ein Prozeß, der über mehrere Stufen abläuft und mit einem schrittweisen Verlust der Pluripotenz einhergeht (Weissmann 2000).

1.2 Zytokine der Hämatopoese

Die hämatopoetische Differenzierung führt zur Entstehung reifer Blutzellen morphologischer und funktioneller Heterogenität. Ihre Entwicklung aus einer pluripotenten Stammzelle wird durch das Vorhandensein zahlreicher Zytokine, sowie der zeitlich abgestimmten Expression ihrer Rezeptoren reguliert (Metcalf 1989). Hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind Glykoproteine, die vorwiegend von Stromazellen, Makrophagen, Endothelzellen, Lymphozyten und Fibroblasten gebildet werden. Zu den Linien-unspezifischen und somit früh in der Hämatopoese aktiven Wachstumsfaktoren zählen IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-11,

SCF und GM-CSF. In der weiter fortgeschrittenen Blutbildung spielen die Linien-spezifischen Zytokine, wie z.B. IL-5, EPO, TPO, M-CSF und G-CSF, die entscheidende Rolle. Sie stimulieren nicht nur die Proliferation, sondern induzieren auch die Differenzierung der jeweiligen Vorläufer zu reifen hämatopoetischen Zellen. Charakteristisch für Zytokine ist ihre überlappende biologische Aktivität mit anderen Wachstumsfaktoren (Kishimoto *et al.* 1994). So können neben IL-6 u.a. auch IL-2, IL-4, IL-5 und γ -IFN die Antikörperproduktion in B-Zellen stimulieren (Kishimoto *et al.* 1994). Die anfängliche Vermutung, daß jedes Zytokin nur spezifische Auswirkungen auf eine bestimmte Zielzelle hat, konnte nicht bestätigt werden. Die meisten Wachstumsfaktoren zeigen verschiedene biologische Effekte auf zahlreiche Zellen und Gewebe (Kishimoto *et al.* 1994). IL-6 z.B. ist ein solches multifunktionales Zytokin. Es spielt nicht nur bei der B-Zell Differenzierung des Immunsystems, sondern auch im Rahmen des endokrinen-, hepatischen- und des neuralen Systems eine Rolle (Kishimoto *et al.* 1992). Zwischen den einzelnen Wachstumsfaktoren herrscht ein funktionelles Zusammenspiel, das die zelluläre Antwort beeinflusst, d.h. verschiedene Zytokine verhalten sich in ihrer Wirkung synergistisch (Ikebuchi *et al.* 1987; Caracciolo *et al.* 1989; Demetri & Griffin 1991; Ulich *et al.* 1991) oder antagonistisch (Lopez *et al.* 1989).

1.3 G-CSF und Granulopoese

Mehr als 70% der weißen Blutkörperchen sind neutrophile Granulozyten. Sie haben eine kurze Lebenszeit und müssen von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark ständig neu gebildet werden. Während der Differenzierung zu reifen neutrophilen Granulozyten kommt es zu einem Proliferationsstopp, zur Aktivierung von Neutrophilen spezifischen Genen und zu morphologischen Veränderungen der Zelle.

Zahlreiche Zytokine, wie z.B. SCF, IL-3, IL-6, GM-CSF und G-CSF spielen zu verschiedenen Zeitpunkten der Myelopoese eine wichtige Rolle und konnten dabei als positive Regulatoren der Granulopoese identifiziert werden (Metcalf 1989, 1991). Die meisten dieser Wachstumsfaktoren fördern die Proliferation früher myeloider Vorläufer, dabei sind sie nur begrenzt in der Lage die Differenzierung zu reifen Granulozyten zu bewirken (Lopez *et al.* 1988; Suda *et al.* 1988; Molineux *et al.* 1991). G-CSF, das von aktivierten Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet wird (Kaushanski *et al.* 1988;

Zsebo *et al.* 1988), kann Proliferation und Differenzierung von neutrophilen Vorläufern stimulieren, sowie das Überleben von reifen Neutrophilen verlängern (Begley *et al.* 1986; Demetri & Griffin 1991). Ursprünglich wurde G-CSF als eine Substanz identifiziert, die in der Lage ist in Zellen der murinen myelomonozytären Leukämiezelllinie WEHI-3BD+ eine Differenzierung zu granulozytären Zellen zu bewirken (Welte *et al.* 1985). G-CSF kann neben weiteren myeloiden Leukämiezellen auch auf normale hämatopoetische Vorläuferzellen, reife neutrophile Granulozyten und einige nicht hämatopoetische Zellen wirken (Platzer *et al.* 1985; Souza *et al.* 1986; Avalos 1996). Zahlreiche Beobachtungen belegen, daß G-CSF für eine normale Hämatopoese in vivo undenkbar ist. Ihm wird sowohl eine Aufrechterhaltung der „steady-state“ Produktion (Watari *et al.* 1989), als auch eine Funktion als „Notfall-Faktor“ bei ansteigender Granulopoese zugeschrieben (Kawakami *et al.* 1990).

Klinisch findet rekombinantes G-CSF seine Anwendung u.a. zur Überwindung einer durch Chemotherapie induzierter Zytopenie nach autologer Knochenmarkstransplantation (Welte *et al.* 1987,1996; Gabilove *et al.* 1988; Morstyn *et al.* 1988a) und bei Patienten mit Neutropenien, wie z.B. Kostmann Syndrom, zyklischer- und idiopathischer Neutropenie (Bonilla *et al.* 1989,1994; Hammond *et al.* 1989; Welte *et al.* 1990,1996; Jakubowski *et al.* 1989). Die G-CSF Therapie beschleunigt die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten und verringert so die Gefahr schwerer bakterieller und fungialer Infektionen (Welte *et al.* 1996; Bronchud *et al.* 1988; Morstyn *et al.* 1988b, 1989).

Anhand von G-CSF^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, daß G-CSF eine Hauptrolle in der Regulation der normalen und der Streßbedingungen unterworfenen Granulopoese spielt (Lieschke *et al.* 1994; Avalos 1996). Die Hypothese, daß G-CSF in multipotenten Vorläuferzellen eine Differenzierung zu myeloiden Zellen zur Folge habe, wurde von Yang *et al.* (1998) angezweifelt. Untersuchungen an Knockin-Mäusen deuteten ebenfalls darauf hin, daß G-CSF keinen Einfluß auf die terminale Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten hat, sondern lediglich an der Übermittlung einzelner, die biologische Aktivität von neutrophilen Granulozyten betreffender Signale beteiligt ist (Semerad *et al.* 1999), z.B. an der Inhibierung der Apoptose und somit ein längeres Überleben von Granulozyten mit sich bringt.

1.4 Expression des G-CSFR

Der G-CSFR wird auf neutrophilen Vorläuferzellen, reifen Neutrophilen, Thrombozyten, Monozyten, einigen B- und T-Zelllinien sowie auf zahlreichen myeloiden Leukämiezellen wie z.B. NFS-60, WEHI-3BD⁺ und HL-60, aber auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen, wie z.B. auf Endothelzellen, Trophoblasten und zahlreichen Karzinomzellen, wie z.B. Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, des Kolons, der Haut und der Blase, exprimiert (Begley *et al.* 1988; Bussulino *et al.* 1989; Uzunaki *et al.* 1989; Avalos *et al.* 1990; Noda *et al.* 1999; Mueller & Fusenig 1999). Reife Neutrophile exprimieren den G-CSFR in relativ niedriger Zahl, ca. 200-1000 Moleküle/Zelle (Avalos *et al.* 1990; Kvas *et al.* 1992). Die G-CSFR Expression ist ein Marker normaler myeloider Differenzierung und wird bei unreifen Granulozyten als Antwort auf G-CSF hochreguliert (Steinman & Tweardy 1994).

1.5 Die Struktur des G-CSFR

Der humane G-CSFR hat ein Molekulargewicht von ca. 13 - 15 kD (Nicola & Peterson 1986; Fukunaga *et al.* 1990). Der Rezeptor besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne (Fukunaga *et al.* 1990). Er gehört zur Zytokinrezeptor-Superfamilie, deren Mitglieder sich durch vier konservierte Cysteinreste und ein Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin (WSXWS) Motiv im extrazellulären Bereich auszeichnen (Cosman *et al.* 1990). Die Rezeptoren für IL-2 bis IL-7 (Miyajima *et al.* 1993), IL-9 (Renauld *et al.* 1992), IL-11 (Hilton *et al.* 1994), IL-12 (Chua *et al.* 1994), GM-CSF, EPO, TPO (Vigon *et al.* 1992), GH, PRL, gp130 (Hibi *et al.* 1990) werden ebenfalls dieser Familie von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren zugeordnet (Cosman *et al.* 1990). Die aus 603 Aminosäuren bestehende extrazelluläre Domäne hat eine zusammengesetzte Struktur: sie besteht aus einer Ig-Domäne, einer für die Ligandenbindung essentiellen Zytokinrezeptor homologen Region (CHR) und drei Fibronectin Typ III Domänen (Larsen *et al.* 1990). Der zytoplasmatische Bereich des G-CSFR besteht aus 183 Aminosäuren und verfügt über vier Tyrosinreste (Y704, Y729, Y744 und Y764), die nach G-CSF Stimulation phosphoryliert werden. Innerhalb der Membran-proximalen Region der zytoplasmatischen Domäne des G-CSFR liegen Bereiche, deren Aminosäuresequenz Homologien zu anderen Zytokinrezeptoren, wie z.B. zu gp130, EPOR, sowie zu den β -Ketten der

IL-2- und IL-3-Rezeptoren, aufweisen. Diese Bereiche werden Box 1 und Box 2 genannt und sind in allen Mitgliedern der Zytokinrezeptor Superfamilie wiederzufinden. Box 3 befindet sich in der Membran-distalen Region der zytoplasmatischen Domäne. Dieses konservierte Motiv teilt seine Homologie nur mit gp130 (Hibi *et al.* 1990; Fukunaga *et al.* 1991; Murakami *et al.* 1991).

Sowohl durch Substitution der konservierten Prolinreste an den Positionen 639 und 641 durch Alaninreste, als auch durch Kürzung des G-CSFR zwischen Box 1 und Box 2 konnte gezeigt werden, daß dieser Bereich für die Übermittlung proliferativer Signale essentiell ist (Avalos *et al.* 1993; Fukunaga *et al.* 1993; Ziegler *et al.* 1993). Das nächste aus 30-35 Aminosäuren bestehende distal zu Box 2 gelegene Segment verstärkt die Proliferation in myeloiden Zellen (Dong *et al.* 1993). Das C-terminale Ende des G-CSFR spielt bei der Übermittlung der für die Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten essentieller Signale eine bedeutende Rolle (Dong *et al.* 1993; Fukunaga *et al.* 1993). Die Differenzierungsdomäne ist darüber hinaus in der Lage Apoptosesignale zu vermitteln (Dong *et al.* 1996). Demnach kann die zytoplasmatische Domäne des G-CSFR in funktionale Subdomänen eingeteilt werden: in eine Proliferationsdomäne, eine die Proliferation verstärkende Region, sowie einen für die Differenzierung essentiellen Bereich. Diese Einteilung wird jedoch zunehmend in Frage gestellt, da gezeigt werden konnte, daß auch die „Differenzierungsdomäne“ an der Übermittlung mitogener Signale beteiligt ist (Ward *et al.* 1999d). Koay und Sartorelli (1999) postulierten, daß verschiedenen Regionen des G-CSFR an der Übermittlung von Differenzierungssignalen beteiligt seien.

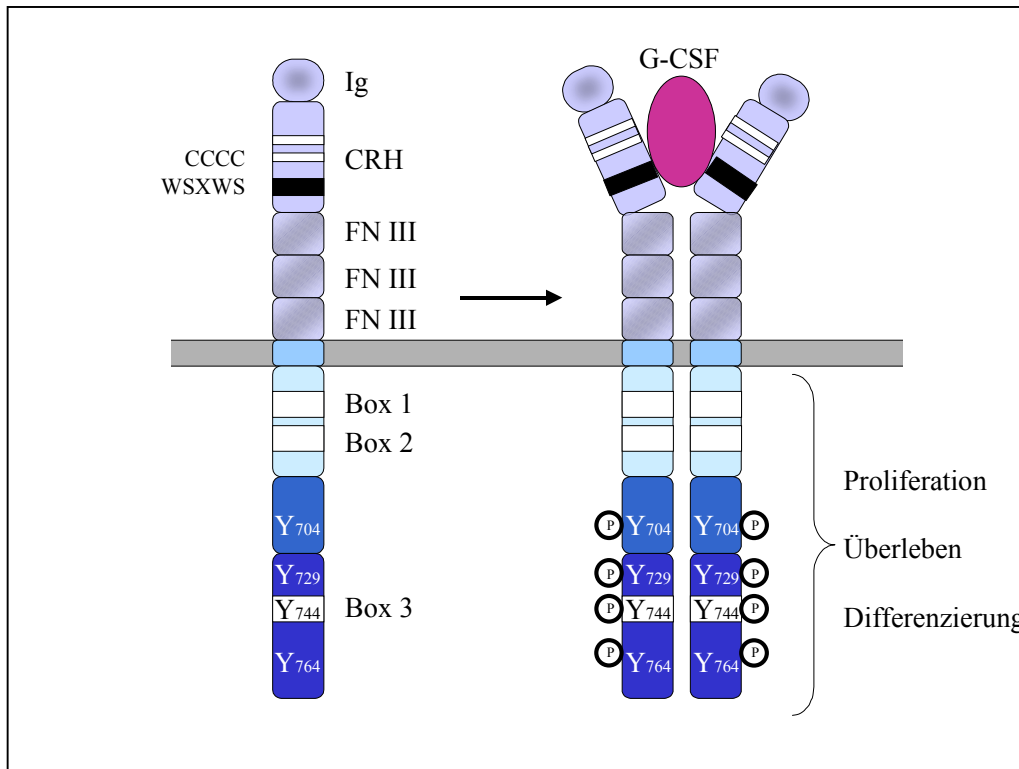


Abb. 1-1. Schematische Darstellung des G-CSFR. Seine extrazelluläre Domäne setzt sich aus der Ig-ähnlichen Domäne, der Zytokinrezeptor homologen Region (CRH) mit vier konservierten Cysteinresten (CCCC) und einem Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin Motiv (WSXWS), sowie drei Fibronectin III Einheiten zusammen. Die zyttoplasmatische Domäne zeigt neben den Box 1-3 Motiven die vier Tyrosinreste (Y) des G-CSFR. Die Bindung von G-CSF führt zur Dimerisierung des Rezeptors und anschließender Phosphorylierung der Tyrosinreste. Der G-CSFR kann Überlebens-, Proliferations- und Differenzierungssignale übermitteln.

1.6 G-CSFR Isoformen

Der G-CSFR verfügt zusätzlich zum WT über acht weitere Isoformen. Bisher wurden drei lösliche Varianten des G-CSFR (Klasse II) identifiziert. Eine wird von der Leukämiezelllinie U937 (Fukunaga *et al.* 1990), zwei weitere werden von reifen myelomonozytären Zellen exprimiert (Iwasaki 1999). Die überwiegend exprimierte Form (WT, Klasse I) hat einen C-Terminus von 183 Aminosäuren und wurde sowohl in der Plazenta als auch in U937 Zellen nachgewiesen (Fukunaga *et al.* 1990; Larsen *et al.* 1990). Eine in der Plazenta identifizierte Isoform „17“ zeigt zwischen Box 1 und Box 2 eine Insertion von 27 Aminosäuren (Klasse III). Diese führt zu keiner Verschiebung des Leserasters. Ebenfalls in der Plazenta wurde eine Variante des G-CSFR „D7“ (Klasse IV) mit einem durch eine Dele-

tion von 87 Aminosäuren hervorgerufenen veränderten C-Terminus von 34 Aminosäuren ausfindig gemacht (Larsen *et al.* 1990). Diese Isoform wurde ebenfalls in neutrophilen Granulozyten identifiziert und als „DC“ bezeichnet (Dong *et al.* 1993). Eine weitere Isoform des G-CSFR „SD“ (Klasse V) zeigt einen C-Terminus, der sich ebenso wie die Rezeptoren der Klasse IV um 34 Aminosäuren vom WT unterscheiden (Dong *et al.* 1995b). Bernard *et al.* (1996) fanden in neutrophilen Granulozyten zwei weitere Varianten des G-CSFR. Einer der G-CSFR weist eine Deletion von 82 bp in Exon 16 auf. Die Verschiebung des Leserasters hat einen veränderten C-Terminus zur Folge, so daß diese Isoform nur noch in ihrer extrazellulären Domäne mit dem WT übereinstimmt. Die andere G-CSFR Variante „15’“ zeigt eine Insertion in der C-terminalen Hälfte des dritten Fibronektins und führt zu keiner Veränderung der zytoplasmatischen Domäne.

Die physiologische Bedeutung der verschiedenen G-CSFR Isoformen und die Regulation ihrer Expression sind bisher noch unklar. Es wird vermutet, daß die löslichen G-CSFR mit den membrangebundenen Varianten um die Bindung von G-CSF konkurrieren und so als negative Regulatoren der Myelopoese fungieren (Iwasaki *et al.* 1999). Die verkürzten G-CSFR Formen wurden vorwiegend auf myeloiden Leukämiezellen identifiziert (Dong *et al.* 1995b; White *et al.* 1998). Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, ob es sich dabei um einen Teil eines leukämischen Phänotyps oder um eine Abnormalität der untersuchten Patienten, die in keinem Zusammenhang zur malignen Entartung steht, handelt (Bernard *et al.* 1996; White *et al.* 1998)

1.7 Die Bedeutung des G-CSFR bei SCN

SCN zeichnet sich durch einen Ausreifungsstopp der Vorläuferzellen von neutrophilen Granulozyten auf der Ebene der Promyelozyten und Myelozyten im Knochenmark und infolgedessen durch einen Mangel an reifen neutrophilen Granulozyten (weniger als $200\mu\text{l}^{-1}$) im peripheren Blut aus (Kostmann 1956, 1975). Unter G-CSF Therapie wird die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten beschleunigt und so die Gefahr schwerer bakterieller und fungialer Infektionen verringert (Bonilla *et al.* 1989; Dale *et al.* 1993). Die Patienten zeigen trotz normaler bis erhöhter Anzahl an Rezeptoren auf Neutrophilen, sowie normaler Bindungsaffinität eine verminderte Antwort auf G-CSF (Kyas *et al.* 1992). Mempel *et al.* (1991) beobachteten außerdem bei SCN-Patienten normale oder erhöhte

Spiegel an biologisch aktivem G-CSF. Folglich könnte dem Kostmann-Syndrom ein Defekt in der Signaltransduktion des G-CSFR zugrunde liegen. Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung von Rauprich *et al.* (1995), die bei unter G-CSF Therapie stehenden SCN-Patienten eine verstärkte Autophosphorylierung von JAK2 zeigten. Diese könnte zur bevorzugten Übermittlung mitogener Signale und somit zu einem Differenzierungsstopp führen, wie er bei Patienten mit Kostmann-Syndrom zu beobachten ist.

15 bis 20 % der SCN-Patienten zeigen Mutationen im *G-CSFR* Gen, die alle zu einem verkürzten C-Terminus führen (Dong *et al.* 1994, 1995a, 1997; Tidow *et al.* 1997). Durch die Transfektion von murinen Zelllinien mit diesen trunkierten Rezeptoren konnte eine verstärkte Proliferation als Antwort auf G-CSF-Stimulation gezeigt werden. Außerdem waren die Zellen nicht mehr in der Lage zu differenzieren: eine mit der in-vivo Myelopoese von SCN-Patienten vergleichbare Beobachtung (Dong *et al.* 1993, 1995a).

Patienten mit Kostmann-Syndrom scheinen außerdem eine erhöhte Prädisposition für die Entwicklung einer AML zu haben (Freedman *et al.* 2000). Deshalb wird das Kostmann-Syndrom auch als präleukämisches Syndrom bezeichnet. Interessanterweise zeigen alle Patienten, die eine Leukämie entwickelt haben Mutationen im *G-CSFR* Gen. Diese Beobachtung weist auf eine Rolle der Rezeptormutationen in der Leukämogenese hin.

1.8 Signaltransduktion des G-CSFR

Der G-CSFR bindet G-CSF mit großer Affinität als Homodimer und kann der Zelle sowohl zur Proliferation, als auch zur Differenzierung wichtige Signale vermitteln. Der Rezeptor verfügt selbst über keine intrinsische Kinaseaktivität, kann aber im Zuge der Signaltransduktion zytoplasmatische Tyrosinkinase, wie z.B. Mitglieder der JAK Familie aktivieren (Isfort *et al.* 1990; Demetri & Griffin 1991; Ihle *et al.* 1994; Avalos *et al.* 1997). Die Substitution des in Zytokinrezeptoren konservierten Tryptophanrestes 650 durch einen Argininrest führte dazu, daß JAK2 nicht mehr an den G-CSFR binden konnte. Dabei wurde die Transduktion mitogener Signale unterbunden, die Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten blieb jedoch unbeeinflusst (Barge *et al.* 1996). Mutationen im proximal zur Membran gelegenen PDP-Motiv der zytoplasmatischen Domäne verhindern ebenfalls die Bindung der JAK und damit die Übermittlung proliferativer Signale (Avalos *et al.* 1997). Gemäß dieser Beobachtungen scheinen die JAK an den Membran-proximalen

Teil, mit den Box-1- und Box-2-Motiven, des G-CSFR zu binden. Unklar ist bisher, ob diese Bindung direkt oder unter Beteiligung von Adaptermolekülen erfolgt (Nicholson *et al.* 1995; Barge *et al.* 1996). Möglicherweise bildet die prolinreiche Box-1-Sequenz eine Sekundärstruktur, die für die Bindung der JAK essentiell ist, aus (Avalos 1996).

Bei zahlreichen Zytokinrezeptoren wurde bereits eine Beteiligung der STAT Moleküle beschrieben (Ihle & Kerr 1995; Ihle 1995; Taniguchi 1995; Mui *et al.* 1996; Nakajima *et al.* 1996; O'Farrell *et al.* 1996). Die JAK können nach ihrer Autophosphorylierung sowohl den G-CSFR, als auch Mitglieder der STAT-Familie phosphorylieren. STAT-Proteine dimerisieren im aktivierten Zustand und wandern in den Zellkern. Dort binden sie an charakteristische Enhancer-Sequenzen und regen so die Gentranskription an. Die Dimerisierung erfolgt über eine Phosphotyrosin/SH2-Domänen vermittelte Interaktion, dabei kann es zur Ausbildung von homo- und heterodimeren STAT Komplexen kommen. Im Rahmen der Signaltransduktion des G-CSFR wurden sowohl STAT3 Homodimere, STAT3:STAT5- als auch STAT1:STAT3 Heterodimere beobachtet. Die STAT-Proteine können aber auch über ihre SH2-Domäne direkt oder über JAK mit dem G-CSFR assoziieren. Tyrosinrest 704 und seine flankierenden Aminosäurereste stellt ein mögliches STAT3 Bindungsmotiv (YXXQ) dar (Stahl *et al.* 1995). Es wird vermutet, daß weitere Tyrosinreste des G-CSFR STAT3-Moleküle binden können (Nicholson *et al.* 1995; Chakraborty *et al.* 1999; Ward *et al.* 1999b). Ward *et al.* (1998 und 1999c) konnten eine zusätzliche STAT3 Aktivierung über die Tyrosinreste 729 und 744 zeigen. Eine tyrosin-unabhängige, Adapterprotein vermittelte Bindung von STAT3 an den G-CSFR kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden (Ward *et al.* 1999b). Sie ziehen außerdem eine STAT3 Aktivierung über die als Adapterprotein fungierende Tyrosinkinase Lyn in Betracht, da Lyn einerseits eine STAT3 Bindungsstelle zeigt und andererseits mit dem G-CSFR konstitutiv assoziiert zu sein scheint (Corey *et al.* 1994; Ward *et al.* 1999b). Die Aktivierung der STAT-Proteine führt zur Übermittlung proliferativer Signale. Nicholson *et al.* (1995) konnten einen hohen Spiegel an tyrosinphosphoryliertem STAT3 auch ohne das Vorhandensein der Proliferationsdomäne nachweisen, deshalb postulierten sie, daß STAT3 für die Proliferation nicht essentiell sei. Neuere Daten sprechen dafür, daß STAT3 für die Kontrolle der Differenzierung und STAT5 für Proliferation und Überleben von myeloiden Zellen verantwortlich sind (Ward *et al.* 1999c).

Neben dem JAK/STAT-Signaltransduktionsweg übermittelt der G-CSFR Signale über den p21^{ras}-Signaltransduktionsweg. Eine Aktivierung des Ras-MAPK-Weges führt zu G-CSF induzierter Proliferation (Barge *et al.* 1996). Es wird vermutet, daß verschiedene Ab-

schnitte des G-CSFR in der Lage sind MAPK zu aktivieren (Rausch *et al.* 1997; Ward *et al.* 1999a). Die Verbindung vom phosphorylierten G-CSFR zum Ras-MAPK-Signaltransduktionsweg kann über die Signalmoleküle Grb2, Shc und SHP-2 hergestellt werden (De Koning *et al.* 1996; Rausch *et al.* 1997; Ward *et al.* 1999a, 1999c). Grb2 kann direkt oder als Komplex mit SHP-2 bzw. Shc über Tyrosinrest 764 mit dem G-CSFR assoziieren, SOS binden und so zur Aktivierung von p21^{ras} führen (Li *et al.* 1993; Egan *et al.* 1993; Rausch *et al.* 1997). Möglich ist außerdem eine Bindung des SHP-2/Grb2-Komplexes an Tyrosinrest 704 mit anschließender p21^{ras}-Aktivierung. Weitere beobachtete Grb2 Komplexe sind: p145/Shc/Grb2 sowie p90/Grb2 (De Koning *et al.* 1996). Diese könnten ebenfalls eine Verbindung zum Ras-MAPK-Signaltransduktionsweg herstellen.

Bei p145 könnte es sich um die Phosphatase SHIP handeln, denn Hunter *et al.* (1998) konnten SHIP mit Shc co-immunpräzipitieren und postulierten eine Bindung von SHIP über Shc an Tyrosinrest 764.

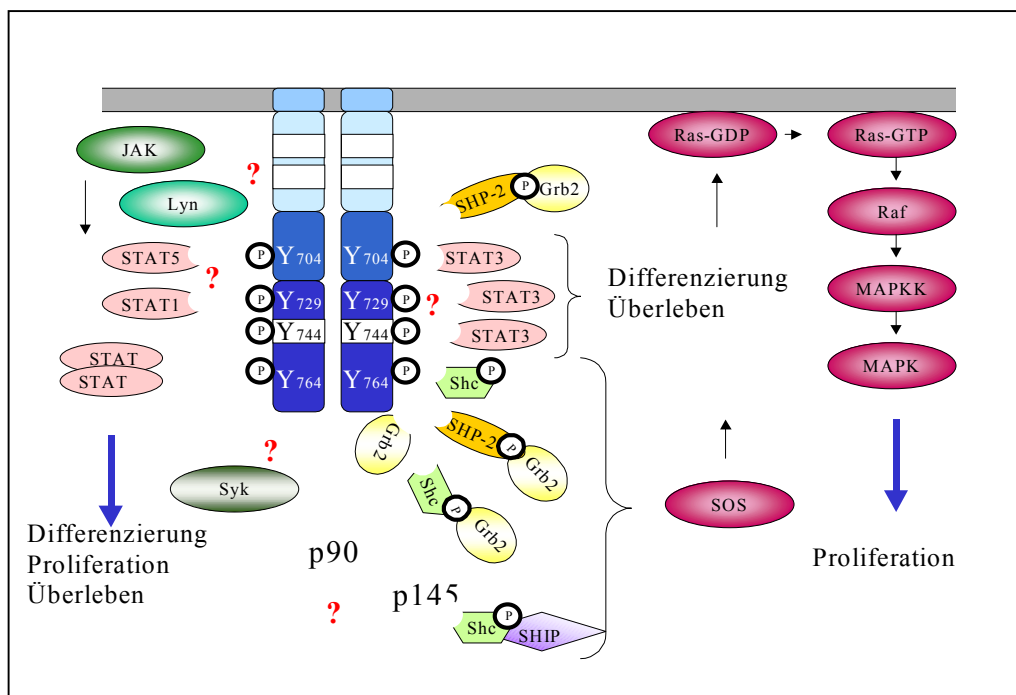


Abb. 1-2. Schematische Darstellung eines Modells der Signaltransduktion des G-CSFR.

Wie Abb. 1-2 entnommen werden kann vermittelt der G-CSFR Signale über den p21ras- und den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg. Als direkte Bindungspartner wurden bisher nur SHP-2, Shc und Grb2 identifiziert (Ward *et al.* 1999a). Zahlreiche andere Wechselwirkungspartner werden vermutet, eine Adapterprotein-vermittelte Interaktion kann dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun weitere Bindeproteine des G-CSFR ausfindig gemacht werden: Im Vordergrund stand die Identifikation von Interaktionspartnern des inaktiven G-CSFR, da die meisten Untersuchungen bisher am stimulierten und somit tyrosinphosphorylierten Rezeptor vorgenommen wurden. Mittels GST-pull-down-Experimenten sollten Wechselwirkungspartner sowohl des phosphorylierten, als auch des nicht phosphorylierten Rezeptors ausfindig gemacht und bei Identifikation eines solchen näher charakterisiert werden. Einen Ausblick auf weitere Interaktionspartner und ihre Bindungseigenschaften sollte mittels ^{35}S -metabolischer Zellmarkierung gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 *Chemikalien*

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Gibco-BRL, Eggenstein
Aminocaprinsäure	Roth, Karlsruhe
Aminosäuren, diverse	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aminotriazol	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco Lab., Detroit, USA
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovines Serum Albumin	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Casaminosäuren	Gibco-BRL, Eggenstein
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cholinchlorid	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau	Merck, Darmstadt
dATP-Stammlösung	Roche Diagnostics, Mannheim
D-Ca-Pantothenat	Gibco-BRL, Eggenstein
dCTP-Stammlösung	Roche Diagnostics, Mannheim
dGTP-Stammlösung	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
Dinatriummethyldiamintetraacetat	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Roche Diagnostics, Mannheim
DMEM-Medium	Gibco-BRL, Eggenstein
dNTP-Stammlösung	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat	Roth, Karlsruhe
Eisennitrat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics, Mannheim
Fötales Kälberserum	Gibco-BRL, Eggenstein
Folsäure	Gibco-BRL, Eggenstein
Formaldehyd 37 % (v/v)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt

Gelatine	Roth, Karlsruhe
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glutamin	Gibco-BRL, Eggenstein
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor	Amgen, Thousand Oaks, USA
Hefeextrakt	Gibco-BRL, Eggenstein
Heringssperma-DNA	Gibco-BRL, Eggenstein
HPLC-Wasser	T.J. Baker, Deventer, Holland
i-Inositol	Gibco-BRL, Eggenstein
Indolacrylsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropylthiogalactosid	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Gibco-BRL, Eggenstein
Lithiumacetat	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maltose	Roth, Karlsruhe
May-Grünwald Farblösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Baker
N,N'-Methylenbisacrylsäureamid	Bio-Rad, München
3-Morpholinopropansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Gibco-BRL, Eggenstein
Nicotinamid	Roth, Karlsruhe
NP-40	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin	Sebak, Aidenbach
Pepton	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenolrot	Gibco-BRL, Eggenstein
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol 4000	Merck, Darmstadt
Proteinmarker	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pyridoxal	Gibco-BRL, Eggenstein
Riboflavin	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco-BRL, Eggenstein

Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat	ICN, Eschwege
Streptomycinsulfat	Sebak, Aidenbach
Tetracyclin	Roche Diagnostics, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Serva, Heidelberg
Thiamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton-X	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Xylenzanol	Serva, Heidelberg
Yeast Nitrogen Base (ohne Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren)	Gibco-BRL, Eggenstein

2.1.2 Enzyme und ihre Puffer

Restriktionsendonukleasen wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) bezogen und mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Roche Diagnostics, Mannheim
AmpliAq FS BigDye Terminator	Perkin Elmer, Weiterstadt
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
RNasin	Stratagene, Heidelberg
SP6-RNA-Polymerase, 5 x Transkriptionspuffer	MBI Fermentas, ST. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase, 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-Polymerase, 10 x Taq-Polymerase-Puffer	Stratagene, Heidelberg

2.1.3 Antikörper

Anti-c-Abl	Santa Cruz Biotechnol., USA
Anti-CD11c	Becton Dickinson, Frankfurt
Anti-CD14	Becton Dickinson, Frankfurt
Anti-c-Src	Santa Cruz Biotechnol., USA
Anti-Erk2	Santa Cruz Biotechnol., USA
Anti-G-CSFR (C20)	Santa Cruz Biotechnol., USA
Anti-G-CSFR (M20)	Santa Cruz Biotechnol., USA
Anti-G-CSFR	Pharmingen, Frankfurt
Anti-G-CSFR	Anogen, Mississauga, Canada
Anti-Gr-1	Becton Dickinson, Frankfurt
Anti-Grb2	Upstate, Lake Placid, USA

Anti-LexA	Santa Cruz Biotechnol., USA
Anti-Lyn	Upstate, Lake Placid, USA
Anti-Phosphotyrosin (4G10)	Upstate, Lake Placid, USA
Anti-Sam68	Santa Cruz Biotechnol., USA
Anti-Shc	Upstate, Lake Placid, USA
Anti-SHP-1	Upstate, Lake Placid, USA
Anti-STAT 1	Santa Cruz Biotechnol., USA
Anti-Tyk2	Upstate, Lake Placid, USA

2.1.4 Radioaktive Substanzen

[¹²⁵ J] anti-mouse IgG	ICN, Eschwege
[¹²⁵ J] anti-rabbit IgG	ICN, Eschwege
[α- ³² P]dCTP	Hartmann, Braunschweig
[α- ³² P]dUTP	Hartmann, Braunschweig
[³⁵ S]-Trans- ³⁵ S-Label	ICN, Eschwege

2.1.5 Sonstige Materialien

2.1.5.1 Verwendete Kit

Jet Nick Probe Purification after Labeling Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Megaprime DNA labelling Kit RPN 1606/7	Amersham Buchler, Braunschweig
PolyAtract mRNA Isolation System	Promega, Mannheim
Qiagen Plasmid Maxipräparations Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5.2 Weitere Materialien

Bio Max TM MR Röntgenfilm	Kodak, Rochester, USA
Bottletop Filter	Millipore, Eschborn
Deckgläser	IDL, Nidderau
Einmal-Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schüell, Dassel
Elektroporationsküvette (0,1 cm)	Bio-Rad, München
ExpressHyb TM Hybridisation Solution	Clontech, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Filmkassette mit Verstärkerfolie	DuPont, USA
Filterkarte	Hettich, Tuttlingen
Gasperlen (Ø 0,45 mm)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia, Freiburg
Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN) TM Blot	Clontech, Heidelberg

1,5-ml-Kryoröhrchen	Falcon, Heidelberg
λ -DNA	Roche Diagnostics, Mannheim
Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Mouse Kidney 5'-Stretch Plus cDNA Library	Clontech, Heidelberg
Mouse Lane Multiple Tissue Northern (MTN) TM Blot	Clontech, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	Kühn & Bayer, Nidderau
Objektträger	IDL, Nidderau
Oxalyticase-Stammlösung	Arbeitsgruppe Dr. Binz
Parafilm	Jürgens-Omnilab, Hannover
Petrischalen (90 mm, 140 mm)	Greiner, Nürtingen
pGEM-T-Vektor-System	Promega, Mannheim
pGEX-Expressionsvektoren (pGEX-2T und pGEX-5x-1)	Pharmacia, Freiburg
Protran BA Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
pVP16-cDNA-Bibliothek	Hollenberg, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Schalen für die Zellkultur (90 mm, 140 mm)	Greiner, Nürtingen
Sequenzierreaktionsgefäß mit Gummiseptum	Perkin Elmer, Weiterstadt
Skalpell	Jürgens-Omnilab, Hannover
Spritzen, diverse Größen	Braun, Melsungen
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe
Trasylol	Bayer, Leverkusen
Whatmann 3MM-Papier	Pierce, Rockford, USA
X-OMAT TM AR Röntgenfilm	Kodak, Rochester, USA
Zytokammer	Hettich, Tuttlingen

2.1.6 Geräte

ABI PRISM 310	Perkin Elmer, Weiterstadt
Bakterienschüttler	GFL, Burg
β -Szintillationszähler	Beckmann, München
Brutschränke	Memmert, Schwabach
Elektrophoresekammer für Agarose-Gele	Eigenbau der Zentralwerkstatt Keutz, Reiskirchen
Elektrophoresekammer für SDS-Polyacrylamid-Gele	Eigenbau der Zentralwerkstatt Keutz, Reiskirch
Elektroporationsgerät	Bio-Rad, München
FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Forschungsmikroskop	Leica, Bensheim
-20 °C Gefrierschrank	Liebherr, Mannheim
-80 °C Gefriertruhe	Forma Scientific, Göttingen
Geltrockner	Eigenbau der Zentralwerkstatt Keutz, Reiskirch
Glasküvette	Hellma, Müllheim
GSA-Rotor	Ivan Sorvall, USA

Hybridisierungsöfen und -röhren	Appligene-Oncor, Heidelberg
Quarzküvette	Hellma, Müllheim
Semi-Dry-Blot-Apparatur	Eigenbau der Zentralwerkstatt
	Keutz, Reiskirchen
Sonifikator	Branson
Sorvall Zentrifugen-Becher	DuPont, USA
Sorvall-Ultraspeed-Zentrifuge	Ivan Sorvall, USA
Speed-vac	Hereaus Christ, Köln
Spektralphotometer	Hereaus Christ, Köln
SS-34 Rotor	Ivan Sorvall, USA
Stromspannungsquelle	Biometra, Göttingen
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
UV-Lampe	Vilber Lourmat, Frankreich
Vibromixer	Eppendorf, Hamburg
Wasserkocher	Köttermann, Hänigsen
Werkbank für die Zellkultur	Hereaus Christ, Köln

2.1.7 Puffer

Acrylamid-Lösung: 30 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylsäureamid

Anodenpuffer I: 300 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol. Der pH-Wert sollte bei 10,4 liegen.

Anodenpuffer II: 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol. Der pH-Wert sollte bei 10,4 liegen.

Blocking-Lösung: TBST, 3 % (w/v) BSA

Blocking-Lösung für Hefe Blots: TBST, 5 % (w/v) Trockenmilch

Bromphenolblau-Lösung: 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Natriumazid

Calciumchlorid-Lösung: 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,0

Coomassie-Blau-Färbelösung: 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau. Der Farbstoff wird in Aqua bidest und Methanol unter Rühren gelöst. Danach wird die Essigsäure zugegeben und das Gemisch durch Whatmann 3MM-Papier filtriert.

Deionisiertes Formamid: Zum Deionisieren wird 1 g Dowex XG8 Mischbettmatrix in 100 ml Formamid gegeben und für 1 h gerührt. Danach wird die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert.

Denaturierungslösung für Northern Blot: 10 mM NaCl, 50 mM NaOH

Denaturierungslösung für das Screening der λ-Phagenbank: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

DEPC-behandeltes Wasser oder Lösungen: Zur Behandlung mit DEPC wird Aqua bidest bzw. die zu behandelnde Lösung mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt und für mindestens 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für mindestens 12 Stunden, anschließend wird die Flüssigkeit autoklaviert. DEPC ist ein starkes Karzinogen und sollte deshalb nur unter dem Abzug gehandhabt werden.

DMSO-Lösung: 14 % (v/v) DMSO in FCS

Ethidiumbromid-Färbelösung: handelsübliche, fertige Ethidiumbromid-Stammlösung wird mit Aqua bidest auf eine finale Konzentration von 20 µg/ml verdünnt.

Entfärbelösung: 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Kathodenpuffer: 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol, 40 mM 6-Amino-n-Hexansäure. Der pH-Wert sollte bei 9,4 liegen.

10 x Klenow-Puffer: 0,5 M Tris-HCl pH 7,2, 0,1 M MgSO₄, 1 mM DTT und 0,5 mg BSA/ml

10 x Laufpuffer: 144 g Glycin, 30 g Tris-Base, 10 g SDS. Mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen.

LiAc/TE-Puffer: 100 mM LiAc, 0,5 x Puffer TE

LiAc/TE/PEG-Lösung: 100 mM LiAc, 40 % PEG-3350, 1 x Puffer TE

Lysispuffer zur Isolierung der Hefepiasmid-DNA: 2,5 M LiCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 4 % (v/v) Triton-X, 62,5 mM Na₂EDTA

10 x MOPS-Puffer: 0,4 M MOPS, 100 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA. Der pH-Wert wird mit 10 N NaOH-Lösung auf pH 7,0 eingestellt.

200 mM Na₃VO₄-Stammlösung: Es wird eine 200 mM Na₃VO₄-Lösung hergestellt. Ihr pH-Wert wird mit 10 N NaOH-Lösung auf pH 10,0 eingestellt. Bei diesem pH-Wert hat die Stammlösung eine gelbe Farbe. Anschließend wird sie solange gekocht, bis die Flüssigkeit farblos ist. Hat die Lösung wieder Raumtemperatur erreicht wird der pH-Wert überprüft. Einstellen des pH-Wertes, kochen der Lösung und überprüfen des pH-Wertes wird so lange durchgeführt, bis sich dieser auch bei Raumtemperatur bei pH 10,0 stabilisiert hat. Die Stammlösung wird als Aliquots zu je 100 µl in 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäßen bei -20 °C weggefroren.

Neutralisierungslösung für Northern Blot: 0,1 M Tris-HCl pH 7,5

Neutralisierungslösung für das Screening der λ-Phagenbank: 1 M Tris-HCl pH 7,4, 1,5 M NaCl

PBS-Puffer: 130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄. Der pH-Wert wird mit 5 N HCl-Lösung auf pH 7,2 eingestellt.

Ponceau-S-Gebrauchslösung: 0,2 % Ponceau S, 3 % TCA

4 x Proben-Aufragepuffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: 1ml Proben-Puffer-Stammlösung, 200 µl Bromphenolblau-Lösung, 200 µl β-Mercaptoethanol

6 x Proben-Aufragepuffer für DNA-Gele: 30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau in Aqua bidest. Der Puffer wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

10 x Proben-Aufragepuffer für RNA-Gele: 0,4 % (w/v) Bromphenolblau, 0,4 % (w/v) Xylenzanol, 50 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA

Proben-Puffer-Stammlösung: 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 8 mM Tris-HCl pH 6,8

10 x Proteinase-K-Puffer: 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 100 mM Tris-HCl pH 8,0

Puffer AM: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10% Glycerin, 0,5% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM KCl, 1mM Benzamidin, 1mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄, 1 % Trasylol. Benzamidin, PMSF, Na₃VO₄ und Trasylol werden erst unmittelbar vor der Verwendung des Puffers zugegeben.

Puffer SM: 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ x 7H₂O, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,01 % (w/v) Gelatine. Der Puffer wird autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt. Es bietet sich an die Gelatine mit einer 2 %-igen Gelatine-Lösung auf die gewünschte Konzentration von 0,01 % einzustellen.

Sammelgel: 1,67 ml Acrylamid-Lösung, 1,25 ml 1M Tris-HCl pH 6,8, 7,3 ml Aqua bidest, 50 µl 20 % SDS, 15 µl TEMED und 50 µl 10 %-ige Ammoniumpersulfat-Lösung

20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M tri-Natriumcitrat. Der pH-Wert wird mit 10 N NaOH-Lösung auf pH 7,0 eingestellt.

50 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer): 2 M Tris-Base, 1 M Essigsäure, 0,1M EDTA pH 8,0, Der pH-Wert wird gegebenenfalls mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8,3 eingestellt. Den Puffer vor Gebrauch 1:50 (v/v) mit Aqua bidest verdünnen.

10 x TBS: 1,37 M NaCl, 2 M Tris. Der pH-Wert wird mit 10 N HCl auf 7,3 eingestellt.

TBST: 1 x TBS, 0,1 % Tween 20,

TE-Puffer pH 8,0 (Tris-EDTA-Puffer): 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0

Trenngel 11 %: 11 ml Acrylamid-Lösung, 11,2 ml 1M Tris-HCl pH 8,8, 7,7 ml Aqua bidest, 150 µl 20 % SDS, 30 µl TEMED und 150 µl 10 %-ige Ammoniumpersulfat-Lösung

Trypanblaulösung: 0,5 % (w/v) Trypanblau und 0,9 % (w/v) NaCl in PBS gelöst

2.1.8 Nährmedien

2.1.8.1 Nährmedien für die Bakterienkultur

Agar-Stammlösung: Es werden 15 g Bacto-Agar in 700 ml Aqua bidest eingewogen, autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Ampicillin-Stammlösung: Es werden 10 mg des Ampicillin-Salzes/ml Aqua bidest gelöst.

Induktionsmedium: zur Herstellung von 1 l Induktionsmedium werden 200 ml modifiziertes 5 x M9-Medium, 1 mM MgSO₄, 2 % (w/v) Glucose, 0,1 % (w/v) Casaminosäuren, 100 µl Thiamin-HCl (0,5 % (w/v)), 50 µg/ml Kanamycin, 12,5 µg/ml Tetracyclin, 50 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Indolacrylsäure zusammengegeben.

Kanamycin-Stammlösung: Es werden 50 mg des Antibiotikums/ml Aqua bidest gelöst.

LB-Medium: Für 1 l Medium werden 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl eingewogen. Der pH-Wert wird einer 10 M NaOH-Lösung auf pH 7,5 eingestellt. Das Medium wird autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

LB/MgSO₄-Agar: Vor dem Autoklavieren werden 15 g Bacto-Agar in 1 l LB/MgSO₄-Medium eingewogen.

LB/MgSO₄/0,2% (w/v) Maltose-Medium: Das LB/MgSO₄-Medium wird zusätzlich mit einer 20%-igen Maltose-Stammlösung versetzt. Maltose soll im fertigen Medium in einer Konzentration von 0,2 % vorliegen.

LB/MgSO₄-Medium: Vor dem Autoklavieren wird das LB-Medium mit 1M MgSO₄-Lösung auf 10 mM MgSO₄ final eingestellt.

5 x M9-Medium: 540 mM Na₂HPO₄, 110 mM KH₂PO₄, 43 mM NaCl, 94 mM NH₄Cl. Das Medium wird autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

M9-(-L)-Platten: Die Agar-Stammlösung (700 ml) wird aufgekocht und auf ca. 50 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 200 ml 5 x M9-Medium, 10 ml 40 % (v/v) Glucose, 100 ml 10 x (-THULL)-Mix, 10 ml 100 x Histidin-, 10 ml 100 x Uracil-, 10 ml 100 x Lysin-, 10 ml 100 Tryptophan-, 10 ml 100 x Prolin-, 10 ml Ampicillin-Stammlösung sowie 1 mM Thiamin wird die Agarlösung mit Aqua bidest auf 1 l aufgefüllt und in sterile Petrischalen (Ø 90mm) gegossen.

Modifiziertes 5 x M9-Medium: 210 mM Na₂HPO₄, 110 mM KH₂PO₄, 95 mM NH₄Cl, 43 mM NaCl, 0,13 mM CaCl₂. Das Medium wird autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

100 x Prolin-Stammlösung: Es werden 400 mg der Aminosäure/ml Aqua bidest gelöst, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

SOC-Medium: 1 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Glucose, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄. Das Medium wird autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

Tetracyclin-Stammlösung: Es werden 12,5 mg der Trockensubstanz/ml Ethanol gelöst.

100 x Tryptophan-Stammlösung: Es werden 200 mg Tryptophan/ml Aqua bidest gelöst, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

2YT-Agar: Vor dem Autoklavieren werden 15 g Bacto-Agar in 1 l 2YT-Medium eingewogen.

2YT-Medium: Für 1 l Medium werden 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt und 5 g NaCl eingewogen. Das Medium wird autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

2YT-Selektiv-Platten: Der 1,5%-ige 2YT-Agar (1 l) wird aufgekocht und auf ca. 50 °C abgekühlt. Nach Zugabe des jeweiligen Antibiotikums wird die Agarlösung in sterile Bakterien-Petrischalen (Ø 90mm) gegossen.

Weichagar: In eine 10 mM MgSO₄-Lösung werden 0,7 % Bacto-Agar eingewogen und anschließend autoklaviert. Vor der Verwendung des Weichagars wird dieser in der Mikrowelle vorsichtig aufgekocht und im Wasserbad bis auf 43-45 °C abgekühlt.

2.1.8.2 Nährmedien für die Zellkultur

DMEM-Kulturmedium: DMEM-Basalmedium mit 10 % FCS, 2,25 % (w/v) Natriumhydrogencarbonat, 1 % (v/v) 200 mM Glutamin

IL-3 Produktionsmedium: DMEM-Basalmedium mit 2 % FCS, 2,25 % (w/v) Natriumhydrogencarbonat, 1 % (v/v) 200 mM Glutamin

Markiermedium-Methionin/Cystein: (Dulbecco's Modified Essential Medium, pH 7,2)

Für einen Liter werden folgende Komponenten zusammengegeben 200 mg CaCl₂, 0,1 mg Fe (NO₃)₃ x 9H₂O, 400 mg KCl, 200 mg MgSO₄ x 7H₂O, 6400 mg NaCl, 125 mg NaH₂PO₄ x H₂O, 3700 mg NaHCO₃, 4500 mg Glucose, 15 mg Phenolrot, 60 mg Penicillin, 110 mg Streptomycinsulfat, 1100 mg Natriumpyruvat, 84 mg L-Arginin x HCl, 584 mg L-Glutamin, 30 mg Glycin, 42 mg L-Histidin x HCl x H₂O, 105 mg L-Isoleucin, 105 mg L-Leucin, 146 mg L-Lysin x HCl, 66 mg L-Phenylalanin, 42 mg L-Serin, 95 mg L-Threonin, 16 mg L-Tryptophan, 72 mg L-Tyrosin, 94 mg L-Valin, 4 mg D-Ca-Pantothenat, 4 mg Cholinchlorid, 4 mg Folsäure, 7,2 mg i-Inosit, 4 mg Nicotinamid, 4 mg Pyridoxal x HCl, 0,4 mg Riboflavin, 4 mg Thiamin x HCl. Das Medium wird sterilfiltriert und als Aliquots zu je 10 ml in 15-ml-Reaktionsgefäßen bei -20 °C weggefroren.

RPMI-Kulturmedium: RPMI-1640-Basalmedium mit 10 % FCS, 1 % (v/v) 200 mM Glutamin, 2,25 (w/v) Natriumhydrogencarbonat und 5 % IL-3

Stimulationsmedium: RPMI-1640-Basalmedium mit 10 % FCS, 1 % (v/v) 200 mM Glutamin, 30 ml 7,5 % (w/v) Natriumhydrogencarbonat und 10 ng/ml G-CSF

2.1.8.3 Nährmedien für die Hefekultur

100 x Histidin-Stammlösung: Es werden 200 mg der Trockensubstanz/ml Aqua bidest gelöst, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

100 x Leucin-Stammlösung: Es werden 1 000 mg der Aminosäure/ml Aqua bidest gelöst, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

100 x Lysin-Stammlösung: Es werden 300 mg Lysin-Salz/ml Aqua bidest gelöst, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

SD-Agar: Für 700 ml Medium werden 15 g Bacto-Agar, 20 g Glucose eingewogen, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

10 x (-THULL)-Mix: Zur Herstellung von 1 l 10 x (-THULL)-Mix werden 300 mg L-Isoleucin, 1500 mg L-Valin, 200 mg L-Adenin, 200 mg Arginin, 200 mg L-Methionin, 500 mg L-Phenylalanin, 2000 mg Threonin und 300 mg Tyrosin in Aqua bidest gelöst, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

(-THULL)-Aminotriazol-Platten : Der SD-Agar (700 ml) wird aufgeköcht und auf ca. 50 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 100 ml 10 x (-THULL)-Mix, 100 ml 10 x YNB, 10 ml Ampicillin-, 1 ml Tetracyclin- sowie 20 ml Aminotriazol-Stammlösung wird die Agarlösung mit Aqua bidest auf 1 l aufgefüllt und in sterile Petrischalen (Ø 140 mm) gegossen.

(-TL)-Medium: Zur Herstellung von 1 l (-TL)-Medium werden 100 ml 10 x (-THULL)-Mix, 100 ml 10 x YNB, 50 ml 40 % (w/v) Glucose-, 10 ml 100 x Histidin-, 10 ml 100 x Uracil-, 10 ml 100 x Lysin-, 10 ml Ampicillin- sowie 1 ml Tetracyclin-Stammlösung zusammengegeben und mit Aqua bidest auf 1 l aufgefüllt.

(-TL)-Platten: Der SD-Agar (700 ml) wird aufgeköcht und auf ca. 50 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 100 ml 10 x (-THULL)-Mix, 100 ml 10 x YNB, 10 ml 100 x Histidin-, 10 ml 100 x Uracil-, 10 ml 100 x Lysin-, 10 ml Ampicillin- sowie 1 ml Tetracyclin-Stammlösung wird die Agarlösung mit Aqua bidest auf 1 l aufgefüllt und in sterile Petrischalen (Ø 90 mm) gegossen.

(-T)-Medium: Zur Herstellung von 1 l (-T)-Medium werden 100 ml 10 x (-THULL)-Mix, 100 ml 10 x YNB, 50 ml 40 % (w/v) Glucose-, 10 ml 100 x Histidin-, 10 ml 100 x Leucin-, 10 ml 100 x Uracil-, 10 ml 100 x Lysin-, 10 ml Ampicillin- sowie 1 ml Tetracyclin-Stammlösung zusammengegeben und mit Aqua bidest auf 1 l aufgefüllt.

(-T)-Platten: Der SD-Agar (700 ml) wird aufgeköcht und auf ca. 50 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 100 ml 10 x (-THULL)-Mix, 100 ml 10 x YNB, 10 ml 100 x Histidin-, 10 ml 100 x Leucin-, 10 ml 100 x Uracil-, 10 ml 100 x Lysin-, 10 ml Ampicillin- sowie 1 ml Tetracyclin-Stammlösung zusammengegeben und mit Aqua bidest auf 1 l aufgefüllt und in sterile Petrischalen (Ø 90 mm) gegossen.

100 x Uracil-Stammlösung: Es werden 200 mg der Aminosäure/ml Aqua bidest gelöst, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

10 x YNB: Zur Herstellung von 1 l 10 x YNB werden 34 g Yeast Nitrogen Base (ohne Ammoniumsulfat und ohne Aminosäuren) sowie 100 g Ammoniumsulfat in Aqua bidest gelöst, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

YPD-Agar: Vor dem Autoklavieren werden 15 g Bacto-Agar und 20 g Glucose in 1 l YPD-Medium eingewogen.

YPD-Medium: Für 1 l Medium werden 20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt eingewogen. Das Medium wird autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt. Vor dem Gebrauch werden 25 ml einer 40 %-igen Glucose-Stammlösung, 100 µg Ampicillin/ml und 25 µg Tetracyclin/ml zugegeben.

YPD-Platten: Der YPD-Agar (1 l) wird aufgeköcht und auf ca. 50 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 10 ml Ampicillin- und 1 ml Tetracyclin-Stammlösung wird die Agarlösung in sterile Petrischalen (Ø 90 mm) gegossen.

2.1.9 Verwendete Mikroorganismen

2.1.9.1 Verwendete Bakterienstämme

Escherichia coli XL1-Blue: $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$, [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10(tet^r)]; (Clontech, Heidelberg)

Escherichia coli DH5 α : deoR endA1 gyrA96 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) recA1 relA1 supE44 thi-1 $\Delta(\text{lacZYA-argFV169}) \phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 F}^-$

Escherichia coli HB101: ara-14 galK-2 hsdS20 (r_B⁻, m_B⁺) lacY1 leuB6 mtl-1 proA2 recA13 rpsL20 (str_R) supE44, 9, 14 xyl-5 thi-1 $\Delta(\text{mcrC-mrr}) \text{ F}^-$

Leucin prototrophe *Escherichia coli* HB101: ara-14 galK-2 hsdS20 (r_B⁻, m_B⁺) lacY1 leuB6 mtl-1 proA2 recA13 rpsL20 (str_R) supE44, 9, 14 xyl-5 thi-1 $\Delta(\text{mcrC-mrr}) \text{ F}^-$

Escherichia coli BM25.8: supE44, thl $\Delta(\text{lac-proAB})$ (F' - kaD36, proAB lacI^qZ Δ M15) $\lambda\text{Imm434}(\text{kan}^r)$ P1(cam^r) hsd R (r_{k12}-m_{k12}-); (Clontech, Heidelberg)

Epicurian Coli TKX1: $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$, [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn5(kan^r)], [pTK tet^r]; (Stratagene, Heidelberg)

2.1.9.2 Verwendete Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae L40: Genotyp: MATa, trp1, leu2, his3, LYS2:: lexAop-LacZ, lexAop-His3

Saccharomyces cerevisiae YRN 974: Genotyp: trp1, leu2, his3, URA3:: lexAop-gfp

Dieser Hefestamm wurde von Dr. R. Niedenthal (Medizinische Hochschule Hannover) generiert und zur Verfügung gestellt.

2.1.10 Verwendete Zelllinien

FDC-P1 mac11: Il-3-, GM-CSF- und M-CSF Rezeptor exprimierender Subklon der murinen multipotenten Vorläuferzelllinie FDC-P1 (Gliniak und Rohrschneider 1990).

WEHI3B: murine myelomonozytäre Leukämiezellen, die IL-3 exprimieren (Ymer *et al.* 1985).

32D.C10: IL-3 abhängige murine myeloide Zellen. Diese wurde mit dem humanen G-CSFR transfiziert und von der Arbeitsgruppe von I. Touw aus Rotterdam zur Verfügung gestellt (de Koning *et al.* 1998).

2.1.11 Verwendete Plasmide

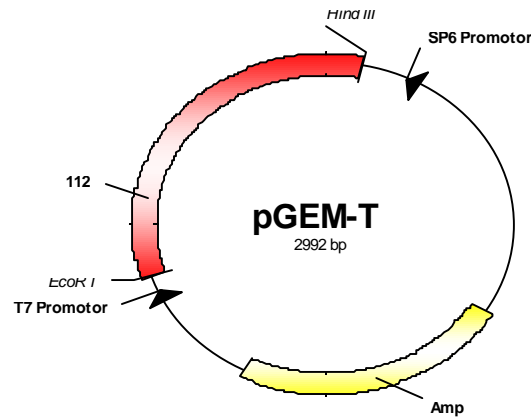


Abb. 2-1. T-112. -Schematisch. In den pGEM-T-Vektor (Promega) wurde das DNA-Fragment 112 inseriert. Das Fragment 112 (531 bp) wurde mittels PCR generiert, dabei wurden künstliche Schnittstellen eingeführt. So weist die Sequenz von 112 an ihrem 5'-Ende eine EcoR-I- und an ihrem 3'-Ende eine Hind-III-Schnittstelle auf. Für die PCR diente der aus dem Screening der Mouse Kidney 5'-Stretch Plus cDNA Library hervorgegangene λ 2-Klon als Matrize. Dabei wurden die Primer 112/2 EcoR-I-sense [5'-AGA ATT CAG ACC GGG GTG GAC C-3'] (Roth, Karlsruhe) und 112/2 Hind-III-antisense [5'-AAG CTT AGG GTG GCT AAT GAG G-3'] (Roth, Karlsruhe) verwendet.

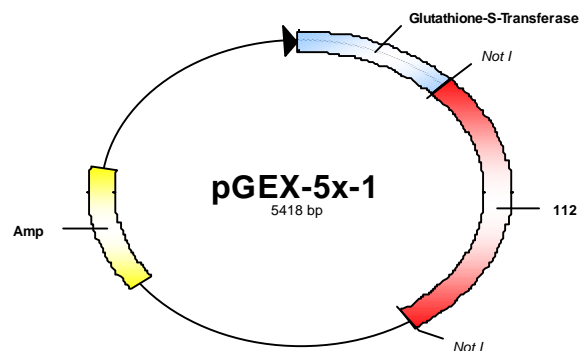


Abb. 2-2. GST-112. -Schematisch. Die DNA-Sequenz 112 wurde mit der Hydrolase Not I aus pVP16 herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pGEX-5X-1 (Pharmacia) ligiert.

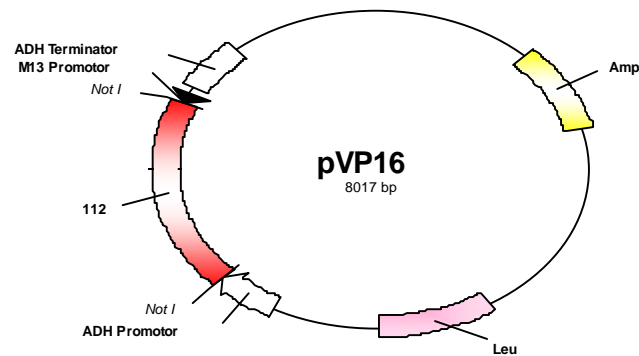


Abb. 2-3. VP16-112. -Schematisch. Die Sequenz 112 wurde im Rahmen der Klonierung der Genbank (Hollenberg, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA) über die Restriktionsschnittstellen Not I in den Expressionsvektor pVP16 ligiert.

Sequenzierprimer

pVP16 upstream Primer [5'-GGA ATT GAC GAG TAC GGT GGG- 3'] (Roth, Karlsruhe)

M13 downstream Primer [5' -AAC AGC TAT GAC CAT G- 3'] (Roth, Karlsruhe)

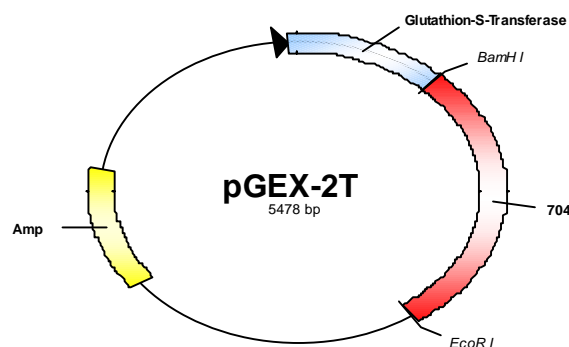


Abb. 2-4. GST-704. -Schematisch. Der Expressionsvektor pGEX-2T (Pharmacia) wurde mit den Restriktionsenzymen BamH I und EcoR I hydrolysiert. Die zytoplasmatische Domäne des G-CSFR von bp 2318 bis bp 2680 wurde mittels PCR generiert, dabei wurden künstliche Schnittstellen eingeführt. So weist die Sequenz GST-704 (363 bp) an ihrem 5'-Ende eine Bam-H-I- und an ihrem 3'-Ende eine EcoR-I-Schnittstelle auf. Für die PCR diente die zytoplasmatische Domäne des G-CSFR als Matrize. Dabei wurden die Primer 704 GST [5'-AAG ATC TAC CTG TGG CCT CCC CAC TCT-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) und Ende GST [5'-AGA ATT CCT AGA AGC TCC CCA GCG CCT-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) verwendet. Die zytoplasmatische Domäne des G-CSFR (554 bp) wurde von J. Bogenberger zur Verfügung gestellt und konnte mit den Restriktionsenzymen EcoR I, Sal I und Xba aus pGBT9 herausgeschnitten werden. Vor der Klonierung in den Expressionsvektor pGEX-2T wurde die Sequenz GST-704 in den pGEM-T-Vektor (Promega) subkloniert.

Auf diese Art und Weise wurde auch die Sequenz GST-Ende (552 bp) in den Expressionsvektor pGEX-2T kloniert. Für die PCR wurden die Primer P1 GST [5'-AAG ATC TAG GAA GAA TCC CCT CTG GCC-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) und Ende GST [5'-AGA ATT CCT AGA AGC TCC CCA GCG CCT-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) verwendet.

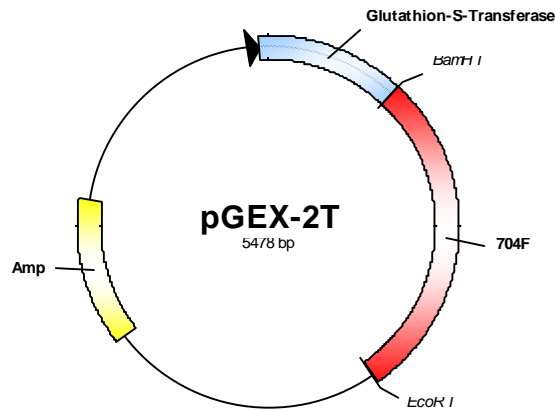


Abb. 2-5. GST-704F. -Schematisch. Bei dem Konstrukt GST-704F (552 bp) wurde das Tyrosin 704 zu Phenylalanin mutiert. Die Mutation wurde mittels PCR eingeführt. Für die erste PCR diente die Sequenz GST-Ende in dem Expressionsvektor pGEX-2T (Pharmacia) als Matrize. Es wurden die folgenden zwei Primerpaare verwendet: P1 GST [5'-AAG ATC TAG GAA GAA TCC CCT CTG GCC-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) und P1/704 Dir. [5'-GGA GCA CAA AGG TCT GGA CCA G-3'] (Roth, Karlsruhe) sowie 704/E Dir. [5'-CCA GAC CTT TGT GCT CCA GGG G-3'] (Roth, Karlsruhe) und Ende GST [5'-AGA ATT CCT AGA AGC TCC CCA GCG CCT-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein). Diese beiden PCR-Produkte wurden miteinander hybridisiert und dienten bei der Amplifikation der Sequenz GST-704F als Template. Für die zweite PCR wurden die Primer P1 GST [5'-AAG ATC TAG GAA GAA TCC CCT CTG GCC-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) und Ende GST [5'-AGA ATT CCT AGA AGC TCC CCA GCG CCT-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) verwendet. Das PCR-Produkt wurde erst in den pGEM-T-Vektor (Promega) subkloniert, mit den Restriktionsenzymen Bgl II und EcoR I wieder herausgeschnitten und schließlich in pGEX-2T ligiert.

In der zytoplasmatischen Domäne des G-CSFR wurden außerdem jeweils die Tyrosine an den Positionen 729, 744 und 764 zu Phenylalanin mutiert. Die Mutationen wurden wie bereits beschrieben eingeführt.

Zur Generierung des Konstruktes GST-729F (552 bp) wurden folgende Primerpaare verwendet: 1. PCR: P1 GST [5'-AAG ATC TAG GAA GAA TCC CCT CTG GCC-3'] und P1/729 Dir. [5'-GCC CAA AAA GGA CCT GAT CGC TGG-3'] (Roth, Karlsruhe) sowie 729/E Dir. [5'-CCT TTT TGG GCA GCT GCT GGG-3'] (Roth, Karlsruhe) und Ende GST [5'-AGA ATT CCT AGA AGC TCC CCA GCG CCT-3']. 2. PCR: P1 GST [5'-AAG ATC TAG GAA GAA TCC CCT CTG GCC-3'] und Ende GST [5'-AGA ATT CCT AGA AGC TCC CCA GCG CCT-3'].

Zur Generierung des Konstruktes GST-744F (552 bp) wurden folgende Primerpaare verwendet: 1. PCR: P1 GST [5'-AAG ATC TAG GAA GAA TCC CCT CTG GCC-3'] und P1/744 Dir. [5'-CAC AGC GGA GAA AGT GCC CTG G-3'] (Roth, Karlsruhe) sowie 744/E Dir. [5'-TTC TCC GCT GTG ACT CCA CTC C-3'] (Roth, Karlsruhe) und Ende GST [5'-AGA ATT CCT AGA AGC TCC CCA GCG CCT-3']. 2. PCR: P1 GST [5'-AAG ATC TAG GAA GAA TCC CCT CTG GCC-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) und Ende GST [5'-AGA ATT CCT AGA AGC TCC CCA GCG CCT-3'].

Zur Generierung des Konstruktes GST-764F (552 bp) wurden folgende Primerpaare verwendet: 1. PCR: P1 GST [5'-AAG ATC TAG GAA GAA TCC CCT CTG GCC-3'] und P1/764 Dir. [5'-CTC AAA GGA CTT GGG GCT GGG G-3'] (Roth, Karlsruhe) sowie 764/E Dir. [5'-CCT TTG AGA ACC TCT GGT TCC AGG-3'] (Roth, Karlsruhe) und Ende GST [5'-AGA ATT CCT AGA AGC TCC CCA GCG CCT-3']. 2. PCR: P1 GST [5'-AAG ATC TAG GAA GAA TCC CCT CTG GCC-3'] und Ende GST [5'-AGA ATT CCT AGA AGC TCC CCA GCG CCT-3'].

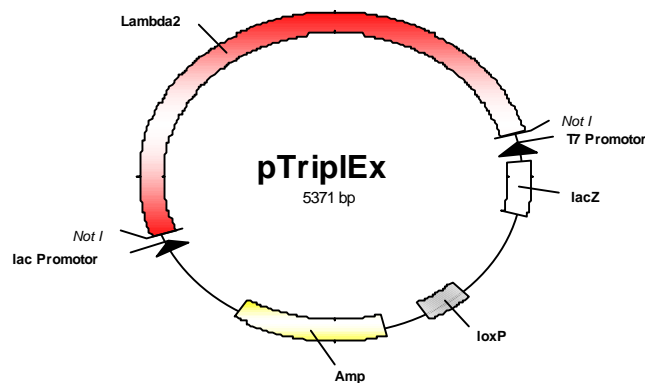


Abb. 2-6. TriplEx- λ 2. -Schematisch. pTriplEx ist ein Vektor der Mouse Kidney 5'-Stretch Plus cDNA Library der Firma Clontech. Die Sequenz λ 2 wurde im Rahmen der Klonierung der Genbank pTriplEx ligiert. λ 2 kann mit der Restriktionsendonuklease Not I herausgeschnitten werden.

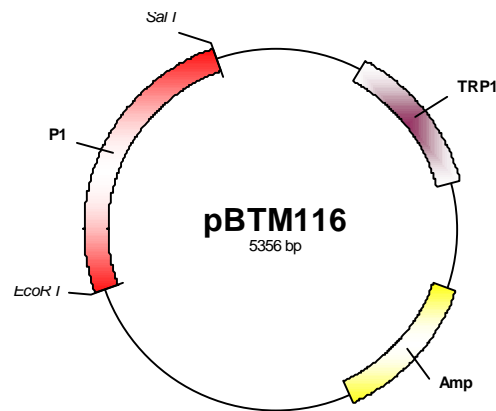


Abb. 2-7. LexA-P1. -Schematisch. Der Expressionsvektor pBTM116 (Fields, University of Washington, Seattle, USA, zur Verfügung gestellt von Funk, MediGene, Martinsried) wurde mit dem Restriktionsenzymen EcoR I und Sal I hydrolysiert. Die zytoplasmatische Domäne LexA-P1 (183 bp) des G-CSFR wurde von bp 2128 bis bp 2311 mittels PCR generiert, dabei wurden künstliche Schnittstellen eingeführt. So weist die Sequenz LexA-P1 an ihrem 5'-Ende eine EcoR-I- und an ihrem 3'-Ende eine Sal-I-Schnittstelle auf. Für die PCR diente die zytoplasmatische Domäne des G-CSFR als Matrize. Dabei wurden die Primer P1 Lex [5'-AGA ATT CAG GAA GAA TCC CCT CTG GCC-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) und P2 Lex [5'-GTC GAC GCT GTT ATG GGA CTC CCA GGG-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) verwendet. Die zytoplasmatische Domäne des G-CSFR wurde von J. Bogenberger zur Verfügung gestellt und konnte mit den Restriktionsenzymen EcoR I, Sal I und Xba aus pGBT9 geschnitten werden. Vor der Klonierung in den Expressionsvektor pBTM116 wurde die Sequenz Lex-P1 in pGEM-T-Vektor (Promega) subkloniert.

Auf diese Art und Weise wurden auch die Sequenzen LexA-704, LexA-729 und LexA-Ende in den Expressionsvektor pBTM116 kloniert.

Zur Generierung des Konstruktes LexA-704 (363 bp) wurden folgende Primerpaare verwendet: 704 Lex [5'-AGA ATT CAC CTG TGG CCT CCC CAC TCT-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) und Ende Lex [5'-GTC GAC CTA GAA GCT CCC CAG CGC CTC-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein)

Zur Generierung des Konstruktes LexA-729 (262 bp) wurden folgende Primerpaare verwendet: 729 Lex [5'-AGA ATT CCT TTA TGG GCA GCT GCT GGG C-3'] (Gibco-BRL, Eggenstein) und Ende Lex [5'-GTC GAC CTA GAA GCT CCC CAG CGC CTC-3']

Zur Generierung des Konstruktes LexA-Ende (552 bp) wurden folgende Primerpaare verwendet: P1 Lex [5'-AGA ATT CAG GAA GAA TCC CCT CTG GCC-3'] und Ende Lex [5'-GTC GAC CTA GAA GCT CCC CAG CGC CTC-3']

2.2 Methoden

2.2.1 *Arbeiten mit DNA*

2.2.1.1 *Isolierung von Plasmid-DNA*

2.2.1.1.1 *Minipräparation von Plasmid-DNA*

Eine Minipräparation wurde durchgeführt, wenn für anschließende Verfahren weniger als 20 µg DNA benötigt wurden, z.B. zum Screening interessierender Klone, zur PCR und zur Sequenzierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde eine Bakterien-Einzelkolonie in 2 ml 2YT-Medium überimpft und als Übernachtskultur bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Abhängig von dem zu isolierenden Plasmid wurde das Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum (Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) bzw. Tetracyclin (12,5 µg/ml)) versetzt. Die Übernachtskultur wurde in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation bei 12 000 rpm sedimentiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.1.2 *Großpräparation von Plasmid-DNA*

Die Maxipräparation dient der Isolation großer Mengen von Plasmid-DNA. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Aufreinigung der Plasmid-DNA unter dem Einsatz von Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen. Eine Bakterien-Einzelkolonie wurde in 2 ml 2YT-Medium, dem zur Selektion ein entsprechendes Antibiotikum zugegeben wurde, überimpft und 5-6 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 100 µl dieser Vorkultur beimpft und 12-16 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden bei Erreichen der stationären Phase bei 6000 g für 15 min bei 4 °C (Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor) abzentrifugiert. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem Aufreinigungsprotokoll des Plasmid Maxipräparations Kit der Firma Qiagen.

2.2.1.2 Analyse von Ausbeute und Reinheit isolierter Nukleinsäuren

2.2.1.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Ausbeute wurde durch photometrische Messung der isolierten Plasmid-DNA bei 260 nm ermittelt. Für genaue Messungen sollte A_{260} zwischen 0,1 und 1,0 liegen. Sowohl die Kalibrierung, als auch die Verdünnung der zu messenden DNA erfolgte mit dem gleichen Puffer, in dem auch die DNA gelöst wurde. Bei der Absorptionsmessung von DNA gilt:

$$A_{260} = 1 \text{ entspricht } 50 \mu\text{g}/\mu\text{l DNA.}$$

Zur Analyse geringer DNA-Mengen wurde eine quantitative Gelelektrophorese (s. 2.2.1.4) durchgeführt. Ihre Nachweisgrenze liegt bei etwa 5 ng DNA pro Bande. Dazu wurde ein Aliquot der abzuschätzenden Plasmid-DNA Lösung zusammen mit einem DNA-Größenmarker auf ein Agarosegel aufgetragen. Da die Fragmentlängen und die aufgetragene Menge des Markers bekannt waren (s. 2.2.1.3), konnte die DNA-Konzentration durch einen Vergleich der Bandenintensitäten abgeschätzt werden.

2.2.1.2.2 Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäure

Das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der isolierten Plasmid-DNA, optimal ist 2,0. Für weitere Untersuchungen wurde DNA mit einem Verhältnis $A_{260/280}$ von 1,7-1,9 eingesetzt.

2.2.1.3 Herstellung der DNA-Größenmarker

2.2.1.3.1 Herstellung des λ -Hind III-Markers (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Für den Reaktionsansatz wurden 200 μl λ -DNA (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 40 μl 10 x Hind-III-Restriktionspuffer, 160 μl steriles Aqua bidest sowie 1,5 μl Hind-III-Restriktionsendonuklease (40 U/ μl) in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wurde für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 6-fach Proben-Auftragspuffer auf 500 μl aufgefüllt. Der Marker wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Der λ -HindIII-Marker zeigte im Agarosegel folgende Bandenverteilung: 23 606 bp (~240 ng), 9 636 bp (~97 ng), 6 636 bp (~68 ng), 4 333 bp (~44 ng), 2 257 bp (~23 ng), 1 985 bp (~20 ng) und 561 bp (~6 ng). Die Angaben in Klammer beziehen sich auf ein aufgetragenes Markervolumen von 5 μl und geben die DNA-Konzentration der einzelnen Banden an.

2.2.1.3.2 Herstellung des PUC-PCR-Markers (0,1 µg/µl)

Für den Reaktionsansatz wurden 20 µl PUC-18-DNA (1,5 µg/µl), 20 µl 10 x RSA-I-Restriktionspuffer, 150 µl steriles Aqua bidest und 10 µl RSA-I-Restriktionsendonuklease (40 U/µl) in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wurde für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach vollständigem Restriktionsverdau wurden 25 µl steriles Aqua bidest, 25 µl 10 x Dra-I-Restriktionspuffer sowie 10 µl Dra-I-Restriktionsendonuklease (40 U/µl) zugegeben und erneut für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der vollständig geschnittene Ansatz mit 40 µl 6-fach Proben-Auftragspuffer versetzt und bei -20 °C aufbewahrt.

PUC-PCR-Marker zeigte im Agarosegel folgende Bandenverteilung: 1 125 bp (~269 ng), 595 bp (~142 ng), 271 bp (~65 ng) und 97 bp (~24 ng). Die Angaben in Klammer beziehen sich auf ein aufgetragenes Markervolumen von 5 µl und geben die DNA-Konzentration der einzelnen Banden an.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese für DNA

2.2.1.4.1 Herstellung des Agarosegels

In Abhängigkeit der zu trennenden DNA-Fragmentgrößen wurden 1-1,4% (w/v) Agarosegele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen, anschließend in 1 x TAE-Puffer resuspendiert und in einem Mikrowellengerät vorsichtig aufgeköcht. Die auf 50-60 °C abgekühlte Agaroselösung wurde luftblasenfrei bis zu einer Schichtdicke von maximal 5 mm in die Gelkammer gegossen. Die Taschenschablone wurde sofort nach dem Gießen eingesetzt, dabei sollte sich zwischen Gelkammerboden und Schablone eine 1-2 mm dicke Agaroseschicht ausbilden können. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Taschenschablone vorsichtig entfernt. Zur Elektrophorese wurde das Gel mit 1 x TAE-Puffer überschichtet.

2.2.1.4.2 Probenvorbereitung

Sowohl die DNA-Probe, als auch der entsprechende DNA-Größenstandard wurden mit 1/6 ihres Volumens an Auftragspuffer versetzt und in die Probentasche eingebracht. Der Probenauftrag erfolgte auf der Kathodenseite des Gels.

2.2.1.4.3 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von maximal 5 V/cm solange durchgeführt, bis der Farbstoffmarker die erforderliche Trennstrecke zurückgelegt hatte. Dabei wandert Bromphenolblau etwa wie ein lineares doppelsträngiges 300-bp-DNA-Fragment.

2.2.1.4.4. Anfärbung des Agarosegels mit Ethidiumbromid

Das Gel wurde nach Beenden der Gelelektrophorese aus der Gelkammer genommen, in die gebrauchsfertige Ethidiumbromid-Färbelösung (20 µg/ml) überführt und darin 20-30 min inkubiert. Danach wurde das Gel zur Dokumentation im durchscheinenden UV-Licht (256 nm) fotografiert.

2.2.1.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde im Rahmen dieser Arbeit das kommerzielle Kit „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.1.6 Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Für den analytischen Restriktionsverdau wurden 0,2-1 µg DNA und 1-5 U Restriktionsendonuklease/µg DNA eingesetzt. Anschließend wurde der Ansatz mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl für mindestens 2 h bei der vorgeschriebenen Temperatur inkubiert. Bei Restriktionsspaltungen mit zwei Enzymen wurde zuerst die Restriktionsendonuklease verwendet, die die niedrigere Salzkonzentration benötigte, anschließend wurde der Ansatz auf die für das zweite Enzym notwendige Ionenkonzentration eingestellt.

Bei einer Vektorhydrolyse für spätere Ligationsreaktionen wurde die Vollständigkeit der Restriktionsspaltung im Agarosegel (s. 2.2.1.4) überprüft.

2.2.1.7 Dephosphorylierung von DNA

Um zu verhindern, daß nach einer Hydrolyse mit nur einem Enzym (s. 2.2.1.6) die dabei entstandenen kompatiblen Enden wieder miteinander ligieren, wurde die DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert. Die Inkubationsbedingungen richteten sich danach, ob DNA mit 3'- oder mit 5'- überstehenden bzw. mit glatten Enden dephosphoryliert wurden sollte. Um die bereits hydrolysierte DNA zu dephosphorylieren wurde 1 U alkalische Phosphatase zum Restriktionsansatz gegeben. Zur Dephosphorylierung von DNA mit 5'-überstehenden Enden folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei

37 °C, mit 3'- überstehenden oder glatten Enden wurden erst 15 min bei 37 °C und dann 15 min bei 56 °C inkubiert. Vor der Ligationsreaktion wurde die alkalische Phosphatase mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.2.1.8) entfernt.

2.2.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion

Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion handelt es sich um eine Standard-Extraktionsmethode zur Entfernung unerwünschter Proteine aus Nukleinsäurelösungen. Dabei wurde die Nukleinsäurelösung nacheinander mit einem Volumen Phenol, einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) und einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils zentrifugiert und die obere, wäßrige Phase in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. In der Lösung verbleibende Phenolreste wurden durch eine anschließende Alkoholfällung (s. 2.2.1.9) entfernt.

2.2.1.9 Alkoholfällung

Zur Alkoholfällung wurde der Reaktionsansatz mit 0,1 Volumenteilen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 Volumenteilen absolutem Ethanol versetzt. Es folgte eine mindestens zweistündige Inkubation bei –20 °C. Die präzipitierte DNA wurde anschließend 30 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes wurde das Nukleinsäure-Sediment mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und für 5-10 min an der Luft getrocknet. Die Nukleinsäure wurde anschließend in der gewünschten Menge Puffer, z.B. Puffer TE, resuspendiert.

2.2.1.10 Ligationsreaktion

Für den Reaktionsansatz wurden die berechneten Mengen an DNA-Fragment und Vektor-DNA, zusammen mit 1 µl 10 x Ligasepuffer in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß gegeben. Das Reaktionsvolumen wurde mit sterilem Aqua bidest auf insgesamt 10 µl eingestellt. Anschließend wurde 1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben. Der Ansatz wurde 12-16 h bei 14 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze, die entweder keine Vektor-DNA oder kein DNA-Fragment enthielten.

2.2.1.11 Sequenzierung von DNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem automatischen Sequenziergerät (ABI PRISM 310, Perkin Elmer, Weiterstadt) gearbeitet. Als Ausgangsmaterial diente DNA, wie sie z.B. durch eine Minipräparation (s. 2.2.1.1.1) gewonnen werden konnte. Für eine Sequenzier-

reaktion, mit einem Gesamtvolumen von 10 μl , wurden 250 ng DNA, 3-10 pmol des jeweiligen Primers sowie 2,5 μl AmpliTaq FS BigDye Terminator Mix eingesetzt. Die Sequenzier-PCR wurde unter folgenden Bedingungen im Thermocycler durchgeführt: Denaturierung bei 96 °C für 30 s, Annealing bei 50 °C für 15 s und Elongation bei 60 °C für 4 min. Nach 25 Zyklen wurde die Reaktion beendet und das PCR-Produkt konnte aufgearbeitet werden. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 90 μl Wasser in HPLC-Qualität, 10 μl 3 M Natriumacetat, pH 5,2 sowie 250 μl absolutem Ethanol versetzt und für 15 min bei 14 000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde das Nukleinsäure-Sediment mit 250 μl 70 %-igem Ethanol gewaschen und für 5 min im Heizblock bei 37 °C getrocknet. Das Nukleinsäurepellet wurde anschließend in 25 μl Wasser in HPLC-Qualität resuspendiert, gemischt und 2 min bei 90 °C im Heizblock denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde der Reaktionsansatz erneut gemischt und in ein Sequenzierreaktionsgefäß mit Gummiseptum überführt. Es folgte die Analyse im automatischen Sequenziergerät.

2.2.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Standard-PCR folgendermaßen durchgeführt: Die Erstellung des Reaktionsgemisches erfolgte auf Eis. Dabei wurden 5 μl 10 x Taq-Polymerase-Puffer, 4 μl eines 10 mM dNTP-Gemisches, 5 μl der jeweiligen 10 μM Primerlösung, 0,5 μl DMSO sowie 1 ng DNA-Matrize in ein 0,5-ml-Mikroreaktionsgefäß gegeben und mit Aqua bidest auf ein Gesamtvolumen von 50 μl aufgefüllt. Nach Zugabe von 2,5 U Taq-Polymerase wurden die Komponenten sorgfältig gemischt und vor dem Überführen in den Thermocycler kurz abzentrifugiert. Das PCR-Programm sieht folgende Bedingungen vor: Eine initiale Denaturierung von 5 min bei 94 °C, 30 Zyklen bestehend aus 1 min bei 94 °C, 2 min bei 55 °C und 3 min bei 72 °C. Zum Schluß folgt eine finale Elongation von 10 min bei 72 °C. Danach wird die Reaktion auf 4 °C abgekühlt. Auf jede PCR folgte eine Analyse der Produkte im Agarosegel (s. 2.2.1.4)

2.2.1.13 Aufreinigung von PCR-Produkten oder anderen DNA-Fragmenten nach enzymatischen Reaktionen

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten oder anderen DNA-Fragmenten wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten der Firma Qiagen.

2.2.1.14 In-vitro-Mutagenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einzelne Basen mutiert (site-directed mutagenesis). Die künstlichen Veränderungen wurden mittels PCR-Mutagenese, einem schnellen Verfahren zur Erzeugung gerichteter Mutationen, eingeführt. Dazu wurden zwei, zueinander komplementäre Primer, die in der Mitte die Mutation tragen und zwei weitere synthetische DNA-Oligonukleotide, die upstream bzw. downstream der komplementären Primer liegen, verwendet. Mit je einem der mutierten und je einem der 3'- bzw. 5'- davon gelegenen Primer wurden DNA-Fragmente amplifiziert. Nach der PCR wurden die beiden PCR-Produkte aufgereinigt und in einer Annealingreaktion eingesetzt. Dabei wurden 100 ng des jeweiligen PCR-Produktes, zusammen mit den beiden upstream bzw. downstream der komplementären Primer gelegenen synthetischen DNA-Oligonukleotiden (jeweils 5 µl der entsprechenden 10 µM Primerlösung) in ein 0,5-ml-Mikroreaktionsgefäß gegeben und für 2 min bei 80 °C inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz im Thermoblock auf 40 °C abgekühlt. Es folgte eine PCR zu Standard-Bedingungen (s. 2.2.1.12). Das PCR-Produkt wurde über eine Agarose-Gel-Extraktion aufgereinigt (s. 2.2.1.5).

2.2.1.15 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch „random priming“

Die radioaktive Markierung der DNA erfolgte im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung des „Megaprime DNA labelling Kit RPN 1606/7“ der Firma Amersham Buchler nach etwas modifizierten Angaben des Herstellers. Zur Markierungsreaktion wurde die doppelsträngige zu markierende DNA (100 ng) zusammen mit 5 µl der im Kit enthaltenen Zufallshexamere in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß gegeben. Danach wurde das Volumen des Reaktionsansatzes mit Aqua bidest auf insgesamt 50 µl aufgefüllt, 5 min bei 90 °C inkubiert und im Thermoblock bis auf 37 °C abgekühlt. Vor Zugabe von 10 µl Labeling-Puffer wurde das Reaktionsgemisch kurz abzentrifugiert. Im Anschluß daran wurden 50 µCi [α -³²P]dCTP und 1 U Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zugegeben und 10-15 min im Thermoblock bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß daran wurden die nicht eingebauten Nukleotide entfernt (s. 2.2.1.16).

2.2.1.16 Reinigung der radioaktiv markierten DNA-Sonde

Nach der Markierung wurden nicht eingebaute Nukleotide mit dem „Jet Nick Probe Purification after Labeling Kit“ der Firma Genomed nach den Angaben des Herstellers entfernt.

2.2.1.17 Bestimmung der spezifischen Aktivität der radioaktiv markierten Nukleinsäure-sonde

Die spezifische Aktivität der Sonde berechnet sich aus der Gesamtaktivität der gereinigten Sonde, dividiert durch die verwendete Nukleinsäure-Menge. Eine brauchbare Sonde sollte mindestens eine spezifische Aktivität von 10^8 cpm/ μ g DNA haben.

Bei der Radioaktivitätsmessung wurde 1 μ l der radioaktiven Sonde in ca. 500 μ l Aquabidest aufgenommen, mit 4 ml für wäßrige Lösungen geeigneter Szintillationslösung vermischt. Die dabei entstehenden Lichtimpulse wurden mit Sekundärelektronenvervielfachern gemessen und ausgewertet

2.2.1.18 Screening einer λ -Phagenbank

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine murine λ -Phagenbank der Niere („Mouse Kidney 5'-Stretch Plus cDNA Library“) der Firma Clontech verwendet. Das Screening erfolgte nach modifizierten Angaben des Herstellers. Zur Ermittlung der Anzahl rekombinanter Phagen wurde eine Verdünnungsreihe der Phagenbank angesetzt. Anschließend wurde der *E.coli*-Wirtstamm XL1-Blue mit den Phagen jeder Verdünnungsstufe infiziert. Dabei beginnen die Phagen die Bakterien zu lysieren. Im Bakterienrasen bilden sich sogenannte Plaques. Mit den Platten, auf denen die einzelnen Plaques gut zu zählen waren, wurde anschließend der Titer der λ -Phagenbank bestimmt.

Vor der Phageninfektion wurde ein Vereinzelausstrich von *E.coli*-XL1-Blue-Wirtstamm auf LB/tet-Selektivagarplatte (Tetracyclinkonzentration 12,5 μ g/ml final) durchgeführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit einer einzelnen Kolonie der Übernachtskultur 2 ml LB/MgSO₄/0,2 % (w/v) Maltose-Medium angeimpft und 12-16 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 1 ml dieser Kultur in 100 ml LB/MgSO₄/0,2 % (w/v) Maltose-Medium überführt und 8 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 2 500 rpm und bei 4 °C. Das Bakterienpellet wurde in 30 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Mit 10 μ l der Phagenbank wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-4} - 10^{-10} in Puffer SM angesetzt. Danach wurden 100 μ l jedes Verdünnungsschrittes zusammen mit 200 μ l der kompetenten *E.coli*-XL1-Blue Zellen 20-30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 ml 43-45 °C warmer Weichagar auf die einzelnen Phagen-Bakterien-Suspension gegeben, gut gemischt und gleichmäßig auf vorgewärmten 90-mm-LB/MgSO₄-Agarplatten verteilt. Die Platten blieben bis zum vollständigen Erstarren bei Raumtemperatur stehen. Danach wurden sie,

mit dem Deckel nach unten, bei 37 °C bis zum Erscheinen deutlicher Plaques inkubiert. Dies dauerte ca. 5-8 h. Das Phagenwachstum wurde durch eine Inkubation der Platten über Nacht, mit dem Deckel nach oben, bei 4 °C gestoppt. Es folgte die Bestimmung des Phagentiters.

Für das eigentliche Screening der λ -Phagenbank wurden jeweils 30000 pfu/140-mm-LB/MgSO₄-Agarplatte auf 20 Platten ausplattiert. Dazu wurde die Phagensuspension in geeigneter Verdünnung zusammen mit 300 μ l der kompetenten *E.coli*-XL1-Blue Zellen 20-30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 7 ml 43-45 °C warmer Weichagar auf die einzelnen Phagen-Bakterien-Suspension gegeben, gut gemischt und gleichmäßig auf die vorgewärmten 140-mm-LB/MgSO₄-Agarplatten verteilt. Das weitere Verfahren bis zur Beendigung des Phagenwachstums wurde bereits beschrieben.

Anschließend mußten die Klone für die Hybridisierung auf Membranen (Filter) transferiert werden. Pro Agarplatte wurden zwei Nitrocellulosemembranen (als a und b bezeichnet) aufgelegt. Vor dem Auflegen der Filter wurden sowohl die Platten als auch die Membranen durch numeriert. Die erste Nitrocellulosemembran (a) wurde blasenfrei mit der Beschriftung nach unten auf den Bakterienrasen gelegt und an drei zueinander asymmetrischen Stellen durch Durchstechen des Filters und des Agars mit einer Kanüle markiert. Die Einstichstellen wurden auf dem Plattenboden nachgezeichnet. Nach 2 min wurde die erste Membran vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen und die zweite (b) aufgelegt. Sie wurde an den entsprechenden Stellen markiert und nach 5 min ebenfalls entfernt. Die Membranen wurden sofort nach dem Ziehen 5 min auf ein mit Denaturierungslösung vollgesogenes Whatmann 3MM-Papier gelegt. Dabei ist zu beachten, daß die DNA-Seite nach oben zeigt und daß die Filter blasenfrei liegen. Für den nächsten Schritt galten die gleichen Bedingungen, nur daß das Whatmann 3MM-Papier jetzt mit Neutralisierungslösung getränkt war. Schließlich wurden die Membranen ca. 20 s mit 2 x SSC gewaschen und danach auf Whatmann 3MM-Papier getrocknet. Sobald die Filter vollständig trocken waren wurden sie zur Fixierung der DNA zwischen Whatmann 3MM-Papiere gelegt und 2 h bei 80°C gebacken.

Prinzipiell ist die Hybridisierung der Nitrocellulosemembranen mit derjenigen bei Northern Blots zu vergleichen, nur ist die Zahl der Filter höher. Deshalb wurde sie in einem großen Plastikgefäß mit einem Durchmesser von 20 cm durchgeführt. In dieses wurden 150 ml Prähybridisierungs-Lösung (ExpressHybTMHybridisation Solution) gegeben. Die Membranen wurden, bevor sie einzeln in das Gefäß überführt wurden, kurz in 6 x SSC geschwenkt. Die Prähybridisierung sollte mindestens 6 h unter leichtem Schütteln

bei 42 °C erfolgen. Zur Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde in die Prähybridisierungs-Lösung gegeben. Diese hatte eine spezifische Aktivität von 8×10^7 cpm. Es folgte eine Inkubation für 12-20 h unter leichtem Schütteln bei 42 °C im Wasserbad. Im Anschluß daran wurden die Filter jeweils 30 min in einem Volumen von 500 ml unter folgenden Bedingungen gewaschen: 2 x SSC/0,1 % (w/v) SDS bei 42 °C; 1 x SSC/0,1 % (w/v) SDS bei 42 °C; 0,5 x SSC/0,1 % (w/v) SDS bei 42 °C und 0,3 x SSC/0,1 % (w/v) SDS bei 50 °C. Die getrockneten Membranen wurden zur Exposition in Filmkassetten mit Verstärkerfolie gelegt und bei -70 °C bis zum Entwickeln der Röntgenfilme (Bio MaxTM MR), nach 1-2 Tagen, gelagert.

Auf den Röntgenfilmen mußte zunächst die Position der Membran markiert werden. Ein Signal wurde nur dann als positiv bewertet, wenn es sowohl auf dem Film des ersten Filters (a) als auch auf dem der zweiten Membran (b) zu sehen war. Konnte ein möglicherweise positiver Klon identifiziert werden, so wurde der Film und die Agarplatte zur Deckung gebracht, dann die Agarregion, in der das Signal liegt, großzügig ausgestochen und in 1 ml Puffer SM überführt. Zur Stabilisierung wurde noch ein Tropfen Chloroform zugegeben. Die Elution der Phagen erfolgte über Nacht bei 4 °C. Da beim ersten Ausstechen nicht nur der gewünschte Klon isoliert wurde, wurde der ganze Versuchsablauf wiederholt. Ausplattiert wurden diesmal die jeweiligen Phageneluate. Dabei wurden ca. 500 pfu/90-mm- LB/MgSO₄-Agarplatte angestrebt. Jetzt waren deutlich mehr positive Signale auf den Röntgenfilmen zu erkennen. Das Screening wurde so oft wiederholt, bis ein einziger positiver Klon aus dem Agar ausgestochen werden konnte.

Anschließend wurde der vorliegende λ TriplEx Klon in ein pTriplEx Klon überführt. Dazu mußte ein vollständiges Plasmid aus dem Genom des rekombinanten Phagen heraus geschnitten werden. Dies geschah durch eine Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination an den loxP-Stellen. Die Freisetzung des Plasmids erfolgte automatisch nach der Transduktion des Phagen in einen Cre-Rekombinase-exprimierenden Bakterienstamm. Es handelte sich dabei um den *E. coli* BM25.8 Wirtstamm, der das Enzym unter Wachstum bei 31 °C bildet. Das an den loxP-Stellen herausgeschnittene Plasmid wurde in *E. coli* stabil exprimiert. Zunächst wurde ein Vereinzelausstrich von *E. coli* BM25.8 auf LB/kan-Selektivagarplatte (Kanamycinkonzentration 50 μ g/ml final) durchgeführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit einer einzelnen Kolonie der Übernachtskultur 10 ml LB/MgSO₄-Medium angeimpft und 12-16 h unter Schütteln bei 31 °C geschüttelt. Anschließend wurden 100 μ l dieser Kultur in 10 ml LB/MgSO₄-Medium überführt und 8 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Dabei sollte die Kultur eine OD₆₀₀ von

1,1-1,4 erreichen. Die Bakterienkultur wurde mit einer 1M MgCl₂-Lösung auf eine Endkonzentration von 10 mM MgCl₂ eingestellt. Dann wurden 200 µl dieser Kultur und 150 µl der Phagenelution in ein Reagenzglas überführt und 30 min bei 31 °C inkubiert. Anschließend wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und für weitere 60 min bei 31 °C geschüttelt. 5 µl der infizierten Bakteriensuspension wurden auf einer LB/amp-Selektivagarplatte (Ampicillinkonzentration 100 µg/ml final) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden einzelne Kolonien gepickt und nach einer Plasmid-DNA-Isolation näher charakterisiert.

2.2.2 Arbeiten mit RNA

2.2.2.1 Vorbereitung des Probenmaterials zur späteren RNA-Isolation

Sofern nicht sofort nach der Probennahme mit der RNA-Isolation begonnen wurde, mußte die RNA vor dem Abbau durch im Material enthaltenen RNasen geschützt werden. Dazu wurde dieses sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70 °C gelagert. Zellkulturmaterial wurde vor dem Einfrieren einmal mit kaltem PBS gewaschen.

2.2.2.2 Minipräparation von Gesamt-RNA aus Zelllinien

Eine Minipräparation wurde durchgeführt, da für anschließende Verfahren weniger als $100\mu\text{g}$ Gesamt-RNA ausreichend waren. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die RNA-Isolation aus 1×10^7 Säugerzellen mit dem „RNeasy Miniprep Kit“ der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2.3 Isolierung von Poly(A)⁺-mRNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Poly(A)⁺-mRNA mittels PolyA Tract mRNA Isolation System der Firma Promega isoliert. Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA (s. 2.2.2.2); die Isolation der mRNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese für RNA

Die Gelelektrophorese für RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, da die einzelsträngige RNA zur Bildung von, die Laufeigenschaften beeinflussenden, Sekundärstrukturen neigt. Bei den verwendeten Agarosegelen wurde die RNA durch Formaldehyd vollständig denaturiert.

2.2.2.4.1 Herstellung des Agarosegels

Für ein 1 %-iges Gel (100 ml) wurde 1 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen. Anschließend wurde sie in 10 ml einer 10 x MOPS-Stammlösung und in 74 ml DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Die Agarosesuspension wurde nun in einem Mikrowellengerät vorsichtig aufgekocht. Nachdem die Flüssigkeit auf 70 °C abgekühlt war, wurden 16 ml Formaldehyd (37 % (v/v)) zugegeben und unter Schwenken gemischt. Anschließend wurde die Agaroselösung luftblasenfrei in eine Gelkammer gegossen. Die Taschen- schablone wurde sofort nach dem Gießen eingesetzt, dabei sollte sich zwischen Gelkam-

methoden und Schablone eine 1-2 mm dicke Agaroseschicht ausbilden können. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Taschenschablone vorsichtig entfernt. Zur Elektrophorese wurde das Gel mit 1 x MOPS-Puffer überschichtet.

2.2.2.4.2 *Probenvorbereitung*

Die für die Gelelektrophorese bestimmte RNA sollte in maximal 6 µl RNase-freiem Wasser gelöst sein. Dazu mußte das Volumen gegebenenfalls mittels einer Speed-vac eingengt werden. Die RNA-Probe wurde mit 1 µl 10 x MOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd (37 % (v/v)) und 10 µl deionisiertem Formamid versetzt. Der Ansatz wurde 15 min bei 55 °C im Thermoblock inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 2 µl 10 x Proben-Auftragepuffer zugegeben. Der Probenauftrag erfolgte auf der Kathodenseite des Gels.

2.2.2.4.3 *Gelelektrophorese*

Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von maximal 5 V/cm solange durchgeführt, bis der Farbstoffmarker die erforderliche Trennstrecke zurückgelegt hatte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine kommerziell erhältlichen Größenmarker verwendet. Die in Gesamt-RNA-Präparationen enthaltenen rRNA-Moleküle (28-S- und 18-S-RNA) erscheinen als diskrete Banden und dienten als Marker. Um die Position der 28-S- und 18-S-RNA sichtbar zu machen, wurde das RNA-Gel nach der Elektrophorese auf eine Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator gelegt und mit UV-Licht bei 254 nm bestrahlt. Mit einem Skalpell wurde die Laufhöhe der beiden rRNA-Banden durch einen kleinen Einschnitt an den entsprechenden Stellen am Seitenrand des Gels markiert.

2.2.2.5 *Northern Blot*

Der Northern Blot wurde wie von Sambrook *et al.* (1989) beschrieben durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch kommerziell erhältliche Northern Blots (MTN) der Firma Clontech verwendet. Es handelte sich dabei um mRNA verschiedener humaner und muriner Gewebe, die auf Nitrocellulose transferiert wurden.

2.2.2.5.1 *Hybridisierung des Northern Blots*

Als Sonde wurden sowohl markierte DNA, als auch einzelsträngige markierte RNA eingesetzt. Um die Membran, auf der die RNA gebunden ist, zu blockieren, wurden die freien Bindungsstellen mit einer Prähybridisierung abgesättigt. Dazu wurde der Northern Blot 2 h

in ca. 4 ml Prähybridisierungspuffer (ExpressHyb™ Hybridisation Solution, Clontech) inkubiert. Die Prähybridisierung geschah in 50-ml-Reaktionsgefäßen, die zur Inkubation bei 42 °C im Hybridisierungsofen, in sogenannte Hybridisierungsröhren gesteckt wurden. Anschließend wurde die radioaktiv markierte, denaturierte Nukleinsäuresonde in die Prähybridisierungs-Lösung gegeben. Diese hatte eine spezifische Aktivität von 1×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung. Es folgte eine Inkubation von 12-20 h bei 42 °C im Hybridisierungsofen. Im Anschluß daran wurde die Nitrocellulosemembran jeweils 30 min in einem Volumen von 20 ml unter folgenden Bedingungen gewaschen: 2 x SSC/0,1 % (w/v) SDS bei 45 °C; 1 x SSC/0,1 % (w/v) SDS bei 45 °C und 0,1 x SSC/0,1 % (w/v) SDS bei 60 °C. Die getrocknete Membranen wurde in Haushalts-Klarsichtfolie gepackt, zur Exposition in eine Filmkassette mit Verstärkerfolie gelegt und bei -70 °C bis zum Entwickeln des Röntgenfilms (X-OMAT™ AR) , nach 1-7 Tagen, gelagert.

Die mRNA von Aktin wurde in Northern-Blot-Experimenten als Ladekontrolle verwendet. Damit sollte sichergestellt wurden, daß in den verschiedenen Spuren des Agarosegels gleich viel RNA aufgetragen wurde.

2.2.2.6 Markierung von RNA durch In-vitro-Transkription

Markierte RNA-Sonden hoher spezifischer Aktivität wurden durch In-vitro-Transkription hergestellt. Dazu wurde das zu transkribierende DNA-Fragment in den pGEM-T-Vektor (Pharmacia, Freiburg) kloniert. Für die Herstellung der Antisensesonde wurde mit dem Restriktionsenzym EcoR I hydrolysiert. Zur Restriktion wurden bei einem Gesamtvolumen von 200 µl ca. 10 µg DNA, 10 U EcoR I und 20 µl 10 x EcoR-I-Restriktionspuffer eingesetzt und 12 h bei 37 °C inkubiert. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.1.4) überprüft. Dazu wurde der gesamte Reaktionsansatz auf ein Gel aufgetragen. Das linearisierte DNA-Fragment wurde anschließend wieder aus dem Agarosegel eluiert (s. 2.2.1.5) und in 60 µl Puffer EB (Bestandteil des „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen) aufgenommen. Es folgte eine Auffüllreaktion mit Hilfe des Klenow-Fragments der *E.-coli*-DNA-Polymerase I an den 3'-Enden. Dazu wurden 16 µl Aqua bidest, 2 µl einer 10 mM dNTP-Lösung, 20 µl 10 x Klenow-Puffer und 10 U Klenow-Fragment zu den 60 µl eluierter DNA gegeben. Der Ansatz wurde für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Polymerase durch Inkubation von 10 min bei 75 °C im Thermoblock inaktiviert. Der Reaktionsansatz wurde mit einer Zentrifugationssäule, wie sie im „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma

Qiagen enthalten ist, nach dem Protokoll zur Aufreinigung von PCR-Produkten aufgereinigt (s. 2.2.1.13). Die Elution des DNA-Fragments erfolgte mit 70 μ l Puffer EB. Anschließend wurden 97,5 μ l Aqua bidest, 20 μ l 10 x Proteinase-K-Puffer, 10 μ l einer 20 %-igen SDS-Lösung und 2,5 μ l Proteinase K (20 mg/ml) zum Eluat gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.2.1.8) aufgereinigt, die DNA mit Ethanol präzipitiert (s. 2.2.1.9) und dann in 14 μ l RNase-freiem Wasser aufgenommen. Es folgte die Transkription der DNA und die Markierung der RNA. Dazu wurden 6 μ l 5 x Transkriptionspuffer, 2 μ l eines 10 mM Nukleotidgemisches (dATP, dCTP und dGTP), 10 U RNase-Inhibitor (RNasin), 12 U SP6-RNA-Polymerase sowie 50 μ Ci [α -³²P]dUTP zur linearisierten Vektor-DNA gegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Auf die In-vitro-Synthese markierter RNA-Moleküle folgte eine Behandlung des Ansatzes mit DNase I. Dadurch wurden Vektorsequenzen hydrolysiert und die Hybridisierungsreaktion störende Einflüsse nicht markierter Sequenzen vermieden. Dazu wurden 20 U DNase I zum Reaktionsansatz gegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die RNA-Sonde mußte schließlich von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt werden. Dies geschah mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.2.1.8). Zur besseren Durchführung wurde der Reaktionsansatz mit DEPC-behandeltem Wasser auf 200 μ l aufgefüllt. Der Phenol-Chloroform-Extraktion folgte eine Alkoholfällung mit Ammoniumacetat (2,5 M final). Die fertige RNA-Sonde wurde in 200 μ l RNase-freiem Wasser aufbewahrt. Zusätzlich wurden 10 U RNase-Inhibitor (RNasin) zum Reaktionsansatz gegeben. Bis zu ihrer Verwendung wurde die RNA-Sonde bei -20 °C gelagert. Wie andere Nukleinsäuresonden wurde auch die hergestellte Antisensesonde vor der Hybridisierung denaturiert.

2.2.3 Arbeiten mit Bakterien

2.2.3.1 Herstellung kompetenter *E.-coli*-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden transformationskompetente *E.-coli*-Zellen mittels Calciumchlorid hergestellt; modifiziert nach Cohen *et al.* (1972).

Zunächst wurde ein frischer Zellausstrich des jeweiligen *E.-coli*-Stammes (HB101, DH5 α , etc) auf einer 2YT-Platte angelegt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Bakterien-Einzelkolonie wurde in 5 ml 2YT-Medium überimpft und 12-16 h bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Danach wurden 50 ml 2YT Medium mit 500 μ l dieser Vorkultur beimpft und 2-4 h bis zum Erreichen einer Zelldichte von 5×10^7 /ml (das entsprach einer OD₅₆₀ von 0,5) bei 37 °C kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterienzellen 10 min in Eis gekühlt. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeiten auf Eis und mit vorgekühlten Materialien und Lösungen durchgeführt. Danach wurden die Zellen für 10 min bei 2 500 rpm bei 4 °C sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 25 ml 0,1 M Calciumchloridlösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 2 500 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, die Bakterienzellen wurden in 500 μ l 0,1 M Calciumchloridlösung aufgenommen. Zur Aufbewahrung wurden die kompetenten *E.-coli*-Zellen mit 400 μ l Glycerin versetzt. Die Zellsuspension wurde in Aliquots zu je 100 μ l in 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen können mehrere Monate bei -70 °C aufbewahrt werden.

2.2.3.2 Herstellung elektrokompetenter Leucin prototropher *E.-coli* HB 101

Zur Herstellung elektrokompetenter Leucin prototropher *E.-coli* HB 101 wurde 2YT-Medium beimpft, kultiviert und schließlich bei Erreichen einer OD₅₆₀ von 0,5 wie unter 2.2.3.1 beschrieben sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 25 ml 10 % (v/v) Glycerinlösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 2 500 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die Bakterienzellen wurden in 500 μ l 10 % (v/v) Glycerinlösung aufgenommen. Zur Aufbewahrung wurden die kompetenten *E.-coli* HB 101 mit 400 μ l Glycerin versetzt. Die Zellsuspension wurde in Aliquots zu je 100 μ l in 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die elektrokompetenten Zellen können mehrere Monate bei -70 °C aufbewahrt werden.

2.2.3.3 Transformation kompetenter *E.-coli*-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Transformation kompetenter *E.-coli*-Zellen mittels Hitzeschock. Dazu wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und die zur Transformation benötigte Zellzahl (15×10^7 Zellen, dem entsprechen ca. 50 μl der unter 2.2.3.1. beschriebenen Anleitung hergestellten kompetenten Zellen) in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die zu transformierende DNA zugegeben. Üblicherweise wurden 5 μl eines 10 μl Ligationsansatzes oder 2 ng Plasmid-DNA zugesetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Zur Aufnahme der Fremd-DNA wurde der Ansatz genau 2 min bei 42 °C im Thermoblock inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Danach wurden 200 μl 2YT-Medium zugegeben. Der Transformationsansatz wurde 1 h bei 37 °C im Thermoblock leicht geschüttelt. Im Anschluß daran wurden 100 μl der Suspension auf 2YT-Selektiv-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einige der gewachsenen Kolonien wurden in 2 ml 2YT-Selektiv-Medium überimpft und mittels einer Minipräparation (s. 2.2.1.1.1) überprüft.

2.2.3.4 Aufbewahrung von Bakterien-Kulturen

Bakterien können auf einer mit Parafilm verschlossenen Agarplatte bis zu vier Wochen gelagert werden. Zur längeren Aufbewahrung wurden Glycerinstocks angelegt. Dazu wurde 1 ml einer frischen Bakterienkultur mit 1 ml Glycerin versetzt, gut durch Invertieren gemischt und bei -70 °C weggefroren.

Zur Wiederinkulturnahme der Bakterien wurde ein erbsengroßes Stück der gefrorenen Bakterienmasse entnommen und direkt auf 2YT-Selektiv-Platten ausplattiert oder in 2YT-Selektiv-Medium überimpft. Der Glycerinstock wurde sofort wieder bei -70 °C gelagert.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Produktion der GST-Fusionsproteine in Bakterienzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Expressionsvektoren der pGEX-Serie der Firma Pharmacia erzielt. Diese Vektoren enthalten einen tac-Promotor; die Genexpression wird somit über die Zugabe von IPTG induziert. Dabei wird das inserierte Gen in Form eines Fusionsproteins mit der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* exprimiert. Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgte über Glutathion-Affinitätschromatographie.

2.2.4.1.1 Expression eines GST-Fusionsproteins in *E.-coli* DH5 α

E.-coli DH5 α wurden mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformiert (s. 2.2.3.3), auf 2YT/amp-Selektivagarplatte (Ampicillinkonzentration 100 μ g/ml final) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Bakterien-Einzelkolonie wurde in 15 ml 2YT/amp-Selektivmedium überimpft und 12-16 h bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Danach wurden 100 ml 2YT Medium mit 10 ml dieser Vorkultur beimpft und unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37 °C inkubiert. Zur Induktion der Expression wurde 1 mmol IPTG/l Kultur zugegeben. Die Bakterien wurden für weitere 4 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Zellen in 50-ml-Reaktionsgefäßen für 10 min bei 2 500 rpm sedimentiert und in 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Das Bakteriensediment wurde bis zur Reinigung des GST-Fusionsproteins (s. 2.2.4.1.3) bei -70 °C gelagert.

2.2.4.1.2 Expression eines GST-Fusionsproteins in *Epicurian Coli* TKX1

Bei *Epicurian Coli* TKX1 handelt es sich um einen Bakterienstamm mit einem Plasmid-codiertem, induzierbarem Tyrosinkinasegen. Nach Transformation des jeweiligen Expressionsplasmids wird, wie in *E.-coli* DH5 α , das gewünschte rekombinante Protein produziert. Nach Induktion der Tyrosinkinase wird das Fusionsprotein in den Bakterien phosphoryliert. *Epicurian Coli* TKX1 wurden mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformiert (s. 2.2.3.3), auf 2YT/amp/tet/kan-Selektivagarplatte (Ampicillin- 100 μ g/ml, Tetracyclin- 12,5 μ g/ml und Kanamycinkonzentration 25 μ g/ml final) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Bakterien-Einzelkolonie in 15 ml 2YT/amp/tet/kan-Selektivmedium, angereichert mit 2 % Glucose, überimpft und 12-16 h bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Danach wurden 100 ml 2YT/2 % (w/v)

Glucose-Selektivmedium mit 10 ml dieser Vorkultur beimpft und unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,7 bei 37 °C inkubiert. Zur Induktion der Expression des rekombinanten Proteins wurde 1 mmol IPTG/l Kultur zugegeben. Die Bakterien wurden für weitere 4 h bei 37 °C geschüttelt. Es folgt eine Zentrifugation in 50-ml-Reaktionsgefäßen von 10 min bei 2 500 rpm. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml PBS-Puffer gewaschen und zur Induktion der unter Kontrolle des *trp*-Promotor stehenden Tyrosinkinase in Induktionsmedium aufgenommen. Es handelt sich dabei um ein Trp-Mangelmedium. In diesem wird das *trp*-Operon induziert. Die im Medium enthaltene Indolacrylsäure, ein Tryptophan-Analogon, hält die Expression der aktivierten Kinase aufrecht. Die Kultur wurde auf eine OD_{600} von 0,5 eingestellt. Es folgte eine Inkubation für 4 h bei 37 °C. Danach wurden die Zellen in 50-ml-Reaktionsgefäßen für 10 min bei 2 500 rpm (Hettich Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nach Waschen des Bakterienpellets in 10 ml PBS-Puffer können die Bakterienzellen bis zur Reinigung des GST-Fusionsproteins (s. 2.2.4.1.3) bei -70 °C aufbewahrt werden.

2.2.4.1.3 Reinigung des GST-Fusionsproteins

Die Isolation des GST-Fusionsproteins erfolgte auf Eis, oder bei 4°C und wurde mit vorgekühlten Materialien und Lösungen durchgeführt. Bei sämtlichen Arbeiten mit Proteinen wurden silikonisierte Mikroreaktionsgefäße verwendet. Zur Reinigung des rekombinanten Proteins über Gluthation-Affinitätschromatographie wurden die Bakterienzellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurde das Bakterienpellet in 4 ml Puffer AM resuspendiert. Zur Ultraschallbehandlung wurde die Sonde in die Flüssigkeit eingetaucht und unter Vermeidung von Schaumbildung 10s mit 50 Stößen/s bei 100 W lysiert. Die Suspension wurde 20 min unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend in 2-ml-Mikroreaktionsgefäßen bei 14 000 rpm für 10 min sedimentiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt bis der Überstand klar und frei von Zelltrümmern war. Dieser wurde in ein neues 2-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Es wurden 25 µl Glutathion-Sepharose 4B/ml Überstand dreimal mit Puffer AM gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den einzelnen Waschschrritten erfolgte für 1 min bei 1 000 rpm. Danach wurden die Sepharose-Perlen zu dem Bakterienüberstand gegeben und mindestens 1 h unter Schütteln inkubiert. Danach wurde der Ansatz 1 min bei 1 000 rpm zentrifugiert und dreimal mit Puffer AM gewaschen. Nach jedem Waschschrtritt wurden die an Glutathion-Sepharose gekoppelten Fusionsproteine in ein neues 2-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Schließlich wurden die Proteine in 200 µl Puffer AM aufgenommen und bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.4.2 GST-pull-down-Experiment

Die GST-pull-down-Technik ist eine Methode mit der Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* nachgewiesen werden können. Zur Identifikation von Interaktionspartnern wurden die an Glutathion-Sepharose gekoppelten Fusionsproteine (ca. 50 µg) zu dem Ganzzellysat gegeben und unter leichtem Schütteln bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die an Glutathionperlen gebundenen rekombinanten Proteine samt ihrer Wechselwirkungspartner für 1 min bei 1 000 rpm abzentrifugiert und dreimal mit Puffer AM gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde der an Glutathion-Sepharose gekoppelte Proteinkomplex in ein neues 2-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Schließlich wurden die Proteine in 30 µl 1 x Proben-Auftragepuffer aufgenommen, 10 min gekocht und bis zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 2.2.4.3) bei 4 °C aufbewahrt.

Wichtig bei der Durchführung und Auswertung von GST-pull-down-Experimenten ist das Mitführen geeigneter Kontrollen. So wurde GST alleine, d.h. nicht als Fusionsprotein, immer als Kontrolle eingesetzt. Mit ihr können mögliche unspezifische Wechselwirkungen der Interaktionspartner mit dem perlenkonjugierten GST erkannt werden.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach Standard Protokollen von Lämmli (1970) durchgeführt.

2.2.4.3.1 Vorbereitung der Proben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die zu analysierende Proteinlösung wurde mit ¼ Volumenanteil 4 x Proben-Auftragepuffer gemischt und 5 min bei 100 °C im Wasserkocher hitzedenaturiert.

Handelte es sich bei den Proben um Sediment, so wurden diese, in 30–50 µl 1 x Proben-Auftragepuffer resuspendiert und unter den beschriebenen Bedingungen denaturiert. Danach wurden unlösliche Bestandteile durch eine Zentrifugation von 5 min bei 14 000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt.

2.2.4.3.2 Färben der SDS-Polyacrylamid-Gele mit Coomassie Blau

Zum Färben wurde das Gel in eine Plastikschaale gelegt, großzügig mit Färbelösung bedeckt und eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit wieder in das Ausgangsgefäß gegossen. Das Polyacrylamidgel wurde in Entfärbelösung bis zur gewünschten Verringerung des Hintergrundes entfärbt.

2.2.4.3.3 Trocknen des gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gels

Zur Beseitigung sämtlicher Alkohol- oder Essigsäurereste wurde das Gel in Aqua bidest gewässert. Anschließend wurde es luftblasenfrei auf einem Whatmann 3MM-Papier, mit Klarsicht-Haushaltsfolie bedeckt, auf dem Geltrockner für etwa 45 min getrocknet.

2.2.4.4 Western Blot

Beim Western Blot wurden Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Gel, unter Beibehaltung des ursprünglichen Bandenmusters, auf eine Trägermembran übertragen und mit für sie spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Burnette 1990). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Semi-Dry-Blot-Verfahren angewandt (Khyse-Andersen 1984, Tovey & Baldo 1987). Dafür wurde das Trenngel nach der Gelelektrophorese für 20 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Die Nitrocellulosemembran (Towbin *et al.* 1989) wurde auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und 30 min in Anodenpuffer II getränkt. Da der Aufbau des Semi-Dry-Blot luftblasenfrei erfolgen muß, wurden Luftblasen durch vorsichtiges Rollen mit einer Glaspipette entfernt. Der Blotting-Sandwich wurde wie folgt aufgebaut: Auf der mit Anodenpuffer I befeuchteten Anode wurden zwei in diesem Puffer getränkte Whatmann 3MM-Papiere, gefolgt von einer Schicht mit Anodenpuffer II vollgesogenem Filterpapier, plaziert. Darauf wurden erst die Nitrocellulosemembran, dann das Acrylamidgel gelegt. Der Sandwich wurde mit drei Lagen in Kathodenpuffer eingeweichem Whatmann 3MM-Papier vervollständigt. Zum Schluß wurde die mit diesem Puffer benetzte Kathodenplatte parallel zur Anodenplatte auf den Stapel gesetzt und mit einem Gewicht beschwert. Die Proteine wurden mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ auf die Membran transferiert. Dafür wurden je nach Proteingröße 2-2,5 h veranschlagt. Da im Rahmen dieser Arbeit nur 11 %-ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet wurden, mußte bei der Transferdauer die Acrylamidkonzentration nicht berücksichtigt werden. Nach dem Blotten wurde die Membran an der Stelle, an der sich die rechte untere Ecke des Gels befand, durch einen kleinen Einschnitt gekennzeichnet. Zusätzlich wurden die Banden des Markers auf der Membran mit Kugelschreiber nachgezogen.

2.2.4.4.1 Färbung der transferierten Proteine mit Ponceau S

Durch die Färbung der transferierten Proteine mit Ponceau S (Salinovich & Montelaro 1986) wurde die Effizienz des Blotvorgangs überprüft. Dazu wurde die Membran nach dem Proteintransfer für 10 min in Ponceau-S-Gebrauchslösung geschwenkt, anschließend 1-2 min unter mehrmaligem Wechseln mit Aqua bidest entfärbt. Vorhandene Proteinban-

den wurden dabei rot dargestellt. Die Färbung nimmt keinen Einfluß auf die folgenden Visualisierungsverfahren und verschwindet nach weiterem Waschen wieder.

2.2.4.4.2 Nachweis der Proteine mit Antikörpern

Zum Absättigen überschüssiger Proteinbindestellen der Membran wurde im Rahmen dieser Arbeit TBST-Puffer mit 3 % (w/v) BSA verwendet. Sie wurde dazu eine Stunde in einem 50-ml-Reaktionsgefäß auf einem Rotationsschüttler geblockt. Im Anschluß daran folgte die eigentliche Nachweisreaktion: die Bindung des spezifischen Erstantikörpers. Dieser Immunkomplex ist nicht sichtbar und wird erst durch die Bindung eines zweiten Antikörpers an den ersten visualisiert. Nach Abgießen der Blocking-Lösung wurde der Erstantikörper in geeigneter Verdünnung (1-10 µg/ml) zu 2 ml frischem TBST/3 % (w/v) BSA-Puffer gegeben und für 1-6 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluß daran wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran dreimal 15 min mit ca. 25 ml TBST-Puffer gewaschen. Der mit Radionukliden gekoppelte Zweitantikörper richtet sich gegen konstante Bereiche des Erstantikörpers. Die Inkubation erfolgte mit 2 µCi des zweiten Antikörpers (^{125}J anti-rabbit IgG bzw. ^{125}J anti-mouse IgG) in 3 ml TBST/3 % (w/v) BSA-Puffer für 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer wurde die Membran in Haushalts-Klarsichtfolie eingepackt, zur Exposition in eine Filmkassette mit Verstärkerfolie gelegt und bei -70 °C bis zum Entwickeln des Röntgenfilms (X-OMATTM AR, Kodak), nach 1-2 Tagen, gelagert.

2.2.5 Arbeiten mit Zellkulturen

2.2.5.1 Kultivierung von 32D.C10-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 32D.C10-Zellen verwendet. Es handelt sich dabei um die IL-3 abhängige murine myeloide Zelllinie. Diese wurde mit dem humanen G-CSFR trans-fiziert und von der Arbeitsgruppe von I. Touw aus Rotterdam zur Verfügung gestellt (de Koning *et al.* 1998). Die Zellen wurden in RPMI-Kulturmedium bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ und wassergesättigter Luftatmosphäre kultiviert. Sie wurden in Zellkulturschalen gehalten und alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:10 passagiert.

2.2.5.2 Einfrieren und Auftauen von 32D.C10-Zellen

2.2.5.2.1 Einfrieren von 32D.C10-Zellen

Zur längeren Aufbewahrung wurden Dauerkulturen angelegt. Diese können tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut und kultiviert werden.

Zum Einfrieren wurden ca. 2×10^6 Zellen in 1 ml kaltem FCS aufgenommen. Jeweils 0,5 ml dieser Zellsuspension wurden in 1,5-ml-Kryoröhrchen, in denen je 0,5 ml DMSO-Lösung vorgelegt waren, gegeben, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in einer Styroporbox über Nacht bei -70 °C weggefroren. Am nächsten Tag wurden sie in flüssigem Stickstoff überführt und dort bis zu ihrem Auftauen gelagert.

2.2.5.2.2 Auftauen von 32D.C10-Zellen

Das Kryoröhrchen wurde in der Hand aufgetaut. Danach wurden die Zellen sofort mit 1 ml vorgewärmtem RPMI-Kulturmedium gemischt und in einem 15-ml-Reaktionsgefäß mit Medium bis 10 ml aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 1 000 rpm nach der die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturschalen ausgesäht wurden.

2.2.5.3 Gewinnung eines IL-3-haltigen Überstandes

32D.C10-Zellen brauchen IL-3 zum Überleben. Dieses wurde in Form eines Kulturüberstandes IL-3 produzierender WEHI-3B-Zellen zur Herstellung des konditionierten Mediums verwendet.

Für die Gewinnung des Überstandes wurden WEHI-3B-Zellen in DMEM-Medium kultiviert. Hatten die Zellen die gewünschte Dichte erreicht, wurden sie in IL-3-Produktionsmedium, das sich nur in seinem prozentualen FCS-Anteil von dem DMEM-Kulturmedium

unterscheidet, aufgenommen. 3 Tage später wurden die Zellen geerntet und der Überstand sterilfiltriert. Bis zu seiner Verwendung wurde er bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Normalerweise wurden 5 % des Filtrates in das Kulturmedium der 32D.C10-Zellen gegeben, seine optimale Konzentration wurde jedoch für jede Charge ausgetestet.

2.2.5.4 Stimulation von 32D.C10-Zellen

32D.C10-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den G-CSFR und können mit G-CSF stimuliert werden. Durch die Stimulation differenzieren die myeloiden Vorläuferzellen zu reifen Granulozyten. Um diesen Effekt erzielen zu können, wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, in Stimulationsmedium aufgenommen und unter den üblichen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden nach 3 Tagen noch einmal passagiert, danach hörten sie auf zu proliferieren und fingen allmählich an zu differenzieren. Ab diesem Zeitpunkt wurde ihr Medium alle 2 Tage durch Zentrifugation für 5 min bei 1 000 rpm und durch anschließendes Resuspendieren in Stimulationsmedium gewechselt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stimulation bis zu 13 Tage lang durchgeführt.

2.2.5.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurden 20 μl einer Zellsuspension mit 20 μl Trypanblaulösung gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Farbstoff dringt nur in tote Zellen ein und färbt diese blau, vitale Zellen dagegen können Trypanblau ausschließen und erscheinen im mikroskopischen Bild hell. 10 μl des Ansatzes wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die lebenden Zellen wurden ausgezählt. Ihre Zellzahl berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellen} \times \text{ml}^{-1} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} \times 2 \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$$

2.2.5.6 Herstellung und Färbung von Zytozentrifugationspräparaten

Zytozentrifugationspräparate wurden hergestellt, um 32D.C10-Zellen zu färben und anschließend mikroskopisch auf ihren Differenzierungsstatus hin zu untersuchen. Dazu wurden Objektträger mit aufgesetzter Zytokammer in eine Objektträgerhalterung gesetzt. Anschließend wurden 200 μl der Zellsuspension in die Kammer pipettiert und für 3 min bei 1500 rpm sedimentiert. Danach wurde zwischen Objektträger und Zytokammer eine Filterkarte eingesetzt und 1 min bei 3000 rpm trocken zentrifugiert. Zum Schluß wurden die Zellen mit Methanol auf dem Objektträger fixiert.

2.2.5.6.1 Färbung der Zytozentrifugationspräparate mit May-Grünwald

Die May-Grünwald-Färbung ist eine spezielle Färbung für hämatopoetische Zellen. Dabei wurden die auf dem Objektträger fixierten 32D.C10-Zellen für 3 min in May-Grünwald-Lösung inkubiert und anschließend unter fließendem Leitungswasser von überschüssiger Färbelösung befreit. Auf die May-Grünwald-Färbung folgte die Giemsa-Färbung

2.2.5.6.2 Färbung der Zytozentrifugationspräparate mit Giemsa

Mit der Giemsa-Färbung kann die Morphologie von Zellen dargestellt werden. Dazu wurde das May-Grünwald gefärbte Zytozentrifugationspräparat für 20 min in verdünnter Giemsalösung (1:20 mit Aqua bidest) gefärbt, kurz mit deionisiertem Wasser abgespült und anschließend an der Luft getrocknet. Das gefärbte Präparat konnte nun mikroskopisch untersucht werden.

2.2.5.7 Immunfärbung der 32D.C10-Zellen

Die 32D.C10-Zellen wurden mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper versehen und mittels FACS analysiert. Mit diesem Verfahren wurde geprüft welche Oberflächenproteine zum jeweiligen Zeitpunkt der Stimulation bevorzugt exprimiert wurden. Man erhält somit Auskunft über den vorliegenden Differenzierungsstatus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gr-1-, CD11c- und CD14-Fluoreszeinkonjugierte Antikörper verwendet. Alle der folgenden Schritte wurden auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, gezählt und auf 6×10^7 Zellen/ml PBS eingestellt. Danach wurden jeweils 50 μ l dieser Zellsuspension in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 1,5 μ g des jeweiligen Antikörpers in einem Volumen von 50 μ l versetzt. Zur Messung der Eigenfluoreszenz der Zellen bleibt ein Ansatz ohne Antikörper, ihm wurden statt dessen 50 μ l reines PBS zugegeben. Die Reaktionsansätze wurden durch vorsichtiges Schnippen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen und sofort mittels FACS analysiert.

2.2.5.8 Metabolische Markierung von Zellen mit Tran-³⁵S-Label

Für die metabolische Markierung wurden die entsprechenden Zellen bis zu einer Dichte von 1×10^7 Zellen pro Kulturschale kultiviert. Danach wurden sie in 1 ml Markiermedium-Methionin/Cystein überführt. Die Zellen wurden 2 h in diesem Medium unter den üblichen Bedingungen inkubiert. Im Anschluß daran wurden sie für 5 min bei 1 000 rpm abzentri-

fugiert und in 1 ml Markiermedium-Methionin/Cystein resuspendiert. Zur 6-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden 100 µCi Tran-³⁵S-Label zugegeben. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Puffer AM lysiert. Das Ganzzelllysate wurde bei einem GST-pull-down-Experiment (s. 2.2.4.2) eingesetzt. Zum Schluß konnte die physische Interaktion des Fusionsproteins mit den radioaktiv markierten Proteinen im Auftreten von spezifischen Banden auf dem Radiogramm gezeigt werden.

2.2.5.9 Herstellung von Zellysaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gesamtzellextrakte von 32D.C10-Zellen hergestellt. Dazu wurden 1×10^7 Zellen für 10 min bei 1 000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und mit 10 ml kaltem PBS gewaschen. Sofern das Zellysate nicht sofort hergestellt wurde, wurde das Zellsediment sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70 °C gelagert. Zur Herstellung des Gesamtzellextraktes wurde das Zellpellet in 1 ml Puffer AM resuspendiert und eine Stunde bei gelegentlichem Schütteln auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysate 5 min bei 14 000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Die isolierten Proteine konnten nun in weiteren Versuchen, z.B. GST-pull-down-Experimenten (s. 2.2.4.2), eingesetzt werden.

2.2.6 Arbeiten mit Hefen

2.2.6.1 Screening einer pVP16-cDNA-Bank

Um die Rolle eines Proteins in der Signaltransduktion der Zelle besser zu verstehen, ist es wichtig seine Wechselwirkungspartner zu kennen. Die Identifikation solcher kann mit verschiedenen Verfahren erfolgen, z.B. durch Screening einer Expressionsbibliothek, mittels GST-pull-down-Experimenten, etc. Eine weitere Möglichkeit bietet das Hefe-Zwei-Hybrid-System. Es handelt sich um eine in-vivo Methode mit der, unter Zuhilfenahme mehrerer Selektionsmarker, Protein-Protein-Interaktionen in Hefe ausfindig gemacht werden können (Fields & Song 1989). Molekulare Grundlage des Systems ist der Aufbau eukaryontischer Transkriptionsfaktoren. Diese bestehen aus zwei komplementären Domänen, einer DNA-bindenden- und einer Aktivierungsdomäne. Beide werden zum Auslösen der Transkription benötigt. Beim Hefe-Zwei-Hybrid-System werden die einzelnen Domänen getrennt an Proteine gebunden. Es entstehen zwei Arten von Fusionsproteinen. Keines der beiden verfügt über Transkriptionsfaktoraktivität. Kommt es in der Hefe zu einer Interaktion des zu untersuchenden Proteins mit seinem Wechselwirkungspartner, wird die ursprüngliche Transkriptionsfaktorfunktion wiederhergestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hybridkonstrukte aus verschiedenen Domänen des G-CSFR und der DNA-Bindungsdomäne LexA hergestellt und zusammen mit einem zweiten Vektor, der die VP16-Transaktivierungsdomäne, ein Kernlokalisierungssignal und beliebige codierende Sequenzen einer cDNA-Bibliothek enthält, in einen geeigneten Hefestamm transfiziert. Dazu wurde der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm L40, der über his3- und lacZ-Reporter verfügt, verwendet.

2.2.6.1.1 Hefetransformation der LexA-Konstrukte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-Screening mit vier Konstrukten gleichzeitig durchgeführt und jedes einzeln in L40 transformiert. Dazu wurde ein frischer Vereinzelausstrich des Hefestammes L40 auf einer YPD-Platte durchgeführt und über Nacht bei 30 °C im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Morgen wurde eine Hefeinzelnkolonie in 10 ml YPD überführt und 12-16 h unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkultur in 50 ml YPD auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und für weitere 2-4 h geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 2 500 rpm sedimentiert und in 40 ml Puffer TE gewaschen. Nach einer Zentrifugation 10 min bei 2 500

rpm wurde das Pellet in 2 ml LiAc/TE-Puffer resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Inzwischen wurden in 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäßen 1 µg Plasmid-DNA der jeweiligen LexA-Konstrukte und 100 µg denaturierte, fragmentierte Heringsperma-DNA vorgelegt. Nach Zugabe von 50 µl der Hefesuspension und 500 µl LiAc/TE/PEG-Lösung wurde der Transformationsansatz gemischt und für mindestens 30 min bei 30 °C inkubiert. Im Anschluß daran folgte ein zehnminütiger Hitzeschock bei 42 °C. Zur Verbesserung der Transformationseffizienz wurden 55 µl DMSO zugegeben. Vor dem Ausplattieren auf (-T)-Agar wurden die Zellen für 2 min bei 2 500 rpm abzentrifugiert und dreimal mit 1 ml Puffer TE gewaschen.

2.2.6.1.2 Überprüfung der Expression der LexA-Fusionsproteine mittels Westen Blot

Die jeweiligen Hefe-Einzelkolonien wurden 2 ml (-T)-Medium überführt und für 12-16 h bei 30 °C geschüttelt, anschließend in 25 ml (-T)-Medium verdünnt und für weitere 7 h bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 kultiviert. Danach wurde die Hefesuspension in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 2 500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen, in 40 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert, mit 10 µl Oxalyticase-Stammlösung versetzt und mindestens 30 min bei 30 °C im Thermoblock leicht geschüttelt. Schließlich wurde der Ansatz mit 15 µl 4 x Probenauftrags-Puffer versetzt und 15 min bei 100 °C im Wasserkocher denaturiert. Für die Gelelektrophorese wurden 20 µl des Hefelysates auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und unter Standardbedingungen getrennt (s. 2.2.4.3). Der Western Blot (s. 2.2.4.4) und der Protein-Nachweis (s. 2.2.4.4.2) erfolgten ebenfalls nach den bereits beschriebenen Vorgehensweisen. Anstelle des TBST/3 % (w/v) BSA-Puffers wurde jedoch TBST-Puffer mit 5 % (w/v) Trockenmilchpulver verwendet.

2.2.6.1.3 Hefetransformation der pVP16-cDNA-Bibliothek

Zur Durchführung des Screenings wurde eine embryonale pVP16-cDNA-Bibliothek 9,5-10,5 Tage alter Mäuse verwendet. Die über Not I in den VP16-Expressionsvektor klonierten Fragmente haben eine durchschnittliche Größe von 350 bis 700 bp.

Für das Screening der pVP16-cDNA-Bibliothek wurden die jeweiligen Hefe-Einzelkolonien in 5 ml (-T)-Medium überimpft und für 10 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Zum Anlegen einer Übernachtskultur wurden diese in 250 ml (-T)-Medium verdünnt und am nächsten Morgen auf eine OD₆₀₀ von 0,4 eingestellt. Alle Hefesuspensionen ergaben ein Gesamtvolumen von 1 l. Die einzelnen Kulturen wurden für weitere 3 h bis zu einer

OD₆₀₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Sobald alle Hefesuspensionen diese Dichte erreicht hatten, wurden sie zusammengegeben und für 10 min bei 2 500 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit Aqua bidest gewaschen, anschließend in 20 ml LiAc/TE-Puffer resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 381 µg Plasmid-DNA der pVP16-cDNA-Bibliothek, 20 mg denaturierte, fragmentierte Heringssperma-DNA und 140 ml LiAc/TE/PEG-Lösung zur Hefesuspension gegeben, gemischt und mindestens 30 min bei 30 °C inkubiert. Vor dem 15-minütigen Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurde der Transformationsansatz mit 17,6 ml DMSO versetzt. Danach wurden die Zellen im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt, für 5 min bei 2 500 rpm sedimentiert und zweimal mit Aqua bidest gewaschen. Das Hefepellet wurde zunächst in einem Liter YPD aufgenommen und eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Schließlich wurden die Hefezellen zweimal mit Aqua bidest gewaschen, in 1 l (-TL)-Medium resuspendiert und über Nacht bei 30 °C geschüttelt.

Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurde 1/10⁶ des Transformationsansatzes auf (-TL)-Platten ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Hefezellen der Flüssigkultur für 10 min bei 2 500 rpm sedimentiert, zweimal mit Aqua bidest gewaschen, in 10 ml Aqua bidest resuspendiert und auf 20 140-mm-(-THULL)-Aminotriazol-Platten ausplattiert. Auf den einzelnen Platten wurden verschiedene Volumina aufgebracht. Es wurden 5 mit 50 µl, 5 mit 250 µl, 5 mit 500 µl, 2 mit 1 000 µl, 2 mit 1 500 µl und 1 Platte mit der restlichen Hefesuspension beimpft.

Zum Picken der Transformanten wurden (-THULL)-Aminotriazol-Platten in kleine Quadrate eingeteilt und durchnummeriert. Nach drei Tagen konnten die ersten Kolonien gepickt und auf den vorbereiteten Platten in aufsteigender Zahlenfolge ausgestrichen werden. Die Position der Transformanten wurde auf der ursprünglichen Platte markiert. Damit wurde vermieden, daß dieselben Kolonien mehrmals überimpft wurden. Sowohl die Platten auf denen die Transformationsansätze ausplattiert wurden, als auch diejenigen mit den gepickten Klonen wurden bei 30 °C inkubiert. An den folgenden zwei Tagen wurden ebenfalls Kolonien auf die beschriebene Art und Weise ausgeimpft und zusätzlich von den gewachsenen Transformanten Glycerinstocks und Flüssigkulturen zur Isolation der Plasmid-DNA angelegt.

2.2.6.2 Aufbewahrung von Hefe-Kulturen

Hefen können auf einer mit Parafilm verschlossenen Agarplatte bis zu vier Wochen gelagert werden. Zur längeren Aufbewahrung wurden Glycerinstocks angelegt. Dazu wurde 1 ml einer frischen Hefekultur mit 1 ml Glycerin versetzt, gut durch Invertieren gemischt und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren. Zur Wiederinkulturnahme der Hefen wurde ein erbsengroßes Stück der gefrorenen Masse entnommen, direkt auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert, oder in geeignetes Flüssigmedium überimpft. Der Glycerinstock wurde sofort wieder bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.6.3 Isolierung der Hefepiasmid-DNA

Um den Interaktionspartner des zu untersuchenden Proteins zu identifizieren, mußte die Plasmid-DNA aus den Hefezellen isoliert werden. Man erhält ein Gemisch aus zwei verschiedenen, für die beiden Fusionsproteine codierenden Plasmiden. Zur Isolation dieses Plasmid-DNA-Gemisches wurde eine Hefeinzelnkolonie in 2 ml (-TL)-Medium überführt und für 12-16 h bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Hefesuspension wurde in ein 2-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 2 500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 μl Lysispuffer resuspendiert, mit 150 μl Glassperlen (\varnothing 0,45 mm), 150 μl Phenol und 150 μl Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde 1 min lang heftig auf dem Vibromischer gemixt. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation wurde die wäßrige Phase in ein neues 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt und mit Ethanol gefällt. Das getrocknete Plasmid-DNA-Gemisch wurde schließlich in 25 μl Puffer TE gelöst und bis zur weiteren Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.6.4 Selektion von pVP16 aus dem Plasmid-DNA-Gemisch

Zur Selektion von pVP16 aus dem Plasmid-DNA-Gemisch wurde dieses in einen Leucin prototrophen *E.-coli*-Stamm HB 101 transformiert. Auf geeigneten Selektionsplatten können nur Bakterien mit pVP16 wachsen. Dazu wurden kompetente Leucin prototrophe HB 101 Zellen auf Eis aufgetaut (s. 2.2.3.2). 40 μl der Zellsuspension wurden mit 2 μl des Hefe-Plasmid-DNA-Gemisches versetzt, gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm) überführt. Die Transformation erfolgte unter folgenden Bedingungen: 1,8 kV, 200 Ω und 25 μF . Danach wurde der Ansatz mit 1 ml kaltem SOC-Medium versetzt, in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt und 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf M9(-L)-Platten ausgestrichen. Von

den gewachsenen Transformanten wurden Glycerolstocks (s. 2.2.3.4) und 2YT/amp-Flüssigkulturen zur Isolation der Plasmid-DNA angelegt.

2.2.6.5 Überprüfung der möglichen Interaktionspartner in YRN 974

Mit dem Hefestamm YRN 974, der ein *GFP*-Reportergen ins Genom integriert hat, kann eine Protein-Protein-Interaktion in der lebenden Hefezelle mittels FACS direkt gemessen werden. Dazu wurden die Plasmide (pVP16 und pBTM116) der möglichen Interaktionspartner in YRN 974 transformiert (s. 2.2.6.1.1) und auf (-TL)-Platten ausgestrichen. Als Negativkontrolle wurde der leere pBTM-116-Vektor zusammen mit dem vermuteten, in pVP16 klonierten, Interaktionspartner in YRN 974 eingebracht. Um verlässlichere Aussagen machen zu können, wurden pro Transformationsansatz 4 Kolonien gepickt und in 2 ml (-TL)-Flüssigmedium 12-16 h bei 30 °C geschüttelt. Danach wurden 200 µl der jeweiligen Übernachtskulturen in 2 ml (-TL)-Medium überführt und unter Schütteln für weitere 4 h bei 30 °C kultiviert. Zur Messung der relativen Grünfluoreszenz wurden 100 µl der Hefesuspensionen in 1 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 verdünnt und in ein FACS-Röhrchen überführt. Bei der Messung wurde die Signalverstärkung so gewählt, daß die Eigenfluoreszenz der Hefe etwa 10 relative Fluoreszenzeinheiten ausmacht. Pro Messung wurden 10 000 Hefezellen analysiert. Eine mögliche, mit weiteren Methoden zu bestätigende, Interaktion zeigt sich im Verhältnis der relativen Grünfluoreszenz der mit den beiden Bindungspartnern transformierten Hefezellen zur Negativkontrolle.

Mittels dieses Hefestammes konnten die zu untersuchenden Proteine auf ihre Fähigkeit, auch ohne Wechselwirkungspartner, eine Transkription der Reportergene auszulösen, untersucht werden. Diese mußte vor dem Screening einer pVP16-cDNA-Bank gemacht werden, da nur Proteine eingesetzt werden können, die keine Fähigkeit zur Selbstaktivierung zeigen.

3 Ergebnisse

3.1 Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening

Um Wechselwirkungspartner des G-CSFR ausfindig zu machen, wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening durchgeführt. Mit dieser Methode können Proteine identifiziert werden, die an den nicht aktivierten, d.h. an den nicht phosphorylierten G-CSFR binden. In-vivo wird der Rezeptor nach Bindung seines Liganden G-CSF phosphoryliert und schafft somit neue Bindungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screenings Proteine des G-CSFR gesucht, die mit dem inaktiven G-CSFR assoziieren.

3.1.1 Erstellung der LexA Konstrukte

Für das Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening wurden vier Konstrukte (LexA-P1, LexA-704, LexA-729, LexA-Ende) erstellt. Sie umfassen verschiedene Bereiche der zytoplasmatischen Domäne des humanen G-CSFR und wurden nach diesen benannt. So schließt LexA-P1 die Aminosäuren 631 bis 691 ein und entspricht damit der Proliferationsdomäne des G-CSFR. LexA-704 kommt der zytoplasmatischen Domäne des G-CSFR von Aminosäurerest 694 bis Aminosäurerest 813 gleich. Dieses Konstrukt verfügt über alle vier Tyrosinreste (Y^{704} , Y^{729} , Y^{744} , Y^{764}) des Rezeptors. Entsprechend ist die Benennung von LexA-729 mit seinen drei Tyrosinresten (Y^{729} , Y^{744} , Y^{764}). Es stimmt in den Aminosäuren 728 bis 813 mit dem G-CSFR überein. LexA-Ende umfaßt die zytoplasmatische Domäne des G-CSFR in ihrer vollen Länge mit den Aminosäureresten 631 bis 813. Die Generierung und Klonierung der Konstrukte wurde bereits im Material- und Methodenteil (s. 2.1.11, Abb. 2-7) beschrieben. Die Beibehaltung des Leserasters der Translationsfusion wurde durch Sequenzierung der jeweiligen Plasmide überprüft.

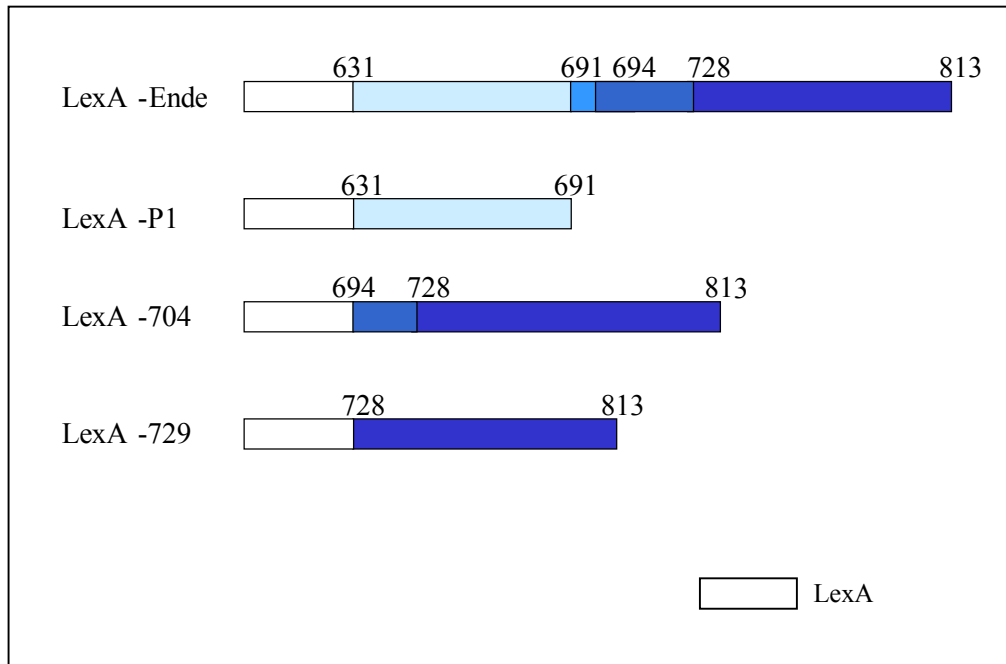


Abb. 3-1. Schematische Darstellung der generierten LexA-Konstrukte.

3.1.2 Überprüfung der generierten LexA-Konstrukte

3.1.2.1 Überprüfung auf ihre Fähigkeit zur Selbstaktivierung

Um auszuschließen, daß die vier Konstrukte eine intrinsische Fähigkeit zur Selbstaktivierung haben, wurden diese zusammen mit pVP16 in einen eigens dafür konstruierten Hefestamm (YRN 974, Dr. R. Niedenthal, Medizinische Hochschule Hannover) transformiert. Dieser hat *GFP* als Reportergen, so daß die Hefen im Falle einer Selbstaktivierung unter dem Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszieren würden.

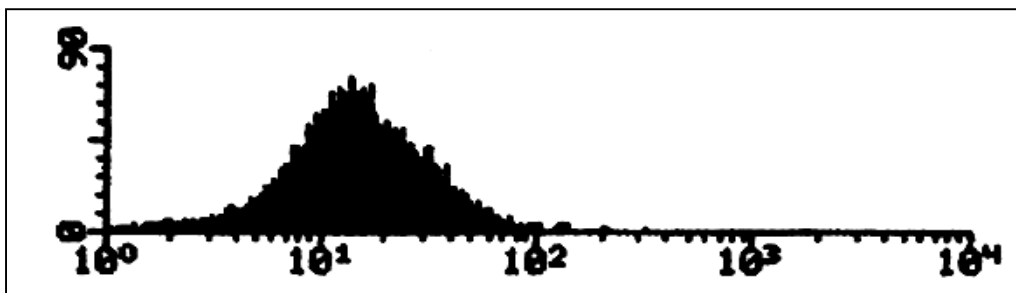


Abb. 3-2. Überprüfung der Konstrukte auf Selbstaktivierung (Durchflußzytometer-Diagramm von Hefestamm YRN974, der mit LexA-P1 und pVP16 kotransformiert wurde als Beispiel für alle anderen Messungen dieser Versuchsreihe). Bei den Diagrammen des Durchflußzytometers ist die Fluoreszenzaktivität logarithmisch auf der x-Achse gegen die Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse aufgetragen.

Auf den Diagrammen können ein oder zwei Peaks zu erkennen sein. Der erste entspricht der Grundfluoreszenz der Zellen. Diese wurde vorher am FACSScanner auf 10 relative Fluoreszenzeinheiten eingestellt. Im Falle einer Selbstaktivierung würden zwei Peaks abgebildet sein, wobei der zweite die Grünfluoreszenz der, durch die Transformation des LexA-Konstruktes hervorgerufenen, *GFP* Reportergenaktivierung widerspiegeln würde. Auf allen Diagrammen des Durchflußzytometers dieser Versuchsreihe war nur ein Peak zu erkennen.

Zusätzlich wurden die jeweiligen LexA-Konstrukte zusammen mit dem leeren pVP16 in den Hefestamm L40 transformiert und auf (-THULL)-Platten ausgestrichen. Dabei konnte keine His-Prototrophie beobachtet werden. Eine Reportergenaktivierung, ohne eine im Zytoplasma stattfindende Interaktion der LexA-G-CSFR-Fusionsproteine mit ihren Bindungspartnern konnte anhand dieser Daten ausgeschlossen werden.

3.1.2.2 Überprüfung auf ihre Expression mittels Western Blot und anschließendem Nachweis der Proteine mit Anti-LexA Antikörper

Vor dem Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening mußte überprüft werden, ob die generierten Fusionsproteine in dem zu verwendenden Hefestamm L40 exprimiert werden. Dazu wurden die Konstrukte in L40 transformiert und auf (-L)-Platten ausplattiert. Sowohl der Western Blot, als auch der Nachweis der Fusionsproteine mittels Anti-LexA Antikörper wurden, wie bereits im Material- und Methodenteil beschrieben (s. 2.2.6.1.2), durchgeführt.

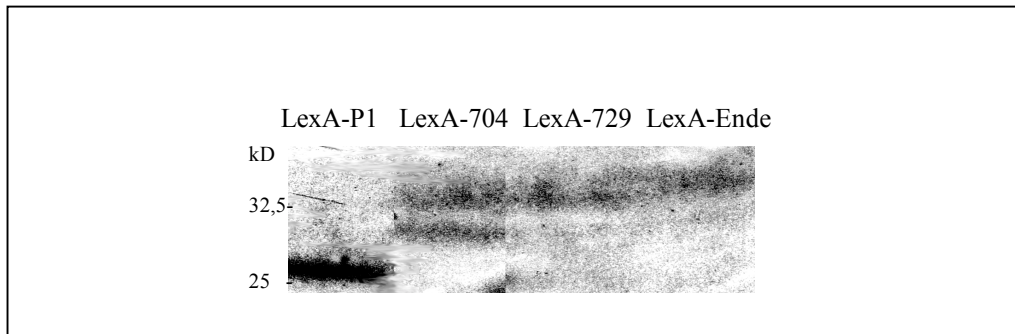


Abb. 3-3. Expression der LexA-Fusionsproteine in Hefe. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm eines Western Blot. Der Proteinnachweis erfolgte mit einem Anti-LexA-Antikörper. Auf das 11 %-ige SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die jeweiligen Hefelysate (LexA-P1, LexA-704, LexA-729, LexA-Ende) aufgetragen.

Es konnte gezeigt werden, daß alle vier Konstrukte in Hefe exprimiert werden. LexA-P1 ließ sich im Vergleich zu den anderen Fusionsproteinen mit dem verwendeten Anti-LexA-Antikörper besonders gut darstellen. Es zeigte wie erwartet eine Proteinbande bei ca. 28 kD. Das Fusionsprotein LexA-704 zeigte neben der erwarteten Hauptbande bei etwa 28 kD zusätzlich eine Nebenbande bei ca. 30 kD, bei dieser handelt es sich vermutlich um ein Degradationsprodukt. Die beiden anderen Fusionsproteine entsprachen in ihrem Laufverhalten den Erwartungen: LexA-729 zeigte eine Proteinbande bei ca. 32 kD und LexA-Ende eine bei etwa 42 kD.

3.1.3 Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening

Zur Durchführung des Screenings wurden die vier Konstrukte (LexA-P1, LexA-704, LexA-729 und LexA-Ende) zusammen mit einer embryonalen pVP16-cDNA-Bibliothek 9,5-10,5 Tage alter Mäuse in den Hefestamm L40, wie im Material- und Methodenteil beschrieben (s. 2.2.6.1.3), kotransformiert. Dabei wurden 381 µg der Maus-Embryo-Genbank eingesetzt und 5×10^6 Transformanten über Histidin-Selektion auf eine mögliche Interaktion zwischen den verschiedenen Bereichen des G-CSFR mit Proteinabschnitten die von der Genbank codiert werden, getestet. An drei aufeinanderfolgenden Tagen konnten insgesamt 616 Klone isoliert und von allen Glycerolstocks angelegt werden (s. 2.2.6.2).

3.1.3.1 Analyse der Transformanten

Von den 400 am schnellsten gewachsenen Transformanten wurden zusätzlich die Hefe-Plasmid-DNAs isoliert und zur Selektion von pVP16 aus dem Plasmid-DNA-Gemisch in einen Leucin prototrophen *E.-coli*-Stamm HB 101 transformiert (s. 2.2.6.3 und 2.2.6.4). Um einen Überblick über die isolierten potentiellen Wechselwirkungspartner zu gewinnen, wurden die Plasmid-DNAs von 26 (218) Transformanten des ersten, von 5 (120) des zweiten, sowie von 1 (278) des dritten Tages mit einem VP16 upstream Primer sequenziert (s. 2.1.11, Abb. 2-3). Nach einer Datenbanksuche zeigte sich, daß unter den analysierten Klonen des ersten Tages nur 5 Transformanten eine zu diesem Zeitpunkt bekannte cDNA-Sequenz oder größere Homologien zu anderen Genen aufwiesen. Die möglichen Wechselwirkungspartner des zweiten und dritten Tages waren bereits bekannt: z.B. GAPDH und Cyclin F

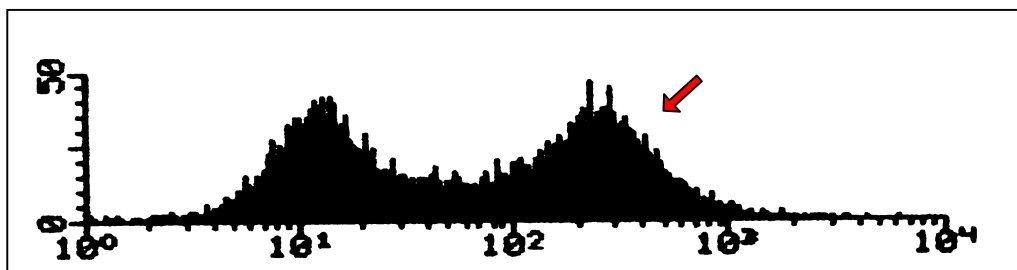


Abb. 3-4. Überprüfung der möglichen Wechselwirkungspartner auf Interaktion mit den LexA-Fusionsproteinen. Auf der Abbildung ist ein Durchflußzytometer-Diagramm als Beispiel für eine durch Protein-Protein-Wechselwirkung (LexA-704/VP16-79) hervorgerufene *GFP* Reporterogenaktivierung dargestellt und mit einem Pfeil markiert. Bei den Diagrammen des Durchflußzytometers ist die Fluoreszenzaktivität logarithmisch auf der x-Achse gegen die Anzahl Ereignisse auf der y-Achse aufgetragen.

Auf den Diagrammen können ein oder zwei Peaks zu erkennen sein. Der erste entspricht der Grundfluoreszenz der Zellen. Diese wurde vorher am FACScanner auf 10 relative Fluoreszenzeinheiten eingestellt. Im Falle einer Interaktion sind zwei Peaks abgebildet, wobei der zweite die Grünfluoreszenz der durch Protein-Protein-Wechselwirkung hervorgerufenen *GFP* Reporterogenaktivierung widerspiegelt und in seiner Größe von der Stärke der Interaktion abhängt. Der erste Peak entsteht im Falle einer Wechselwirkung durch den

Verlust eines seiner Plasmide. Diese Hefezellen können unter der bestehenden Selektion ohne zu wachsen einige Stunden überleben.

Zunächst wurde die Interaktion von zwei der bereits bekannten Proteindomänen des ersten, sowie der sequenzierten Klone der beiden folgenden Tage mit den LexA-Fusionsproteinen durch ein zweites Hefe-Zwei-Hybrid-System im Hefestamm YRN 974 überprüft. Bei der Messung im FACScanner konnte keine der primären Protein-Protein-Wechselwirkungen bestätigt werden. Auf eine Untersuchung der restlichen Transformanten des ersten Tages mit bekannter cDNA-Sequenz konnte verzichtet werden, da mit einer realen, direkten in-vivo Interaktion zwischen den Proteindomänen des G-CSFR, einem Membranprotein und den identifizierten Proteinen, die alle im Kern lokalisiert sind, schon aufgrund der Positionierung beider Moleküle nicht zu rechnen war. Es schien sinnvoll sich auf die schnell wachsenden Klone zu konzentrieren, da rasches Hefewachstum in der Regel mit einer starken Interaktion korreliert. Daher wurden zusätzlich noch 16 weitere Klone des ersten Tages auf ihre Interaktion mit dem G-CSFR in YRN 974 geprüft. Dabei konnte ein Transformant identifiziert werden, der eine spezifische Wechselwirkung zeigte. Dieser, Klon 112, wurde im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert.

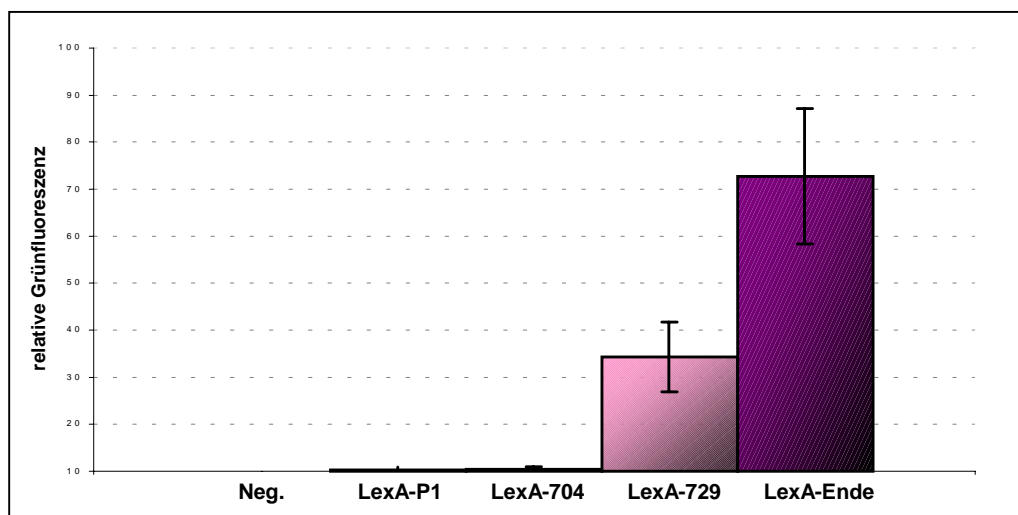


Abb. 3-5. Grafische Darstellung der gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten. VP16-112 wurde mit sowohl pBTM116 (Neg), als auch mit allen vier LexA-Konstrukten des G-CSFR in YRN 974 kotransformiert. Von jedem Transformationsansatz wurden vier Klone gemessen und der Mittelwert aus den mittleren Fluoreszenzwerten gebildet. In dem Balkendiagramm wurden die relativen Fluoreszenzeinheiten auf der y-Achse gegen die verschiedenen Konstrukte auf der x-Achse aufgetragen.

Die Transformation des Leervektors pBTM116 diente als Negativkontrolle. Mit ihr wurde geprüft, ob der zu untersuchende Transformant auch ohne Wechselwirkung mit den verschiedenen Fusionsproteinen des G-CSFR eine Interaktion auslösen kann. Im Rahmen der durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente auf *GFP*-Reportergerbasis konnten zwei Proteine identifiziert werden, die das Reporterger ohne Beihilfe eines LexA-Fusionsproteins aktivierten. Bei diesen Selbstaktivierern handelte es sich um Pax3 und um ein zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntes Protein. Indem die relativen Fluoreszenzeinheiten in Bezug zur Negativkontrolle gesetzt werden, können Aussagen über die Stärke einer gemessenen Interaktion gemacht werden. Die Messungen ergaben, daß VP16-112 nur zusammen mit einem Interaktionspartner eine Aktivierung des Reporterger hervorrufen kann. Auch konnten keine Wechselwirkungen zwischen VP16-112 und LexA-P1 bzw. LexA-704 festgestellt werden, da die gemessenen mittleren relativen Fluoreszenzeinheiten etwa denen der Negativkontrolle entsprachen. Deutlich höher lagen die Meßwerte von LexA-729/VP16-112 und LexA-Ende/VP16-112. Die mit VP16-112 und LexA-729 kotransformierten Hefezellen zeigten eine 3,6-fach und die VP16-112 und LexA-Ende exprimierenden Transformanten eine 7,7-fach größere Grünfluoreszenz als die mitgeführte Negativkontrolle. Folglich konnte von einer spezifischen Interaktion von VP16-112 mit LexA-729 bzw. LexA-Ende ausgegangen werden.

3.1.4 Sequenzierung von VP16-112

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA von VP16-112 ergab (s. 2.1.11, Abb. 2.3), daß es sich dabei um einen DNA-Abschnitt mit repetitiven DNA-Sequenzen handelt. Dies zeigt sich besonders deutlich in der Proteinsequenz: 112 besteht aus 11 unvollständigen Repeats von 9 Aminosäuren. Die DNA-Sequenz hat einen offenen Leserahmen bis Basenpaar 354.

CTCAGGGGTCTCTGGCTCCACCTGGC TTTTGGGGTCTCTGGCCCC ACCTGGCTTTTGG GAGTCCCAGGAGACCGAGGTGGACCGAAAA CCCCAGGAGACCGGGGTGGACCGAAAAACC	60
L R G P L A P P G F W G P L A P P G F W	
GGTCC TCTGGCCCC ACCTGGCCTTTT GGGTCTCTGGCCCC ACCTGGCCTTTTGGGTCTT CCAGGAGACCGGGGT GGACCGGAAAACCC AGGAGACCGGGGT GGACCGGAAAACCCAGAA	120
G P L A P P G L L G P L A P P G L L G L	
CTGGCCCC ACCTGGCCTTTTGGGTCTCTGGCTCCACCTGGCCTTTTGGGTCTCTGGC C GACCGGGTGGACCGGAAA ACCCAGGAGACCGAGGT GGACCGGAAAACCCAGGAGACCGG	180
L A P P G L L G P L A P P G L L G P L A	
CCACC TGGC TTTTGGGGTCTCTGGCCCC ACCTGGCTTTTGGGGTCTCTGGCCCCACC T GGTGGACC GAAAACCC AGGAGACCGGGGT GGACCGAAAA CCCCAGGAGACCGGGGTGGA	240
P P G F W G P L A P P G F W G P L A P P	
GGCTTTT GGGGTCTCTGGCCCC ACCTGGCTTTTGGGGTCTCTGGCCCCAC CTGGCTTT CCGAAAAACCCAGGAGACCGGGGTGGACCGAAAACCCAGAAGACCGGGG TGGACCG AAA	300
G F W G P L A P P G F W G L L A P P G F	
TGGGGTCTCTGGCCCATCCCAT CCTTTTGGGACTCAGGACACTCTGAAGGGGTAG GAG ACCC AGGAGACCGGGTAAGGGTAGGAAAACCC TGAGTCTGTGAGACTTCCCAT CCTC	360
W G P L A H S H P F G T Q D T L K G . E	
ACAGGGCACTGGCCTGCACTTGAGTGTTACTGGCTACTCCATCACCTTCAGCTCCTTCCT TGT CCGTGACCGGACGTGAAC TACAATGACCGATGAGGTAGTGAAGTCG AGGAAGGA	420
T G H W P A L E C Y W L L H H L Q L L P	
CCACCTTCCTCCGTTTTCTTACCTCAT TAGCCACCC TAGCCAC AAGACAGGGCT GTT CAG GGTGG AAGGAGGCAAAAGAATGGAGTAA TCGGTGGGATCGGT GTTCTGTCCCGACAAGTC	480
P P S S V F L P H . P P . P Q D R A V Q	
CCTCCCTGGGCTCCTGGCTGGTAGGGCTGAGGGCACAC 518 GGAGGGACCC GAGGACC GACCATCCCGAC TCCCG TGTG	
P P W A P G W . G . G H T	

Abb. 3-6. Sequenz des Klons 112

3.1.5 Bestätigung der Interaktion *in-vitro*

Mit der GST-pull-down-Technik sollte die *in-vivo* gezeigte Interaktion zwischen der Proteindomäne 112 und der zytoplasmatischen Domäne des G-CSFR bestätigt werden. Hierfür wurde das GST-Fusionsprotein GST-112 generiert, in *E. coli* DH5 α exprimiert, über Gluthation-Affinitätschromatographie gereinigt und bei einem GST-pull-down-Experiment eingesetzt.

Zur Generierung des GST-Fusionsproteins wurde das DNA-Fragment 112 mit der Restriktionsendonuklease Not I aus pVP16 herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pGEX-5X-1 kloniert (s. 2.1.11, Abb. 2-2). Das aufgereinigte rekombinante Protein GST-112 wurde vor seiner Verwendung bei GST-pull-down-Experimenten mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Färbung des Gels mit Coomassie-Blau überprüft (s. 2.2.4.1- 2.2.4.3).

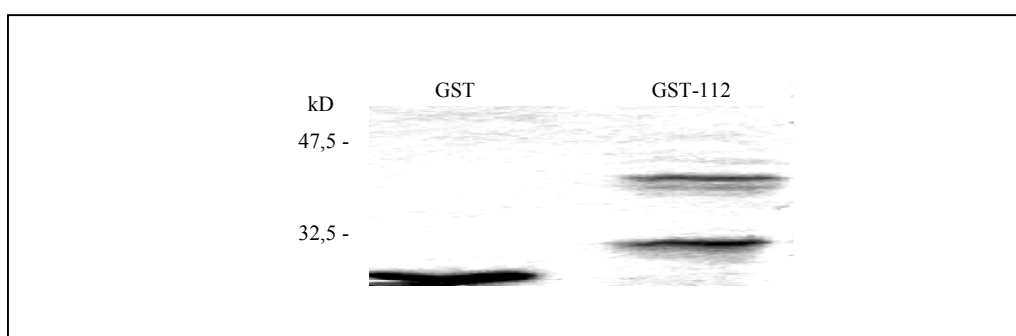


Abb. 3-7. Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel. Auf das 11 %-ige SDS-Polyacrylamid-Gel wurden GST und GST-112 aufgetragen. Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt.

Im Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel konnte GST-112 dargestellt werden. Es zeigte neben wenigen Abbauprodukten die erwartete Hauptbande bei ca. 43 kD und konnte somit in einem GST-pull-down-Experiment eingesetzt werden. Dabei wurde das Sediment einer 32D.C10-Zellkultur mit Puffer AM lysiert (s. 2.2.5.9) und das Proteinextrakt sowohl mit GST, als auch in einem anderen Ansatz mit GST-112 versetzt

(s. 2.2.4.2). Der Nachweis des mit 112 interagierendem G-CSFR erfolgte mit einem Anti-G-CSFR Antikörper (s. 2.2.4.3 und 2.2.4.4).

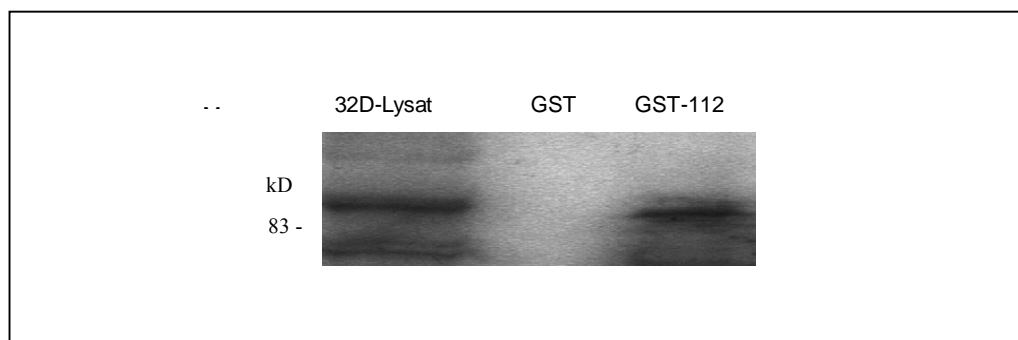


Abb. 3-8. Autoradiographie des Anti-G-CSFR entwickelten Western Blot. Auf ein 11 % -iges SDS-Polyacrylamid-Gel wurden Zellysat aus 32D.C10-Zellen und die jeweiligen GST-pull-down-Ansätze aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte mit einem Anti-G-CSFR-Antikörper (C20, Santa Cruz).

Im Rahmen dieses Versuches wurde Zellysat aus 32D.C10-Zellen als Positivkontrolle aufgetragen. Die dominante G-CSFR Bande hatte eine Größe von etwa 90 kD und war sowohl im Lysat, als auch im Ansatz GST-112 vertreten. In der mitgeführten Negativkontrolle, GST, konnte kein G-CSFR nachgewiesen werden. In diesem GST-pull-down-Experiment wurde gezeigt, daß der Proteinabschnitt 112 in-vitro mit dem G-CSFR interagiert.

Um auszuschließen, daß GST-112 unspezifisch im Zellysat enthaltene Proteine bindet, erfolgte der Proteinnachweis zusätzlich mit einem Anti-SHIP-Antikörper. Im Autoradiogramm konnte SHIP nur in der Positivkontrolle, dem Zellysat, nachgewiesen werden.

3.1.6 Expression von 112

3.1.6.1 Expression von 112 in murinem Gewebe

Da die Datenbanksuche keine Sequenzhomologien zu anderen Genen ergab und somit weder Aussagen über die Expression noch über die Funktion von 112 gemacht werden konnten, wurde überprüft, ob der gefundene Genabschnitt gewebsspezifisch exprimiert wird. Dazu wurde das DNA-Fragment 112 mit der Restriktionsendonuklease Not I aus dem Expressionsvektor pVP16 herausgeschnitten (s. 2.1.11, Abb. 2-3), mit ^{32}P markiert und zur Hybridisierung eines kommerziell erhältlichen Northern Blot der Firma Clontech verwendet. Es handelte sich um einen „Mouse Lane Multiple Tissue Northern (MTNTM) Blot“. Auf die Membran wurden die mRNAs (10 μg) verschiedener muriner Gewebe transferiert und durch UV-Strahlung fixiert. So wurde die murine mRNA des Herzens, des Gehirns, der Milz, der Lunge, der Leber, des Skelettmuskels, der Niere, sowie des Hodens mit dem radioaktiv markierten DNA-Fragment 112 hybridisiert.

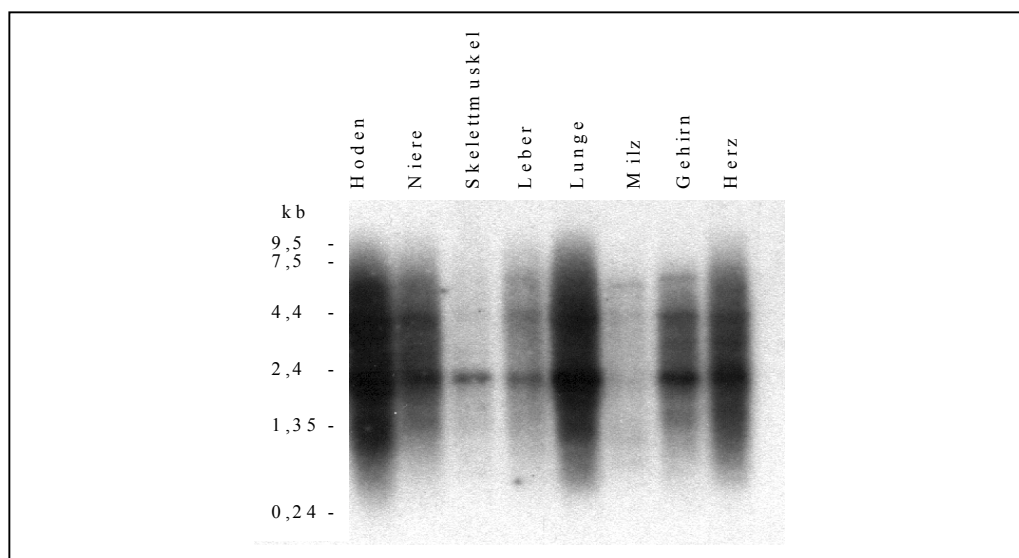


Abb. 3-9. Autoradiogramm des Mouse Lane Multiple Tissue Northern (MTN)TM Blot, hybridisiert mit ^{32}P -markiertem DNA-Fragment 112.

In allen Geweben waren Hybridisierungssignale zu erkennen. Mit Ausnahme der Milz dominierte ein Transkript mit einer Länge von 2,2 kb. Auf dem Autoradiogramm waren

bei der Milz nur drei sehr schwache Banden (bei 2,2, 4,4 und 5,7 kb), ohne deutliche Unterschiede in ihrer Intensität, zu erkennen. Ebenfalls in allen Geweben konnte ein Transkript von 4,4 kb Länge nachgewiesen werden. Unterschiede waren in der Expression der jeweiligen längsten mRNA zu erkennen, sie zeigte in Hoden, Niere, Leber, Lunge, sowie Gehirn eine Größe von 7,0 kb, im Skelettmuskel und der Milz eine Länge von 5,7 kb. Die Ergebnisse zeigten, daß 112 Teil eines Gens ist, das in allen getesteten murinen Geweben, in Form von drei Transkripten, nachgewiesen werden konnte.

3.1.6.2 Expression von 112 in humanem Gewebe

Außerdem wurde geprüft, ob die murine Sequenz 112 ein humanes Homolog besitzt. Dazu wurde das radioaktiv markierte DNA-Fragment 112 zur Hybridisierung des kommerziell erhältlichen „Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN)TM Blot“ der Firma Clontech verwendet. Auf die Membran wurden die mRNAs (1 µg) 12 verschiedener humaner Gewebe transferiert und durch UV-Strahlung fixiert.

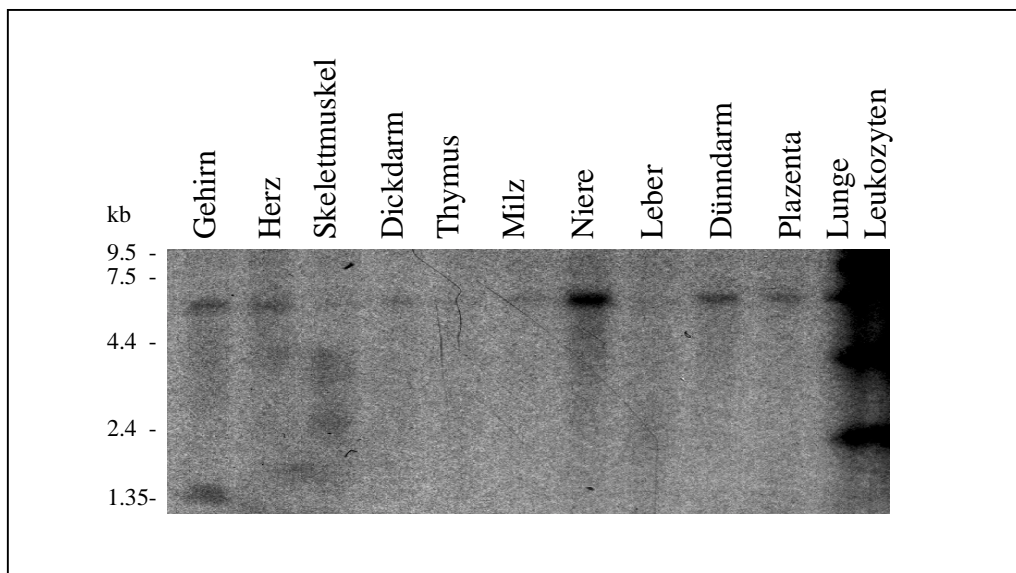


Abb. 3-10. Autoradiogramm des Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN)TM Blot, hybridisiert mit ³²P-markiertem DNA-Fragment 112.

Die murine DNA-Sequenz zeigte mit allen getesteten humanen Geweben Hybridisierungssignale. In Gehirn, Herz, Skelettmuskel, Dickdarm, Thymus, Milz, Niere, Leber, Dünndarm, Plazenta und Lunge war ein Transkript einer Länge von 6,0 kb zu verzeichnen. Im Gehirn konnte noch eine weitere mRNA mit einer Länge von 1,35 kb nachgewiesen werden. In den Leukozyten des peripheren Blutes waren auf dem Autoradiogramm vier Signale zu erkennen. Diese waren etwas breiter und deutlich stärker als alle anderen Banden. Sie ließen sich auch durch nachträgliches Waschen für 30 min mit 0,1 x SSC/0,1 % (w/v) SDS bei 60 °C nicht reduzieren. Zur Überprüfung der Membran wurde diese nach dem Abklingen der Radioaktivität zur Hybridisierung mit einer G-CSFR-Sonde verwendet. Dazu wurde die zytoplasmatische Domäne des G-CSFR mit den Restriktionsenzymen EcoR I, Sal I und Xba aus pGBT9 geschnitten, mit ³²P markiert und als Sonde eingesetzt. Dabei konnten keine übermäßig breiten Banden detektiert werden (s. Abb. 3-11).

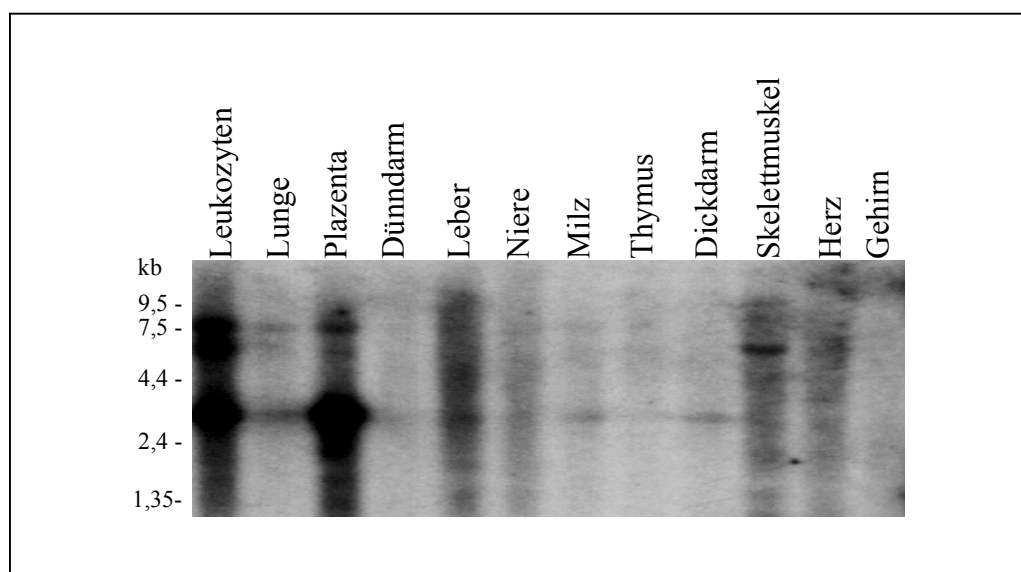


Abb. 3-11. Autoradiogramm des Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN)TM Blot, hybridisiert mit ³²P-markierter zytoplasmatischer Domäne des G-CSFR.

Der G-CSFR wurde besonders stark in Leukozyten des peripheren Blutes und in der Plazenta exprimiert. Das dominierende Transkript hatte dabei eine Größe von 3,7 kb. Außerdem konnten in beiden Geweben noch weitere Banden von 6,0 und 7,5 kb nach-

gewiesen werden. Die gleichen Banden wurden in der Lunge detektiert. In Leber, Niere, Milz, Thymus und Dün- und Dickdarm konnten ebenfalls Transkripte mit einer Länge von 3,7 kb nachgewiesen werden. Im Skelettmuskel wurde eine mRNA mit einer Größe von 6,0 kb identifiziert. In Herz und Gehirn konnte keine Expression des G-CSFR detektiert werden.

3.1.6.3 Stimulation der 32D.C10-Zellen

Die myeloide, murine, IL-3 abhängige 32D-Zelllinie kann mit G-CSF stimuliert werden. Dazu wurden die Zellen in G-CSF-haltiges Stimulationsmedium (10 ng G-CSF/ml Medium) überführt. Während der ersten drei Tage war eine verstärkte Proliferation der Zellen zu beobachten, danach wurden die Zellen kleiner. Ihre Differenzierung zu granulocytären Zellen wurde anhand der Expression ihrer Oberflächenmarker mittels Fluoreszenzfarbstoff markierter Anti-Gr-1-, Anti-CD-11c- und Anti-CD-14-Antikörper verfolgt. Die relative Grünfluoreszenz wurde im FACScanner gemessen und in einem Durchflußzytometer-Diagramm grafisch dargestellt.

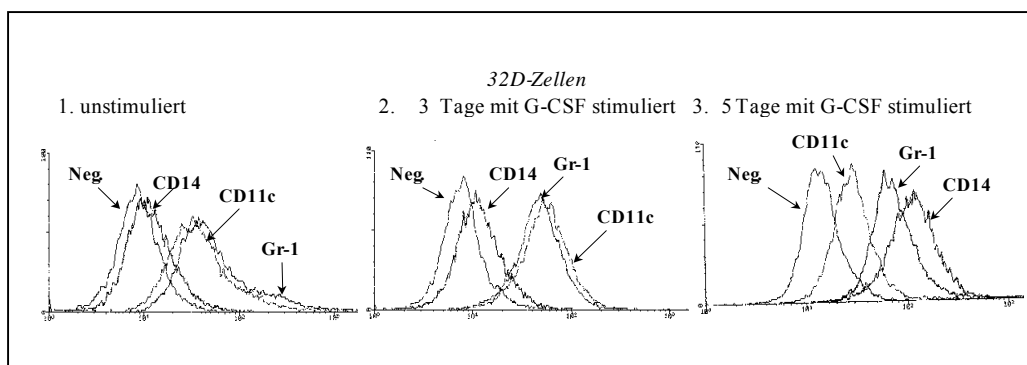


Abb. 3-12. Expression verschiedener Oberflächenmarker. 1. ohne Stimulation 2. nach dreitägiger Stimulation mit G-CSF 3. nach fünftägiger Stimulation mit G-CSF. Bei den Diagrammen des Durchflußzytometers ist die Fluoreszenzaktivität logarithmisch auf der x-Achse gegen die Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse aufgetragen.

Die Grundfluoreszenz der Zellen wurde vorher am FACScanner auf 10 relative Fluoreszenzeinheiten eingestellt. Die relativen Fluoreszenzen der jeweiligen Messungsreihe wurden in Bezug auf die Negativkontrolle (Neg.), d.h. die durchflußzytometrisch gemessenen Ereignisse ohne Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörper, ausgewertet.

Bei den unstimulierten Zellen konnte eine schwache Expression der CD11c- und der Gr-1-Antigene beobachtet werden. CD14 schien kaum auf der Zelloberfläche repräsentiert zu sein. Nach dreitägiger Stimulation mit G-CSF wurden vermehrt CD14-Antigene auf der Oberfläche von 32D.C10-Zellen detektiert. Die Zahl der Gr-1 und CD11c repräsentierenden Zellen überstieg nur geringfügig den ursprünglichen Wert. Nach fünftägiger Stimulation mit G-CSF wurden deutlich mehr Zellen mit CD14 auf ihrer Oberfläche gemessen. Die Gr-1 Expression nahm deutlich zu. Nach fünf Tagen konnten weniger CD11c-Antigene auf der Zelloberfläche, als zu Beginn der Stimulation beobachtet werden. Die Zellen differenzierten in G-CSF-haltigem Medium zu granulozytären Zellen. Das Ergebnis konnte durch die Färbung von Zytozentrifugationspräparaten mit May-Grünwald- und Giemsa-Färbung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.6.4 Expression von 112 in G-CSF stimulierten 32D.C10-Zellen

Die Expression von 112 in G-CSF stimulierten 32D.C10-Zellen sollte näher untersucht werden. Dazu wurde die mRNA sowohl aus unstimulierten, als auch aus stimulierten Zellen isoliert und für einen Northern Blot verwendet (s. 2.2.2.1-2.2.2.5). Zur Herstellung der Sonde wurde das DNA-Fragment 112 mit der Restriktionsendonuklease Not I aus dem Expressionsvektor pVP16 herausgeschnitten (s. 2.1.11, Abb. 2-3) und mit ^{32}P markiert. Die mRNA von Aktin wurde in diesen Northern-Blot-Experimenten als Ladekontrolle verwendet.

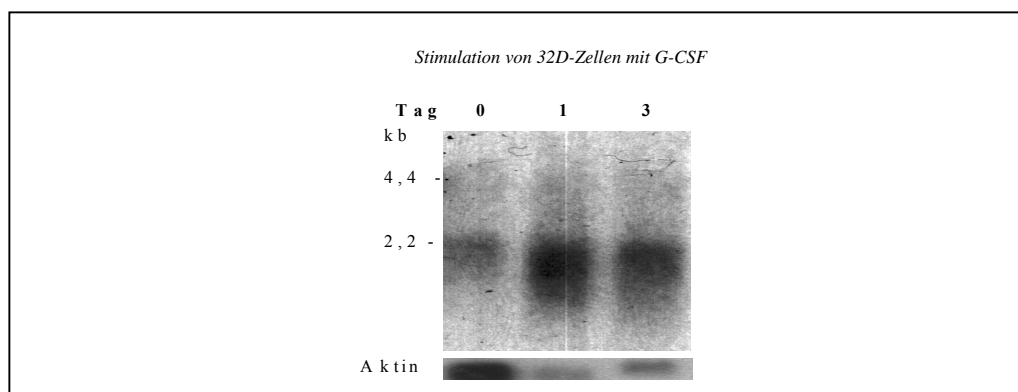


Abb. 3-13. Northern Blot hybridisiert mit ^{32}P -markiertem DNA-Fragment 112. Auf das denaturierende Agarosegel wurden die isolierten mRNAs verschiedener Zeitpunkte aufgetragen: vor der Stimulation mit G-CSF (0), nach einem Tag (1), sowie nach dreitägiger Stimulation mit G-CSF (3).

Auf dem Autoradiogramm war zu beobachten, daß die mRNA von 112 während der ersten drei Tage der G-CSF-Stimulation exprimiert wurde. Auch auf diesem Northern Blot dominierte das Transkript mit einer Länge von 2,2 kb. Die schwächere, 4,4 kb lange mRNA konnte ebenfalls detektiert werden. Auf dem Autoradiogramm war keine Bande bei 5,7 kb bzw. 7,0 kb zu verzeichnen.

3.1.7. Screening der Mouse Kidney 5'-Stretch Plus cDNA Library

Da mit der Sequenz 112 nur ein Teil eines Gens gefunden wurde, sollte eine murine λ -Phagenbank der Niere (Mouse Kidney 5'-Stretch Plus cDNA Library) nach dem vollständigen Gen durchsucht werden. Dabei wurden 6×10^5 Transformanten auf das Vorhandensein des Genabschnittes 112 getestet. Zur Herstellung der Sonde wurde das DNA-Fragment 112 mit der Restriktionsendonuklease Not I aus dem Expressionsvektor pVP16 herausgeschnitten (s. 2.1.11, Abb. 2-3) und mit ^{32}P markiert. Die auf Filter transferierten Klone wurden mit dieser Sonde hybridisiert. Auf den Autoradiogrammen waren sehr viele positive Klone zu verzeichnen. Es wurden 20 positive Agarregionen ausgestochen und in 1 ml Puffer SM mit einem Tropfen Chloroform überführt. Da beim ersten Ausstechen nicht nur der gewünschte Klon isoliert werden konnte, wurde der ganze Versuchsablauf wiederholt. Dazu wurden 100 μl der jeweiligen Phageneluate ausplattiert. Auf den Röntgenfilmen waren deutlich mehr positive Signale zu erkennen und es konnte jeweils ein einziger, positiver Klon aus dem Agar ausgestochen werden. Die positiven Klone wurden in *E. coli* BM25.8 überführt und nach Isolation ihrer Plasmid-DNA wurden die ersten sechs Klone sequenziert. Bei allen Transformanten wurde dieselbe Gensequenz gefunden. Es handelte sich um ein 2,2 kb großes DNA-Fragment, das $\lambda 2$ genannt wurde.

Die Sequenzanalyse zeigte, daß die DNA-Sequenz von 112 in dem isolierten DNA-Fragment enthalten war, jedoch in umgekehrter Richtung. Sein ursprüngliches 5'-Ende repräsentierte jetzt sein 3'-Ende. $\lambda 2$ codierte für ein Gen, das sowohl einen Transkriptionsstart, als auch ein Transkriptionsstop aufwies. Die Datenbanksuche ergab zu diesem Zeitpunkt keine Sequenzhomologien zu anderen Genen. Spätere Sequenzanalysen zeigten, daß es sich bei $\lambda 2$ um ein murines Homolog des OGFR der Ratte handelt (AF156878, Zagon *et al.* 1999).

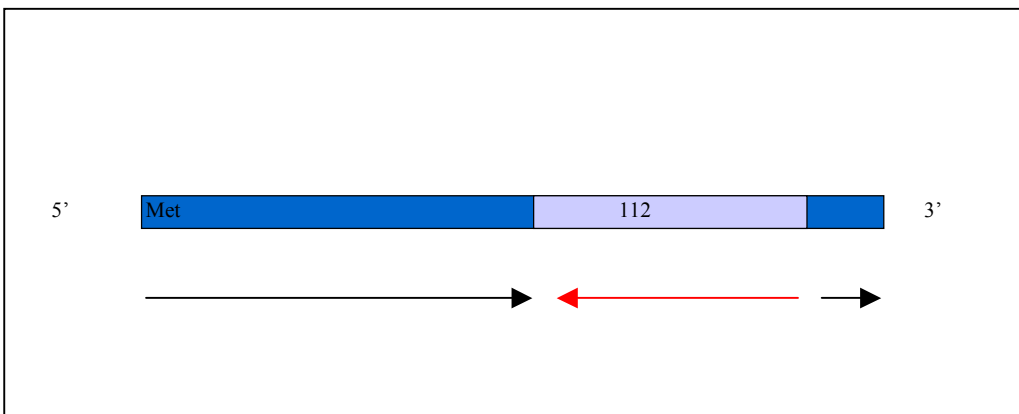


Abb. 3-14. Schematische Darstellung des Klon $\lambda 2$. Das Gen codiert in seiner gesamten Länge für ein Transkript von 2,2 kb Länge. Die schwarzen Pfeile symbolisieren die Leserichtung des Gens. Der rote Pfeil zeigt die ursprüngliche Leserichtung des aus dem Hefe-zwei-Hybrid stammenden Genabschnitts 112.

3.1.7.1 Sequenzvergleich von den DNA-Sequenzen 112 und OGFR der Ratte

112:	100	ccacctggccttttgggtcctctgcccacactggccttttgggtcctctggctccacct	159
OGFR:	1765	ccacctggctgtttgggtcctctggcccacactggctgtttgggtcctctggcccacact	1706
112:	160	ggccttttgggtcctctgcccacactggcttttgggtcctctgcccacactggcttt	219
OGFR:	1705	ggctgtttgggtcctctgcccacactggctgtttgggtcctctgcccacactggctgt	1646
112:	220	tgggtcctctgcccacactggcttttgggtcctctgcccacactggcttttgggt	279
OGFR:	1645	tgggtcctccagcccacactggctgtttggatcctccgcccacactggcttttggaa	1586
112:	280	cctctgcccacactggcttttgggtcctctgcccattccatccttttgggactcag	339
OGFR:	1585	cctctgcccacactggctgtttgagtcctctgcccattccatccttttgggcctcag	1526
112:	340	gacactctgaagggtaggagacagggcactggcctgcacttgagtgttactggctactc	399
OGFR:	1525	gacactctgaagggtaggagggcagggcactggcctgcatttgagtgttactgactactc	1466
112:	400	catcacctcagctccttctccaccttctccgctttcttacctcattagccaccctag	459
OGFR:	1465	catcacctcagccccttctccaccttctccgctttcttacctcattagccaccctgg	1406
112:	460	ccacaagacagggtgttcagcctccctgggtcctggctggtagggctgagggcacac	518
OGFR:	1405	ccacaggacagggcgggttcagcctccctgggtcctggctgatagggctaagggcacac	1347

Abb. 3-15. Sequenzvergleich von der DNA-Sequenz 112 mit der des OGFR der Ratte (AF156878, Zagon et al. 1999)

Der Sequenzvergleich von der DNA-Sequenz 112 mit der des OGFR der Ratte zeigte, daß die Sequenz 112 von bp 100 bis bp 518 zu 89% mit der Sequenz des OGFR der Ratte von bp 1347 bis bp 1765 identisch ist. Die in diesem Rezeptor invertiert vorliegende DNA-Sequenz 112 weist in den bp 1-100 drei weitere Repeats auf. Diese fehlen dem OGFR.

3.1.7.1 Expression von $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II) in G-CSF stimulierten 32D.C10-Zellen

Aus $\lambda 2$ wurde mit den Restriktionsendonukleasen Acc I und Bgl II ein 275 bp langes DNA-Fragment geschnitten und mit ^{32}P markiert (s. 2.1.11, Abb 2-6). Dieses Fragment wurde als Sonde zur Hybridisierung eines Northern Blot verwendet. Damit wurde geprüft, ob dieses OGFR-Fragment, genau wie 112, in verschiedenen Differenzierungsstadien der G-CSF stimulierten 32D.C10-Zellen exprimiert wird. Ferner wurde untersucht, ob die detektieren Transkripte eine vergleichbare Größe aufwiesen.

Die mRNA von Aktin wurde in diesen Northern-Blot-Experimenten als Ladekontrolle verwendet. Damit sollte sichergestellt werden, daß in den einzelnen Spuren des Agarosegels gleich viel Gesamt-RNA aufgetragen wurde.

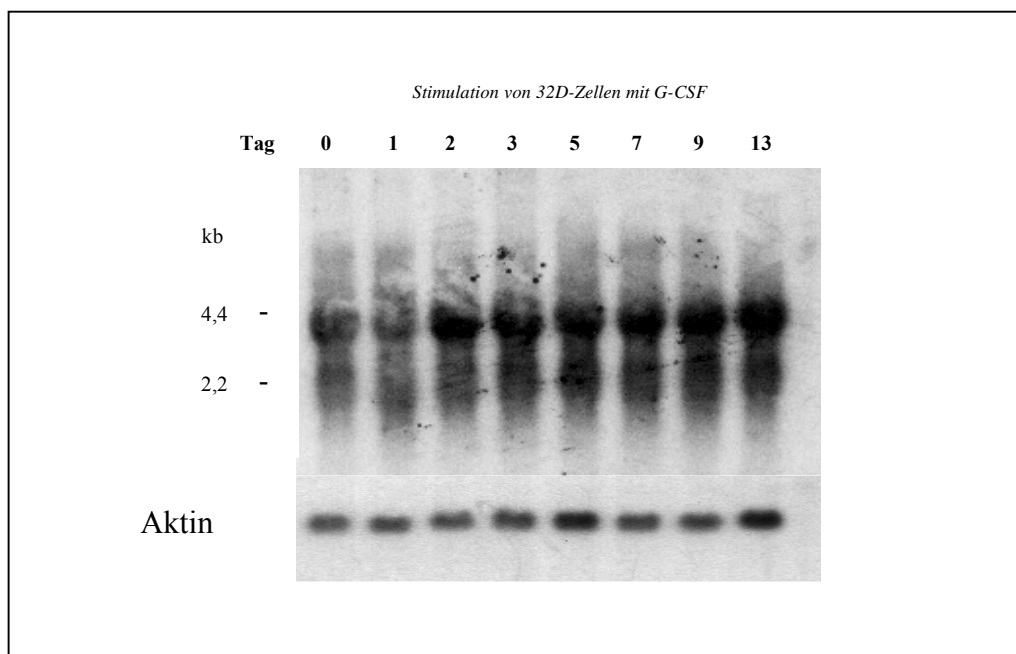


Abb. 3-16, Northern Blot hybridisiert mit ^{32}P -markiertem DNA-Fragment $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II). Auf das denaturierende Agarosegel wurden die isolierten mRNAs verschiedener Zeitpunkte aufgetragen: vor der Stimulation mit G-CSF (0), nach einem Tag (1), sowie nach zwei- (2), drei- (3), fünf (5), sieben (7), neun (9) und nach dreizehntägiger Stimulation mit G-CSF (13).

Auf dem Radiogramm konnte zu allen Zeitpunkten der Stimulation Transkripte gezeigt werden. Es dominierte ein Transkript mit einer Länge von 4,4 kb. Die 2,2 kb lange mRNA wurde ebenfalls detektiert. Auf dem Audiogramm konnte eine schwache Bande bei 5,7 kb verzeichnet werden. Die Expression stieg mit zunehmender Differenzierung an. Wie Abb. 3-17 zeigt, blieb die Expression des G-CSFR währenddessen weitestgehend konstant. Die G-CSFR Sonde wurde wie unter 3.1.6.2 beschrieben, hergestellt.

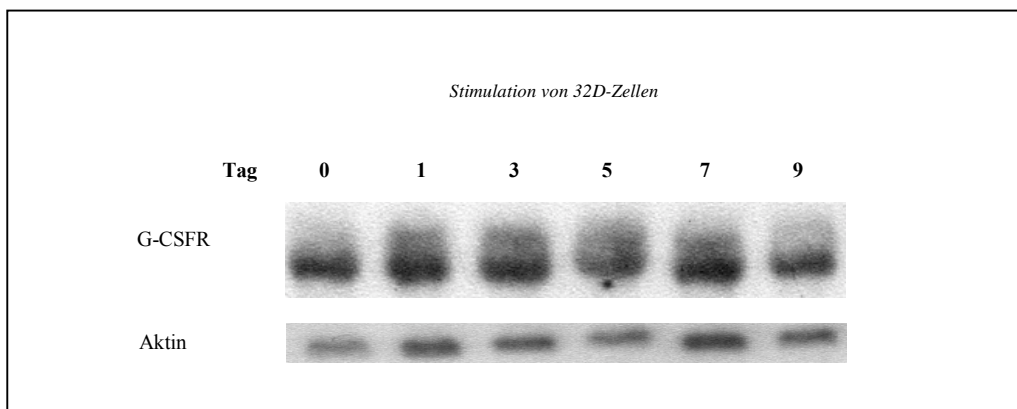


Abb. 3-17. Northern Blot hybridisiert mit ³²P-markierter zytoplasmatischer Domäne des G-CSFR. Auf das denaturierende Agarosegel wurden die isolierten mRNAs verschiedener Zeitpunkte aufgetragen: vor der Stimulation mit G-CSF (0), nach einem Tag (1), sowie nach zwei- (2), drei- (3), fünf (5), sieben (7) und neuntägiger (9) Stimulation mit G-CSF.

Der G-CSFR zeigte ein Haupttranskript von 3,7 kb. An den Tagen 1, 3, 5, 7 und 9 konnte noch ein weiteres Transkript des G-CSFR detektiert werden. Es hatte eine Länge von ca. 3,9 kb.

3.1.7.2. Expression von $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II) in humanem Gewebe

Mit dem folgenden Experiment sollte geprüft werden ob nach einer Hybridisierung des „Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN)TM Blot“ mit dem ³²P-markiertem DNA-Fragment $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II) ein anderes Expressionsmuster, als bei der Verwendung der Sonde des DNA-Fragments 112 beobachtet werden kann.

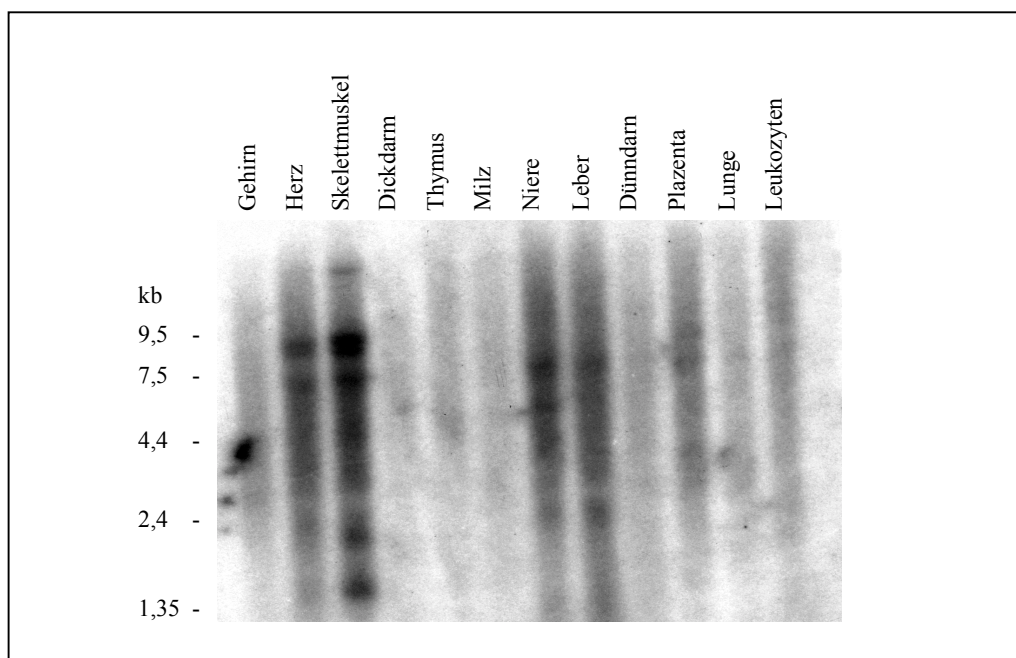


Abb. 3-18. Autoradiogramm des Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN)TM Blot, hybridisiert mit ³²P-markiertem DNA-Fragment $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II).

Die verwendete Sonde zeigte mit den folgenden getesteten humanen Geweben Hybridisierungssignale: mit Herz, Skelettmuskel, Niere, Leber, Dünndarm, Plazenta, Lunge und Leukozyten des peripheren Blutes. In Herz und Skelettmuskel wurden Transkripte von 8,0, 7,8, 6,0, 4,4, 2,4, 2,2 und 1,35 kb, in der Niere und Leber von 6,0, 4,4, 2,4 und 2,2 kb, in der Plazenta, dem Dünndarm, der Lunge und in Leukozyten des peripheren Blutes von 6,0 kb nachgewiesen. Im Vergleich zu Abb. 3-10 waren in Abb. 3-18 keine Hybridisierungssignale in Gehirn, Dickdarm, Thymus und Milz zu verzeichnen. Unter den detektierten mRNAs war jedoch immer das bereits beschriebene Transkript von 6,0 kb zu sehen.

Mit einer Antisensesonde sollte überprüft werden, ob 112 in der ursprünglichen Leserichtung ein Hybridisierungssignal zeigt. Zur Herstellung der Sonde wurde der pGEM-T-Vektor (s. 2.1.11, Abb. 2.1) mit EcoR I linearisiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie im Material- und Methodenteil (s. 2.2.2.6) beschrieben. Der „Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN)TM Blot“ wurde mit der ³²P-markierten Antisensesonde hybridisiert. Dabei konnte kein Transkript detektiert werden.

3.2 Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen

Diese Studien wurden ergänzend zum Hefe-zwei-hybrid System durchgeführt, denn die GST-pull-down-Technik ermöglicht die Identifikation von Wechselwirkungspartnern sowohl des inaktiven, als auch des aktivierten, d.h. phosphorylierten, G-CSFR.

3.2.1 Erstellung der GST-Konstrukte

Für die GST-pull-down-Versuche wurden zwei GST-Fusionsproteine erstellt. Sie umfassen verschiedene Bereiche der zytoplasmatischen Domäne des G-CSFR, so entspricht GST-704 der zytoplasmatischen Domäne des G-CSF von Aminosäurerest 694 bis Aminosäurerest 813. Dieses Konstrukt verfügt über alle vier Tyrosinreste (Y⁷⁰⁴, Y⁷²⁹, Y⁷⁴⁴, Y⁷⁶⁴) des Rezeptors. GST-Ende umfaßt die zytoplasmatische Domäne des G-CSF in ihrer vollen Länge mit den Aminosäureresten 631-813. Die Generierung und Klonierung der Konstrukte wurde bereits im Material und Methodenteil (s. 2.1.11, Abb.2-4) beschrieben. Die Beibehaltung des Leserasters der Translationsfusion wurde durch Sequenzierung der jeweiligen Plasmide überprüft.

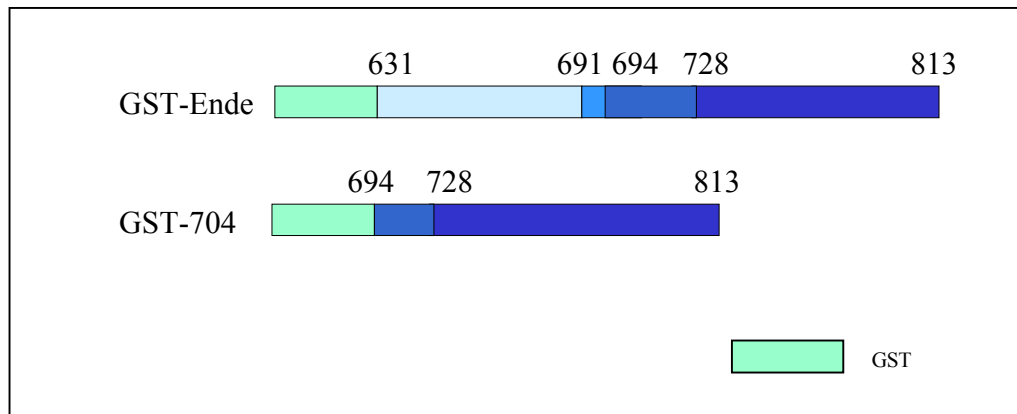


Abb. 3-19. Schematische Darstellung der generierten GST-Konstrukte.

3.2.2 Überprüfung der generierten GST-Konstrukte

3.2.2.1 Überprüfung auf ihre Expression

Mittels eines Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gels wurde überprüft, ob sich die generierten GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimieren ließen. Die beiden Konstrukte wurden sowohl in DH 5 α , als auch in TKX transformiert.

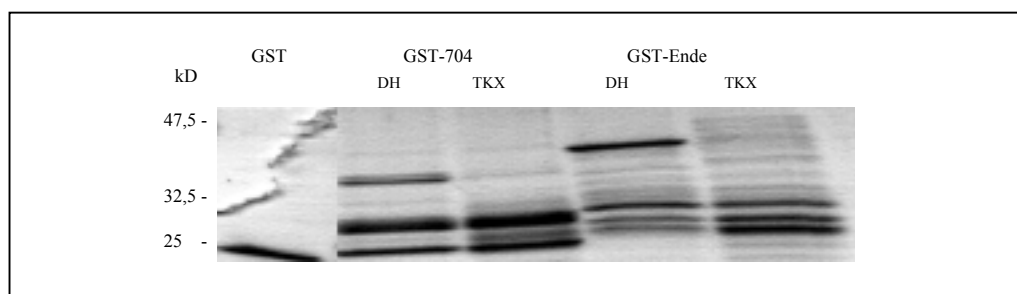


Abb. 3-20. Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel. Auf das 11 %-ige SDS-Polyacrylamid-Gel wurden GST, GST-704 aus DH5 α , GST-704 aus TKX, GST-Ende aus DH5 α , sowie GST-Ende aus TKX aufgetragen.

Die GST-Fusionsproteine ließen sich mit Coomassie-Blau darstellen. GST-704 und GST-Ende zeigten einige Degradationsprodukte. Die Proteinausbeute aus TKX war deutlich niedriger als in DH5 α .

3.2.2.2 Überprüfung auf Tyrosinphosphorylierung

Bei *Epicurian Coli* TKX1 handelt es sich um einen Bakterienstamm mit einem Plasmid-codierten, induzierbaren Tyrosinkinasegen. Nach Induktion der Tyrosinkinase wird das Fusionsprotein in den Bakterien phosphoryliert. Mittels GST-pull-down-Experimenten kann so überprüft werden, ob eine Protein-Protein-Interaktion phosphorylierungsabhängig ist. Die Phosphorylierung der beiden Fusionsproteine in TKX wurde mittels eines Anti-Phosphotyrosin Blot überprüft.

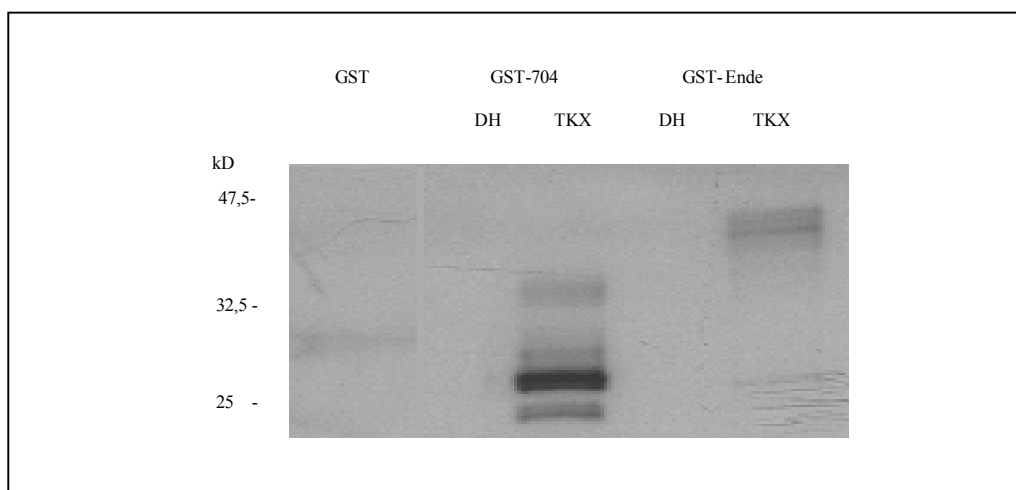


Abb. 3-20. Autoradiographie des Anti-Phosphotyrosin entwickelten Western Blot. Auf ein 11 %-iges SDS-Polyacrylamid-Gel wurden GST, GST-704 aus DH5 α , GST-704 aus TKX, GST-Ende aus DH5 α , sowie GST-Ende aus TKX aufgetragen und in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt.

Auf dem Autoradiogramm konnte gezeigt werden, daß die zytoplasmatische Domäne des G-CSFR in TKX phosphoryliert wird, nicht aber in DH5 α . Die GST-Fusionsproteine zeigten eine erwartete Bande bei GST-704 von ca. 38 kD und bei GST-Ende von etwa 45 kD. Entsprechend dem Coomassie-Gel waren auch auf dem Autoradiogramm Degradationsprodukte zu erkennen.

3.2.3 GST-pull-down-Experimente

Zur Identifikation neuer Bindungspartner des G-CSFR wurden die an Glutathion-Sepharose gekoppelten Fusionsproteine als „Köder“ zum „fischen“ von Interaktionspartnern aus dem dazu verwendeten 32D.C10-Zellysat eingesetzt (s. 2.2.4.2). Bei diesen Versuchen wurde GST alleine, d.h. nicht als Fusionsprotein, immer als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Mit ihr konnten mögliche unspezifische Wechselwirkungen der Interaktionspartner mit dem perlenkonjugierten GST identifiziert werden. Außerdem wurde 32D-Zellysat mit auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. In diesem sollte der jeweilige potentielle Wechselwirkungspartner nachgewiesen werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob c-Abl, Erk-2, Grb2, Lyn, Sam68, SHP-1, SHIP, STAT1, c-Src, STAT5 und Tyk2 an den G-CSFR binden.

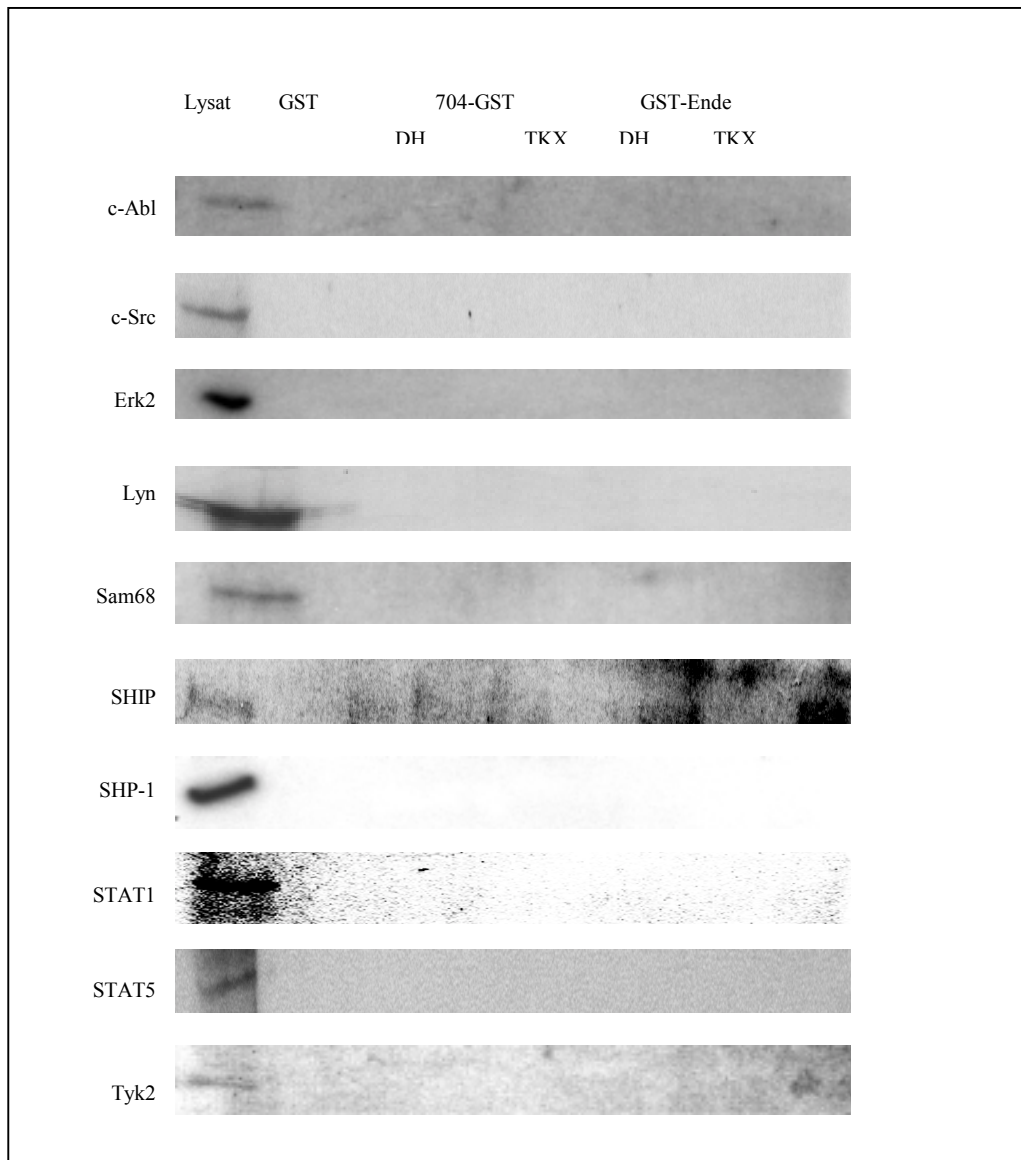


Abb. 3-22. GST-pull-down-Experimente zur Identifikation von Wechselwirkungspartnern des G-CSFR. Die Abbildung zeigt die Autoradiographien verschiedener Immunoblot kombiniert.

Wie Abb. 3-22 zeigt, konnten die jeweiligen Immunkomplexe im Zellysat nachgewiesen werden, nicht aber nach Inkubation mit den verwendeten GST-Fusionsproteinen. Auch die Negativkontrolle, GST, zeigte wie erwartet keine Interaktion mit den angenommenen Bindeproteinen. c-Abl, c-Src, Erk2, Lyn, Sam68, SHIP, SHP-1, STAT1, STAT5 und Tyk2 zeigten keine Wechselwirkung mit den verschiedenen Domänen des G-CSFR und wurden somit als mögliche Interaktionspartner ausgeschlossen.

3.2.3.1 Identifikation von Grb2 als Bindeprotein des G-CSFR

Grb2 konnte hingegen als Bindeprotein des G-CSFR identifiziert werden.

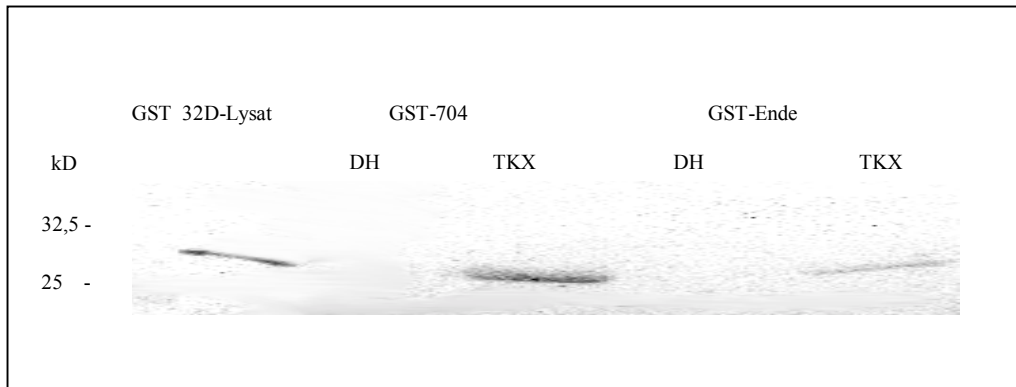


Abb. 3-23. GST-pull-down-Experiment zur Identifikation von Grb2 als Wechselwirkungspartner des G-CSFR. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Anti-Grb2 entwickelten Western Blot. Auf ein 11 %-iges SDS-Polyacrylamid-Gel wurden Proteinmarker, Zellysat aus 32D.C10-Zellen und die jeweiligen GST-pull-down-Ansätze aufgetragen.

Auf dem Autoradiogramm des Anti-Grb2 entwickelten Western Blot konnte gezeigt werden, daß Grb2 an die phosphorylierten GST-G-CSFR-Fusionsproteine bindet. Eine Protein-Protein-Wechselwirkung von Grb2 mit dem unphosphorylierten G-CSFR konnte nicht detektiert werden. Grb2 bindet folglich tyrosinphosphorylierungsabhängig.

3.2.3.2 Identifikation der Grb2-Bindungsstelle

3.2.3.2.1 Generierung der G-CSFR Mutanten

Zur Ermittlung der Grb2-Bindungsstelle wurden die jeweiligen Tyrosinreste der zytosplasmatischen Domäne des G-CSFR einzeln mutiert. Die Generierung der Mutanten erfolgte nach der im Material- und Methodenteil unter in-vitro-Mutagenese beschriebenen Anleitung (s. 2.2.1.14). Die verwendeten Primer und Vektoren sind Abb. 2-5, des Material- und Methodenteils zu entnehmen (s. 2.1.11). Die Beibehaltung des Leserasters der

Translationsfusion, sowie die Einführung der Mutation wurde durch Sequenzierung der jeweiligen Plasmide überprüft.

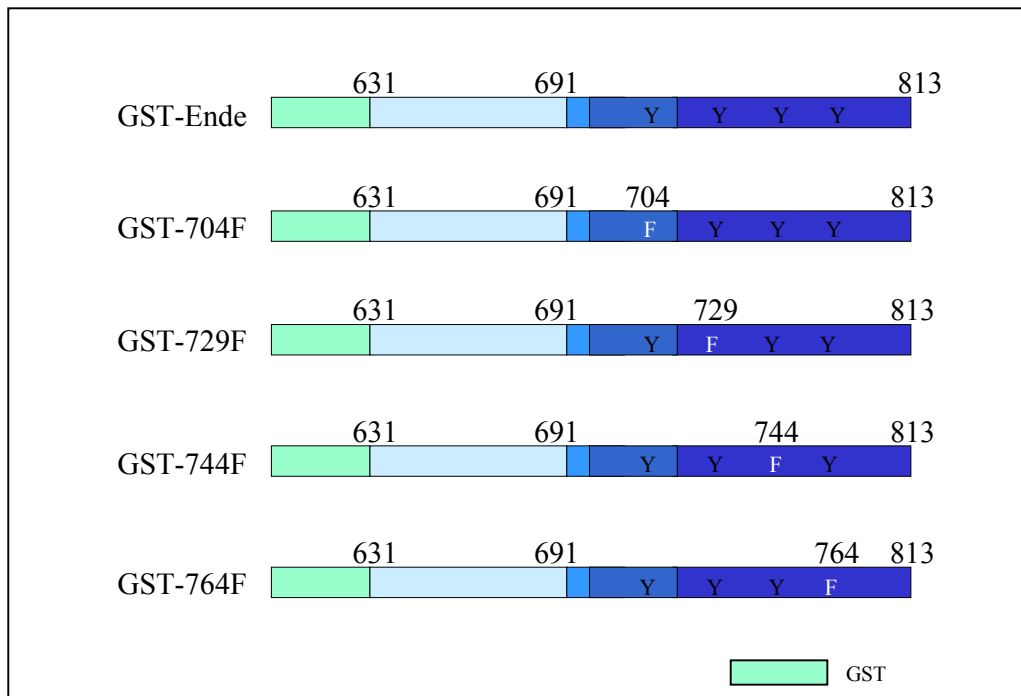


Abb. 3-24. Schematische Darstellung der generierten Mutanten.

3.2.3.2.2 Identifikation der Grb2 Bindungsstelle mittels GST-pull-down-Experiment

Mit diesen Mutanten wurden erneut GST-pull-down-Experimente durchgeführt (s. 2.2.4.2).

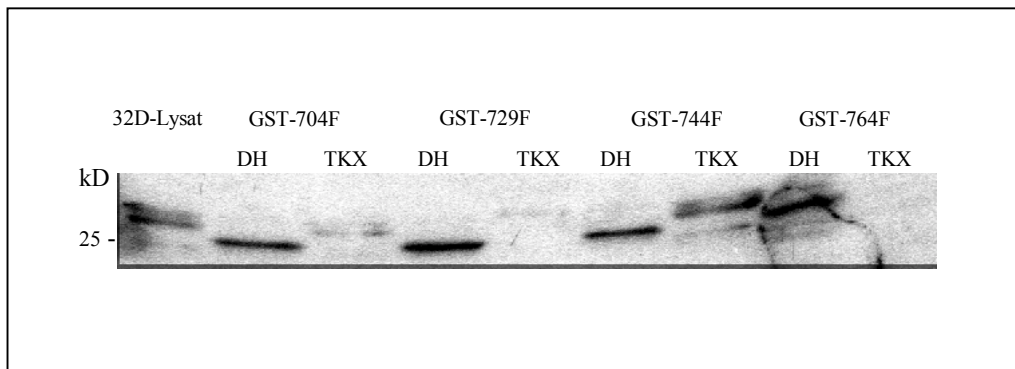


Abb. 3-25. GST-pull-down-Experiment zur Identifikation der Bindungsstelle von Grb2. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Anti-Grb2 entwickelten Western Blot. Auf ein 11 %-iges SDS-Polyacrylamid-Gel wurden Proteinmarker, Zellysat aus 32D.C10-Zellen und die jeweiligen GST-pull-down-Ansätze aufgetragen.

Auf dem Autoradiogramm konnte keine Bindung von Grb2 an Mutante 764F detektiert werden, d.h. Grb2 bindet an den phosphorylierten Tyrosinrest 764.

Die neue Charge des verwendeten Antikörpers zeigte eine Kreuzreaktion mit dem GST-Anteil der Fusionsproteine.

3.3 Metabolische Markierung von Zellen mit Tran-³⁵S-Label

Einen Überblick über weitere Interaktionspartner des G-CSFR sollte durch die metabolische Markierung von Zellen mit Tran-³⁵S-Label gewonnen werden. Die radioaktiv markierten Zellen wurden lysiert und in einem GST-pull-down-Experiment eingesetzt (s. 2.2.5.8 und 2.2.4.2). Zum Schluß konnte die physische Interaktion des Fusionsproteins mit den radioaktiv markierten Proteinen im Auftreten von spezifischen Banden auf dem Autoradiogramm gezeigt werden. Bei diesen Versuchen wurde neben dem GST-

Fusionsprotein GST-Ende GST als Kontrolle mitgeführt. Dadurch können Proteine identifiziert werden, die aufgrund ihrer Struktur unspezifisch an GST binden. Zur Auffindung phosphotyrosinspezifischer Bindungspartner wurden GST-Ende Proteine sowohl aus DH5 α , als auch aus TKX isoliert und anschließend mit den verschiedenen Zellysaten inkubiert.

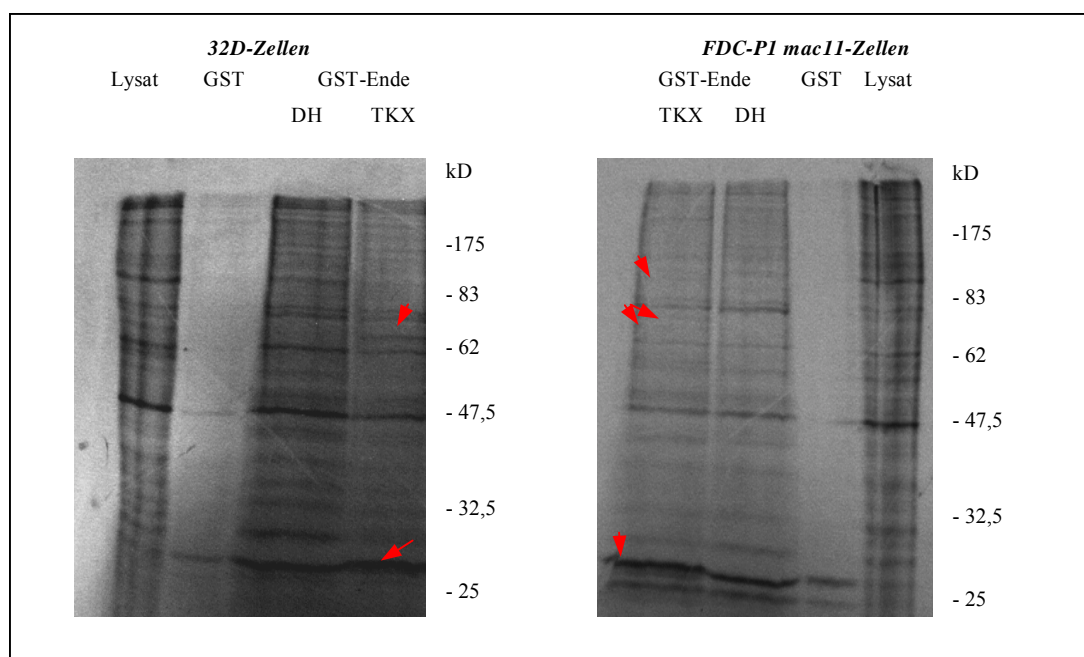


Abb. 3-25. Autoradiogramm von GST-pull-down-Experimenten mit Zellysaten metabolisch, ^{35}S -markierter 32D.C10- und FDC-P1 mac11-Zellen. Auf ein 11 %-iges SDS-Polyacrylamid-Gel wurden Proteinmarker, die jeweiligen Zellysate, sowie die jeweiligen Ansätze der GST-pull-down-Experimente aufgetragen. Die roten Pfeile markieren die Positionen der spezifischen Bindproteine.

Mittels dieser Versuche konnten in 32D.C10-Zellen zwei Proteine gezeigt werden, die lediglich an den tyrosinphosphorylierten G-CSFR binden. In FDC-P1 mac11-Zellen wurden vier Bindeproteine ausfindig gemacht. Die Interaktionspartner in 32D.C10- und FDC-P1 mac11 Zellen hatten ein Molekulargewicht von 26 und 71 kD. Die weiteren, nur in FDC-P1 mac11 Zellen dargestellten, Bindeproteine zeigten auf dem Autoradiogramm eine Bande bei 65 und 96 kD.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es Wechselwirkungspartner des G-CSFR zu identifizieren. Dazu wurden drei unterschiedliche methodische Ansätze gewählt: Mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Systems wurde ein Interaktionspartner des inaktiven, unphosphorylierten G-CSFR ausfindig gemacht. Durch GST-pull-down-Experimente konnten zusätzlich zahlreiche Signalmoleküle auf ihre Wechselwirkung mit dem G-CSFR untersucht werden. Dabei wurde das Adapterprotein Grb2 als Bindungspartner des aktivierten, tyrosinphosphorylierten Rezeptors identifiziert. Zusätzlich wurde durch den Einsatz von Mutanten des G-CSFR die genaue Bindungsstelle von Grb2 ausfindig gemacht. Einen Überblick über weitere, näher zu charakterisierende Bindeproteine des phosphorylierten und des nicht-phosphorylierten Rezeptors konnte durch die metabolische Markierung von Zellen mit Tran-³⁵S-Label gewonnen werden.

4.1 Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening

Das Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening stellt ein sensitives in-vivo System dar mit dem bisher unbekannte Protein-Protein-Interaktionen ausfindig gemacht werden können (Fields & Song 1989; Chien *et al.* 1991). Diese Methode ermöglichte allerdings nur die Identifikation von Bindeproteinen des inaktiven G-CSFR, da dieser über keine intrinsische Kinaseaktivität verfügt und folglich in der Hefe nicht phosphoryliert wird. Dabei detektierte Wechselwirkungen beruhen auf einer direkten Bindung am G-CSFR. Im Gegensatz zu anderen Methoden, wie z.B. die Co-Immunpräzipitation, kann dabei eine Adapterprotein-vermittelte Interaktion ausgeschlossen werden. Erleichtert wird die Charakterisierung des gefundenen Bindungspartners dadurch, daß seine cDNA direkt nach der Plasmid-DNA-Isolation in dem Expressionsvektor pVP16 vorliegt.

Nach Bindung seines Liganden, G-CSF, kommt es zur Ausbildung von G-CSFR-Homodimeren und anschließender Phosphorylierung der vier Tyrosinreste des Rezeptors (Tidow & Welte 1997). Der G-CSFR kann in diesem Zustand sowohl Proliferations-, als auch Differenzierungssignale vermitteln (Fukunaga *et al.* 1993). Studien mit verkürzten Rezeptormutanten zeigten, daß für die Differenzierung von neutrophilen Vorläuferzellen zu reifen Granulozyten die zytoplasmatische Domäne mit ihren Tyrosinresten benötigt wird (Fukunaga *et al.* 1993). Zur Übermittlung mitogener Signale reichen 55 Aminosäurereste des N-terminalen Bereichs des intrazellulären G-CSFR-Abschnittes aus (Dong *et al.* 1993). Da diese Domäne über keine Tyrosinreste verfügt, wird davon ausgegangen, daß der konservierte Bereich mit den Box-1- und Box-2-Motiven eine Bindungsstelle für JAK-Kinasen (Nicholson *et al.* 1995) und für die Tyrosinkinase Lyn (Corey *et al.* 1994) darstellt. Da sich die erwähnten Untersuchungen auf den aktivierten G-CSFR beziehen, erschien es interessant nach Bindungspartnern des unstimulierten Rezeptors zu suchen.

Um die Bindungsdomänen von vorneherein näher eingrenzen zu können, wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening mit verschiedenen „Köderproteinen“ durchgeführt (s. 3.1.1, Abb. 3-1). Neben der Suche nach Bindeproteinen der zytoplasmatischen Domäne in ihrer vollen Länge mittels LexA-Ende wurde nach Interaktionspartnern der sogenannten Proliferationsdomäne, LexA-P1, die den zytoplasmatischen Teil des G-CSFR von Aminosäurerest 631 bis Aminosäurerest 691 umfaßt, sowie nach Wechselwirkungspartnern des alle Tyrosinreste umfassenden Köderproteins LexA-704 und des Proteins LexA-729, dem der Tyrosinrest 704 fehlt, gesucht. Um zu vermeiden, daß ein an die Proliferationsdomäne bindendes Protein auch mit LexA-704 und LexA-729 gefischt wird, fehlt beiden Fusionsproteinen dieser Bereich der zytoplasmatischen Domäne. LexA-729 wurde zusätzlich generiert, da insbesondere an Tyrosinrest 704 im phosphorylierten Zustand mehrere SH2-Domänen besitzende Proteine, wie z.B. Grb2, SHP-2 und eventuell STAT3 binden (Ward *et al.* 1999a). Mittels der generierten Konstrukte sollte untersucht werden, ob bestimmte Proteine konstitutiv mit dem G-CSFR assoziiert sind und ob insbesondere die Region um den nicht-phosphorylierten Tyrosinrest 704 Andockstelle für den Rezeptor inhibierende Signalmoleküle ist. Direkte Interaktionspartner des inaktiven G-CSFR wurden bisher noch nicht identifiziert, es wurde aber postuliert, daß Lyn und JAK2 konstitutiv mit dem G-CSFR assoziiert seien (Corey *et al.* 1994; Nicholson *et al.* 1995). In diesen Studien konnte jedoch eine über Adaptermoleküle vermittelte Bindung der beiden

Kinasen an den G-CSFR nicht ausgeschlossen werden. Sie stellten potentielle, mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening nachzuweisende Interaktionspartner dar.

Für das Screening selbst wurde eine embryonale pVP16-cDNA-Bibliothek 9,5-10,5 Tage alter Mäuse verwendet (Hollenberg *et al.* 1995). Die Tatsache, daß mit Domänen des humanen G-CSFR nach murinen Interaktionspartnern gesucht wurde, stellte kein Problem dar, da große Homologie zwischen den beiden Rezeptoren herrscht (Larsen *et al.* 1990) und bindende Proteindomänen meist stark konserviert sind (Sudol 1998). Für die nähere Charakterisierung des murinen Wechselwirkungspartners stand bereits ein murines Zellsystem zur Verfügung: Es handelte sich dabei um promyelozytäre, IL-3-abhängige 32D.C10-Zellen, die mit dem G-CSFR stabil transfiziert worden waren und sich durch G-CSF Stimulation zu granulozytären Zellen differenzieren ließen (Ward *et al.* 1999a).

4.1.1 Der Proteinabschnitt 112 ist ein Interaktionspartner des G-CSFR

In einem Hefe-Zwei-Hybrid-System mit *GFP* als Reportergen wurde der aus dem Genbankscreening stammende Proteinabschnitt 112 als Interaktionspartner des G-CSFR *in vivo* bestätigt. Dabei konnte eine spezifische Wechselwirkung mit den Köderproteinen LexA-729 und LexA-Ende gezeigt werden. Es handelte sich um eine vergleichsweise schwache Protein-Protein-Wechselwirkung, wie sie von TrkA mit c-Abl (Koch *et al.* 2000) gezeigt wurde. Die fehlende Interaktion mit LexA-704 könnte damit erklärt werden, daß es bei diesem Rezeptorabschnitt zu einer Protein-Faltung kommt, die eine Bindung des Proteinabschnitts 112 nicht mehr ermöglicht. Eine andere Erklärung könnte sein, daß LexA-704 besonders empfindlich gegenüber proteolytischem Abbau ist und deshalb keine Protein-Protein-Wechselwirkung mit 112 detektiert werden konnte. Diese Vermutung stützt sich auf die Beobachtung, daß LexA-704 als einziges Fusionsprotein in dem Anti-LexA entwickelten Western Blot zusätzlich zu der erwarteten Hauptbande von ca. 35 kD noch eine Nebenbande von etwa 30 kD zeigte. Bei dieser dürfte es sich um ein Degradationsprodukt handeln (Keegan *et al.* 1996).

In-vitro wurde die *in-vivo* gezeigte Interaktion des Proteinabschnitts 112 mit dem G-CSFR mittels GST-pull-down-Experimenten bestätigt (s. 3.1.5, Abb. 3-8). Sowohl im Zellysat,

als auch im GST-pull-down-Ansatz wies die dominierende Bande ein Molekulargewicht von etwa 90 kD auf. Im Zellysat konnten zusätzliche Proteinbanden detektiert werden. Diese zeigten Molekulargewichte, die sowohl größer als auch kleiner als 90 kD waren. Im GST-pull-down-Ansatz konnten neben der dominierenden Proteinbande nur noch kleinere identifiziert werden. Bisher wurden Molekulargewichte des G-CSFR von 150 kD, 135-125 kD, 110-105 kD, 92-83 kD und von 30 kD beobachtet (Fukunaga *et al.* 1991; Li *et al.* 1994). Bei Rezeptoren mit einer Größe von 150 kD und 135-125 kD handelt es sich um reife, auf der Zelloberfläche exprimierte G-CSFR, das Protein mit einem Molekulargewicht von 30 kD ist vermutlich ein Degradationsprodukt des Rezeptors (Fukunaga *et al.* 1991; Li *et al.* 1994). Die beobachteten Molekulargewichte von 110-105 kD und 92-83 kD beruhen auf unterschiedlichen Glykosylierungsmustern des G-CSFR (Fukunaga *et al.* 1991; Li *et al.* 1994). Im Rahmen der GST-pull-down-Versuche konnte also eine Interaktion des Proteinabschnitts 112 mit dem nicht vollständig glykosylierten G-CSFR beobachtet werden. Dies könnte einerseits daran liegen, daß in der 32D.C10-Zellpräparation überwiegend unreife Rezeptorformen vorliegen oder andererseits daran, daß der Glykosylierungszustand für die Interaktion ohne Bedeutung ist. Darüber hinaus könnte es sich bei dem Wechselwirkungspartner 112 um einen Inhibitor des G-CSFR handeln. Dieser könnte ähnlich wie die SOCS-Proteine als Adapter fungieren und dazu führen, daß der G-CSFR sofort nach der Interaktion mit dem Proteinabschnitt 112 durch proteosomale Degradation abgebaut wird (Alexander *et al.* 1999).

4.1.2 Die Sequenz 112 wird in allen getesteten murinen Geweben exprimiert

Mittels „Mouse Lane Multiple Tissue Northern (MTNTM) Blot“ der Firma Clontech konnte gezeigt werden, daß die Sequenz 112 in allen getesteten Geweben exprimiert wird (s. 3.1.6.1, Abb. 3-9): in allen Geweben konnten drei Transkripte detektiert werden. Die dominierende Bande hatte eine Größe von 2,2 kb. Die beiden anderen mRNAs wiesen eine Länge von 4,4 und 5,7 bzw. 7,0 kb im Skelettmuskel und der Milz auf.

Die 32D.C10-Zellen wurden zusätzlich mit G-CSF stimuliert und reagierten die ersten drei Tage mit einer verstärkten Proliferation, anschließend konnte ihre Differenzierung beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stimulation der 32D.C10-Zellen mittels Fluoreszenzfarbstoff markierter Anti-Gr-1-, Anti-CD-11c- und Anti-CD-14-Antikörper, Messung der relativen Grünfluoreszenz im FACScanner und anschließender grafischer Darstellung in einem Durchflußzytometer-Diagramm, verfolgt (s. 3.1.6.3, Abb. 3-12). An Tag fünf konnte eine deutliche Veränderung in der Expression der Oberflächenmarker festgestellt werden. Wie erwartet, hatte die Zytokin-Stimulation mit zunehmender Differenzierung einen Anstieg der CD14- und Gr-1-Expression zur Folge (Ziegler-Heitbrock *et al.* 1993). Die Gr-1 Repräsentanz korreliert mit dem reifen granulozytären Phänotyp. Je mehr die 32D.C10-Zellen ihre Fähigkeit zur Proliferation verlieren, desto stärker wird die Gr-1-Expression (Fleming *et al.* 1993). Die Repräsentation von CD11c auf der Zelloberfläche gilt als Marker für einen makrophagen-ähnlichen Phänotyp (Lopez-Rodriguez *et al.* 1997). Die CD11c-Expression nahm, wie erwartet, mit andauernder G-CSF-Stimulation der 32D.C10-Zellen ab. Die Differenzierung konnte ebenfalls durch Färbung von Zytozentrifugationspräparaten mit May-Grünwald- und Giemsa-Färbung bestätigt werden.

4.1.3 Die Sequenz 112 konnte auch in myeloiden Zellen nachgewiesen werden

In unstimulierten als auch in G-CSF stimulierten 32D-Zellen wurde neben der schwächer exprimierten 4,4 kb langen mRNA das dominierende 2,2 kb Transkript nachgewiesen (s. 3.1.6.4, Abb. 3-13). Die beiden mRNAs sind typisch für 112. Dieses Experiment zeigte, daß die Sequenz 112 in myeloiden Zellen exprimiert wird, allerdings nur in Form von zwei Transkripten, die in murinem Gewebe detektierte mRNA mit einer Länge von 5,7 bzw. 7,0 kb konnte nicht nachgewiesen werden.

4.1.4 Die murine Sequenz 112 besitzt ein humanes Homolog

Es konnte gezeigt werden, daß der Klon 112 ein humanes Homolog besitzt. Es wurden entsprechend der murinen mRNA in allen untersuchten humanen Geweben Transkripte von 112 mit einer Länge von 6,0 kb nachgewiesen (s. 3.1.6.2, Abb. 3-10). Nur im menschlichen Gehirn wurde zusätzlich eine kleinere mRNA detektiert. Eine besonders starke Expression zeigte renales Gewebe. Auffällig bei diesem Northern Blot waren die ungewöhnlich breiten und deutlich stärkeren Signale der Leukozyten des peripheren Blutes. Da sich diese Banden auch durch nachträgliches Waschen unter stringenten Bedingungen nicht reduzieren ließen, könnte dies auf eine Überexpression der mRNA von 112 in Leukozyten hinweisen. Dieser Blot erlaubt keine Unterscheidung zwischen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Daher ist es wahrscheinlich, daß die detektierte Überexpression von Granulozyten herrührt.

4.1.5 Expression des G-CSFR in verschiedenen Geweben

Derselbe „Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN)TM Blot“ der Firma Clontech wurde mit einer ³²P-markierten G-CSFR-Sonde hybridisiert. Auch hier wurden sehr starke Signale in Leukozyten des peripheren Blutes detektiert (s. 3.1.6.2, Abb. 3-11). Da die Firma gleiche mRNA-Mengen für jedes Gewebe garantiert, könnte zwischen der starken G-CSFR- und 112-Expression in leukozytären Zellen ein Zusammenhang bestehen. Dies scheint aber nur für Leukozyten zu gelten, da die mRNA von 112 im Gegensatz zu der des G-CSFR in der Plazenta nicht verstärkt exprimiert wird. Möglicherweise interagiert der Proteinabschnitt 112 bevorzugt mit den G-CSFR der Neutrophilen (Bernard *et al.* 1996) und wird deshalb in den Leukozyten des peripheren Blutes verstärkt exprimiert.

Ferner konnten Hybridisierungssignale des G-CSFR in Leber, Niere, Milz, Thymus, Dün- und Dickdarm identifiziert werden (s. 3.1.6.2, Abb. 3-11). Die 3,7 kb lange mRNA in diesen Geweben entsprach den Erwartungen (Avalos *et al.* 1996). Bisher wurden jedoch keine Transkripte mit einer Größe von 6,0 und 7,5 kb beschrieben. Es könnte sich um Spleißvarianten handeln. Ebenfalls keine Angaben wurden bisher über das Vorkommen des G-CSFR im Skelettmuskel gemacht. Im vergangenen Jahr wurde von der Entdeckung

von „Stammzellen“ des Muskels berichtet (Lemischka 1999). Sie zeigten eine zehnfach höhere hämatopoetische Aktivität als das gesamte Knochenmark und verfügten darüber hinaus über eine breitere Spanne an Differenzierungspotential (Lemischka 1999). Bei den „Stammzellen“ des Muskels handelt es sich um Vorläuferzellen, die in der Lage sind sowohl zu Muskelzellen als auch zu hämatopoetischen Zellen zu differenzieren. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß diese unreifen Zellen den G-CSFR exprimieren. Auch die Detektion des G-CSFR in Leber, Niere, Milz, Thymus, Dün- und Dickdarm stellt keine Besonderheit dar, da sich in allen Geweben sogenannte mesenchymale Vorläuferzellen befinden, die erst später zu parenchymalen Zellen auf denen der G-CSFR nicht mehr exprimiert wird, differenzieren. Eine zweite Möglichkeit für die Expression des G-CSFR ist eine extramedulläre Hämatopoese in diesen Geweben. Eine solche wurde z.B. in der murinen Milz beobachtet (Welte *et al.* 1987). Auch in der Leber konnten blutbildende Inseln gezeigt werden. Dieser Blot erlaubt keine nähere Charakterisierung der G-CSFR exprimierenden Zellen, da die Organe nicht unterteilt wurden, so daß eine Detektion des G-CSFR in den oben genannten Geweben zu erwarten ist. Im Gegensatz zu 112 konnte der G-CSFR nicht in Gehirn und Herz nachgewiesen werden. Es ist dennoch möglich, daß der G-CSFR unterhalb der Nachweisgrenze oder nur während der Embryonalentwicklung in diesen Geweben exprimiert wird. Calhoun *et al.* (1999) beobachteten eine Regulation der G-CSFR-Expression in Darm, Auge und Niere des humanen Fötus. Stan *et al.* (1999) wiesen G-CSFR-Transkripte, deren Expression mit zunehmender Differenzierung abnahm in Zellen astroglialen Ursprungs, nach. Diese Beobachtungen könnten das Fehlen des G-CSFR im adulten Gehirn erklären.

4.1.6 Das DNA-Fragment 112 ist Teil der cDNA des murinen OGFR

Da es sich bei der aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Genbankscreen stammenden cDNA nur um einen Teil eines Gens handelt und zu dem damaligen Zeitpunkt keine Homologien zu anderen Genen bekannt waren, wurde eine murine λ -Phagenbank der Niere (Mouse Kidney 5'-Stretch Plus cDNA Library) nach dem vollständigen Gen durchsucht. Dazu wurde eine λ -Phagenbank aus renalem Gewebe verwendet, weil die mRNA von 112 sowohl in muriner, als auch in humaner Niere stark exprimiert wird (s. 3.1.6.1, Abb. 3-9; 3.1.6.2, Abb. 3-10). Dabei wurden 6×10^5 Transformanten analysiert. Insgesamt wurden sechs

Klone sequenziert: es stellte sich heraus, daß es sich bei allen um dasselbe Gen handelte. Sequenzanalysen ergaben, daß das DNA-Fragment 112 in umgekehrter Richtung in dem neuen Klon, λ 2, vorliegt. Sein ursprüngliches 5'-Ende repräsentiert jetzt sein 3'-Ende. Eine spätere Datenbanksuche ergab, daß es sich bei λ 2 um einen zur Ratte homologen Opioid-Wachstumsfaktor-Rezeptor (OGFR) handelt (Zagon *et al.* 1999). Ausgangsmaterial für die Klonierung des OGFR der Ratte war ein 1 kb Fragment, #14, das in umgekehrter Leserichtung zu 89% der Sequenz 112 entspricht (s. 3.1.7.1, Abb. 3-15). #14 wies 8 unvollständige Repeats aus 9 Aminosäuren auf (Zagon *et al.* 1999). Der Proteinabschnitt 112 besteht aus 11 unvollständigen Repeats von 9 Aminosäuren bei einem offenen Leserahmen von 354 bp (s. 3.1.4, Abb. 3-6). Mit #14 wurde eine λ gt11 Expressionsbibliothek nach dem vollständigen Gen durchsucht. Der OGFR der Ratte codiert für ein Protein von 580 Aminosäuren, mit einem geschätzten Molekulargewicht von 58 kD. Mittels Northern Blot wurde im Ratten-Cerebellum ein Transkript von 2,1 kb nachgewiesen. (Zagon *et al.* 1999). Der humane OGFR weist 8 unvollständige Repeats von 20 Aminosäuren, die nicht zu denen des murinen OGFR homolog sind, auf. Die fünf identifizierten Isoformen des humanen OGFR unterscheiden sich in der Anzahl der Repeats voneinander. In adultem Gewebe konnte ein Transkript von 2.4 kb, in fötalem noch eine zusätzliche mRNA mit einer Länge von 1,7 kb nachgewiesen werden. Die Expression des humanen OGFR wurde in Herz, Gehirn, Leber, Plazenta, Skelettmuskel, Niere, Pankreas und verschiedenen Karzinomzelllinien gezeigt (Zagon *et al.* 2000). Der humane OGFR und der der Ratte zeigen auf Aminosäureebene in ihrem N-terminalen Bereich eine Homologie von 87%, die C-Termini jedoch nur noch eine solche von 43 %. Die Autoren postulierten eine, die Struktur des OGFR betreffende divergente Evolution (Zagon *et al.* 2000). Beweise stehen aber noch aus. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es sich bei dem 6,0 kb Transkript des „Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN)TM Blot“ der Firma Clontech (s. 3.1.6.2, Abb. 3-10) um ein humanes Homolog von 112 unbekannter Funktion handelt, denn ein Sequenzvergleich auf DNA- und Proteinebene zeigte keine Verwandtschaft zwischen 112 und humanen OGFR.

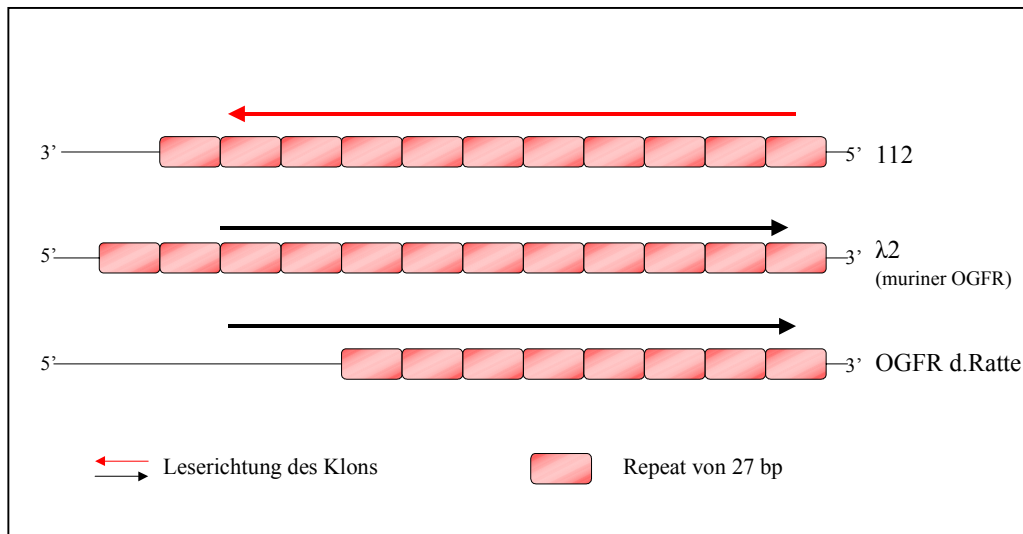


Abb. 4-1. Schematische Darstellung des DNA-Fragmentes 112, des Klons $\lambda 2$, sowie des OGFR der Ratte. Die OGFR unterscheiden sich sowohl in der Anzahl ihrer Repeats, als auch in ihrer Leserichtung von dem DNA-Fragment 112.

Ein Northern Blot mit unstimulierten- und bis zu dreizehn Tage stimulierten 32D.C10-Zellen wurde mit einem ^{32}P -markierten Fragment $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II) des klonierten murinen OGFR hybridisiert (s. 3.1.7.1, Abb. 3-16). $\lambda 2$ (AccI, Bgl II) liegt stromaufwärts des invertierten DNA-Fragmentes 112 und weist keine Repeats auf. Es zeigte sich ein ähnliches Bandenmuster wie bei der Hybridisierung mit der DNA-Sonde von 112. Der Unterschied bestand in der Stärke der Hybridisierungssignale. Das dominierende Transkript hatte bei diesem Northern-Blot-Experiment eine Länge von 4,4 kb. Es könnte sein, daß es sich bei den detektierten Transkripten um Mitglieder einer Genfamilie, die sich in der Anzahl ihrer repetitiven DNA-Sequenzen unterscheiden, handelt. Die mRNA mit einer Länge von 2,2 kb repräsentiert den OGFR und verfügt über 11 Repeats. Die beiden anderen Transkripte (4,4 und 5,7 bzw. 7,0 kb) weisen wahrscheinlich weniger repetitive DNA-Abschnitte als 112 auf und zeigen deshalb schwächere Hybridisierungssignale. Die für 112 typischen, 4,4 kb und die 2,2 kb langen mRNAs scheinen in dem mit $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II) hybridisierten Bereich, der keine Repeats aufweist, über Bereiche großer Homologie zu verfügen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß sich die beiden Transkripte in der Anzahl ihrer repetitiven DNA-Sequenzen unterscheiden. Unklar bleibt, ob es sich bei der 4,4 kb langen mRNA um eine Isoform des murinen OGFR handelt. In 32D.C10 Zellen konnte die 5,7 kb lange mRNA lediglich sehr schwach und nur bei Verwendung der $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II) Sonde nachgewiesen werden. In murinen Geweben

konnten bei der Hybridisierung mit der Sequenz 112 Transkripte von 5,7 bzw. 7,0 kb detektiert werden. Wahrscheinlich beruht der Unterschied in der Nachweisbarkeit wie bereits vermutet auf einer abweichenden Anzahl an repetitiven DNA-Sequenzen, sowie auf einer Expression des Transkriptes in bestimmten Geweben. Auch hier bleibt die Frage offen, ob es sich bei den in murinen Geweben detektierten 5,7 bzw. 7,0 kb mRNAs um eine Spleißvariante des OGFR, oder um ein anderes Gen mit Teilen der repetitiven Sequenz 112 handelt.

Eine Hybridisierung des „Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN)TM Blot“ der Firma Clontech (s. 3.1.7.2, Abb. 3-18) mit dem ³²P-markierten λ 2-(Acc I, Bgl II)-DNA-Fragment zeigt mehr Signale als bei der Verwendung des radioaktiv markierten DNA-Fragmentes 112. Zusätzlich zu dem bereits identifizierten 6,0 kb Transkript konnten in Herz, Skelettmuskel, Niere und Leber weitere mRNAs verschiedener Länge nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um Gene, die in ihrer DNA-Sequenz das λ 2-(Acc I, Bgl II)-DNA-Fragment repräsentieren, nicht aber die in 112 enthaltenen Repeats. Die DNA-Sequenzen der beiden Sonden sind lediglich in dem 6,0 kb Transkript enthalten. Man kann davon ausgehen, daß es sich bei diesem um ein humanes Homolog des murinen OGFR handelt. Im Gegensatz zu dem von Zagon *et al.* (2000) identifizierten humanen OGFR, weist das hier detektierte Transkript nicht nur eine längere mRNA auf, sondern zeigt ein Hybridisierungssignal mit beiden ³²P-markierten DNA-Fragmenten. Folglich wurde ein humanes Transkript detektiert, das eine größere Homologie zu dem murinen OGFR als der bereits klonierte humane Opioid Wachstumsfaktor Rezeptor (Zagon *et al.* 2000) zeigt. Es scheint eine mRNA zu existieren, die die postulierte, die Struktur des OGFR betreffende, divergente Evolution (Zagon *et al.* 2000) nicht durchlaufen hat. Die genaue Sequenz und die Funktion dieses Transkriptes sind bisher noch unbekannt. Bei den anderen in diesen Geweben exprimierten mRNAs, könnte es sich um - durch divergente Evolution entstandene - Gene handeln. Sie haben möglicherweise im Laufe ihrer Entwicklung die in dem DNA-Fragment 112 enthaltenen Repeats verloren. Den Ergebnissen von Zagon *et al.* (2000) zufolge dürften sich die identifizierten Transkripte lediglich in ihrem C-Terminus unterscheiden, ihr N-terminales Ende müßte aber Bereiche großer Homologien aufweisen. Diese Hypothese wird durch die zusätzlichen Banden in Herz, Skelettmuskel, Niere und Leber nach Hybridisierung des humanen Northern Blot der Firma Clontech mit dem ³²P-markierten λ 2-(Acc I, Bgl II)-DNA-Fragment bestärkt. Die 2.4 kb lange mRNA in diesen Geweben dürfte dem von Zagon *et al.* (2000) klonierten humanen OGFR entsprechen.

Keine Signale konnten in Gehirn, Dickdarm, Thymus und Milz gezeigt werden. Es handelt sich dabei um Transkripte, die die in dem DNA-Fragment 112 repräsentierten Repeats, nicht aber die $\lambda 2$ -(Acc I, Bgl II)-DNA-Sequenz enthalten. Es scheint sich dabei um humane Homologe des DNA-Fragmentes 112, nicht aber um ein menschliches Äquivalent des murinen OGFR zu handeln. Ein weiteres Indiz für die Existenz weiterer Gene mit der repetitiven Sequenz 112 ist die Beobachtung, daß schon nach der ersten Hybridisierung der Filter mit dem ^{32}P -markierten DNA-Fragment 112 sehr viele eindeutig positive Klone zu verzeichnen waren. Es ist sehr wahrscheinlich, daß neben dem stark exprimierten OGFR noch andere, seltener exprimierte Gene mit diesen Repeats zu finden sind. Daher kann postuliert werden, daß 112 in verschiedenen Genen wieder zu finden ist. Im Laufe der Evolution könnten Gene entstanden sein, die diese repetitiven Sequenzen entweder in ihrem C- oder N-Terminus repräsentieren. Folglich ist das DNA-Fragment 112 in mehreren Genfamilien präsent. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung, daß Repeats meistens hoch konservierte DNA-Abschnitte sind, bestärkt (Ricke *et al.* 1995).

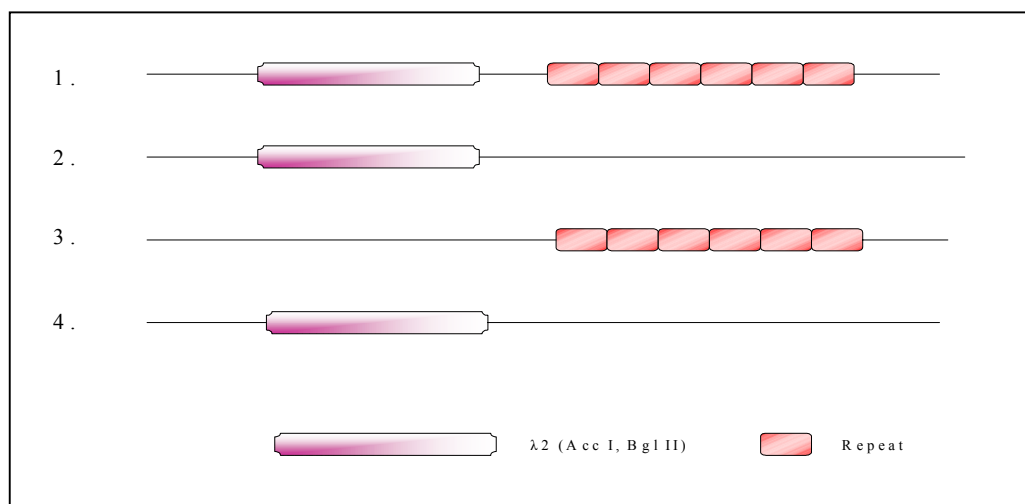


Abb 4-2. Schematische Darstellung der detektierten Transkripte. (1.) Die eingesetzte Sonde $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II) hybridisierte mit dem Transkript, das gleichzeitig auch mit der Sequenz 112 nachgewiesen werden konnte. Daher wird postuliert, daß diese mRNA sowohl über repetitive Sequenzen als auch über das Fragment $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II) verfügt. (2.) Der humane OGFR zeigte keine Homologien zu 112, aber zu $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II). Ein Sequenzvergleich zeigte, daß das 275 bp Fragment in den bp 126 bis 275 zu 77% mit denen des humanen OGFR identisch ist. (3.) Weitere Transkripte hybridisierten nur mit dem Fragment 112, nicht aber Sequenz der $\lambda 2$ (Acc I, Bgl II). Solche wurden in Gehirn, Dickdarm, Thymus und Milz nachgewiesen. (4.) In Herz, Skelettmuskel, Niere und Leber wurden mRNAs verschiedener Länge gezeigt. Diese waren mit der Sonde 112 nicht detektierbar.

4.1.7 Existiert das DNA-Fragment 112 in seiner ursprünglichen Leserichtung?

Bisher konnte das DNA-Fragment 112 nur in seiner umgekehrten Leserichtung ausfindig gemacht werden. Mit einer Antisensesonde der Sequenz 112, die Transkripte in Leserichtung des aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening stammenden cDNA-Klons erkennt, konnten keine mRNAs detektiert werden. Es wäre nicht verwunderlich gewesen, wenn mit der Antisensesonde ein Transkript entdeckt worden wäre, denn in letzter Zeit mehren sich die Berichte, daß Gene bidirektional transkribiert werden können. Diese stehen dabei unter der Kontrolle verschiedener Promotoren (Huelseweh *et al.* 1998). Huelseweh *et al.* (1998) fanden beim Screening einer Genbank von Rochen-Gonaden ein Antisensetranskript des Natrium/Phosphat Co-Transporters (NaPi II). Es hatte einen offenen Leserahmen von 204 bp. Dabei handelte es sich dabei um eine mRNA, die auf sehr niedrigem Level exprimiert wird und nach einer Datenbanksuche keine Ähnlichkeit zu anderen, zu diesem Zeitpunkt bekannten, Genen zeigte.

Es ist möglich, daß es sich bei dem DNA-Abschnitt 112 um einen Teil eines geprägten Gens handelt. In geprägten Genen wurden häufig hintereinander geschaltete repetitive Sequenzen nachgewiesen (Neumann *et al.* 1995). Es könnte also sein, daß die Sequenz 112 in ihrem Prägungsmuster von Gewebe zu Gewebe variiert und sich im Laufe der Entwicklung ändert. Es könnte folglich nur während der Embryonalentwicklung exprimiert sein.

Ferner ist es möglich, daß es sich bei 112 um einen Genabschnitt handelt, dessen Expression auf ein bestimmtes Entwicklungsstadium beschränkt ist (Kimelman *et al.* 1989, Hsieh-Li *et al.* 1995, Merzendorfer *et al.* 1997). Die kommerziellen Northern Blots wurden beide aus adulten Spezies gewonnen und hätten damit die Detektion eines embryonalen Gens verhindert. Da es sich bei der verwendeten cDNA-Bank um eine embryonale pVP16-cDNA-Bibliothek 9,5-10,5 Tage alter Mäuse (Hollenberg *et al.* 1995) handelt, können durchaus für Embryonen spezifische Gene als Interaktionspartner gefunden werden. Ein Northern Blot mit embryonalem Gewebe 9,5-10,5 Tage alter Mäuse, hybridisiert mit der bereits beschriebenen Antisensesonde könnte Hinweis auf die Existenz eines Gens in Leserichtung des aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screening stammenden cDNA-Klons geben. Nicht aber, wenn 112 Teil eines geprägten Gens ist. In diesem Fall würde das Screening einer genomischen DNA-Bank Aufschluß über die Existenz des gefundenen Interaktionspartners geben. Ebenfalls nicht mittels Northern Blot nachgewiesen werden

kann das DNA-Fragment 112 in seiner ursprünglichen Leserichtung, wenn es sich dabei um eine kryptische Sequenz handelt. Durch eine Mutation in dem entsprechenden Gen könnte der Spleißprozeß unterdrückt worden sein und 112, ein sehr kurzes Intron ohne kryptische Spleißstelle, wäre abgelesen worden und hätte so zu einer Übernahme der Intronsequenz in die reife mRNA geführt. Da eine solche Mutation nur in der Genbank präsent wäre, könnte 112 ebenfalls nicht mittels einer Antisensesonde auf einem Northern Blot nachgewiesen werden. Ferner ist es möglich, daß die Expression des DNA-Fragmentes 112 auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt ist. Dabei würde der Northern Blot keine ausreichend sensitive Methode darstellen. Selbst die Detektion seltener mRNA in bestimmten Zelltypen ist bei der Verwendung eines Blot verschiedener Gewebe schwierig, mitunter sogar nicht möglich. In diesem Fall könnte eine in-situ-Hybridisierung Aufschluß geben. Geeignet wären Mäuseembryonen verschiedener Entwicklungsstadien. Um weniger als 10-50 Kopien der Nukleinsäuresequenz 112 pro Zelle identifizieren zu können, bietet sich eine Hybridisierung des zu untersuchenden Gewebes mit Streptavidin-Nanogold-Silber an (Hacker 1998).

Nicht ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei dem Klon 112 um ein Produkt der Genbank-Klonierung handelt. Beim Herstellen dieser cDNA-Bibliothek wurden die DNA-Fragmente über Not-I-Linker in den pVP16-Expressionsvektor kloniert. Da sich an beiden Enden des cDNA-Fragmentes die selbe Restriktionsschnittstelle befindet, hängt die Richtung des Inserts vom Zufall ab. Diese Erklärung erscheint bei erster Betrachtung sehr plausibel und wäre deshalb zu favorisieren, aber gerade in neuster Zeit wird von repetitiven Sequenzen berichtet, die in beiden Richtungen abgelesen werden können (Danilevskaya *et al.* 1999). Auch im Rahmen der Entschlüsselung des Chromosom 21 wurden ebenfalls invertierte Repeats entdeckt, deren Funktion noch geklärt werden muß (Hattori *et al.* 2000).

4.1.8 Ist 112 ein potentieller Inhibitor des G-CSFR und dadurch von therapeutischem Nutzen?

Insgesamt wurde mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Genbank-Screenings ein Teil eines Proteins gefunden, das an den G-CSFR bindet. Unbekannt ist bis jetzt die Herkunft des Proteinabschnitts und sein dazugehöriges Gen. Ebenfalls nicht geklärt ist, ob 112 aufgrund seiner prolinreichen Proteinstruktur bindet, oder weil es ein natürlicher Interaktionspartner

des inaktiven G-CSFR ist. 112 bietet vielversprechende Möglichkeiten die Signaltransduktion des G-CSFR näher zu untersuchen. Es wurde ein Protein gefunden, das an den inaktiven G-CSFR bindet und somit Bindungsstellen für andere Signalmoleküle blockiert. Ein potentieller Inhibitor des G-CSFR könnte auch von therapeutischem Nutzen sein. Viele Tumorzellen des Kopf-Hals-Bereichs (Noda *et al.* 1999) oder auch Leukämiezellen (Souza *et al.* 1986) exprimieren den G-CSFR und können durch endogenes G-CSF zur Proliferation und somit zur Vermehrung des Tumormaterials angeregt werden. Bei Kopf-Hals-Karzinomen wurde beobachtet, daß G-CSF die Metastasierung fördert (Noda *et al.* 1999). Könnte man in diesen Zellen den G-CSFR gezielt blockieren, wäre eine Ausbreitung des Tumors zu verhindern. Bei dem Interaktionspartner 112 handelt es sich möglicherweise um ein biologisch aktives Peptid, das den G-CSFR inhibieren kann. Es wurde berichtet, daß innerhalb von Proteinmolekülen Peptide von ungefähr 15 Aminosäuren und ihren entsprechenden Antisensepeptiden existieren (Baranyi *et al.* 1995). Sense- und Antisensepeptide werden durch ca. 50 Aminosäurereste, einer sogenannten Antisense-Homologie-Box, voneinander getrennt, da beide Peptide aneinander binden können. Diese könnte bei der Faltung der Proteine eine Rolle spielen (Baranyi *et al.* 1995). Es wurde gezeigt, daß z.B. der menschliche Endothelin Rezeptor A eine solche Antisense-Homologie-Box besitzt und daß mittels dieser ein biologisch aktives Peptid, welches den Endothelin A Rezeptor blockiert, identifiziert werden konnte (Baranyi *et al.* 1995). Weitere Studien sollen zeigen, ob von der Proteindomäne 112 mehrere solche Peptide abgeleitet werden können und welches davon die größte inhibitorische Aktivität aufweist. Auch sein möglicher therapeutischer Nutzen wird erst noch erprobt werden müssen.

4.2 Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen

Die Bindung von G-CSF an seinen Rezeptor führt zu dessen Dimerisierung und anschließender Phosphorylierung. In diesem aktivierten Zustand übermitteln der G-CSFR Proliferations- und Differenzierungssignale (Nicola 1986; Demetri & Griffin 1991; Lieschke *et al.* 1994; Liu *et al.* 1998). Im Rahmen dieser Signaltransduktion spielen die einzelnen phosphorylierten Tyrosinreste eine besondere Rolle, in dem sie Andockstellen für Proteine mit SH2-Domänen bilden (Pawson 1995). Die Tyrosinreste 704 und 764 übermitteln vorwiegend Proliferationssignale, während die Tyrosinreste 729 und 744 STAT3 aktivieren und die Differenzierung zu Neutrophilen zur Folge haben (Ward *et al.* 1999a). Trotz dieses Kenntnis ist die Signaltransduktion des G-CSFR bisher nur wenig verstanden und hinkt deshalb anderen Rezeptorsystemen hinterher (Ward *et al.* 1999a). Aus diesem Grund war es von besonderem Interesse Bindungspartner des G-CSFR aufzufindig zu machen. Da mittels Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen nur bereits bekannte Signalmoleküle als Wechselwirkungspartner identifiziert werden können, wurde versucht möglichst viele Proteine, die bei der Signaltransduktion des G-CSFR eine Rolle spielen könnten, auf ihre Interaktion mit dem Rezeptor zu testen. Zur Untersuchung auf tyrosinabhängige Wechselwirkungen wurden die Fusionsproteine in *Epicurian Coli* TKX1 exprimiert, denn nach Induktion der Tyrosinkinase dieses Bakterienstammes werden die Tyrosinreste der G-CSFR phosphoryliert und bieten somit Andockstellen für Interaktionspartner des aktivierten Rezeptors. In allen Experimenten wurde sowohl die nicht-phosphorylierte, als auch die phosphorylierte zytoplasmatische Domäne des G-CSFR an GST gekoppelt, eingesetzt.

Als direkte Bindeproteine wurden bisher SHP-2, Grb2 und Shc identifiziert (Ward *et al.* 1999a). Außerdem wurde von Ward *et al.* (1999b) postuliert, daß STAT3 ebenfalls am G-CSFR binde. Sowohl Tyrosinrest 704, als auch 744 zeigen ein STAT3 Bindungsmotiv. Eine direkte Assoziation von STAT3 ohne Beteiligung von SH2-Domänen mit dem G-CSFR kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Möglich ist auch eine Wechselwirkung von STAT3 über Lyn (Ward *et al.* 1999b).

4.2.1 Überprüfung verschiedener Signalmoleküle auf ihre Interaktion mit dem G-CSFR

Im Rahmen dieser Arbeit wurden c-Abl, c-Src, Erk2, Grb2, Lyn, Sam68, Ship, SHP-1, Stat1, Stat5 und Tyk2 auf ihre Interaktion mit dem G-CSFR in 32D-Zellen überprüft: dabei zeigte nur Grb2 mit dem G-CSFR eine Wechselwirkung. Diese wurde von Ward *et al.* (1999a) bestätigt.

Lyn zeigt in Neutrophilen sowie in 32D.C10-Zellen nach G-CSF-Stimulation einen dosis- und zeitabhängigen Anstieg der Phosphorylierung und konnte darüber hinaus mit dem G-CSFR coimmunpräzipitiert werden; deshalb wird vermutet, daß Lyn konstitutiv mit dem G-CSFR assoziiert ist. Möglicherweise bindet Lyn, unabhängig vom Phosphorylierungsstatus des Rezeptors, über seine SH3-Domäne an die prolinreiche Region von Box 1 (Corey *et al.* 1994). Diese Daten stehen in Widerspruch zu denen von Yoshikawa *et al.* die in 32D.C10-Zellen, des gleichen Subklons keine Phosphorylierung der Lyn-Kinase detektieren konnten (Yoshikawa *et al.* 1995). Die GST-pull-down-Experimente konnten die Bindung von Lyn in 32D-Zellen nicht bestätigen (s. 3.2.3, Abb. 3-22). Lyn wurde, wie erwartet, im Zellysat nachgewiesen, nicht aber als Interaktionspartner der verschiedenen GST-Fusionsproteine. Bei Lyn handelt es sich um eine vorwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimierte Tyrosinkinase der Src-Familie. Da beobachtet wurde, daß auch ein ubiquitäres Mitglied dieser Gruppe von Proteinkinasen, c-Src, bei der Signaltransduktion des G-CSFR eine Rolle spielt, wurde es auf seine Interaktion mit den GST-Fusionsproteinen überprüft (Desphande *et al.* 1997). Auch hier konnte keine Wechselwirkung mit dem G-CSFR nachgewiesen werden (s. 3.2.3, Abb. 3-22).

Sam68 wurde auf seine Interaktion mit dem G-CSFR überprüft, weil es mit Proteinen, die bei der Signaltransduktion des G-CSFR von Bedeutung sind coimmunpräzipitiert wurde. Zu diesen zählen u.a. SHP-1, p85 der PI3-Kinase und Grb2 (Taylor *et al.* 1995, Fusaki *et al.* 1997). Eine direkte Assoziation mit dem G-CSFR konnte jedoch nicht beobachtet werden (s. 3.2.3, Abb. 3-22), so daß Sam68 – falls es im Rahmen der Signaltransduktion des G-CSFR von Bedeutung ist – nur über seine direkte Wechselwirkung mit Mitgliedern der Src Tyrosinkinase-Familie oder mit den oben genannten Proteinen, wie z.B. mit Grb2, an der Signalweiterleitung teilnimmt.

Auch die Interaktion mit einer weiteren Tyrosinkinase, c-Abl, konnte nicht detektiert werden (s. 3.2.3, Abb. 3-22).

Anfangs wurde SHIP nur in reifen Zellen des Blutes entdeckt. Mittlerweile ist bekannt, daß SHIP in allen Zellpopulationen des Blutes exprimiert wird (Geier *et al.* 1997). Hunter *et al.* (1998) postulierten, daß SHIP die primären Substrate der PI3-Kinase hydrolysiert und somit bei der Signaltransduktion des G-CSFR als negativer Regulator mitogener Signale fungieren könne. SHIP ließ sich mit Shc copräzipitieren, so daß davon ausgegangen wurde, daß die beiden Proteine zusammen einen Komplex bilden und über Shc an Tyrosinrest 764 am G-CSFR binden. Eine direkte Bindung von SHIP konnte anhand der Daten nicht ausgeschlossen werden (s. 3.2.3, Abb. 3-22). In Übereinstimmung mit der Theorie von Hunter *et al.* (1998) zeigten die GST-Bindungsstudien keine Bindung von SHIP am G-CSFR.

Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg gilt als einer der Hauptmechanismen der zellulären Antwort auf Zytokine. Bis heute wurden in Säugern vier JAKs (JAK1-3 und Tyk2) und sieben STATs (STAT1-6, darunter STAT5A und STAT5B) identifiziert. Mit dem G-CSFR wurden folgende Moleküle des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges in Verbindung gebracht: JAK1, JAK2, Tyk2, STAT1, STAT3 und STAT5 (Avalos *et al.* 1997). Die GST-pull-down-Experimente ergaben jedoch keine Assoziation mit den GST-Fusionsproteinen des G-CSFR. Weitere untersuchte Proteine des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges waren STAT1 und STAT5. Da die JAK1-3 mit STAT5 (5A und 5B) interagieren könnten, wurde STAT5 auf seine Wechselwirkung mit dem G-CSFR überprüft. Es sollte verifiziert werden, ob STAT5 auch unabhängig von JAK2 mit den Rezeptorvarianten interagieren kann; dabei konnte aber keine STAT5-Bindung am G-CSFR detektiert werden (s. 3.2.3, Abb. 3-22). Auch eine Interaktion mit STAT1 konnte nicht nachgewiesen werden (s. 3.2.3, Abb. 3-22), so daß lediglich STAT3 an den G-CSFR zu binden scheint (Ward *et al.* 1999b).

Signaltransduktionswege der MAP Kinasen spielen eine entscheidende Rolle bei der Zytokin-abhängigen Regulation von Zellwachstum und Differenzierung. Ferner konnte gezeigt werden, daß ERK-MAP Kinasen die Transkriptionsaktivität von STAT3 und somit den JAK/STAT-Signalweg beeinflussen (Chung *et al.* 1997). Da diese Signalmoleküle down-

stream von GTP bindenden Proteinen fungieren, konnte gemäß den Erwartungen keine Wechselwirkung mit dem G-CSFR gezeigt werden (s. 3.2.3, Abb. 3-22).

SHP-1 und SHP-2 sind Protein-Tyrosin-Phosphatasen, die bei der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren eine wichtige Rolle spielen (Vogel *et al.* 1993). SHP-1 wird vorwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert, während SHP-2 ubiquitär verbreitet ist (Stein-Gerlach *et al.* 1998). Es konnte gezeigt werden, daß diese beiden Phosphatasen bei der Signaltransduktion des G-CSFR von Bedeutung sind (Tidow *et al.* 1999). Tidow *et al.* (1999) stellten in Patienten mit Kostmann-Syndrom eine Überexpression von SHP-1 und SHP-2 unter Beweis. Diese könnte sowohl die Ursache, als auch die Folge des erblichen Mangels an Neutrophilen sein. Ward *et al.* (1999a) konnten zeigen, daß SHP-2 über seine SH2-Domäne an den G-CSFR zu binden vermag. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, ob SHP-1 ebenfalls mit den GST-Fusionsproteinen interagiert. Mittels GST-Bindungsstudien konnte keine Wechselwirkung mit dem G-CSFR beobachtet werden (s. 3.2.3, Abb. 3-22).

4.2.2 Grb2 bindet an Tyrosinrest 764 des G-CSFR

Als Bindungspartner des G-CSFR wurde Grb2 identifiziert. Es wurde eine Interaktion mit den phosphorylierten Fusionsproteinen GST-704 und GST-Ende detektiert, erwartungsgemäß nicht mit der Negativkontrolle GST (s. 3.2.3.1, Abb. 3-23). Bis zu diesem Zeitpunkt war bekannt, daß Grb2 mit Shc, SHP-2, p90, SOS und p145 Komplexe bilden kann (De Koning *et al.* 1996) und bei der Übermittlung proliferativer Signale eine entscheidende Rolle spielt (Barge 1996). Nachdem die Bindung von Grb2 an den G-CSFR gezeigt werden konnte, wurde seine Bindungsstelle analysiert. Dazu wurden Mutanten der zytosomatischen Domäne des G-CSFR generiert und dabei jeder Tyrosinrest einzeln mutiert (s. 3.2.3.2, Abb. 3-24). Pull-down-Experimente mit diesen Mutanten ergaben, daß Grb2 an Tyrosinrest 764 bindet (s. 3.2.3.2, Abb. 3-25). Die Tatsache, daß in diesem Versuchsansatz trotzdem Banden zu sehen sind, beruht auf einer Hybridisierung des Antikörpers mit dem GST-Anteil des Fusionsproteins. Bei diesem Grb2-Antikörper handelt es sich um eine andere Charge der Firma Upstate.

Mittels dieser GST-Bindungsstudien wurde in Übereinstimmung mit den Daten von Ward *et al.* (1999a) gezeigt, daß Grb2 am phosphorylierten Tyrosinrest 764 bindet. Ferner konnte die Bindung zahlreicher Proteine, die bei der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren eine Rolle spielen, ausgeschlossen werden.

4.2.3 Sind weitere Bindeproteine des G-CSFR zu erwarten?

Um weitere Aussagen über die Signaltransduktion des G-CSFR machen zu können, wurden sowohl 32D-, als auch FDC-P1 mac11-Zellen metabolisch markiert und anschließend mit phosphorylierten und nicht-phosphorylierten GST-Ende inkubiert. Die Analyse der gebundenen Proteine zeigte in 32D-Zellen zwei und in FDC-P1 mac11-Zellen vier Proteine, die ausschließlich an den tyrosinphosphorylierten G-CSFR binden. Die beiden gemeinsamen Wechselwirkungspartner hatten ein Molekulargewicht von 26 und 71 kD. Die weiteren, nur in FDC-P1 mac11-Zellen dargestellten Bindeproteine, zeigten auf dem Autoradiogramm eine Bande bei 65 und 96 kD. Bei dem 26 kD Protein könnte es sich um das bereits als Interaktionspartner identifizierte Adaptermolekül Grb2 handeln.

Mit diesem Experiment konnte ein Überblick über weitere Wechselwirkungspartner des G-CSFR gewonnen werden. Die Ergebnisse zeigen auch, daß es in FDC-P1 mac11-Zellen mehr Bindeproteine als in 32D-Zellen gibt. Dies deutet darauf hin, daß der G-CSFR in den untersuchten Zelllinien verschiedene Signalwege verwendet. Eine zelltypische Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege wurde bereits von Koay *et al.* (1999) vermutet.

Diese drei Proteine sind interessante Kandidaten für eine Aufreinigung und anschließende Mikrosequenzierung. Mit ihnen können weitere Interaktionspartner in der Signaltransduktion des G-CSFR identifiziert werden.

5 Literaturverzeichnis

Alexander WS, Starr R, Metcalf D, Nicholson SE, Farley A, Elefanty AG, Brysha M, Kile BT, Richardson R, Baca M, Zhang JG, Willson TA, Viney EM, Sprigg NS, Rakar S, Corbin J, Mifsud S, DiRago L, Cary D, Nicola NA, Hilton DJ. 1999. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol.* 66: 588-592.

Avalos BR. 1996. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood.* 88: 761-777.

Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C, Quan SG, Baldwin GC, Weisbart RH, Williams RE, Golde DW, DiPersio JF. 1990. Human granulocyte colony-stimulating factor: Biological activities and receptor characterisation on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood.* 75: 851-857.

Avalos BR, Hunter MG, Parker JM, Ceselski SK, Druker BJ, Corey SJ, Mehta VB. 1995. Point mutations in the conserved box 1 region inactivate the human granulocyte colony-stimulating factor receptor for growth signal transduction and tyrosine phosphorylation of p75c-rel. *Blood.* 85: 1079-3126.

Avalos BR, Parker JM, Ware DA, Hunter MG, Sibert KA, Druker BJ. 1997. Dissociation of the Jak kinase pathway from G-CSF receptor signaling in neutrophils. *Exp Hematol.* 25: 160-168.

Baranyi L, Campbell W, Ohshima , Fujimoto S, Boros M, Okada H. 1995. The antisense homology box: a new motif within proteins that encodes biologically active peptides. *Nat Med.* 1: 894-901.

Barge RM, de Koning JP, Pouwels K, Dong F, Lowenberg B, Touw IP. 1996. Tryptophan 650 of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor, implicated in the activation of JAK2, is also required for G-CSF-mediated activation of signaling complexes of the p21ras route. *Blood.* 87: 2148-2153.

Begley CG, Lopez AF, Nicola NA, Warren DJ, Vadas MA, Sanderson CJ, Metcalf D. 1986. Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. *Blood.* 68: 162-166.

Begley CG, Metcalf D, Nicola NA. 1988. Binding characteristics and proliferative action of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal and leukemic human promyelocytes. *Exp Hematol.* 16: 71-79.

Begley CG, Nicola NA. 1999. Resolving conflicting signals: cross inhibition of cytokine signaling pathways. *Blood*. 93: 1443-1447. Bernard T, Gale RE, Linch DC. 1996. Analysis of granulocyte colony stimulating factor receptor isoforms, polymorphisms and mutations in normal haemopoietic cells and acute myeloid leukaemia blasts. *Br J Haematol*. 93: 527-533.

Bonilla MA, Gillio AP, Ruggeiro M, Kernan NA, Brochstein JA, Abboud M, Fumagalli L, Vincent M, Gabrilove JL, Welte K, Souza LM, O'Reilly RJ. 1989. Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with congenital agranulocytosis. *N Engl J Med*. 320: 1574-1580.

Bonilla MA, Dale D, Zeidler C, Last L, Reiter A, Ruggeiro M, Davis M, Koci B, Hammond W, Gillio A, Welte K. 1994. Long-term safety of treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (r-metHuG-CSF) in patients with severe congenital neutropenias. *Br J Haematol*. 88: 723-730.

Bronchud MH, Potter Mr, Morgenstern G, Blasco MJ, Scarffe JH, Thatcher N, Crowther D, Souza LM, Alton NK, Testa NG, Dexter TM. 1988. In vitro and in vivo analysis of the effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor in patients. *Br J Cancer*. 58: 64-69.

Burnette WN. 1990. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *A Anal Biochem*. 112: 195-203.

Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell CJ, Aglietta M, Arese P, Mantovani A. 1989. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*. 337: 471-473.

Callhoun DA, Donnelly WH Jr, Du Y, Dame JB, Li Y, Christensen RD. 1999. Distribution of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and G-CSF-receptor mRNA and protein in the human fetus. *Pediatr Res* 46: 333-338.

Caracciolo D, Clark SC, Rovera G. 1989. Human interleukin 6 supports granulocytic differentiation of hematopoietic progenitor cells and acts synergistically with GM-CSF. *Blood*. 73: 666-670.

Chakraborty A, Dyer KF, Cascio M, Mietzner TA, Tweardy DJ. 1999. Identification of a novel Stat3 recruitment and activation motif within the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*. 93: 15-24.

Chien C-T, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. 1991. The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Sci USA*. 88: 9578-9582.

Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ, Warriar RR, Presky DH, Levine JF, Gately MK, Gubler U. 1994. Expression cloning of a human interleukin-12 receptor component: A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp 130. *J Immunol*. 153: 128-136.

Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. 1997. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 17: 6508-6516.

Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 69: 2110-2114.

Corey SJ, Burkhardt AL, Bolen JB, Geahlen RL, Tkatch LS, Tweardy DJ. 1994. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with Lyn and Syk protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 4683-4687.

Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March CJ. 1990. A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci.* 15: 265-269.

Dale DC, Bonilla MA, Davis MW, Nakanishi AM, Hammond WP, Kurtzberg J, Wang W, Jakubowski A, Winton E, Lalezari P, Robinson W, Glaspy JA, Emerson S, Gabilove JL, Vincent M, Boxer LA. 1993. A randomized controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (Filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood.* 81: 2496-2502.

Danilevskaya ON, Traverse KL, Hogan NC, DeBaryshe PG, Pardue ML. 1999. The two *Drosophila* telomeric transposable elements have very different patterns of transcription. *Mol Cell Biol.* 19: 873-881.

Demetri GD, Griffin JD. 1991. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood.* 78: 2791-2808.

Desphande RV, Perterson RHF, Moore MAS. 1997. Protein tyrosine kinases in granulocyte colony stimulating factor receptor signal transduction, myeloid cell proliferation, and neutrophil activation. *Life Sciences* 60: 587-604.

Dong F, van Buitenen C, Pouwels K, Hoefsloot LH, Lowenberg B, Touw IP. 1993. Distinct cytoplasmic regions of the human granulocyte colony-stimulating factor receptor involved in induction of proliferation and maturation. *Mol Cell Biol.* 13: 7774-7781.

Dong F, Hoefsloot LH, Schelen AM, Broeders LCAM, Meijer Y, Veerman AJP, Touw I, Löwenberg B. 1994. Identification of a nonsense mutation in the granulocyte colony stimulating factor receptor in severe congenital neutropenia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 4480-4484.

Dong F, Brynes RK, Tidow N, Welte K, Löwenberg B, Touw I. 1995a. Mutations in the gene for the granulocyte colony stimulating factor receptor in patients with acute myeloid leukemia preceded by severe congenital neutropenia. *N Engl J Med.* 333: 487-493.

Dong F, van Paassen M, van Buitenen C, Hoefsloot LH, Löwenberg B, Touw I. 1995b. A point mutation in the granulocyte colony stimulating factor receptor (G-CSF-R) gene in a case of acute myeloid leukemia results in the overexpression of a novel G-CSF-R isoform. *Blood.* 85: 902-911.

- Dong F, Dale DC, Bonilla MA, Freedman M, Fasth A, Neijens HJ, Palmbad J, Briars GL, Carlsson G, Veerman AJP, Welte K, Löwenberg B, Touw I. 1997. Mutations in the granulocyte colony-stimulating factor receptor gene in patients with severe congenital neutropenia. *Leukemia*. 11: 120-125.
- Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA. 1993. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*. 363: 45-51.
- Feming TJ, Fleming ML, Malek TR. 1993. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. *J Immunol*. 151: 2399-2408.
- Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 1989. 340: 245-246.
- Freedman MH, Bonilla MA, Fier C, Bolyard AA, Scarlata D, Boxer LA, Brown S, Cham B, Kannourakis G, Kinsey SE, Mori PG, Cottle T, Welte K, Dale DC. 2000. Myelodysplasia syndrome and acute myeloid leukemia in patients with congenital neutropenia receiving G-CSF therapy. *Blood*. 96:429-36.
- Fuchs E, Segre JA. 2000. Stem cells: a new lease on life. *Cell*. 100: 143-155
- Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Seto Y, Nagata S. 1990. Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Cell*. 61: 341-350.
- Fukunaga R, Seto Y, Mizushima S, Nagata S. 1990. Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 8702-8706.
- Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Pan C-X, Seto Y, Nagata S. 1991. Functional domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *EMBO J*. 10: 2855-2865.
- Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Nagata S. 1993. Growth and differentiation signals mediated by the cytoplasmic domain of granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Cell*. 74: 1079-1087.
- Fusaki N, Iwamatsu A, Iwashima M, Fujisawa J-I. 1997. Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling. *J Biol Chem*. 272: 6214-6219.
- Gabrilove JL, Jakubowski A, Fain K, Grous J, Scher H, Sternberg C, Yagoda A, Clarkson B, Bonilla MA, Oettgen HF, Alton NK, Boone TC, Altrock B, Welte K, Souza LM. 1988. Phase I study of granulocyte colony-stimulating factor in patients with transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Clin Invest*. 82: 1454-1461.
- Geier SJ, Algate PA, Carlberg K, Flowers D, Friedmann C, Trask B, Rohrschneider LR. 1997. The human SHIP gene is differentially expressed in cell lineages of the bone marrow and blood. *Blood*. 89: 1876-1885.

Gillio AP, Bonilla MA, Potter GK, Gabrilove JL, O'Reilly RJ, Souza LM, Welte K. 1987. Effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor of hematopoietic reconstitution after autologous bone marrow transplantation in primates. *Transplant Proc.* 19: 153-156.

Gliniak BC, Rohrschneider LR. 1990. Expression of M-CSF receptor is controlled posttranscriptionally by the dominant actions of GM-CSF or multi-CSF. *Cell.* 63: 1073-1083.

Hacker GW. 1998. High performance Nanogold-silver in situ hybridisation. *Eur J Histochem.* 42: 111-20.

Hammond WP, Price TH, Souza LM, Dale DC. 1989. Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor receptor. *New Eng J Med.* 320: 1306-1311.

Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park H-S, Toyoda A, Ishii K, Totoki Y, Choi D-K, Soeda E, Ohki M, Takagi T, Sakaki Y, Taudien S, Blehschmidt K, Polley A, Menzel U, Delabar J, Kumpf K, Lehmann R, Patterson D, Reichwald K, Rump A, Schillhabel M, Schudy A, Zimmermann W, Rosenthal A, Kudoh J, Shibuya K, Kawasaki K, Asakawa S, Shintani A, Sasaki T, Nagamine K, Mitsuyama S, Antonarakis SE, Minoshima S, Shimizu N, Nordsiek G, Hornischer K, Brandt P, Scharfe M, Schön O, Desario A, Reichelt J, Kauer G, Blöcker H, Ramser J, Beck A, Klages S, Hennig S, Riesselmann L, Dagand E, Haaf T, Wehrmeyer S, Borzym K, Gardiner K, Nizetic D, Francis F, Lehrach H, Reinhardt R, Yaspo M-L. 2000. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature.* 405: 311-319.

Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T. 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp 130. *Cell.* 63: 1149-1157.

Hilton DJ, Hilton AA, Raicevic A, Rakar S, Harrison-Smith M, Gough NM, Begley CG, Metcalf D, Nicola NA, Willson TA. 1994. Cloning of murine IL-11 receptor α -chain: Requirement for high affinity binding and signal transduction. *EMBO J.* 13: 4765-4775.

Hilton DJ, Hilton AA, Raicevic A, Rakar S, Harrison-Smith M, Gough NM, Begley CG, de Koning JP, Schelen AM, Dong F, van Buitenen C, Burgering BM, Bos JL, Lowenberg B, Touw IP. 1996. Specific involvement of tyrosine 764 of human granulocyte colony-stimulating factor receptor in signal transduction mediated by p145/Shc/GRB2 or p90/GRB2 complexes. *Blood.* 87: 132-140.

Hollenberg SM, Sternglanz R, Cheng PF, Weintraub H. 1995. Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol Cell Biol.* 15: 3813-3822.

Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M, Branford W, Li H, Small K, Potter SS. 1995. Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development.* 121: 1373-1385.

Huelseweh B, Kohl B, Hentschel H, Kinne RK, Werner A. 1998. Translated anti-sense product of the Na/phosphate co-transporter (NaPi-II). *Biochem J.* 332: 483-489.

- Hunter MG, Avalos BR. 1998. Phosphatidylinositol 3'-kinase and SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) are recruited by distinct positive and negative growth-regulatory domains in the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J Immunol.* 160: 4979-4987.
- Ihle JN. 1995. Cytokine receptor signalling. *Nature.* 377: 591-594.
- Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Thierfelder WE, Kreider B, Silvennoinen O. 1994. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci.* 19: 222-227.
- Ihle JN, Kerr IM. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 11: 69 -74.
- Ikebuchi K, Wong GC, Clark SC, Ihle N, Hirai Y, Ogawa M. 1987. Interleukin 6 enhancement of Interleukin 3-dependent proliferation of multi potential hematopoietic progenitors. *Proc Natl Sci USA.* 84: 9035-9039.
- Isfort RJ, Ihle JN. 1990. Multiple hematopoietic growth factors signal through tyrosine phosphorylation. *Growth factors.* 2: 213-220.
- Jakubowski AA, Souza LM, Kelly F, Fain K, Budman D, Clarkson B, Bonilla MA, Moore MAS, Gabilove JL. 1989. Effects of human granulocyte colony-stimulating factor in a patient with idiopathic neutropenia. *N Engl J Med.* 320: 38-42.
- Kaushanski K, Lin N, Adamson JW. 1988. Interleukin-1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. *J Clin Invest.* 81: 87-92 .
- Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, Abe H, Hirai M, Kurosawa S, Mori M, Fukushima M. 1990. Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood.* 76: 1962-1964.
- Keegan K, Cooper JA. 1996. Use of the two hybrid system to detect the association of the protein-tyrosine-phosphatase, SHPTP2, with another SH2-containing protein, Grb7. *Oncogene.* 12: 1537-1544.
- Kimelman D, Kirschner MW. 1989. An antisense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in *Xenopus* oocytes. *Cell.* 59: 687-696.
- Kishimoto T, Taga T, Akira S. 1992. Il-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science.* 258: 593-597.
- Kishimoto T, Taga T, Akira S. 1994. Cytokine signal transduction. *Cell.* 76: 253-262.
- Koay DC, Sartorelli AC. 1999. Functional differentiation signals mediated by distinct regions of the cytoplasmic domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood.* 93: 3774-3784.

- Koch A, Mancini A, Stefan M, Niedenthal R, Niemann H, Tamura T. 2000. Direct interaction of nerve growth factor receptor, TrkA, with non-receptor tyrosine kinase, c-Abl, through the activation loop. *FEBS Lett* 469: 72-76.
- Kondo M, Weissmann IL, Akashi K. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 91: 661-672
- de Koning JP, Soede-Bobok AA, Schelen AM, Smith L, van Leeuwen D, santini V, Burgering BMT, Bos JL, Löwenberg B, Touw IP. 1996. Proliferation signaling and activation of Shc, p21Ras, and Myc via tyrosine 764 of human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*. 91: 1924-1933
- Kostmann R. 1956. Infantile genetic agranulocytosis. *Acta Paediatr Scand*. 45: 1-78 (suppl 105).
- Kostmann R. 1975. Infantile genetic agranulocytosis. A review with presentation of ten new cases. *Acta Paediatr Scand*. 64: 362-368.
- Kyas U, Pietsch T, Welte K. 1992. Expression of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on neutrophils from patients with severe congenital neutropenia and cyclic neutropenia. *Blood*. 79: 1144-1147.
- Khyse-Andersen J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. 10: 203-209.
- Lämmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larsen A, Davis T, Curtis BM, Gimpel S, Sims JE, Cosman D, Park L, Sorensen E, March CJ, Smith CA. 1990. Expression cloning of a human granulocyte colony-stimulating factor receptor: a structural mosaic of hematopoietin receptor, immunoglobulin, and fibronectin domains. *J Exp Med*. 172: 1559-1570.
- Lemischka I. 1999. The power of stem cells reconsidered? *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 14193-14195.
- Li J, Koay DC, Xiao H, Sartorelli AC. 1993. Regulation of the differentiation of WEHI-3B D⁺ leukemia cells by granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J Cell Biol*. 120: 1481-1489.
- Li J, Koay DC, Sartorelli AC. 1994. Evidence for the glycosylation of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 205: 238-244.
- Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B, Schlessinger J. 1993. Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*. 363:85-88.

Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR. 1994. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilisation. *Blood*. 84: 1737-1746.

Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA. 1998. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol*. 10: 271-278.

Lopez AF, Dyson PG, To LB, Elliott MJ, Milton SF, Russell JA, Juttner CA, Yang Y-C, Clark S, Vadas MA. 1988. Recombinant human interleukin-3 stimulation of hematopoiesis in humans: Loss of responsiveness with differentiation in the neutrophilic myeloid series. *Blood*. 72: 1797-1804.

Lopez AF, Eglinton JM, Gillis D, Park LS, Clark S, Vadas MA. 1989. Reciprocal inhibition of binding between interleukin-3 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor to human eosinophils. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 7022-7026.

Lopez-Rodriguez C, Zubiaur M, Sancho J, Concha A, Corbi AL. 1997. An octamer element functions as a regulatory element in the differentiation-responsive CD11c integrin gene promoter: OCT-2 inducibility during myelomonocytic differentiation. *J Immunol*. 158: 5833-5840.

Mempel K, Pietsch T, Menzel T, Zeidler C, Welte K. 1991. Increased serum levels of granulocyte colony-stimulating factor in patients with severe congenital neutropenia. *Blood*. 77: 1919-1922

Merzendorfer H, Harvey WR, Wieczorek H. 1997. Sense and antisense RNA for the membrane associated 40 kDa subunit M40 of the insect V-ATPase. *FEBS Lett*. 411: 239-244.

Metcalf D. 1989. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haematopoietic cells. *Nature*. 339: 27-30.

Metcalf D. 1991. Control of granulocytes and makrophages: molecular, cellular, and clinical aspects. *Science*. 254: 529-533.

Miyajima A, Mui ALF, Ogorochi T, Sakamaki K. 1993. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. *Blood*. 82:1960-1974.

Molineux G, Migdalska A, Szmitowski M, Zsebo K, Dexter TM. 1991. The effects on hematopoiesis of recombinant stem cell factor (ligand for c-kit) administered in vivo to mice either alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 78: 961-966.

Morstyn G, Campbell L, Souza LM, Alton NK, Keech J, Green M, Sheridan W, Metcalf D, Fox RM. 1988a. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet*. 1: 667-672.

- Morstyn G, Campbell L, Duhrsen J, Souza LM, Alton NK, Villeval JL, Nicola NA, Boyd AW, Kannourakis G, Cebon J, Green M, Sheridan W, Metcalf D, Fox RM. 1988b. Clinical studies with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in patients receiving cytotoxic chemotherapy. *Behring Inst Mitt.* 83: 234-239.
- Morstyn G, Campbell L, Lieschke G, Layton JE, Maher D, O'Connor M, Green M, Sheridan W, Vincent M, Alton NK, Souza LM, McGrath K, Fox RM. 1989. Treatment of chemotherapy-induced neutropenia by subcutaneously administered granulocyte colony-stimulating factor with optimization of dose and duration of therapy. *J Clin Oncol.* 7: 1554-1562.
- Mueller MM, Fusenig NE. 1999. Constitutive expression of G-CSF and GM-CSF in human skin carcinoma cells with functional consequence for tumor progression. *Int J Cancer.* 83: 780-789.
- Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasykawa K, Hamaguchi M, Toza T, Kishimoto T. 1991. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp 130 is conserved in cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 11349-11353.
- Neumann B, Kubicka P, Barlow DP. 1995. Characteristics of imprinted genes. *Nat Genet.* 9: 12-13.
- Nicholson SE, Novak U, Ziegler SF, Layton JE. 1995. Distinct regions of the granulocyte colony-stimulating factor receptor are required for tyrosine phosphorylation of the signaling molecules JAK2, Stat3, and p42, p44MAPK. *Blood.* 86: 3698-3704.
- Nicola NA, Peterson L. 1986. Identification of distinct receptors for two hematopoietic growth factors (granulocyte colony-stimulating factor and multipotential colony-stimulating factor) by chemical cross-linking. *J Biol Chem.* 261: 12384-12389.
- Noda I, Fujieda S, Ohtsubo T, Tsuzuki H, Tanaka N, Sunaga H, Saito H. 1999. Granulocyte-colony-stimulating factor enhances invasive potential of human head-and-neck-carcinoma cell lines. *Int J Cancer.* 80: 78-84.
- Parmely RT, Ogawa M, Darby CP, Spicer SS. 1975. Congenial neutropenia: neutrophil proliferation with abnormal maturation. *Blood.* 46: 723-734.
- Pawson T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature.* 373: 573-580.
- Platzer E, Welte K, Gabilove JL, Lu L, Harris P, Mertelsmann R, Moore MA. 1985. Biological activities of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor on normal and leukemic cells. *J Exp Med.* 162: 1788-1801.
- Rauprich P, Kasper B, Tidow N, Welte K. 1995. The protein tyrosine kinase JAK2 is activated in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia. *Blood.* 86: 4500-4505.
- Rausch O, Marshall CJ. 1997. Tyrosine 763 of the murine granulocyte colony-stimulating factor receptor mediates Ras-dependent activation of the JNK/SAPK mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol.* 17: 1170-1179.

- Renauld JC, Druetz C, Kermouni A, Houssiau F, Uyttenhove C, van Roost E, van Snick J. 1992. Expression cloning of the murine human interleukin 9 receptor cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 5690-5694.
- Ricke DO, Liu Q, Gostout B, Sommer SS. 1995. Nonrandom patterns of simple and cryptic triplet repeats in coding and noncoding sequences. *Genomics*. 26: 510-20.
- Salinovich O, Montelaro RC. 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 156: 341-347.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning – A laboratory manual*. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Semerad CL, Poursine-Laurent J, Liu F, Link DC. 1999. A role for G-CSF receptor signaling in the regulation of hematopoietic cell function but not lineage commitment or differentiation. *Immunity*. 11: 153-161.
- Souza LM, Boone TC, Gabilove JL, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, Chazin VR, Bruszewski J, Lu H, Chen KK, Barendt J, Platzer E, Moore MAS, Mertelsmann R, Welte K. 1986. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Effects of normal and leukemic myeloid cells. *Science*. 232: 61-65.
- Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD. 1995. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*. 267: 1349-1353.
- Stan AC, Walter GF, Welte K, Schneider B, Bona CA, Pietsch T. 1999. Expression of granulocyte colony-stimulating factor in recurrent glial tumors is inversely correlated with tumor progression. *J Neuroimmunol*. 94: 66-73.
- Stein-Gerlach M, Wallasch C, Ullrich A. 1998. SHP-2, SH2-containing protein tyrosine phosphatase-2. *Int J Biochem Cell Biol*. 30: 559-566 .
- Steinman RA und Twardy DJ. 1994. Granulocyte colony-stimulating factor receptor mRNA upregulation is an immediate early marker of myeloid differentiation and exhibits dysfunctional regulation in leukemic cells. *Blood*. 83: 119-127.
- Suda T, Yamaguchi Y, Suda J, Miura Y, Okano A, Akiyama Y. 1988. Effect of interleukin-6 (IL-6) on the differentiation and proliferation of murine and human hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*. 16: 891-895.
- Sudol M. 1998. From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *Oncogene*. 17: 1469-1474.
- Taniguchi T. 1995. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*. 268: 251-255.
- Taylor SJ, Anafi M, Pawson T, Shalloway D. 1995. Functional interaction between c-src and its mitotic target, Sam68. *J Biol Chem*. 270: 10120-10124.

- Tidow N, Welte K. 1997. Advances in understanding postreceptor signaling in response to granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol.* 4: 171-175.
- Tidow N, Pilz C, Teichmann B, Müller-Brechlin A, Germeshausen M, Kasper B, Rauprich P, Sykora K.-W., Welte K. 1997a. Clinical relevance of point mutations in the cytoplasmic domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor gene in patients with severe congenital neutropenia. *Blood.* 89: 2369-2375.
- Tidow N, Kasper B, Welte K. 1999. SH2-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 are dramatically increased at the protein level in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia (Kostmann's syndrome). *Exp Hematol.* 27: 1038-1045.
- Tovey ER und Baldo BA. 1987. Comparison of semi-dry and convenient tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Electrophoresis* 8: 384-387.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 4350-4354.
- Ulich TR, del Castillo J, McNiece IK, Yi ES, Alzona CP, Yin SM, Zsebo KM. 1991. Stem cell factor in combination with granulocyte colony-stimulating factor (CSF) or granulocyte-macrophage CSF synergistically increases granulopoiesis in vivo. *Blood.* 78: 1954-1962.
- Uzumaki U, Okabe T, Sasaki N, Hagiwara K, Takaku F, Tobita M, Yasukawa K, Ito S, Umezawa Y. 1989. Identification and characterisation of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 9323-9326.
- Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht S, Souyri M. 1992. Molecular cloning and characterisation of MPL, the human homolog of the v-mpl superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 5640-5644.
- Vogel W, Lammers R, Huang J, Ullrich A. 1999. Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Exp Hematol.* 27: 1038-1045.
- Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. 1993. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell.* 74: 205-214.
- Ward AC, Smith L, de Koning JP, van Aesch Y, Touw IP. 1999a. Multiple signals mediate proliferation, differentiation, and survival from the granulocyte colony-stimulating factor receptor in myeloid 32D cells. *J Biol Chem.* 274: 14956-14962.
- Ward AC, Hermans MH, Smith L, van Aesch YM, Schelen AM, Antonissen C, Touw IP. 1999b. Tyrosine-dependent and -independent mechanisms of STAT3 activation by the human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor are differentially utilized depending on G-CSF concentration. *Blood.* 93: 113-124.

- Ward AC, van Aesch YM, Gits J, Schelen AM, de Koning JP, van Leeuwen D, Freedman MH, Touw IP. 1999c. Novel point mutation in the extracellular domain of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor in a case of severe congenital neutropenia hyporesponsive to G-CSF treatment. *J Exp Med.* 190: 497-507.
- Ward AC, van Aesch YM, Schelen AM, Touw IP. 1999d. Defective internalization and sustained activation of truncated granulocyte colony-stimulating factor receptor found in severe congenital neutropenia/acute myeloid leukemia. *Blood.* 93: 447-458.
- Watari K, Asano S, Shirafuji N, Kodo H, Ozawa K, Takaku F, Kamachi S. 1989. Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. *Blood.* 73: 117-122.
- Weissmann IL. 2000. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 100: 157-168.
- Welte K, Platzer E, Lu L, Gabilove JL, Levi E, Mertelsmann R, Moore MAS. 1985. Purification and biochemical characterisation of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 1526-1530.
- Welte K, Bonilla MA, Gillio AP, Boone TC, Potter GK, Gabilove JL, Moore MAS, O'Reilly RJ, Souza LM. 1987. Recombinant human G-CSF: Effects of hematopoiesis in normal and cyclophosphamide treated primates. *J Exp Med.* 165: 941-948 .
- Welte K, Zeidler C, Reiter A, Muller W, Odenwald E, Souza LM, Riehm H. 1990. Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with severe congenital neutropenia. *Blood.* 75: 1056-1063.
- Welte K, Gabilove JL, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G. 1996. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood.* 88: 1907-1929.
- White SM, Ball ED, Ehmann WC, Rao AS, Tweardy DJ. 1998. Increased expression of the differentiation-defective granulocyte colony-stimulating factor receptor mRNA isoform in acute myelogenous leukemia. *Leukemia.* 12: 899-906.
- Yang F-C, Watanabe S, Tsuji K, Xu M-J, Kaneko A, Ebihara Y, Nakahata T. 1998. Human granulocyte colony-stimulating factor stimulates the in vitro development but not commitment of primitive multipotential progenitors from transgenic mice expressing the human G-CSF receptor. *Blood.* 92: 4632-4640.
- Ymer S, Tucker WQJ, Sanderson CJ, Hapel AJ, Campbell HD, Young IJ. 1985. Constitutive synthesis of interleukin-3 by leukaemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near the gene. *Nature.* 317: 255-258.
- Yoshikawa A, Murakami H und Nagata S. 1995. Distinct signal transduction through the tyrosine-containing domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *EMBO J.* 14: 5288-5296.

Zagon IS, Verderame MF, Allen SS, McLaughlin PJ. 1999. Cloning, sequencing, expression and function of a cDNA encoding a receptor for the opioid growth factor, [Met(5)]enkephalin. *Brain Res.* 849: 147-154.

Zagon IS, Verderame MF, Allen SS, McLaughlin PJ. 2000. Cloning, sequencing, chromosomal location, and function of cDNAs encoding an opioid growth factor receptor (OGFR) in humans. *Brain Res.* 856:75-83.

Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. 1993. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today.* 14: 121-125.

Zsebo KM, Yuschenkoff VN, Schiffer S, Chang D, McCall E, Dinarello CA, Brown MA, Altrock B, Bagby GC Jr. 1988. Vascular endothelial cells and granulopoiesis: interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF. *Blood.* 71: 99-103.

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. K. Welte gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung während der Arbeit. Herr Prof. Welte stand mir in zahlreichen Diskussionen beratend zur Seite und hat mich stets moralisch unterstützt.

Herrn Prof. Dr. W. Müller möchte ich dafür danken, daß er mir bei der Anfertigung meiner Arbeit Unterstützung entgegengebracht und sich sofort zur Begutachtung bereit erklärt hat.

Frau PD. Dr. T. Tamura-Niemann danke ich für die Bereitstellung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems, für ihre Diskussionsbereitschaft bezüglich der Charakterisierung der Interaktionspartner des G-CSFR, sowie für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes während dieser Zeit.

Frau Prof. Dr. R. Gerardy-Schahn und Herrn Prof. Dr. R.E. Schmidt möchte ich für ihre Unterstützung als Kobetreuer im Rahmen des Graduiertenkollegs meinen Dank aussprechen; in ihnen fand ich stets hilfreiche Ansprechpartner.

Dank möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tamura-Niemann, besonders aber Frau Monica Stefan, für ihre kollegiale Zusammenarbeit entgegenbringen.

Frau Nicole Wittner und Herr Karsten Heidrich unterstützten mich tatkräftig bei der Durchführung der FACS-Messungen. Für ihre enorme Hilfsbereitschaft bin ich sehr dankbar.

Frau Karin Flicka und Frau Bettina Sohns möchte ich für ihre Verbundenheit während der letzten drei Jahre danken. In ihnen fand ich stets eine Ansprechpartnerin.

Frau Elisabeth Dumont und Frau Elke Nüßeler danke ich dafür, daß sie mich während dieser Zeit mit fachlichen Beiträgen unterstützt haben.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern herzlich bedanken, sie standen mir in jeder Hinsicht zur Seite.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert und im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“ angefertigt.

Ihnen allen sei hiermit herzlich gedankt.

Lebenslauf

Name:	Andrea Mohr	
Geburtsdatum:	13.02.1972	
Geburtsort:	Brackenheim	
Familienstand:	ledig	
Schulbildung:	1978-1982 1982-1992	Grundschule in Remseck Gymnasium in Ludwigsburg,
Hochschulstudium:	Biologie 1992 1993 1994 1996 1996-1997 1997	Studium der Biologie an der Universität Hohenheim Fortsetzung des Biologiestudium an der Universität Ulm Vordiplom Diplomprüfungen Diplomarbeit „Isolierung, phänotypische Charakteri- sierung und Immunoblotting von Helicobacter-pylori- Lipopolysacchariden“ Abschluß: Diplom-Biologin
Promotion:	1997-2000	an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Abteilung Pädiatrische Hämatologie und Onkologie im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“.

Kongresse

A. *Mohr*, K. Welte, H. Niemann and T. Tamura. Identification of interactive proteins with the granulocyte colony-stimulating factor receptor. 10th AEK Symposium, Heidelberg, 24-26 March 1999. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Supplement to volume 125 (1999).

A. *Mohr*, K. Welte, A. Mancini, H. Niemann and T. Tamura. Identification of interaction partners of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. GBM Meeting, Hamburg, 5-8 September 1999. *Biological Chemistry Supplement to volume 380* (1999).

Publikationen

Stefan M, Koch A, Mancini A, *Mohr A*, Weidner KM, Niemann H, Tamura T. The SH2-containing inositol 5' phosphatase (SHIP)-1 binds to the multifunctional docking site of c-Met and potentiates hepatocyte-growth factor (HGF) induced branching tubulogenesis. *J. Biol. Chem.* In press.

Vorträge

Greifswald Mai 1998

Würzburg April 1999

Ulm März 2000

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel sowie die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Außerdem erkläre ich, daß diese Dissertation bisher noch nicht als Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Andrea Mohr

