Zentrum für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg

Direktorin: Professor Dr. Chica Schaller

Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern des Arg3.1-Proteins im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Béatrice Dorothée Mühlberger

aus Marburg/Lahn

Hamburg 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am 16. November 1999

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. Ch. Schaller

Korrefernt: -

Meiner Großmutter

Suzanne

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS 4

1 EINLEITUNG 7

1.1 DIE ROLLE DES HIPPOCAMPUS BEI LERN-UND GEDÄCHTNISPROZESSEN 7

1.2 LTP ALS ZELLULÄRES LERNMODELL IM SÄUGERGEHIRN 8

1.3 SYNAPTISCHE PLASTIZITÄT 9

1.4 LANGZEITGEDÄCHTNIS UND LTP SIND VON PROTEIN- UND RNA-SYNTHESE ABHÄNGIG 10

1.5 ARG3.1, EIN DURCH SYNAPTISCHE AKTIVITÄT REGULIERTES GEN 12

1.6 TWO-HYBRID-SYSTEM 13

2 MATERIAL 17

2.1 GERÄTE 17

2.2 CHEMIKALIEN 18

2.3 ZELLULOSE UND FILTERPAPIERE 20

2.4 ENZYME UND KITSYSTEME 20

2.5 ANTIKÖRPER 21

2.6 AGAROSE UND MEDIENKOMPONENTEN 21

2.7 PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN 22

2.8 BAKTERIENSTÄMME 26

2.9 HEFESTÄMME 27

2.10 PLASMIDE 28

2.11 CDNA-BANKEN 28

2.11.1 Beschreibung der cDNA-Bank pACTII-libIII 28

2.11.2 Beschreibung der cDNA-Bank pGAD10-lib 31

2.12 NUKLEINSÄUREN 31

2.12.1 Sequenzierprimer 31

2.12.2 weitere Nukleinsäuren 31

3 METHODEN 32

3.1 ISOLIERUNG UND MANIPULATION VON DNA 32

3.1.1 Restriktionsverdau 32

3.1.2 DNA-Gelelektrophorese 32

3.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 32

3.1.4 Ligation 33

3.1.5 Transformation 33
3.1.6 Selektion der positiven Klone 33
3.1.7 DNA-Isolierung 33
3.1.8 DNA-Sequenzierung 34
3.1.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 34
3.2 MANIPULATION AN HEFEZELLEN 35
3.2.1 Transfektion von Hefezellen 35
3.2.2 Transfektion der cDNA-Bank pACTII-libIII/pGAD10-lib in Hefe 35
3.2.3 Filterassay auf β-Galactosidaseaktivität 36
3.2.4 Cycloheximid-Selektion 37
3.2.5 Hefe-Paarungstest (Mating-Test) 37
3.2.6 Plasmidisolation aus Hefezellen 38
3.2.7 Metabolische Markierung von Hefezellen und Immunopräzipitation 38
3.3 AUFTRENNUNG UND IMMUNDETEKTION VON PROTEINEN 39
3.3.1 Elektrophorese in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen 39
3.3.2 Immunchemischer Proteinnachweis mittels Western-Blot 40
3.4 PROTEINGEWINNUNG UND ANTIKÖRPERHERSTELLUNG 40
3.4.1 Expression und Aufreinigung von GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen 40
3.4.2 Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen das Arg3.1-Protein 41
3.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford 41

4 ERGEBNISSE 42

4.1 ERSTES HYBRID: ARG3.1-GAL4-DNA-BINDUNGSDOMÄNE 42
4.2 HERSTELLUNG DES PLASMIDS PAS1-CYH2-ARG3.1 43
4.3 ZWEITES HYBRID: CDNA-BANK-AKTIVIERUNGSDOMÄNE 44
4.4 HEFESTAMM CG-1945 45
4.5 HEFESTAMM Y-187 46
4.6 HERSTELLUNG DES ARG3.1-ANTIKÖRPERS 46
4.7 VORVERSUCHE 49
4.8 SCREENING 51
4.9 KASKADENSCHEMA DES TWO-HYBRID-SYSTEMS 52
4.10 SCREENING DER PACTII-LIBIII/PGAD10-LIB-BANK NACH ARG3.1-INTERAKTIONSPARTNERN 53
4.11 VERIFIZIERUNG DER IM ERSTEN SCREENING POSITIVEN KLONE 53
4.12 FILTERASSAY FÜR DIE β-GALACTOSIDASE-AKTIVITÄT DER PACTII-LIBIII/PGAD10-LIB-KLONE 54
4.13 CYCLOHEXIMID-SELEKTION 55
4.14 FILTERASSAY FÜR β-GALACTOSIDASE NACH CYCLOHEXIMID-SELEKTION DER POSITIVEN KLONE DER PACTII-LIBIII/PGAD10-LIB-BANK 56

4.15 HEFE-PAARUNGSTEST (MATING-TEST) 57
4.16 MATING-ERGEBNISSE DER PACTII-LIBIII/PGAD10-LIB-BANK 58
4.17 SEQUENZIERUNG DER POSITIVEN KLONE 58
4.18 POSITIVE KLONE DES SCREENS DER PACTII-LIBIII/PGAD10-LIB-BANK 59
4.18.1 Ergebnisse der unbekannten Klone 59
4.18.2 Beta-Subtyp der 14-3-3-Proteine 64
4.18.3 Necdin 66
4.18.4 Trypsinogen 67

5 DISKUSSION 70

6 ZUSAMMENFASSUNG 78

7 LITERATURVERZEICHNIS 80

ABKÜRZUNGEN 90

DANKSAGUNG 93

LEBENSLAUF 94

ERKLÄRUNG 95

1 Einleitung

Lernen und Gedächtnis sind charakteristische Merkmale aller höheren Lebewesen. Die physiologischen Grundlagen dieser komplexen Vorgänge innerhalb des Nervensystems sind nur ansatzweise verstanden. Die funktionelle Einheit ist die Nervenzelle. Man unterscheidet signalerzeugende, signalweiterleitende und signalverarbeitende Neurone. Die Kommunikation zwischen den Nervenzellen erfolgt über spezialisierte Kontaktzonen, die Synapsen. Eine Synapse besteht aus der signalgebenden Präsynapse des vorgeschalteten Neurons und der signalempfangenden Postsynapse des nachgeschalteten Neurons. Neurone besitzen die Fähigkeit, ihre funktionellen und anatomischen Eigenschaften aktivitätsabhängig zu verändern. Diese Veränderungen bezeichnet man als neuronale Plastizität.

Die zu Plastizität führende Aktivität kann sowohl physiologischen, pathologischen als auch experimentellen Ursprungs sein. Physiologisch ist sie während der Entwicklung des Gehirns und bei Prozessen wie Lernen und Gedächtnis, pathologisch z.B. bei Epilepsie, experimentell ist sie chemisch oder elektrisch induzierbar. Durch synaptische Plastizität können bereits vorhandene Synapsen modifiziert werden und neue Synapsen gebildet werden (Bailey & Kandel, 1993).

1.1 Die Rolle des Hippocampus bei Lern-und Gedächtnisprozessen

Der Hippocampus ist Teil des limbischen Systems. Er ist für die Überführung von Informationen von dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis im Säugergehirn entscheidend. Patienten, bei denen dieser Gehirnbereich zerstört ist, verfügen noch über ein funktionelles Kurzeitgedächtnis und über ein Langzeitgedächtnis bis zu dem Zeitpunkt, an dem ihr Hippocampus intakt war. Sie sind jedoch nicht mehr in der Lage, neue Erfahrungen in ihrem Langzeitgedächtnis zu speichern (Milner, 1968; Zola-Morgan et al., 1986). Der Hippocampus scheint daher als Zwischenspeicher für die Überführung in das Langzeitgedächtnis zu dienen. Auch für bestimmte Formen des Lernens, z.B. dem expliziten Lernen, ist der Hippocampus von Bedeutung. Unter explizitem Lernen versteht man an das Bewußtsein gekoppeltes Lernen.

Hebb stellte 1949 die These auf, die synaptische Verbindung zweier Neurone würde verstärkt, wenn das prä- und das postsynaptische Neuron gleichzeitig aktiv sind. Er entwarf damit ein zelluläres Modell assoziativer Lern- und Gedächtnisprozesse (Hebb, 1949). Bliss und Lomo demonstrierten 1973 Neurone im Hippocampus mit genau jenen plastischen Eigenschaften und assoziativen Vorraussetzungen, welche von Hebb vorgeschlagen worden waren (Bliss & Lomo, 1973). Sie fanden heraus, daß eine kurze, hochfrequente Salve von Aktionspotentialen in bestimmten neuronalen Schaltkreisen des Hippocampus zu einer Verstärkung der Synapsen in diesen Schaltkreisen führt. Diesen Prozeß nannten Bliss und Lomo Langzeitpotenzierung (LTP, engl. long-term potentiation). LTP des Hippocampus ist somit eine Form aktivitätsabhängiger synaptischer Plastizität. Es wird angenommen, LTP sei mit Speicherung des Langzeitgedächtnisses und explizitem Lernen assoziiert. Die Auslösung von LTP im Tractus perforans

führt zu einer länger anhaltenden Erhöhung der Übertragungseffizienz der Synapsen von den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Diese gesteigerte Effizienz kann bei narkotisierten Tieren mehrere Stunden, bei Tieren, die sich frei bewegen, mehrere Tage anhalten. Die plastischen Fähigkeiten der Neurone des Hippocampus prädestinieren diesen für Lernvorgänge.

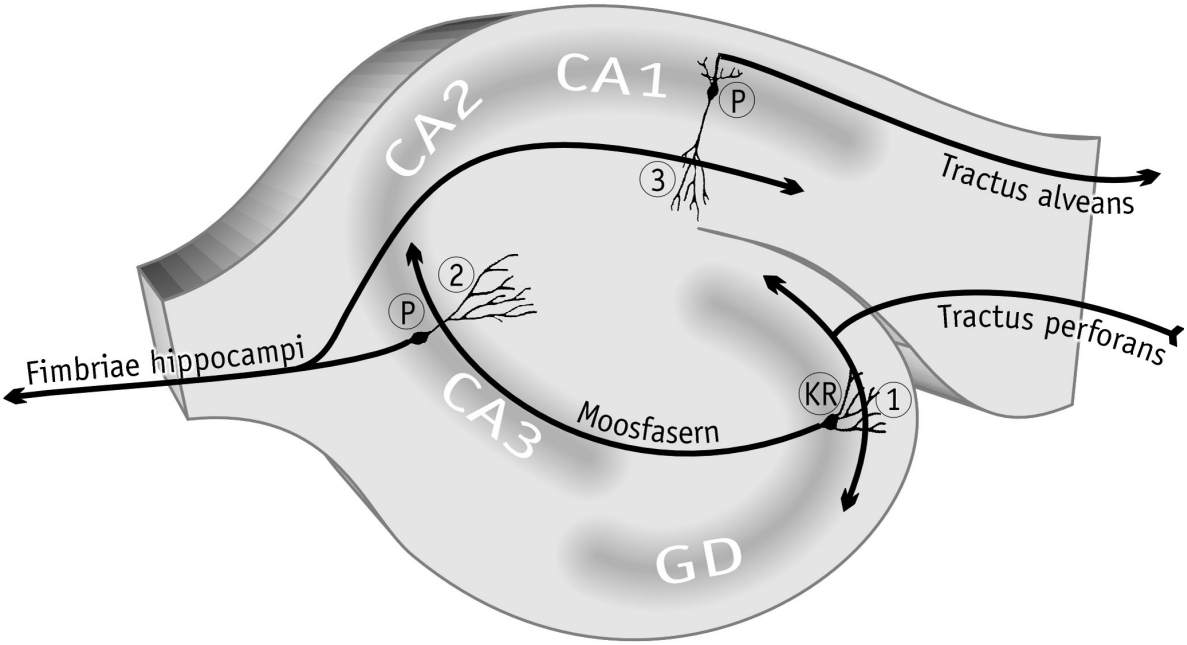

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Trisynaptischen Schaltkreises des Hippocampus

Hier dargestellt sind der Hippocampus und der Gyrus dentatus (GD). Die C-förmige Struktur des Hippocampus wird in drei Ammonshorn-(Cornu ammonis)-Regionen aufgegliedert (CA1-CA3). In den CA-Regionen und im Gyrus dentatus sind die Nervenzellkörper in kompakten Schichten angeordnet (in der Abbildung als graue Banden dargestellt). Im Hippocampus handelt es sich um Pyramidenzellen (P) im Gyrus dentatus um Körnerzellen (KR). Beide Nervenzelltypen werden von Korbzellen durch ein netzartiges Geflecht inhibiert (nicht dargestellt).

Der einschichtige Hippocampus ist direkt mit dem mehrschichtigem Cortex verbunden. Axone des Cortex bilden Synapsen mit den Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus. Dies ist der Tractus perforans (1.). Axone der Körnerzellen projizieren, als sogenannten Moosfasern, zu der CA3 Region und bilden Synapsen mit den Dendriten der Pyramidenzellen (2.). Axone der CA3 Neurone teilen sich. Ein Teil verläßt den Hippocampus über die Fimbriae hippocampii zur Fornix. Der andere Teil zieht zu den Pyramidenzellen der CA1 Region. Diese Bahn wird als Schafferkollaterale (3.) bezeichnet. Schließlich projizieren die Axone der CA1 Neurone über den Tractus alveans wieder zum Cortex zurück.

1.2 LTP als zelluläres Lernmodell im Säugergehirn

Mehrere Eigenschaften machen LTP zu einem attraktiven Modell für bestimmte Formen des Gedächtnisses (Malenka, 1994). Wie Gedächtnisspuren kann LTP schnell gebildet und durch Wiederholung verstärkt werden. Für beide Phänomene existiert eine Reizschwelle. LTP ist

eingangsspezifisch, d.h. nur die Synapsen, die zur Zeit der hochfrequenten Stimulation aktiv waren, werden potenziert, während andere Synapsen des selben Neurons nicht potenziert werden.

Weiterhin besitzt LTP assoziative Eigenschaften. Eine präsynaptische Nervenzelle, deren Signal nicht stark genug ist, LTP auszulösen, kann die Übertragungseffizienz zu einem Zielneuron dennoch erhöhen, wenn dieses gleichzeitig eine starke Stimulation eines anderen vorgeschalteten Neurons erfährt (Bliss & Collinridge, 1993). Dies kann als zelluläre Entsprechung assoziativer Eigenschaften bestimmter Lernformen interpretiert werden.

Als eine molekulare Struktur, die die zeitliche Assoziation von prä- und postsynaptischer Aktivität detektiert, wurde der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor identifiziert. Die Rezeptoren für Glutamat, dem häufigsten exzitatorischen Transmitter im Gehirn, werden nach ihrer Ansprechbarkeit für bestimmte Antagonisten in mindestens zwei Klassen unterteilt (Stevens, 1993), nämlich in NMDA-Rezeptoren und in Kainat- und AMPA-Rezeptoren.

Der NMDA-Rezeptor bildet einen Ionenkanal, der für Ca^{2+}, aber auch für Na^{+} und K^{+} durchlässig ist. Dieser Ionenkanal wird während des Ruhepotentials von einer physiologischen extrazellulären Mg^{2+}-Konzentration blockiert. Für die Öffnung des Ionenkanals sind zwei gleichzeitige Ereignisse notwendig: Die Bindung von Glutamat an den NMDA-Rezeptor und die zeitgleiche Auflösung der Mg^{2+}-Blockade, welche durch eine NMDA-Rezeptor unabhängige Depolarisierung der postsynaptischen Membran zustande kommt. Treten beide Ereignisse zur selben Zeit ein, kann extrazelluläres Ca^{2+} durch den Kanal in die Zelle einströmen. Durch diesen Koinzidenzmechanismus lassen sich Eingangsspezifität, Assoziativität und Reizschwellen bei LTP erklären (Bliss & Collingridge, 1993).

Der Einstrom von Ca^{2+}-Ionen in die postsynaptische Zelle ist für die LTP-Induktion notwendig (Bliss & Lynch, 1988; Bear, 1996). Dieses vorübergehende Signal kann dann zu einer stabilen Modifikation der synaptischen Übertragung führen.

1.3 Synaptische Plastizität

Die Vermutung, Informationen könnten mittels Veränderung der synaptischen Effizienz im Gehirn gespeichert sein, entstand bereits Anfang dieses Jahrhunderts aufgrund einer Beobachtung von Cajal. Er demonstrierte, daß das Netzwerk der Neurone mit Hilfe von Verbindungen untereinander kommuniziert. Diese Verbindungen wurden von Sherrington „Synapsen" genannt (Sherrington, 1906; Cajal, 1911). Äußerliche Einflüsse sind durch ein Muster neuronaler Aktivität im Gehirn repräsentiert, und diese Aktivitätsmuster müssen als Ursache synaptischer Veränderung angesehen werden. Aus diesem Grund scheint die Synapse, deren Signalübertragung aktivitätsabhängig reguliert wird, prädestiniert für den Ort, an dem sich Lernen und Gedächtnis vollzieht.

Die größte Anzahl von exzitatorischen synaptischen Verbindungen tritt an den sogenannten Dornen auf. Dornen sind kleine Strukturen mit Hals und knollenartigem Kopf, die an den dendritischen Auswüchsen von Neuronen gefunden werden.

Theoretische Überlegungen legen zweierlei nahe: 1. Diese Dornen bilden ein biochemisch isoliertes Kompartiment, in dem spezifische Botenstoffe konzentriert werden, die sonst innerhalb der Zelle zu schnell diffundieren würden (Koch & Zandor, 1993). 2. Morphologische Änderungen der Dornen haben eine Erhöhung der synaptischen Leistungsfähigkeit zur Folge (Rall, 1974).

In der Tat zeigt eine große Zahl experimenteller Studien eine hohe Korrelation zwischen der Induktion der synaptischen Plastizität und Veränderungen in Gestalt und Anzahl der Dornen und Synapsen. Erste Beweise für eine Veränderung der Synapsenanzahl während LTP in der CA1-Region des Hippocampus wurden zuerst von Lynch und Mitarbeitern 1977 erbracht (Lynch et al., 1977). Elektrische Reize, die eine LTP verursachen, erhöhen gleichzeitig die Anzahl der Synapsen an dendritischen Schäften (Lee et al., 1980). Diese Beobachtung konnte von Chang und Greenough noch erweitert werden. Sie konnten zusätzlich zeigen, daß nicht nur Synapsen, die am Dendritenschaft, sondern auch Synapsen, die an Dornen lokalisiert sind, in ihrer Anzahl erhöht werden. Diese durch äußere Reize ausgelöste Synaptogenese im Hippocampus korreliert sehr stark mit LTP (Chang & Greenough, 1984).

Neuere Studien von Geinisman und Mitarbeitern zeigten Veränderungen der Synapsenanzahl während LTP im Gyrus dentatus (Geinisman et al., 1992, 1996). Nach Stimulation des Tractus perforans mit hochfrequenten Reizen wurden die Synapsen in der mittleren und inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus untersucht. Die Induktion von LTP wird begleitet von einem hohen selektiven Anstieg der perforierten axo-dornischen Synapsen, die eine segmentierte postsynaptische Dichte zeigen. Diese Veränderungen wurden nur in den aktivierten synaptischen Regionen des Gyrus dentatus beobachtet.

Die selektive Erhöhung eines bestimmten Synapsentyps könnte durch eine dynamische Transformation einer Synapsenform in die andere erklärt werden. Daraus könnte ein synaptischer „turnover", bei dem sich eine Synapse in mehreren Schritten umwandelt und anschließend teilt, resultieren. In diesem Zusammenhang wird seit langem diskutiert, wie diese strukturellen Veränderungen der Synapsen durch Modifikationen der am Zytoskelett beteiligten Proteine erreicht werden können (Baudry et al., 1981; Lynch & Baudry, 1987). Bislang konnte jedoch keine Beteiligung eines bestimmten Proteins an morphologischer Plastizität nachgewiesen werden.

1.4 Langzeitgedächtnis und LTP sind von Protein- und RNA-Synthese abhängig

Sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten unterscheidet sich Langzeitgedächtnis von Kurzzeitgedächtnis dadurch, daß Langzeitgedächtnis RNA- und Proteinsynthese benötigt (Davis & Squire, 1984; Castelucci et al., 1989). Wie das Langzeitgedächtnis wird auch LTP durch Inhibitoren der

RNA- und Proteinsynthese blockiert (Krug, 1984; Stanton & Sarvey, 1984). Aus diesem Grund wird sehr viel Wert auf die Identifizierung der Gene gelegt, die durch Aktivität induziert werden.

Im Jahre 1992 konnten Kuhl und Mitarbeiter erstenmals zeigen, daß Verhaltenstraining in Invertebraten Veränderungen in der Konzentration spezifischer mRNAs in Zellen verursacht, die an Lernvorgängen beteiligt sind (Kuhl et al., 1992; Kennedy et al., 1992). In Neuronen des Säugergehirns und -rückenmarks wird durch eine Reihe von physiologischen und pathologischen Reizen eine schnelle und transiente Aktivierung von unmittelbar frühen Genen (immediate early genes, IEGs) induziert (Sheng & Greenberg, 1990). Viele IEGs kodieren für Transkriptionsfaktoren, die wahrscheinlich die Expression von abwärts gelegenen Effektorgenen kontrollieren (Goelet et al., 1986). In neueren Studien wurden Gene identifiziert, die vielleicht selbst Effektorwirkung für die LTP besitzen (Qian et al., 1993; Yamgata et al., 1993 und 1994; Nedivi et al., 1993). Die frühen Effektorgene besitzen wahrscheinlich die Möglichkeit Langzeitveränderungen im neuronalen Phänotyp während plastischer Prozesse, einschließlich LTP, zu fördern. So haben Kuhl und Mitarbeiter den Gewebe-Plasminogenaktivator (t-PA), eine extrazelluläre Serin-Protease, als ein frühes Effektorgen identifiziert, das wahrscheinlich an den morphologischen Veränderungen, die während der LTP auftreten, beteiligt ist (Qian et al., 1993).

In anschließenden Studien konnten Kuhl und Mitarbeiter mit Uwe Frey in Magdeburg zeigen, daß Mäuse, die eine durch homologe Rekombination eingeführte Mutation im t-PA-Gen tragen, keine normale LTP entwickeln (Frey et al., 1996). Obwohl diese Experimente eine enge Verbindung zwischen Genexpression und neuronaler Plastizität knüpfen, bleibt die Frage offen, wie eine im Nukleus stattfindende transkriptionelle Aktivierung in der Lage ist, selektiv stimulierte Synapsen im entfernten dendritischen Kompartiment eines Neurons zu verändern. Solche selektiven Modifikationen von Synapsen, die koinzidente Aktivität erfahren haben, werden von der Hebb'schen Regel postuliert und sind eine Voraussetzung für die Eingangsspezifität der LTP.

Neue Untersuchungen zeigen, daß nicht nur im Perikaryon sondern auch im Dendriten der Nervenzelle Proteinsynthese stattfindet (Kuhl & Skehel, 1998). Im Gegensatz zu Axonen finden sich in Dendriten Polyribosomenkomplexe und freie Ribosomen. Die Anreicherung von Polyribosomen an der Basis von dendritischen Dornen ermöglicht eine lokale Proteinsynthese in der Nähe von Synapsen (Steward & Levy, 1982). Eine spezifische dendritische Proteinsynthese wurde in Zellkulturen an Neuronen aus dem Hippocampus gezeigt (Torre & Steward, 1992; Feig & Lipton, 1993). Bislang waren allerdings keine spezifischen Proteine bekannt, deren mRNAs nach synaptischer Aktivität differentiell in den Dendriten lokalisiert werden und dort lokal an aktivierten postsynaptischen Orten translatiert werden. Solche neusynthetisierten Proteine könnten dann morphologische Veränderungen der aktivierten Synapse einleiten. Eines der ersten Proteine, das diese Bedingungen erfüllt, ist arg3.1, ein durch synaptische Aktivität reguliertes Genprodukt.

1.5 Arg3.1, ein durch synaptische Aktivität reguliertes Gen

Kuhl und Mitarbeiter und, davon unabhängig, das Labor von Paul Worley an der Johns Hopkins Universität entdeckten ein bislang unbekanntes unmittelbar frühes Gen im Säugergehirn, arg3.1 genannt (Activity-Regulated Gene 3.1, Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). In bestimmten Neuronenpopulationen führt synaptische Aktivität zu einer dramatischen Erhöhung der Anzahl der arg3.1-Transkripte. Im Hippocampus war die konstituive Expression niedrig. Die basale Expression ist in cortikalen Bereichen, besonders im visuellen Cortex, hoch. Im Cortex sind NMDA-Rezeptoren wesentlich an der normalen, erregenden synaptischen Übertragung beteiligt. Die Blockade des NMDA-Rezeptors führte zu einer Reduktion der basalen Expression der arg3.1-mRNA. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die konstituive Expression von arg3.1 im Cortex durch eine natürlich vorkommende Aktivierung des NMDA-Rezeptors, z.B. durch visuelle Erfahrung, verursacht wird. Synaptische Aktivität, die durch konvulsive epileptische Anfälle ausgelöst wird, erhöht die Zahl der mRNA Moleküle in Neuronen des Cortex und des Hippocampus. Die Induktion ist unabhängig von *de novo* Proteinsynthese, wie es für alle IEGs charakteristisch ist. Hochfrequente Reizung des Tractus perforans resultiert in LTP und zu einem räumlich begrenzten, dramatischen Anstieg der Anzahl der arg3.1-mRNA Transkripte in den Körnerzellen des ipsilateralen Gyrus dentatus. Besonders auffallend ist, daß nach LTP oder epileptischer Aktivität starke Hybridisierungssignale im Stratum moleculare des Gyrus dentatus beobachtetet werden.

Die Hybridisierungsmuster belegen, daß arg3.1-mRNA in den Dendriten der Körnerzellen lokalisiert ist. Bislang sind nur wenige mRNAs identifiziert worden, die in der dendritischen Lamina vorkommen. Arg3.1 ist das erste Beispiel für ein Gen, dessen mRNA in den Dendriten lokalisiert ist und durch synaptische Aktivität reguliert wird. Die Mehrzahl der im Gehirn beschriebenen IEGs kodiert für Transkriptionsfaktoren. Die Lokalisierung der arg3.1-mRNA in den Dendriten deutet daraufhin, daß arg3.1 ein Mitglied einer Familie von IEGs ist, die andere Funktionen besitzen.

Ähnlich dem t-PA repräsentiert arg3.1 ein frühes Effektorgen, das sehr schnell Veränderungen in den aktivierten Neuronen herbeiführen kann. Arg3.1-Protein ist strukturell entfernt mit Gehirn α-Spektrin verwandt (Link et al., 1995). Spektrin ist ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts, der unterhalb der Plasmamembran liegt (Bennett, 1985). Die Prozessierung von Gehirnspektrin durch kalziumabhängige Proteasen an der postsynaptischen Membran wird als ein zentraler Mechanismus für LTP diskutiert (Seubert et al., 1988; Siman & Noszek, 1988). Die enge Korrelation der arg3.1-Expression mit synaptischer Aktivität, die dendritische Lokalisierung und die Ähnlichkeit mit α-Spektrin deuten auf eine wichtige Rolle dieses bisher unbekannten Gens bei plastischen Veränderungen hin. Die differentielle Lokalisierung der arg3.1-mRNA in den Dendriten eröffnet die Möglichkeit der lokalen Synthese des Proteins an aktivierten Synapsen und könnte zu synapsenspezifischen Modifikationen während langandauernder plastischer Veränderungen des Nervensystems beitragen. Möglicherweise

sind für die selektive, dendritische Verteilung der arg3.1-mRNA bestimmte Signalsequenzen in der mRNA selbst verantwortlich (Wallace et al., 1998; Kuhl & Skehel, 1998).

Um in Zukunft die Fuktionen des Arg3.1-Proteins besser verstehen zu können, müssen Proteine identifizieren werden, welche mit dem Arg3.1-Protein in Wechselwirkung treten. Bislang sind solche Interaktionspartner völlig unbekannt. Da jedoch nahezu alle zellulären Prozesse durch spezifische Interaktionen zwischen Proteinen reguliert werden, würde die Detektion von Proteinen, welche mit dem Arg3.1-Protein interagieren, einen großen Schritt zum Verständnis der Funktion des Arg3.1-Proteins darstellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels des Two-Hybrid-Systems nach Interaktionspartnern des Arg3.1-Proteins gesucht. Auf das Two-Hybrid-System wird im Folgenden näher eingegangen.

1.6 Two-Hybrid-System

Das Two-Hybrid-System bietet eine Technik zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen. Das Besondere am Two-Hybrid-System ist, die Interaktionen *in vivo* detektieren zu können. Da diese Detektion in der Hefe, einem eukaryoten Organismus stattfindet, wird angenommen, die Proteine kämen in ihrer nativen Konformation vor (Chien et al., 1991; Fields & Song, 1989; Fields & Sternglanz, 1994). Das Two-Hybrid-System macht sich die Tatsache zunutze, daß Transkriptionsfaktoren aus zwei Untereinheiten bestehen: Zum einem aus der DNA-Bindungsdomäne, die es dem Transkriptionsfaktor ermöglicht, aufwärts des Reportergens spezifisch an die DNA zu binden, zum anderen der Aktivierungsdomäne, die mit der RNA-Polymerase interagiert und einen Komplex bildet und auf diese Weise die Transkription stimuliert.

Beide Untereinheiten sind für eine Aktivierung notwendig und normalerweise auf demselben Protein lokalisiert. Es wurde jedoch *in vivo* nachgewiesen, daß die Aktivierung auch dann möglich ist, wenn die Domänen auf zwei unterschiedlichen Proteinen lokalisiert sind (Hope & Struhl, 1986; Keegan et al., 1986). Im Two-Hybrid-System setzt man zum einen Expressionsvektoren ein, welche für die DNA-Bindungsdomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors kodieren, und mit dem gewünschten Protein über den N-Terminus fusioniert sind. Zum anderen Expressionsvektoren, welche für die GAL4-Aktivationsdomäne des GAL4 Transkriptionsfakors kodieren, und über den N-Terminus ihrerseits mit einer Bank von Proteinen fusioniert sind. Weiterhin kodieren diese Expressionsvektoren für Enzyme, die für die Synthese von Aminosäuren nötig sind. Da die eingesetzten Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*) für bestimmte Aminosäuren auxotroph sind, können diese Defizite durch die von Expressionsvektoren ermöglichte Aminosäuren-Synthese komplemetiert werden. So kann man die Transformation der Expressionsvektoren in Hefe durch das Wachstum auf Medium, welchem eine einzelne Aminosäure fehlt, überprüfen. Die eingesetzten Hefestämmme besitzen folgende Reportergene: Das LacZ-Gen, welches für die β-Galactosidase kodiert, und das HIS3-Gen, welches für die Imidazol Glycerinphosphat (IGP) Dehydrogenase kodiert. Die IGP Dehydrogenase ist für die Histidin Synthese notwendig. Beide

Enzyme sind unter der Kontrolle des GAL Promotors. Interagieren zwei Proteine miteinander, so entsteht ein funktionstüchtiger Transkriptionsfaktor, der die Expression dieser Reportergene zur Folge hat.

Bei bestehender Interaktion ermöglicht das HIS3-Gen der Hefe auf Histidin defizientem Medium das Wachstum. Durch diese Reportergene ist es zum einen möglich, positive Interaktionspartner zu selektionieren, und zum anderen, diese anschließend durch die β-Galactosidase Aktivität zu überprüfen (siehe Abb. 2).

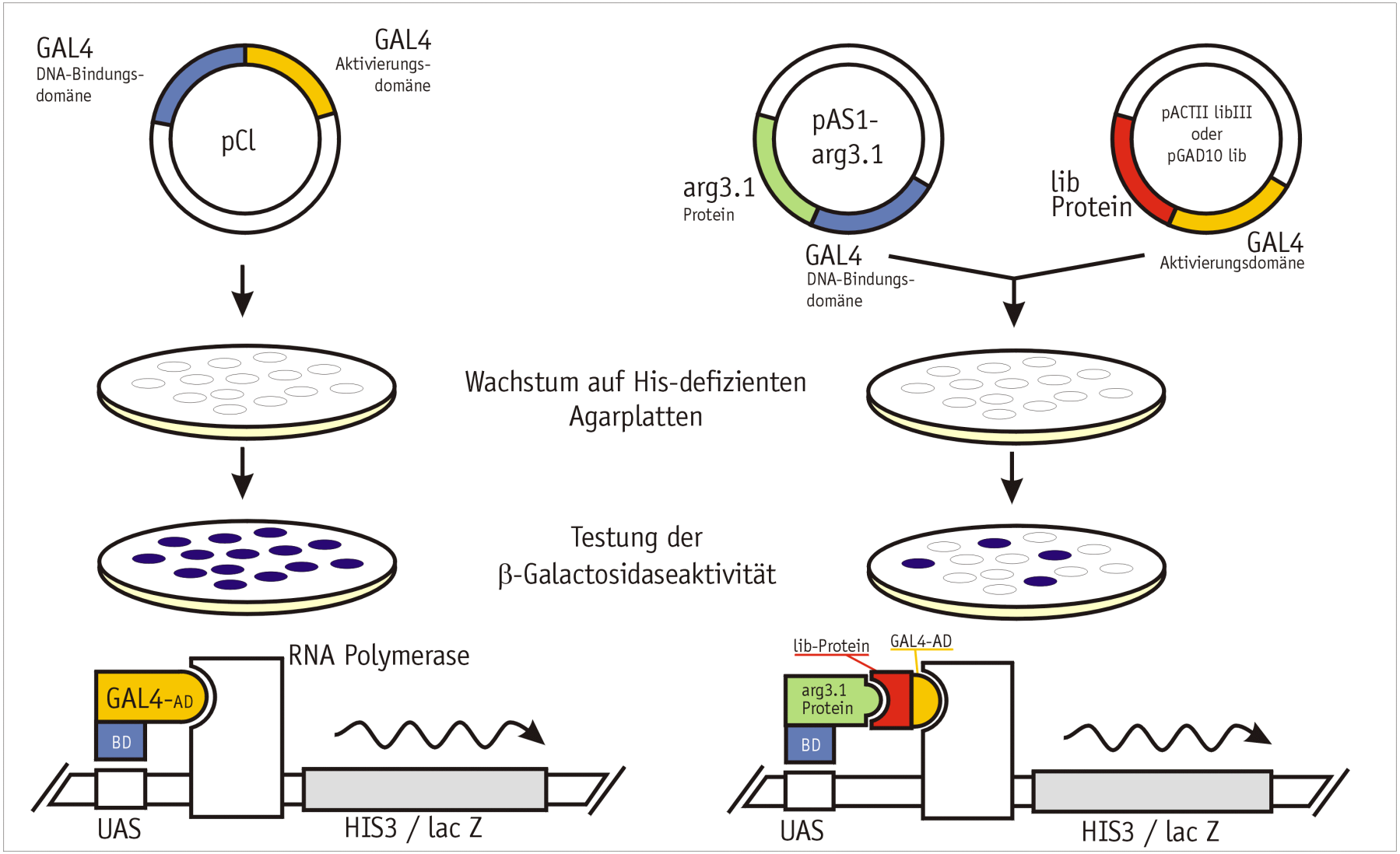

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Two-Hybrid-Systems. Das Prinzip des Two-Hybrid-Systems beruht auf der Interaktion zweier Hybride. Eine Interaktion beider Hybride führt zur Bildung eines funktionellen Transkriptionsaktivators, der die Reportergene aktiviert. Interagiert das Arg3.1-Protein mit einem libIII-Protein, werden GAL4-DNA-Bindungsdomäne (BD) und GAL-Aktivierungsdomäne (AD) zu einem funktionsfähigen Transkriptionsaktivator zusammengefügt, so daß HIS 3/LacZ translatiert werden können. Im Vergleich dazu ist das Plasmid pCl dargestellt, es enthält die cDNA für das gesamte Wildtyp GAL4-Protein, einem Transkriptionsaktivator.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Suche nach Proteinen, welche mit dem Arg3.1-Protein interagieren. Zur Identifizierung solcher Proteine wurde das Two-Hybrid-System eingesetzt. Bislang sind solche Interaktionspartner völlig unbekannt. Die Detektion von Arg3.1 interagierenden Proteinen könnte neue Ansätze für die Rolle des Arg3.1-Proteins aufzeigen. Das Erforschen solcher Interaktionen ist somit von herausragender Bedeutung.

2 Material

Im Nachfolgenden werden technische Ausrüstung sowie benutzte Chemikalien tabellarisch dargestellt. (Die Produkte sind in der linken, die Hersteller in der rechten Spalte aufgelistet.)

2.1 Geräte

30 °C Schrank	Heraeus
DU-70 Spektrophotometer	Beckman
Elektroporationsküvetten	Invitrogen
Eppendorf-Schüttler	Heidolph
Geldokumentationssystem	Intas
Gelkammern	Gibco BRL
GenePulser	BioRad
Glasgeräte	Schott
Mikrowelle	Bosch
Minifuge RF	Heraeus
Mini-Protein-Gel	Biorad
PCR-Block: Hybaid Omni Gene	MWG Biotech
Power Supply	BioRad
Rotor JA 10 und JS 13.1	Beckman
Rotor JA 20	Beckman
Speedvac Sc110	Savant
Tischzentrifuge	Qualitron
UV-Bildschirm	Herolab

Waage	Mettler
Wasserbad	MGW Lauda
Whirler (REAX 2000)	Heidolph
Zentrifuge J2-21M7E	Beckman
Zentromat	Braun

2.2 Chemikalien

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer-Mannheim, Gibco BRL, Merck, Pharmacia LKB, Roth, Serva und Sigma in p.A. Qualität bezogen.

3-Amino-1,2,4-Triazol (3AT)	Sigma
5-Brom-3-indolyl-β-D-galactosid	Gibco BRL
5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-β-D-galactosid	Gibco BRL
Acrylamid	Serva
Adeninsulfat	Fluka
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumperoxidisulfat	Merck
Ampicillin	Merck
Aprotinin	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Merck
Coomassie-Blau R 250	Serva
Cycloheximid	Sigma
Dimethylformamid	Fluka

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
DTT	Merck
EDTA	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Gibco BRL
Ficoll	Merck
Glassperlen	Sigma
Glutathion	Sigma
Glutathion-Agarose	Sigma
Glycerol (87 %)	Merck
Glykogen	Boehringer
Isoamylalkohol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Gibco BRL
Leupeptin	Sigma
Lithiumchlorid	Merck
Magermilchpulver	Glücks-Klee
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Phenol	Gibco BRL
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Gibco BRL

PMSF	Sigma
Polyaethylenglykol 6000	Fluka
Protein-G-gekoppelte Sepharoseperlen	Pharmacia
Protein-Molekulargewichtsmarker	Gibco BRL
Salzsäure	Merck
Sarcosyl	Fluka
TEMED	Sigma
Thrombin	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton X-100	Merck
Wachs-Kügelchen	Perkin Elmers
Xylen Cyanol	Pharmacia

2.3 Zellulose und Filterpapiere

DE81-Zellulose	Whatman
597 S&S Filterpapier 125 mm	Schleicher & Schuell
Nitrocellulose	Schleicher & Schuell

2.4 Enzyme und Kitsysteme

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden über die Firmen MBI Fermentas oder NEBiolabs bezogen.

Alkalische Phosphatase	Boehringer
Pfu-Polymerase	Stratagene
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, Boehringer

Lysozym	Sigma
RNAse	Boehringer
Zymolase 100T	ICN Biomedicals
Plasmid-Mini-Kit	QIAGEN
Plasmid-Maxi-Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN

2.5 Antikörper

HA-Antikörper	Boehringer

2.6 Agarose und Medienkomponenten

SeaKem LE Agarose FMC	BioProducts
SeaPlaque GTG low melting Agarose	FMC BioProducts
Dextrose	DIFCO
Bacto Agar	DIFCO
Hefe-Stickstoff-Basis	DIFCO
Hefe-Extrakt	DIFCO
Bacto-Pepton	DIFCO
Dropout-Pulver	Fluka
Sorbitol	DIFCO

2.7 Puffer, Lösungen und Medien

EDTA-Puffer	10 mM Tris-HCl
	1 mM EDTA
	pH 7.4
Fixativ	4 % Paraformaldehyd
	100 mM KH_2PO_4
	1 mM $MgCl_2$
Hochsalzlösung	10 mM Tris HCl
	1 mM EDTA
	1 M LiCl
	20 % Ethanol
Lauf-Puffer	25 mM Tris
(Lämmli-Puffer)	190 mM Glycin
	0.1 % SDS
Lauria-Bertani Medium	5 g Hefeextrakt
	5-10 g NaCl
	mit 5 N NaOH auf pH 7.0 einstellen
	ad 1 l H_2O
Lösung I	1 Volumen 10 x TE
	1 Volumen 10 x LiAcetat Lösung (1 M)
	8 Volumen H_2O

Lösung II	1 Volumen 10 x TE
	1 Volumen 10 x LiAcetat Lösung (1 M)
	8 Volumen 50 % PEG
Lösung III	1 Volumen 10 x TE
	1 Volumen 10 x LiAcetat Lösung (1 M)
	8 Volumen 1.2 M Sorbitol
Lysierpuffer	2 % Triton X-100
	1 % SDS
	100 mM NaCl
	10 mM Tris pH 8.0
	1 mM EDTA
PBS	3.2 mM Na_2HPO_4
	1.5 mM KH_2PO_4 pH 7.4
	140 mM NaCl
	2.7 mM KCl
Probenpuffer	0.1 M EDTA
	1 % SDS
	20 % Ficoll
	0.25 % Bromphenolblau
	0.25 % Xylen Cyanol

Schwyzer Waschpuffer	500 mM LiCl
	100 mM Tris-HCl pH 9
	10 g/l NP-40
SDS-Probenpuffer	2 x 50 mM Tris-HCl pH 6.8
	2 % SDS
	0.04 % Bromphenolblau
	20 % Glycerin
	84 mM β-Mercaptoethanol
Selektionsmedium	5 g Ammoniumsulfat
	1.7 g Stickstoff Basis
	1.2 g Dropout Pulver
	20 % Dextrose
	ad 1 l H_2O
Sorbitol-Puffer	1.2 M Sorbitol
	100 mM K_3PO_4 pH 6.5
STE	0.1 M NaCl
	10 mM Tris-HCl pH 8
	1 mM EDTA pH 8
TAE-Puffer 1 x	0.04 M Tris-Acetat
	0.001 M EDTA

10 x TE	0.1 M Tris-HCl
	10 mM EDTA
	pH 7.5
TELT-Puffer	50 mM Tris HCl pH 7.5
	62.5 mM EDTA
	2.5 mM LiCl
	0.4 % Triton X 100
Transfer-Puffer	50 mM Tris
	380 mM Glycin
	3.5 mM SDS
	20 % MeOH
1 M Tris-HCL	121.1 g Tris Basis
	gewünschten pH mit HCl einstellen
YPAD-Medium	10 g Hefe-Extrakt
	20 g Bacto-Pepton
	20 g Bacto-Agar
	20 % Dextrose
	40 µg/ml Adeninsulfat
	ad 1 l H_2O

YPD-Medium	10 g Hefe-Extrakt
	20 g Bacto-Pepton
	20 g Bacto-Agar
	20 % Dextrose
	ad 1 l H_2O

2.8 Bakterienstämme

Die Folgenden *Escherichia coli* Stämme der Firma Life Technologies wurden verwendet.

Tabelle 1:

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21	F^- *omp t hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3)	Studier (1986)
ElektroMAX DH10B	F^- *mcr*A, Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), ϕ80d*lac*ZΔM15, Δ*lac*X74, *deo*R, *rec*A *1*, *end*A *1*, *ara*D *139*, Δ(*ara, leu)*7697, *gal*U, *gal*K, λ$^-$, *rps*L, *nup*G	Lin et al. (1992)
ElektroMAX DH12S	ϕ80d*lac*ZΔM15, *mcr*A, Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), *ara*D *139*, Δ(*ara, leu)*7697, Δ*lac*X *74*, *gal*U, *gal*K, *rps*L, *deo*R, *nup*G, *rec*A1F′, *pro*AB+, *lacI*^{q} *Z*ΔM15	Grant et al. (1990)

2.9 Hefestämme

Folgende *Saccharomyces cerevisiae* Stämme der Firma Clontech wurden verwendet.

Tabelle 2:

Stamm	Genotyp	Referenz
CG-1945	MATa, ura 3-52, his 3-200, lys 2-801, trp 1-901, ade 2-101, leu 2-3, 112, gal 4-542, gal 80-538, LYS::GAL 1-HIS 3, cyh^r 2, URA 3 $(GAL\ 4\ 17\text{-}mers)_3$-CYH 1-lacZ	Feilotter et al. (1994)
Y-187	MATα, ura 3-52, his 3-200, ade 2-101, trp 1-901, leu 2-3, 112, gal 4-542, gal 80-538, URA::GAL 1-lacZ	Harper et al. (1993)

2.10 Plasmide

Tabelle 3:

Plasmid	Länge	Genotyp	Referenz
pAS1-CYH2	8 500 bp	GAL4 (1-147), Amp, TRP1, CYH2, ADH Pro, ADH Ter	Harper et al. (1993)
pACTII	7 550 bp	GAL4 (768-881), Amp, LEU2, ADH Pro, ADH Ter	Elledge et al. (1993)
pACTII-libIII	variabel	libIII-Inserts, GAL4 (768-881), Amp, LEU2, ADH Pro, ADH Ter	Putz et al. (1996)
pGAD10-lib	variabel	lib-Inserts, GAL4 (768-881), Amp, LEU2, ADH Pro, ADH Ter	Bartel et al. (1993)
pGEX-KG-arg	5 800 bp	arg-Insert (800 bp), GST, lac I q Rep, p tac Pro, Amp	Smith & Johnson (1988)
pSPORT1-arg3.1	7 127 bp	arg3.1-Insert (3028 bp), lacZ, Amp	Link et al. (1995)
pSORT1-libIII	variabel	libIII-Inserts, lacZ, Amp	Link et al. (1995)
pCl	15 300 bp	GAL4(1-881), Amp, LEU2	Fields & Song (1989)
pSE 1111	7 500 bp	SNF4, GAL4(768-881), LEU2, Amp	Elledge et al. (1993)
pSE 1112	7 300 bp	SNF1, GAL4(1-147), TRP1, CYH2, Amp	Elledge et al. (1993)

2.11 cDNA-Banken

2.11.1 Beschreibung der cDNA-Bank pACTII-libIII

Die pACTII-libIII-Bank besteht aus dem pACTII Schaukelvektor und den cDNAs der pSPORT1-libIII-Bank (Link et al.,1995). Bei dieser Bank handelt es sich um eine PTZ (Pentylentetrazol)/CHX (Cycloheximid) induzierte Hippocampus-cDNA-Bank der Ratte. Zur Herstellung dieser Bank ist Ratten Cycloheximid und 30 min später Pentylentetrazol intraperitoneal injiziert worden, wodurch

epileptische Anfälle ausgelöst wurden. Nach 3 h wurden die zelluläre mRNA isoliert und über oligo(dT)-Zellulosesäulen aufgereinigt. Nach der cDNA-Synthese wurde diese in pSPORT1 (Gibco BRL) kloniert und die pSPORT1-libIII-Bank erstellt (Link et al., 1995).

Für die Herstellung der pACTII-libIII-Bank wurden mehr als 2 x 10^6 unabhängige cDNAs der pSPORT1-libIII-Bank mit SmaI und BamHI herausgeschnitten. Dieser Ansatz wurde in einem low melting Gel aufgetrennt, die dann aus den pSPORT1 Vektor herausgeschnittenen cDNA-Banden wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert und über SmaI und BamHI in pACTII (7550 bp, Elledge, 1993) kloniert. Die neu entstandene cDNA-Bank wurde pACTII-libIII-Bank benannt (siehe Abb. 3). Das Plasmid pACTII (Elledge et al., 1991) besitzt die Information zur Expression der GAL4-Aktivierungsdomäne. Der GAL4-Aktivierungsdomäne wurde die Kernlokalisierungs-Sequenz des SV40 T-Antigens hinzukloniert (Chien et al., 1991). Es enthält einen prokaryoten und eukaryoten Replikationsursprung und kann damit als Schaukelvektor eingesetzt werden. Es trägt weiterhin als *E.coli*-Selektionsmarker die Ampicillinresistenz und zur Selektion in Hefezellen das LEU2-Gen.

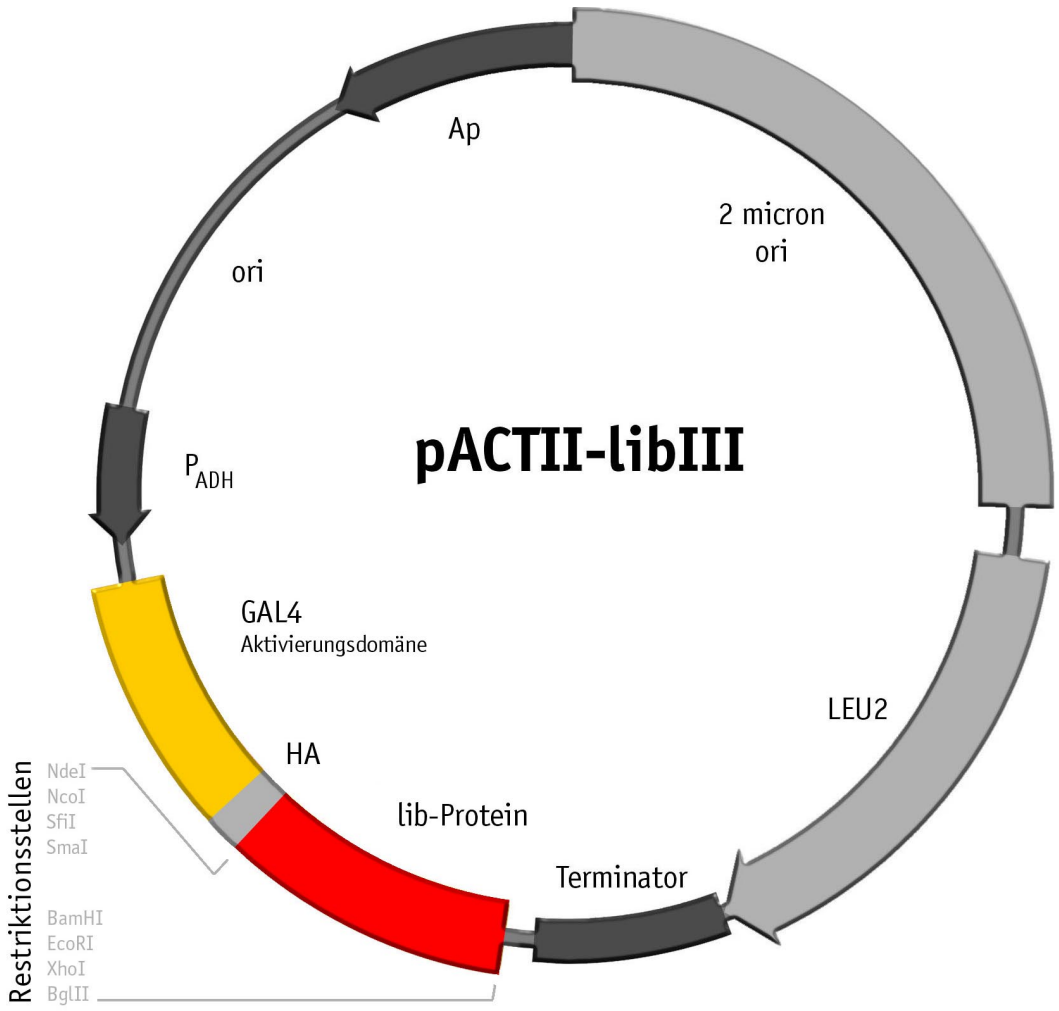

Abbildung 3: Plasmidkarte pACTII-libIII-Bank

pACTII ist ein Schaukel- und Expressionsvektor. pACTII-libIII enthält ein *E.coli* col E1 ori als Ursprung und das Ampicillingen zur Ampicillin Selektion in *E.coli.* Weiterhin enthält das pACTII-libIII den Hefe Replikationsursprung 2 µ ori und als Ernährungsselektionsmarker das LEU2-Gen. Die cDNA-Bank pACTII-libIII enthält die cDNA der GAL4-Aktivierungsdomäne und die cDNA der Bank libIII als Fusionsgene. Diese Fusionsgene stehen unter der Kontrolle des konstitutiven Wildtyp ADH1 Hefe Promotors, welcher eine hohe Expression des Fusionsproteins erlaubt.

LEU2: Gen des Leucin Stoffwechsels, Ernährungsselektionsmarker. Länge 1100 bp.

ADH Pro: Promotor des Alkohol-Dehydrogenase-Gens. Länge 400 bp.

ADH Ter: Terminator des Alkohol-Dehydrogenase-Gens. Länge 325 bp.

GAL4 AD: Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsaktivators. Länge 410 bp.

libIII: cDNA-Bank aus Ratten-Hippocampus. Insertlänge variiert von 500-2500 bp.

2.11.2 Beschreibung der cDNA-Bank pGAD10-lib

Die pGAD10-lib-Bank wurde von der Firma Clontech hergestellt. Die poly(A)+RNAs wurden aus dem gesamten Gehirn der Ratten gewonnen. Zur Synthese der cDNA mittels Reverser Transkriptase wurden sowohl oligo(dT)-Primer als auch zufällige - „random" - Primer eingesetzt. Die Bank besteht aus 2 x 10^6 unabhängigen Klonen, die in den LEU Schaukelvektor pGAD10 (6600 bp, Bartel et al., 1993) einkloniert wurden. Der Vektor trägt als *E.coli*-Selektionsmarker die Ampicillinresistenz und zur Selektion in Hefezellen das LEU2-Gen.

2.12 Nukleinsäuren

2.12.1 Sequenzierprimer

Tabelle 4:

Primer	**Länge**	**Firma**
arg3.1 rev (358-337)		
5' CAC TTC GGT CAA CAG ATG CC 3'	20mer	Pharmacia
HA for		
5' ATG GCT TAC CCA TAC GA 3'	17mer	Pharmacia
pACTII/pGAD10 for		
5' TAC CAC TAC AAT GGA TG 3'	19mer	MWG

Die Primer arg3.1 rev und HA for wurden zur Prüfung, ob die neu konstruierten Plasmide sich im richtigen Leserahmen befinden, eingesetzt. Der Primer pACTII/pGAD10 for diente der Sequenzierung der positiven Klone.

2.12.2 weitere Nukleinsäuren

Tabelle 5:

Lachssperma-DNA	Boehringer
DNA-Größenmarker (1 kb Leiter)	Gibco BRL

3 Methoden

Wenn nicht näher bezeichnet, wurden die Methoden nach Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1991) angewendet.

Für die Hefeuntersuchungen sind, falls nicht anders erwähnt, das Clontech Protokoll (Matchmaker Supplement Kit Protocol) und das Laborprotokoll von S.J. Elledge benutzt worden.

3.1 Isolierung und Manipulation von DNA

3.1.1 Restriktionsverdau

Die Plasmid-DNA wurde mit eineinhalbfachem Enzymüberschuß, der für die DNA-Menge berechneten Enzymeinheiten, 60 min bei 37 °C (oder 30 °C für SmaI) verdaut. Falls nötig wurde dem Verdau RNAse zugesetzt. Die Enzyme wurden bei 65 °C 10 min inaktiviert und durch Phenol/Chloroform extrahiert. Wurde der Restriktionsansatz direkt auf ein Agarosegel geladen, so ist die Reaktion vorher durch Zugabe von 10 x Laufpuffer gestoppt worden.

3.1.2 DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Präparationen, DNA-Restriktionen und zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurde Seakem LE Agarose (FMC) oder SeaPlaque GTG low melting Agarose (FMC) in 1 x TAE gelöst und mit 5 µl / 100 Ethidiumbromid (mg/ml) versetzt. Die Konzentration des Agarosegeles (0.5-1 % Agarose) wurde in Abhängigkeit der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente gewählt. Es wurde 1 x TAE als Laufpuffer verwendet.

3.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurden low melting Agarosegele eingesetzt. Nach der Gelelektrophorese wurde die auf einem UV-Schirm detektierte Bande sauber mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die ausgeschnittene Bande wurde entweder mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) aufgereinigt, oder über Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und anschließend mit Ethanol, Ammoniumacetat (oder Natriumacetat) und Glykogen gefällt. Bei der Phenol/Chloroform Aufreinigung wurde die ausgeschnittene Bande mit dem dreifachen Volumen H_20 versetzt und in einem Wasserbad bei 65 °C für 15 min erwärmt. Nachdem das Gel geschmolzen war, wurde die Lösung mit dem selben Volumen Phenol versetzt, geschüttelt und mit einer Tischzentrifuge bei 13 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfröhrchen überführt. Die DNA wurde insgesamt 2 x mit Phenol, 2 x mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 2 x mit Chloroform aufgereinigt. Danach wurde

die wäßrige Phase mit 2.5 Volumen eiskaltem Ethanol, 1/10 Volumen Natriumacetat und 2 µl Glykogen versetzt und bei -20 °C für 2 h inkubiert. Die Fällung wurde mit 2.5 Volumen Ethanol, 0.5 Volumen Ammoniumacetat und 3 µl Glykogen durchgeführt, anschließend wurde die Probe für 1 h bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der DNA-Niederschlag wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 10-20 µl H_2O aufgenommen.

3.1.4 Ligation

50-200 ng Vektor-DNA wurden mit der dreifachen molaren Menge Insert-DNA im Ligationspuffer (Boehringer) mit 1 U T4-DNA-Ligase ligiert. Handelte es sich dabei um eine Ligation mit kohäsiven Enden, wurde sie bei Raumtemperatur für 1-4 h durchgeführt. Eine Ligation mit nicht kohäsiven Enden wurde bei 15 °C über Nacht durchgeführt. Nach der Ligation wurde der Ansatz mit Ethanol gefällt und in 5 µl H_2O aufgenommen.

3.1.5 Transformation

Für die Transformation wurden Zellen von zwei verschiedenen *E.coli*-Stämmen verwendet: ElektroMAX DH12S oder ElektroMAX DH10B. 0.5-1 µl Ligationsansatz wurden mit 20-50 µl kompetenten Zellen vermischt und in eisgekühlte Elektroporationsküvetten gefüllt. Die Elektroporation erfolgte bei 1.66 kVolt, 25 µFarad und 200 µOhm. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml S.O.C. Medium bei 37 °C für 1 h geschüttelt.

3.1.6 Selektion der positiven Klone

Verdünnungen des Transformationsansatzes in S.O.C. Medium wurden auf LB-Platten, denen Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt wurde, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.7 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde im wesentlichen nach dem Protokoll von Wilimzig angefertigt (Wilimzig, 1985). Für eine Minipräparation der Plasmid-DNA wurden 4 ml LB/Amp-Medium mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden Stammes angeimpft und bei 37 °C über Nacht auf einem Rotor geschüttelt. Das Sediment von 3 ml Bakterienkultur (Tischzentrifuge) wurde in 200 µl TELT-Puffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Lysozym (50 mg/ml) zugesetzt. Die Lösung wurde 1 min auf 95 °C erhitzt und 5 min auf Eis gekühlt. Durch die Zentrifugation für 10 min in der Tischzentrifuge entstand ein Pellet, welches mit einem autoklavierten Zahnstocher entfernt wurde. Die DNA wurde mit 200 µl absolutem Ethanol gefällt (15 min bei RT inkubieren und 10 min zentrifugieren). Das Sediment wurde getrocknet und in 20 µl H_2O aufgenommen.

Wurde eine besonders reine DNA-Isolierung benötigt oder größere Mengen von Plasmid-DNA, wurden mit dem Quiagen-System nach Angaben des Herstellers (Quiagen) aus 5 ml bzw. 250 ml

Bakterienkultur DNA isoliert. Das wesentliche Prinzip dieser Methode besteht in einem Aufschluß der Bakterien durch alkalische Lyse, gefolgt von einer Ausfällung der SDS-solubilisierten Proteine und Bindung der DNA an eine Anionenaustauschersäule. Nach zwei Waschschritten wurde die Nukleinsäure von der Säule eluiert und durch Zugabe von Isopropanol zur wäßrigen Phase gefällt, welches die Sedimentation ermöglichte.

3.1.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse wurde nach der Didesoxyterminationsmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. 2 µg DNA und 15 pmol Primer wurden mit H_2O auf ein Endvolumen von 10.5 µl aufgefüllt und im ZMNH Servicelabor sequenziert.

3.1.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Hybaid Omni Gene Block der Firma MWG Biotech durchgeführt. Da es für das Konstrukt pAS1-CYH2-arg3.1 essentiell war fehlerfrei modifiziert und amplifiziert zu werden, wurde die Pfu-Polymerase eingesetzt, da dieses Enzym eine Korrekturleseaktivität besitzt, welche die Rate von Einbaufehlern und somit ungewollten Punktmutationen im Vergleich zur Taq-Polymerase deutlich senkt. Der PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

<u>Untere Lösung in 25 µl:</u>

je 2 µl einer 10 µM Primer-Stammlösung (Endkonzentration 400 nM Hin- und Rückprimer)

2.5 µl Pfu 10 x Puffer

3 µl einer 10 mM dNTP-Stammlösung (2.5 mM je Nukleotid; Endkonzentration 75 µM je Nukleotid)

<u>Obere Lösung in 75 µl:</u>

7.5 µl Pfu 10 x Puffer

1 µl Pfu-Polymerase (2.5 Units)

50 ng DNA

Zuerst wurde die untere Lösung in ein Eppendorfröhrchen überführt, ein Wachskügelchen zugegeben, erhitzt bis das Kügelchen geschmolzen war (5 min bei 80 °C), erhärtet bei RT und anschließend wurde die obere Lösung zugegeben. Diese Methode wird als Hot-Start bezeichnet. Sie verhindert durch die temperaturabhängige Trennung die Hybridisierung der Primer an die Matrize bei Temperaturen unter 50 °C, um so unspezifische Hybridisierungen zu vermeiden. Während der ersten Denaturierung schmilzt das Wachs erneut, beide Lösungen vermischen sich, das Wachs liegt den Lösungen auf und verhindert die Kondensation innerhalb des Eppendorfröhrchens.

Zyklen:

1 min Denaturierung bei 94 °C

1 min Hybridisierung der Primer an die Matrize bei 50 °C

2 min Synthese des PCR-Fragmentes bei 72 °C

Es wurden 20 Zyklen angewandt.

3.2 Manipulation an Hefezellen

3.2.1 Transfektion von Hefezellen

100 ml YPD- oder Selektionsmedium wurden mit 75 µl einer stationären Phase der zu transfektierenden Hefezellen angeimpft und bis zu einer Dichte von OD_{600} = 0.2-0.8 bei 30 °C geschüttelt (Dauer ca.15 h). Die 100 ml wurden auf zwei 50 ml Falcon-Tubes verteilt und für 10 min bei 3200 rpm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in je 3 ml H_2O gewaschen und wieder zentrifugiert. Beide Niederschläge wurden in 0.5 ml Lösung I (1 Volumen 10 x TE pH 7.5, 1 Volumen 10 x LiAcetat, 8 Volumen H_2O) aufgenommen und in ein 1.5 ml Eppendorfröhrchen überführt. 200 µl der so behandelten Hefezellen wurden mit 200 µg Lachssperma-DNA (vorher aufgekocht und wieder abgekühlt), 3 µg Plasmid-DNA und 1 ml Lösung II (1 Volumen 10 x TE pH7.5, 1 Volumen 10 x LiAcetat, 8 Volumen PEG) in ein 1.5 ml Eppendorftube gegeben und für 30 min bei 30 °C geschüttelt. Es folgte für 15 min ein Hitzeschock bei 42 °C. Die Zellen wurden 10 sec in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und in 200 µl H_2O aufgenommen. Die 200 µl wurden auf YPD- oder Selektionsmedien ausgestrichen. Die Hefen benötigten für ihr Wachstum bei 30 °C ca. drei bis vier Tage.

3.2.2 Transfektion der cDNA-Bank pACTII-libIII/pGAD10-lib in Hefe

250 ml -Tryptophan Selektionsmedium wurden mit fünf Kolonien CG-1945, die das Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 enthalten, angeimpft und bei 30 °C zwei Tage lang bis zu einer OD_{600} von 1.0 geschüttelt. Die 250 ml -Tryptophan-Medium wurden mit 250 ml YPAD versetzt und weitere 4 h bei 30 °C geschüttelt. In einem vorgewärmten Rotor (JA10) wurden die 500 ml Medium bei 2200 rpm 5 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde 2 x mit H_2O gewaschen und dann in 20 ml Lösung III (1 Volumen 1 x LiAcetat, 1 Volumen 10 x TE, 8 Volumen Sorbitol) aufgenommen, in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 30 min in ein 30 °C Wasserbad gestellt. Der Ansatz wurde danach wieder bei 2200 rpm und Raumtemperatur 5 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1.5 ml Lösung III aufgenommen.

Die 1.5 ml wurden auf 13 Ansätze verteilt. 12 Ansätze wurden zur Transfektion der pACTII-libIII/pGAD10-lib cDNA Bank eingesetzt:

Je 100 µl der CG-1945 Zellen, die das Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 enthielten, wurden mit 100 µl DNA-Mix (30 µg pACTII-libIII/pGAD10-lib, 300 µg gescherter Lachssperma-DNA, 10 µl 10 x TE, 10 µl 10 x LiAcetat, mit H_2O auf 100 µl auffüllen) und 900 µl Lösung II (1 Volumen 10 x TE pH 7.5, 1 Volumen Lithium Acetat, 8 Volumen PEG) in Eppendorfröhrchen pipettiert.

Die 12 Eppendorfröhrchen wurden für 30 min in ein 30 °C Wasserbad gestellt. Nach Zugabe von je 100 µl DMSO und einem Hitzeschock bei 42 °C für 7 min, wurden die 12 Ansätze in einem 250 ml Erlenmeyerkolben vereinigt. Nach Zugabe von 100 ml -Tryptophan, -Leucin, -Histidin Selektionsmedium wurden die Zellen für 2 h bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert, 2 x mit 1 x TE gewaschen und in 3 ml 1 x TE aufgenommen.

Je 200 µl wurden auf 100 mm -Tryptophan, -Leucin, -Histidin + 30 mM 3AT Agarplatten ausgestrichen.

Um die Transfektionsrate zu bestimmen, wurden 50 µl der Transfektion auf eine -Tryptophan, -Leucin Agarplatte ausgestrichen.

Als positiv Kontrolle wurden CG-1945 Zellen, die das Plasmid pSE1112 enthielten mit dem Plasmid pSE1111 transfektiert. Als negativ Kontrolle wurden CG-1945 Zellen mit pAS1-CYH2-arg3.1 und pSE1111 kotransfektiert. Das Plasmid pSE1111 kodiert für das Fusionsprotein aus SNF4 und der GAL4-Aktivierungsdomäne. Das Plasmid pSE1112 kodiert für das Fusionsprotein aus SNF1 und die GAL4-DNA-Bindungsdomäne. SNF1 bindet spezifisch an SNF4. Die Kontrollen wurden auf -Tryptophan, -Leucin Platten und auf -Tryptophan, -Leucin, -Histidin + 30 mM 3AT Platten ausgestrichen.

3.2.3 Filterassay auf β-Galactosidaseaktivität

Frische Hefekolonien (Durchmesser ca. 1-2 mm) wurden auf einem Filter (597 Schleicher § Schuell Filterpapier) mit einer Öse als Strich ausgestrichen. Auf einen 125 mm Filter wurden 15 - 20 Kolonien ausgestrichen und mit Kugelschreiber beschriftet. Der Filter wurde mit den Kolonien nach oben in ein Bad mit flüssigem Stickstoff gelegt. Währenddessen wurde in einer 150 mm Petrischale ein zweiter Filter mit 3.5 ml Z-Puffer, der 60 µl X-Gal-Lösung (20 mg/ml) enthielt, versetzt. Pro 100 ml Z-Puffer wurden 1.67 ml X-Gal (20 mg/ml) eingesetzt. Der erste Filter wurde aus dem Stickstoffbad genommen, kurz an der Luft getrocknet und blasenfrei auf den zweiten Filter gelegt. Nach 0.5 bis 8 h bei 30 °C wurden die positiven Kolonien blau. Als positiv Kontrolle wurden CG-1945 Zellen, die das Plasmid pCI enthielten, ausgestrichen. Das Plasmid pCI enthält die gesamte Wildtyp Sequenz des GAL4-Proteins. Als negativ Kontrolle wurden CG-1945 Zellen, die ausschließlich das Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 enthielten, eingesetzt.

3.2.4 Cycloheximid-Selektion

CG-1945 Hefezellen, die das Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 und ein Plasmid der pACTII-libIII/pGAD10-lib-Bank besaßen, wurden auf -Leucin +CYH2 Medium ausgestrichen. Nach drei bis vier Tagen wurden die Kolonien, die einen Durchmesser von 1-2 mm erreicht hatten, auf -Tryptophan Medium und auf -Leucin Medium ausgestrichen. Kolonien, die nur auf -Leucin Medium wuchsen, wurden auf -Leucin -Histidin +30 mM 3AT Medium ausgestrichen und einem Filterassay für β-Galactosidaseaktivität unterzogen.

3.2.5 Hefe-Paarungstest (Mating-Test)

Y-187 Hefezellen wurden mit den folgenden Plasmiden transfektiert:

a) pAS1-CYH2-arg3.1

b) pAS1

c) pSE 1112

CG-1945 Hefezellen, die nicht das Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1, sondern nur ein Plasmid der pACTII-libIII/pGAD10-lib-Bank enthielten, wurden mit je einer Kolonie Y-187 Hefezellen a) - c) in 0.5 ml YPD bei 30 °C für 6- 18 h inkubiert. Danach wurden je 10-100 µl auf -Tryptophan, -Leucin, -Histidin + 30 mM 3AT Medium und zur Kontrolle auf -Tryptophan, -Leucin Medium ausgestrichen. Die Hefezellen wuchsen drei bis vier Tage bei 30 °C.

Als Kontrolle wurde je eine Kolonie von CG-1945 Hefezellen, die das Plasmid pACTII enthielt, mit Y-187 Hefezellen a) - c) gepaart.

Nach drei bis vier Tagen wurden Kolonien mit einem Durchmesser von 1-2 cm als positives Ergebnis gewertet. Kleinere Kolonien wurden als schwach positives Ergebnis gewertet. Die Anzahl der Kolonien wurde im Verhältnis zu den Kontrollplatten bestimmt (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Plasmid-Kombinationen im Paarungstest

Plasmid in Y-187, Mat α	Plasmid in CG-1945, Mat a	LacZ-Phänotyp	HIS3-Phänotyp
a) pAS1-CYH2-arg3.1	pACTII-libIII 1-X	β-Gal positiv	pos. Wachstum
b) pAS1	pACTII-libIII 1-X	β-Gal negativ	kein Wachstum
c) pSE 1112	pACTII-libIII 1-X	β-Gal negativ	kein Wachstum
a) pAS1-CYH2-arg3.1	pACTII	β-Gal negativ	kein Wachstum
b) pAS1	pACTII	β-Gal negativ	kein Wachstum
c) pSE 1112	pACTII	β-Gal negativ	kein Wachstum

3.2.6 Plasmidisolation aus Hefezellen

2 ml YPD-Medium wurden mit einer Hefekolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. 1.5 ml wurden bei 14.000 rpm für 5 sec zentrifugiert, der Überstand wurde abgegossen. Der Niederschlag wurde in 0.2 ml Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0.2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0.3 g Glasperlen (Sigma), wurde die Probe für 2 min stark gevortext. Der wäßrige Überstand wurde nach dem Zentrifugieren (14.000 rpm, 5 min, RT) in ein sauberes 1.5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5.2 und 2.5 Volumen Ethanol gefällt. Nach einem Waschschritt mit 70 % Ethanol wurde der Niederschlag in 10 µl H_2O aufgenommen.

3.2.7 Metabolische Markierung von Hefezellen und Immunopräzipitation

Über Nacht wurde eine Kultur des entsprechenden Stammes in methioninfreiem Medium hochgezogen. Im logarithmischen Wachstum wurden 10 OD_{600}-Einheiten geerntet, in 1 ml methioninfreiem Medium resuspendiert und mit 250 µCi ^{35}S-Methionin versetzt. Die Markierung lief 30 min bei 30 °C. Die Zellen wurden sedimentiert, einmal in methioninfreiem Medium gewaschen und dann in 100 µl TEA (10 µl/ml Leupeptin; 10 µl/ml Aprotinin) aufgenommen. Nach Zugabe von 0.1 g Glasperlen wurde die Probe 5x 30 sec stark gevortext, wobei sie zwischen den einzelnen Schritten jeweils 1 min auf Eis inkubiert wurde. Danach wurde 900 µl Lysis-Puffer (mit Protease-Inhibitoren) für die Immunopräzipitation zugegeben, die Glasperlen und nicht aufgeschlossene Zellen wurden sedimentiert und der Überstand abgenommen.

Dem Überstand wurde der Antikörper (HA-Antiköper oder Arg3.1-Antikörper) zugesetzt, der Ansatz 2 h auf Eis inkubiert und dann ca. 100 µl Protein-G-gekoppelte Sepharoseperlen (Pharmacia) zugegeben. Nach 2 h unter sanfter Bewegung bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen, die Sepharoseperlen 5 x mit Schwyzer Waschpuffer, 2 x mit PBS und einmal mit 0.1 PBS gewaschen. Die gebundenen Immunglobuline und das Antigen wurden in Elutionspuffer für die Immunopräzipitation mit 5 % β-Mercaptoethanol 30 min bei 37 °C eluiert. Das Eluat wurde in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und in 0.1 Volumen 10 % Glycerin in H_2O mit Bromphenolblau aufgenommen.

Nach Auftrennung der Proben auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel wurde das Gel fixiert, bei 95 °C auf einem Vakuumtrockner getrocknet und auf einer Platte für den Phosphorimager exponiert.

3.3 Auftrennung und Immundetektion von Proteinen

3.3.1 Elektrophorese in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen

Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gele wurden zur Auftrennung von Proteingemischen entsprechend ihrer Größe eingesetzt. Es wurden 7.3 x 8 x 0.5 cm Mini-Protein-Gele (Biorad) verwendet. Sie setzten sich aus einem unteren Polyacrylamid-Trenngel unterschiedlicher Prozentigkeit und einem oberen Sammelgel aus 5 % Polyacrylamid zusammen.

Die Lösung eines 10 %igen Trenngels setzt sich aus 8 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (29 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid), 6 ml Trenngellösung (0.4 % SDS, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8) und 10 ml H_2O zusammen. Zur Polymerisation wurden 90 µl einer 20 %igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 20 µl TEMED zugesetzt. Die Gelapparatur wurde bis ca. 3 cm unterhalb der oberen Glaskante mit der Gellösung gefüllt. Zur Ausbildung einer geraden Oberfläche wurde die Gellösung sofort mit Isopropanol vorsichtig überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Trenngel mit der Lösung des Sammelgels überschichtet und ein Taschenformer eingesetzt. Das Sammelgel setzt sich aus 1.67 ml einer Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, 2.5 ml Sammelgellösung (1.4 % SDS, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8), 5.8 ml H_2O und 20 µl 20 %ige Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 8 µl TEMED zusammen. Die Proben wurden vor dem Auftragen in 3 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 3 min bei 100 °C denaturiert. Die Elektrophorese in Lämmli-Laufpuffer lief ca. 1 h bei 100 Volt und 50 mA, gestoppt wurde sie an dem Zeitpunkt an dem die untere Ionenfront mit dem Bromphenolblau die untere Grenze des Gels erreicht hatte. Danach wurde das Gel entweder in 45 % Methanol, 10 % Essigsäure mit 0.4 % Coomassie-Blau gefärbt und anschließend entweder in 45 % Methanol, 10 % Essigsäure entfärbt oder für den Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran vorbereitet.

3.3.2 Immunchemischer Proteinnachweis mittels Western-Blot

Das Gel wurde in Transfer-Puffer gespült, auf Transfer-Puffer getränkte Whatman-Filterpapiere gelegt, mit einer Nitrocellulose-Membran und mit weiteren Whatman-Filterpapieren überdeckt und in einem Einsatz mit der Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell) zur Anode hin in der Blotkammer (Biorad) orientiert. Der Transfer lief ca. 1 h bei, 200 Volt. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran in einer Blocklösung (5 % Magermilchpulver, 0.5 x PBST, 0.5 x Transfer-Puffer) für eine Stunde bei RT abgesättigt. Überschüssige Magermilch wurde durch dreimaliges Waschen mit PBST für je 5 min bei RT entfernt. Anschließend wurde mit dem jeweiligen Antiserum oder Antikörper eine Verdünnung von 1:3000 in PBST erstellt, und die Nitrocellulose-Membran wurde für 1-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBST für je 5 min entfernt. Daraufhin wurde die Membran 20 min bei Raumtemperatur mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Protein-A inkubiert (1:3000 in PBST). Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit dem ECL-Reagenz der Firma Amersham (300 µl ECL1, 300 µl ECL2, 300 µl PBS) beträufelt, nach einer Minute wurde die überschüssige Flüssigkeit abgetupft und die Membran auf einem Film exponiert (5 sec bis 4 h).

3.4 Proteingewinnung und Antikörperherstellung

3.4.1 Expression und Aufreinigung von GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen

Eine Kultur des *E.coli*-Stamms BL 21 (Studier, 1986) wurde mit dem für das GST-Fusionsprotein kodierendem Expressionsvektor, transformiert. Der hier eingesetzte Expressionsvektor pGEX-KG ist eine modifizierte Form des pGEX von Smith & Johnson (1988).

Die Transformanten wurden anschließend auf LB-Platten mit Ampicillin (100 mg/ml) ausplattiert. Ein einzelner Klon wurde in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 mg/ml) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Vorkultur wurde zu 500 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 mg/ml) gegeben und bis zu einer OD_{600} von 1.0 bei 37 °C geschüttelt. Nachdem der Kultur 500 µl 1 M IPTG zugesetzt worden war, wurde sie weitere 4 h bei 37 °C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde 20 min bei RT mit 4000 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge 21 M/E, Rotor JA 14 Beckmann). Das Pellet wurde mit 4 °C STE-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert, anschließend 15 min auf Eis gelagert und dann in 20 ml Lysispuffer (STE-Puffer, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 0.2 mM PMSF, 10 µg / ml Aprotinin, 10 µg / ml Leupeptin, 2 % Sarcosyl) resuspendiert und dreimal je 30 sec mit 40 Watt auf Eis ultrabeschallt. Um ein zu starkes Erhitzen der Proben zu vermeiden, wurde zwischen den einzelnen Beschallungen je 1 min pausiert.

Die lysierten Bakterien wurden bei 9500 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge J2-21 M/E, Rotor JA 20, Beckman). Der Überstand wurde mit Triton-X-100 auf eine Endkonzentration von 4 % eingestellt, anschließend mit 500-800 µl Glutathion Agarose (Sigma) 2 h lang bei 4 °C in einem

14 ml Falcon-Röhrchen rotiert. Das Pellet wurde viermal mit STE-Puffer (0.2 mM PMSF, 10 µg / ml Aprotinin, 10 µg / ml Leupeptin), zweimal mit Thrombin-Schneide-Puffer (50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1.2 mM CaCl2, 0.1 % β-Mercaptoethanol, 1 mM DTT) gewaschen, anschließend wurde dem Thrombin-Schneide-Puffer das Thrombin zugegeben (1 Unit / 100 ml Bakterienkultur) und 30 min für 2 h bei 4 °C rotiert, mit dem Ziel, das Protein, welches über eine Thrombinschnittstelle mit der Glutathion-S-Transferase verbunden war, abzuspalten. Um das aufgereinigte Protein zu erhalten, wurde die Lösung zentrifugiert (3 min, 2000 rpm, Tischzentrifuge). Im Überstand befand sich das erwünschte Protein, im Pellet die an die Glutathion-Agarose gekoppelte Glutathion-S-Transferase. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das Pellet noch zweimal mit dem Thrombin-Schneide-Puffer gewaschen. Dem so erhaltenen Überstand wurde Leupeptin (10 µg / ml), EDTA (5 mM) zugegeben.

3.4.2 Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen das Arg3.1-Protein

Das aufgereinigte Protein, welches unter 4.6 beschrieben ist, wurde bei Eurogentic eingeschickt. Dort verabreichte man zwei Kaninchen je 600 µg Protein, appliziert wurden vier Injektionen im einen Zeitraum von zwei Monaten. Das uns zurückgeschickte Serum wurde mittels Western-Blot getestet.

3.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung proteinhaltiger Lösungen wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt (1976). 0.8 ml PBS wurden mit 10 µl der zu analysierenden Proteinlösung versetzt. Zu dieser Lösung wurden 0.2 ml Färbereagenz (Biorad) gegeben. Die Lösung wurde durchmischt und für mindestens 5 min bei RT inkubiert. Aus der Extinktionsmessung bei 595 nm konnte die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve berechnet werden.

4 Ergebnisse

Mittels des Two-Hybrid-Systems wurde aus einer induzierten Hippocampus Bank (Ratte) und einer Bank des gesamten Gehirns (Ratte) nach Proteinen, welche mit dem Arg3.1-Protein interagieren, gesucht. Auf die Ergebnisse dieser Suche wird im Folgenden eingegangen.

4.1 Erstes Hybrid: Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne

Das erste Hybrid besteht aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und dem Arg3.1-Protein. Viele eukaryote Transkriptionsfaktoren, GAL4 eingeschlossen, bestehen aus mindestens zwei verschiedenen Domänen: Einer GAL4-DNA-Bindungsdomäne und einer Aktivierungsdomäne (Johnston et al., 1986). Die GAL4-DNA-Bindungsdomäne von GAL4 bindet an spezifische DNA-Sequenzen, an die „UAS" (upstream activating sequence) und an die 17mer Konsensussequenz in der Promotorregion der Gene, die durch diesen Faktor reguliert werden (Giniger et al., 1985). Die Aktivierungsdomäne interagiert mit dem RNA-Polymerase Komplex, um die Transkription zu initiieren.

Beide Domänen sind für eine Aktivierung der Transkription notwendig und normalerweise Teil eines Proteins. Es ist jedoch *in vivo* nachgewiesen worden, daß die Transkription auch dann initiiert werden kann, wenn die Domänen auf zwei unterschiedlichen Proteinen lokalisiert sind (Keegan et al., 1986).

Durch rekombinante DNA-Technologien ist es möglich, funktionelle Aktivatoren aus separaten Domänen verschiedener Proteine zu konstruieren (Ma & Ptashne, 1988; Brent & Ptashne, 1985). Das native GAL4-Protein ist 881 Aminosäuren lang und hat drei verschiedene Aufgaben: Erstens die Bindung an die „UAS" auf der DNA, zweitens die Aktivierung der Transkription der stromabwärts gelegenen Gene GAL1 und GAL10, und schließlich drittens die Bindung des Regulatorproteins GAL80.

Diese Funktionen können auf dem GAL4-Protein verschiedenen Domänen zugeordnet werden (Johnston et al., 1985).

1. GAL4-DNA-Bindungsdomäne mit Kernlokalisationssequenz (1.- 65. Aminosäure). Die ersten 74 Aminosäuren binden an ein 17mer in der Promotorsequenz von GAL1 und an vier Stellen in der „UAS"

2. Dimerisierungsdomäne (65.-94. Aminosäure)

3. Aktivierungsdomäne (148.-196. Aminosäure und 768.-881. Aminosäure)

4. Domäne für die Interaktion mit GAL80 (851.- 881. Aminosäure)

Das GAL80-Protein ist ein negativer Regulator von GAL4. Durch Zugabe von Galaktose wird der Regulator inhibiert. In dem Hefestamm CG-1945, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist durch eine Mutation das native GAL80-Protein ausgeschaltet, so daß keine Inhibierung des GAL4-Proteins auftritt.

Die im ersten Hybrid verwendete GAL4-DNA-Bindungsdomäne besteht aus den Aminosäuren von Position 1-147 und wurde mit dem Arg3.1-Protein fusioniert. Zu diesem Zweck wurde die arg3.1-cDNA in den TRP1 Schaukelvektor pAS1-CYH2 einkloniert. Die Expression des Proteinhybrids steht unter der Kontrolle des starken Alkohol-Dehydrogenase Promotors. Die Konstruktion des arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne-Hybrids ist unter 4.2 beschrieben.

4.2 Herstellung des Plasmids pAS1-CYH2-arg3.1

Das Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 enthält die Information zur Expression des Fusionsproteins Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne. Die arg3.1-cDNA wurde aus dem Plasmid pSPORT1-arg3.1 (7127 bp, Link et al.,1995) gewonnen. Mittels PCR wurde die DNA-Sequenz mit einer Sma und einer Bam H1 Erkennungssequenz versehen, wodurch die Ligation in pAS1-CYH 2 (8500 bp, Harper et al., 1993) über diese Schnittstellen ermöglicht wurde. Die benutzten Primer sind unter 2.12.1 beschrieben. Die arg3.1-Sequenz, welche in pAS1 eingebaut wurde, enthält ausschließlich die proteinkodierende Sequenz, d.h. ab dem für das Starter-Methionin kodierende Triplet bei dem Nukleotid 197 bis zum Stop-Codon in Höhe des Nukleotids 1386 (siehe Abb. 4).

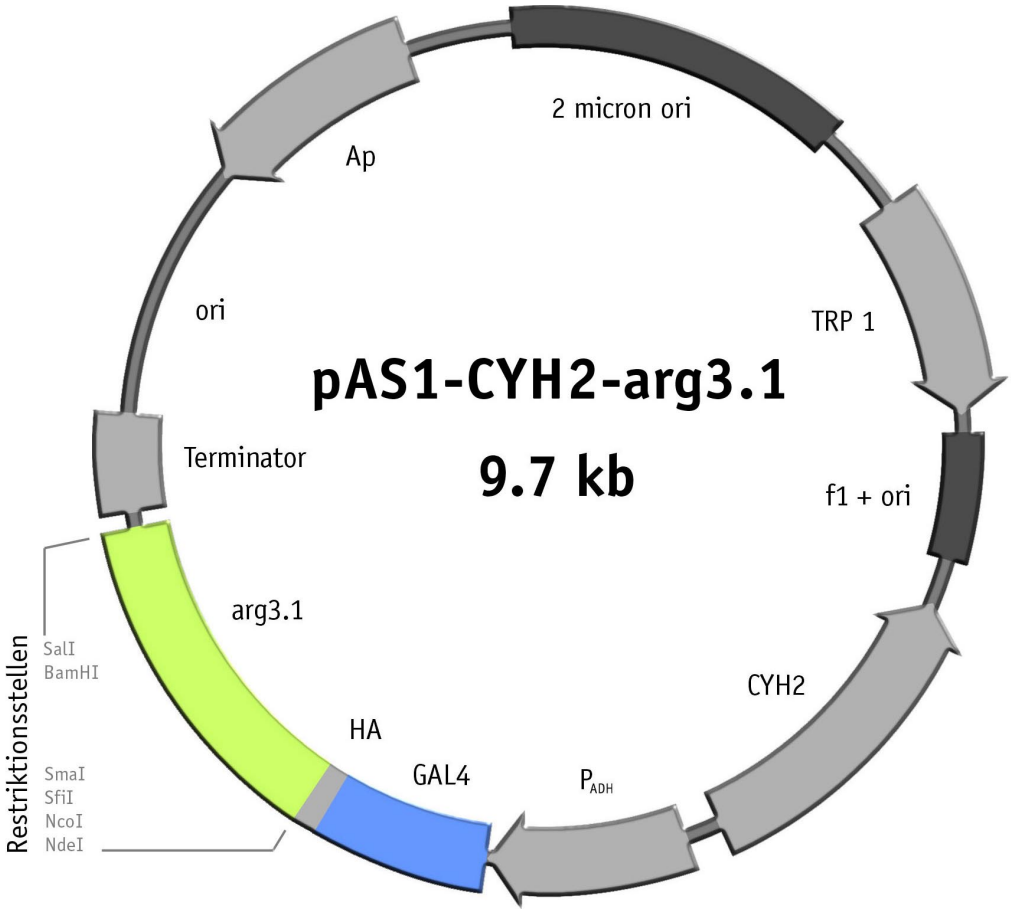

Abbildung 4: Plasmidkarte pAS1-CYH2-arg3.1

pAS1-CYH2-arg3.1 ist ein Schaukel- und Expressionsvektor. pAS1-CYH2-arg3.1 enthält ein *E.coli* col E1 ori als Replikationsursprung und das Ampicillingen zur Ampicillin Selektion in *E.coli*. Weiterhin besitzt das pAS1-CYH2-arg3.1 den Hefe Replikationsursprung 2 µ ori und als Ernährungsselektionsmarker das TRP1-Gen. pAS1-CYH2-arg3.1 trägt das Wildtyp CYH2-Gen der Hefe in dominanter Ausprägung, welches Cycloheximid-Sensitivität auf die transfektierten Zellen überträgt. Das pAS1-CYH2-arg3.1 enthält die cDNA für das Fusionsprotein aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne. Dieses Fusionsgen steht unter der Kontrolle des konstitutiven Wildtyp ADH1-Hefe-Promotor, welcher eine hohe Expression des Fusionsproteins erlaubt. Die GAL4-Sequenz enthält das GAL4-Kernlokalisationssignal.

TRP1: Gen des Tryptophan Stoffwechsels, Ernährungsselektionsmarker. Länge 1000 bp.

CYH2: Gen für das L29 Protein der Hefe-Ribosomen. Länge 1500 bp.

ADH Pro: Promotor des Alkohol-Dehydrogenase-Gens. Länge 710 bp.

ADH Ter: Terminator des Alkohol-Dehydrogenase-Gens. Länge 325 bp.

GAL4 DNA-BD: GAL4-DNA-Bindungsdomäne des GAL4 Transkriptionsaktivators. Länge 410 bp.

arg3.1: cDNA des arg3.1-Gens. Länge 3018 bp.

4.3 Zweites Hybrid: cDNA-Bank-Aktivierungsdomäne

Das zweite Hybrid besteht aus einer cDNA-Bank, welche für potentielle Arg3.1 Bindungsproteine, die an eine GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert sind, kodiert (siehe hierzu auch 2.11.1). Hierzu

wurden mehr als 2 x 10^6 unabhängige cDNAs, die eine Länge zwischen 500 und 2000 Basenpaaren besitzen, mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert. Der GAL4-Aktivierungsdomäne wurde die Kernlokalisations-Sequenz des SV40 T-Antigens hinzukloniert, so daß das exprimierte Fusionsprotein in den Kern der Hefe transportiert wird (Chien et al., 1991).

Es wurden zwei unterschiedliche cDNA-Banken für das Sreening benutzt. Zum einen die pACTII-libIII-Bank (beschrieben unter 2.11.1) und zum anderen die pGAD10-lib-Bank (beschrieben unter 2.11.2). Den Plasmiden ist gemein, daß sie Schaukelvektoren mit Aktivierungsdomäne sind. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in ihren Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Die pACTII-libIII-Bank ist PTZ/CHX induziert. Die RNA wurde aus dem Hippocampus isoliert und in cDNA transkribiert. Die cDNAs sind unidirektional - d.h. gerichtet - einkloniert. Die für die pGAD10-lib-Bank Herstellung notwendige RNA wurde aus dem gesamten Gehirn der Ratte isoliert.

4.4 Hefestamm CG-1945

Als Wirtszellen der Doppeltransfektion mit den Plasmiden pAS1-CYH2-arg3.1 und pACTII-libIII/pGAD10-lib wurden *Saccharomyces cerevisiae* Zellen verwendet. Der Wirtstamm CG-1945 wurde aus dem Stamm HF7c entwickelt (Clontech, 1994; Feilotter, 1994). CG-1945 besitzt Mutationen in den Genen für den Tryptophanstoffwechsel TRP1 und für den Leucinstoffwechsel LEU2. Dies hat zur Folge, daß der Hefestamm nicht mehr in der Lage ist, diese Aminosäuren selbst zu synthetisieren. Für das Wachstum des Hefestammes müssen diese Aminosäuren entweder dem Nährmedium zugesetzt werden, oder aber die nicht mutierten Gene TRP1 und LEU2 werden über Plasmide in die Hefezelle transformiert. Dies bedeutet, daß Hefezellen nur auf Selektionsmedien, die kein Tryptophan und kein Leucin enthalten, wachsen können, wenn sie sowohl das Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 (trägt das TRP1-Gen) als auch ein Plasmid der cDNA-Bank pACTII-libIII/pGAD10-lib (trägt das Gen LEU2) aufgenommen haben.

Weiterhin besitzt der Hefestamm das nicht mutierte Gen HIS3, dessen Expression unter der Kontrolle eines GAL4-Promotors, der die UAS (upstream activating sequence) von GAL4 und die TATA-Box des GAL1 Promotors beinhaltet, steht. Besteht eine Interaktion zwischen dem Fusionsprotein arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne und einem Fusionsprotein Bank-Protein-Aktivierungsdomäne, kann der GAL4-Promotor aktiviert werden, und die Hefe kann auf Selektionsmedium ohne Histidin wachsen. Dies erlaubt eine Selektion der Hefeklone, die mit zwei interagierenden Hybriden transfektiert wurden.

Die Expression des HIS3-Gens ist in dem Stamm CG-1945 allerdings nicht vollständig unterdrückt, deshalb wird den Selektionsmedien 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) beigefügt. Der Histidin Antimetabolit 3AT ermöglicht eine stringentere Histidin Selektion. Die Zugabe von 3AT führt demnach zu einer Verminderung der Anzahl der Klone und des weiteren zu einer Verlängerung der Wachstumszeit (Feilotter et al., 1994).

Der benutzte Hefestamm trägt als zweites Reportergen ein LacZ-Gen. Dem LacZ-Gen wurden als spezifischer GAL4-Promotor drei Kopien der GAL4 17mer Konsensussequenz und die TATA Box des Cycloheximid Promotors hinzukloniert. Damit unterscheidet sich der LacZ-Promotor vom HIS3-Promotor. Die GAL4-DNA-Bindungsdomäne erkennt und bindet an beide Sequenzelemente: GAL1 „UAS" und GAL4 17-mer.

Die Mutation gal4-542 des verwendeten Hefestamms CG-1945 hat zur Folge, daß endogenes GAL4-Protein nicht gebildet werden kann. Das Gen für GAL80, dessen Produkt normalerweise die GAL4 Funktion inhibiert, ist ebenfalls mutiert (Mutation gal80-538), so daß eine Inhibierung von GAL80 durch Galaktose nicht notwendig ist.

4.5 Hefestamm Y-187

Der Wirtstamm Y-187 (*Saccharomyces cerevisiae)* wurde für die Mating (Paarung) Versuche eingesetzt. Die Paarung zwischen haploiden Zellen ist nur bei unterschiedlichen Paarungstypen möglich. Klassifiziert werden die Paarungstypen nach dem sogenannten Paarungstyplocus (*MAT*) in *MAT*a und *MAT*α. Y-187 besitzt den Paarungstyplocus *MAT*α, CG-1945 den *MAT*a (Clontech, 1994; Harper, 1993).

Y-187 besitzt Mutationen in den Genen für den Tryptophanstoffwechsel TRP1 und für den Leucinstoffwechsel LEU2. Der Hefestamm ist nicht mehr in der Lage, diese Aminosäuren selbst zu synthetisieren. Für das Wachstum des Hefestammes müssen diese entweder dem Nährmedium zugesetzt werden, oder aber die nicht mutierten Gene TRP1 und LEU2 werden über Plasmide in die Hefezelle transformiert. Auf Selektionsmedien, die kein Tryptophan und kein Leucin enthalten, können nur Hefezellen wachsen, die sowohl das Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 (trägt das TRP1-Gen) als auch ein Plasmid der cDNA-Bank pACTII-libII/pGAD10-lib I (trägt das Gen LEU2) aufgenommen haben.

Der Mating-Test ermöglicht eine schnelle Methode zur Verifizierung der Ergebnisse: Von Plasmiden, die auf ihre Interaktion hin getestet werden sollten, wurde das eine in den CG-1945 Hefestamm transfektiert, das andere in den Y-187 Hefestamm. Nach einer Inkubationszeit, die das Mating ermöglichte, wurde der diploide Hefestamm auf ein -Trp, -Leu, -His defizientem Medium ausgestrichen, so daß nur Zellen, die doppeltransfektiert waren und deren Proteine miteinander interagierten, zum Wachstum befähigt waren.

4.6 Herstellung des Arg3.1-Antikörpers

Das Plasmid pGEX-KG ist aus dem Plasmid pGEX-2T (Smith & Johnson, 1988; Malone, 1994 unveröffentlicht) entstanden. Der pGEX-2T Vektor exprimiert das einklonierte Gen und die Glutathion-S-Transferase (GST) als Fusionsprotein. Der im Vektor enthaltene *lac*-Repressor - Produkt

des *lac* ^{q}-Gens - bindet an den p_{tac}-Promotor und hemmt auf diese Weise die Expression des GST-Fusionsproteins. Durch Isopropyl-1-thio-β-D-Galactosid (IPTG) kann die Expression induziert werden.

Um das Fusionsprotein aufzureinigen, setzt man Glutathion-Agarose-Kügelchen ein. Um das Protein von Interesse aus diesem Komplex abspalten zu können, existiert zwischen der GST und dem gewünschten Protein eine Thrombin-Schnittstelle. Weiterhin besitzt dieses Plasmid die *E.coli* col E1 ori und das Gen für Ampicillinresistenz. Der pGEX-KG unterscheidet sich vom pGEX-2T durch eine erhöhte Anzahl der Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme und durch einen Einbau von vier GGT-Triplets, kodierend für die Aminosäure Glycin, zwischen der Thrombinschnittstelle und dem gewünschtem Protein. Dadurch ist dem Thrombin die Schnittstelle zugänglicher.

Der C-Terminus von Arg3.1, mit einer Länge von 800 bp, wurde in den Expressionsvektor pGEX-KG einkloniert. Die DNA-Sequenz wurde aus dem Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 mit den Restriktionsenzymen Nco I und Sal I geschnitten und über diese Schnittstellen in das Plasmid pGEX-KG einkloniert.

4.6.1.1 C-terminales Arg3.1-Fragment: arg0.8 in seiner Aminosäuresequenz dargestellt

```
132  MGGKYPVGSE PARHTVSVGV GGPEPYCQEA DGYDYTVSPY AITPPPAAGE LPEQESVGAQ QYQSWVPGED
202  GQPSPGVDTQ IFEDPREFLS HLEEYLRQVG GSEEYWLSQI QNHMNGPAKK WWEFKQGSVK NWVEFKKEFL
272  QYSEGTLSRE AIQRELDLPQ KQGEPLDQFL WRKRDLYQTL YVDAEEEEII QYVVGTLQPK FKRFLRHPLP
342  KTLEQLIQRG MEVQDGLEQA AEPSVTPLPT EDETEALTPA LTSESVASDR TQPE
```

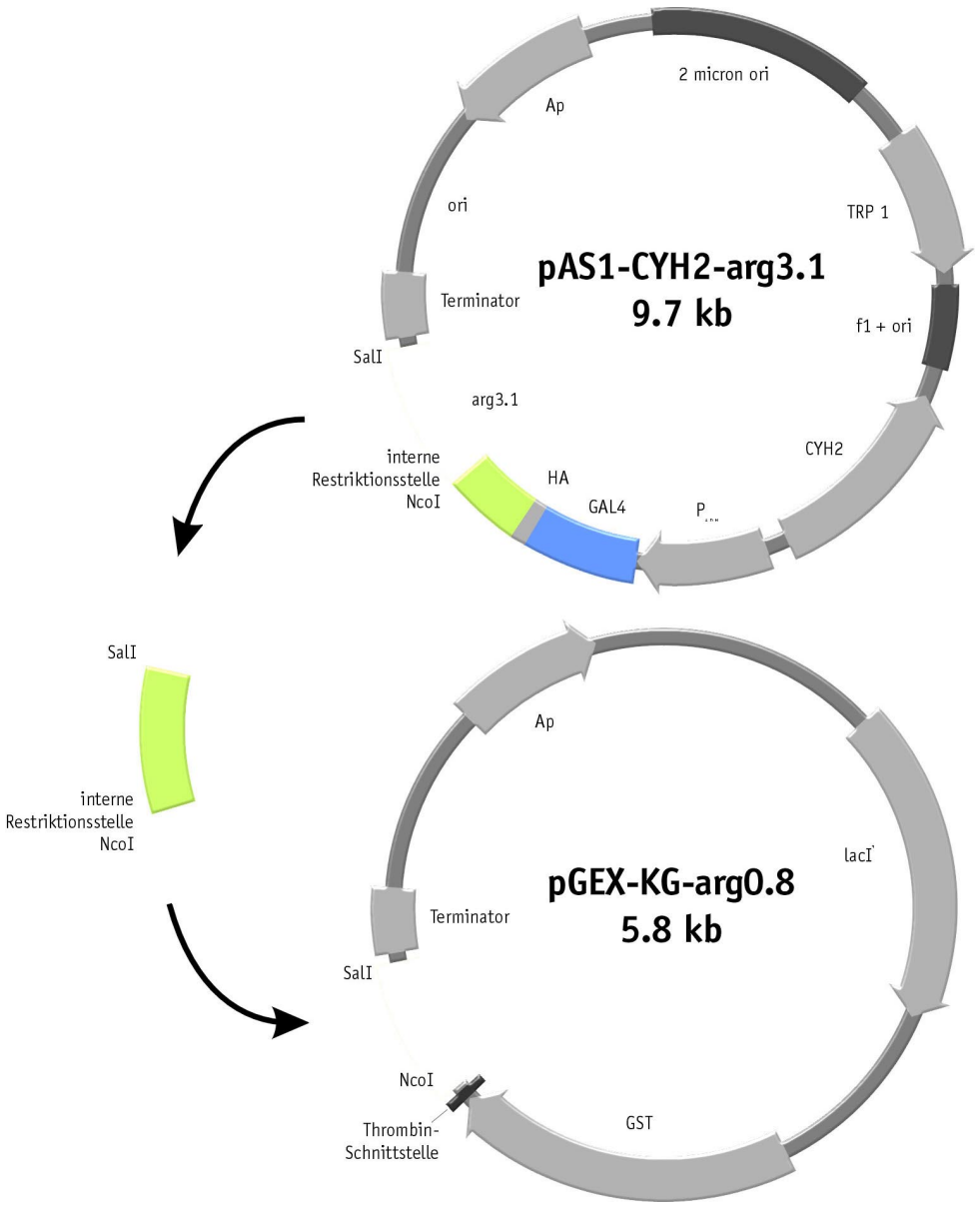

Abbildung 5: Entstehung und Beschreibung des Plasmids pGEX-KG-arg0.8

Das Plasmid pGEX-KG ist aus dem Plasmid pGEX-2T (Smith & Johnson, 1988; Malone, 1994 unveröffentlicht) weiterentwickelt worden. Der pGEX-2T Vektor exprimiert sowohl das einklonierte Gen als auch die Glutathion-S-Transferase (GST) als Fusionsprotein. Der C-Terminus von Arg3.1, mit einer Länge von 800 Basenpaaren wurde aus dem Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 herausgeschnitten und in das Plasmid pGEX-KG einkloniert. Das so enstandene Plasmid wurde pGEX-KG-arg0.8 benannt.

4.7 Vorversuche

Um das Two-Hybrid-System sinnvoll anzuwenden, müssen folgende Fragestellungen erläutert werden:

1. Wird das Fusionsprotein Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne in der Hefezelle gebildet ?

2. Werden die Reportergene durch das Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne-Protein allein, auch ohne Interaktion, aktiviert ?

ad 1.) Die Bildung des Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne-Proteins wurde durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Antikörper und durch metabolische Markierung der Hefe in einer Western-Blot Analyse nachgewiesen. Die benutzten Antikörper waren zum einen der HA-Antikörper (Boehringer), welcher gegen das im pAS1-CYH2 enthaltene HA-Epitop gerichtet ist, und zum anderen der Arg3.1-Antikörper. Auf dem 10 %igen Acrylamidgel wurden der CG-1945 Hefestamm als Leerkontrolle und der mit pAS1-CYH2-arg3.1 transformierte Hefestamm aufgetragen, laufen gelassen und auf Nitrocellulose geblottet. Um die Arg3.1-Antikörper zu überprüfen, wurden zur Kontrolle monoklonale Hämaglutinin-Antikörper eingesetzt, die gegen das HA-Epitop des pAS1-Plasmids gerichtet sind. Die Inkubation wurde zum einen mit dem Arg3.1-Antiserum, zum andern mit Hämaglutinin-Antikörpern durchgeführt (siehe Abb. 6). Anschließend wurden durch die an Protein-A gekoppelte Meerrettich-Peroxidase die gebundenen Antikörper durch den ECL-Assay nachgewiesen. Durch die metabolische Markierung des pAS1-CYH2-arg3.1 enthaltenden CG-1945 Hefestammes, die Auftrennung im Western-Blot und die anschließende Exponation auf einem Phospoimager, gelang die Darstellung des Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne-Proteins. Die Laufhöhe des Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne-Proteins aller drei Western-Blot Analysen waren identisch, was auf eine regelrechte Detektion schließen läßt (siehe Abb. 6).

ad 2.) Eine Aktivierung der Reportergene allein durch die Expression des Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne-Proteins des Two-Hybrid-Systems ist unbedingt auszuschließen. Wäre es in der Lage, die Aktivierung der Reportergene allein auszulösen, wäre eine Identifikation von Arg3.1-Bindungsproteinen nicht möglich. Zu diesem Zweck wurden sowohl der β–Galactosidase-Test als auch das Wachstum auf -Histidin-Selektionsmedium (30 mM 3AT) mit den pAS1-CYH2-arg3.1 transfektierten CG-1945 Hefezellen durchgeführt. Eine Aktivität der beiden Reportergene durch die Expression des Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne-Proteins konnte nicht nachgewiesen werden.

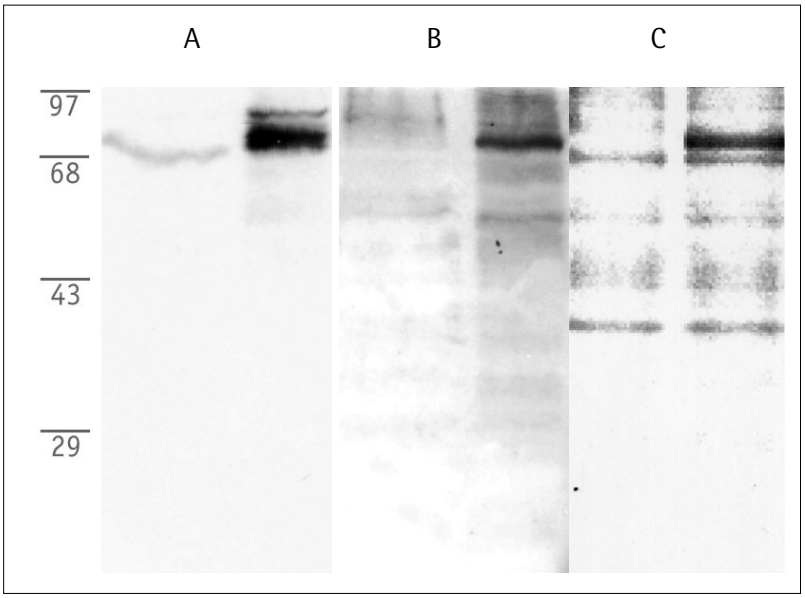

Abbildung 6: Nachweis der Expression der Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne, deren kodierende DNA-Sequenz auf dem Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 enthalten ist. Dieser Nachweis wurde mittels dreier unterschiedlicher Detektionsmöglichkeiten wie folgt erbracht: Auf den Protein-Gelen sind jeweils der untransformierte CG-1945 Hefestamm und der mit pAS1-CYH2-arg3.1 transformierte CG-1945 Hefestamm aufgetragen worden. Der Nachweis der Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne gelingt unter A) mit dem Arg3.1-Antikörper, unter B) mit dem HA-Antikörper, der gegen das Hämaglutinin-Epitop der Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne grichtet ist. C) Durch die metabolische Markierung des mit pAS1-CYH2-arg3.1 transformierten Hefenstammes CG-1945 konnte die zu erwartende Laufhöhe der Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne bestimmt werden.

Als Positivkontrolle des Two-Hybrid-Systems wurde die bekannte Protein-Protein-Interaktion des SNF4- mit dem SNF1-Protein genutzt (Elledge et al., 1991).

1. SNF4-GAL4-DNA-Bindungsdomäne (pSE1112)
2. SNF1-Aktivierungsdomäne (pSE1111)

Durch die Interaktion dieser beiden Fusionsproteine entstand ein funktioneller Transkriptionsfaktor. Beide Plasmide wurden in CG-1945 Hefezellen kotransfektiert. Die kotransfektierten Hefezellen wurden einer Histidin Selektion und einem β-Galactosidasetest unterzogen. Beide Kontrolluntersuchungen zeigten ein positives Ergebnis. Kotransfektierte Hefezellen wuchsen auf Histidin defizientem Selektionsagar und verfärbten sich beim β-Galactosidase Test blau.

Als Negativkontrolle wurden zwei Plasmidkombinationen eingesetzt:

1. Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne (pAS1-CYH2-arg3.1) mit SNF1-Aktivierungsdomäne (pSE1111)
2. Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne(pAS1-CYH2-arg3.1) mit Aktivierungsdomäne (pACTII)

Bei der ersten Plasmidkombination wurde untersucht, ob das Arg3.1-Fusionsprotein mit einem beliebigen Fusionsprotein, welches die Aktivierungsdomäne beinhaltet, interagiert. Die zweite Plasmidkombination schloß eine Interaktion zwischen dem Arg3.1-Fusionsprotein und der Aktivierungsdomäne, die nicht mit anderen cDNAs fusioniert ist, aus. Die Herstellung des Plasmids pACTII-libIII ist unter 2.11.1 beschrieben. Als Kontrolle des β-Galactosidase Tests wurde das Plasmid pCI (15300bp; Fields & Song, 1989) verwendet. Das Plasmid pCI enthält das native GAL4-Protein, das allein in der Lage ist, die Reportergene zu aktivieren.

Die Ergebnisse der Vorversuche sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Vorversuche

Nr.	Plasmidkombination	Hybridkombination	HIS3	lacZ
1	pSE 1112 und pSE1111	DNA-BD / SNF1 und AD / SNF4	pos.	pos.
2	pCI	GAL4-Protein	pos.	pos.
3	pAS1-CYH2-arg3.1	DNA-BD / Arg3.1	neg.	neg.
4	pACTII-libIII/pGAD10-lib	libIII / AD	neg.	neg
5	pAS1-CYH2-arg3.1 und pSE 1111	DNA-BD / Arg3.1 und AD / SNF4	neg.	neg.
6	pAS1-CYH2-arg3.1 und pACTII	DNA-BD / Arg3.1 und AD	neg.	neg.

DNA-BD: GAL4-DNA-Bindungsdomäne, AD: GAL4-Aktivierungsdomäne

4.8 Screening

Gescreent wurden zwei unterschiedliche cDNA-Banken: Erstens die pACTII-libIII-Bank, eine induzierte und gerichtet Hippocampus-Bank (Ratte), zweitens die pGAD10-lib-Bank aus dem gesamten Gehirn (Ratte).

Die Screening-Bedingungen waren bezüglich der HIS3-Selektion unterschiedlich: Es wurde auf -Tryptophan, -Leucin, -Histidin Selektionsmedien mit 30, 40 oder 45 mM 3AT-Konzentrationen gescreent. 3-Amino-Triazol (3AT) ist ein kompetitiver Hemmstoff der Imidazol Glycerinphosphat Dehydrogenase (IGP). Dieses Enzym ist für die HIS3-Synthese notwendig.

Bei erhöhter 3AT-Konzentration ist nur dann ein Wachstum der Hefe auf -HIS-Selektionsmedium möglich, wenn die Interaktion der zu testenden Proteine stark genug ist, das HIS3-Reportergen in ausreichendem Maße zu aktivieren. Dies bedeutet, daß bei steigender 3AT-Konzentration die Selektions-Bedingungen stringenter werden. Als Überblick über die weitere Vorgehensweise findet sich unter 4.9 ein Kaskadenschema des Two-Hybrid-Systems.

4.9 Kaskadenschema des Two-Hybrid-Systems

pAS1-CYH2-arg3.1 pACTII-libIII/pGAD10-lib

Cotransformation von pAS1-CYH2-arg3.1 und pACTII-libIII/pGAD10-lib in CG-1945

(CG-1945 besitzt die GAL4-regulierten Reportergene LacZ und HIS3.)

↓

Selektion der HIS3 positiven Klone

↓

Filterassay auf β-Galactosidase-Aktivität der HIS3 positiven Transformanten

↓

Cycloheximid-Selektion zur Segregation von pACTII-libIII/pGAD10-lib

(pAS1-CYH2-arg3.1 enthaltende Hefen sind Cycloheximid sensitiv.)

↓

Filterassay auf β-Galactosidase-Aktivität

↓

Hefe-Paarungstest zwischen CG-1945 pACTII-libIII/pGAD10-lib und Y-187 mit den folgenden drei Kontrollplasmiden

a) pAS1 b) pAS1-CYH2-arg3.1 c) pSE1112

↓

Filterassay auf β-Galactosidase-Aktivität der positiven Klone aus dem Paarungstest

↓

Sequenzierung der positiven Klone

↓

Sequenz-Vergleich

4.10 Screening der pACTII-libIII/pGAD10-lib-Bank nach Arg3.1-Interaktionspartnern

Unter Verwendung des Two-Hybrid-Systems wurde die pACTII-libIII/pGAD10-lib-Bank nach Arg3.1-Bindungsproteinen durchscreent. CG-1945 Hefezellen wurden mit dem Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 und der pACTII-libIII/pGAD10-lib-Bank kotransfektiert. Doppeltransfektanten wurden auf synthetischen Selektionsmedien ohne Tryptophan, Leucin und Histidin ausplattiert. Die Fähigkeit zum Wachstum auf Medien ohne Tryptophan wurde dabei von pAS1-CYH2-arg3.1, die Fähigkeit zum Wachstum ohne Leucin von pACTII-libIII/pGAD10-lib vermittelt. Dies erlaubte eine Selektion der Klone, die beide Plasmide enthielten und interagierende Hybride exprimierten. Interagierten die zwei Hybride miteinander, wurde die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 mit der Aktivierungsdomäne zusammengeführt, und es erfolgte eine transkriptionelle Aktivierung des Promotors, der die HIS3-Expression kontrolliert.

Eine Aktivierung der Transkription der Reportergene, die stromaufwärts eine GAL4-Bindungssequenz besitzen, wurde zur Identifizierung von Interaktionen zwischen dem bekannten und dem unbekannten Protein genutzt. Nach der Doppeltransfektion von CG-1945 Hefezellen mit den Plasmiden pAS1-CYH2-arg3.1 und pACTII-libIII wurden 114 positive Klone isoliert. Insgesamt umfaßte das Screening 4.5 x 10^5 Klone. Die 10^5 Transformanten der pGAD10 lib cDNA-Bank wurden ebenfalls auf -Tryptophan, -Leucin, -Histidin 30 mM 3AT-Selektionmedium gescreent. Von diesen 10^5 Transformanten erwiesen sich 77 als positiv. Als positiv angesehen wurden Kolonien, die nach vier bis sechs Tagen Wachstum auf Selektionsagarplatten einen Durchmesser von 1-2 mm zeigten, kleinere Kolonien wurden nicht isoliert. Bei erhöhten 3 AT-Konzentrationen verlängerte sich die Wachstumszeit.

Die Klone wurden einem Filterassay auf β-Galactosidase Aktivität unterzogen. Die vorläufig positiven Klone wurden, unabhängig der 3AT-Konzentrationen während des Screenings, auf Selektionsagarplatten (-Tryptophan, -Leucin, -Histidin) mit einer 3AT-Konzentration von 30 mM ausgestrichen.

4.11 Verifizierung der im ersten Screening positiven Klone

Nachdem die Doppeltransfektanten auf HIS3 selektioniert worden waren, wurde das zweite Reportergen LacZ auf seine Aktivität hin untersucht. Die auf Histidin defizientem Medium wachsenden Klone wurden einem β-Galactosidasetest unterzogen. Nach jeder HIS3-Selektion erfolgte ein Test auf LacZ-Expression.

Trotz der unterschiedlichen Reportergene, HIS3 und LacZ, und der unterschiedlichen Promotoren, die die Expression dieser Gene kontrollieren, besteht die Möglichkeit, falsch positive Klone zu erhalten. Dieses hat zwei Gründe:

Erstens: Das unbekannte Bank-Protein interagiert mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne allein, statt mit dem Arg3.1-Fusionsprotein. Um diese Fehlerquelle auszuschalten wurden zwei Kontrollen durchgeführt: Das unbekannte Bank-Protein wurde zum einen mit dem pAS1-Plasmid, welches für die GAL4-DNA-Bindungsdomäne kodiert, zum anderen mit dem pSE1112-Plasmid, welches für das Fusionsprotein GAL4-DNA-Bindungsdomäne und SNF1 (S. Elledge et al., 1993) kodiert, getestet. Eingesetzt wurden diese Kontroll-Plasmide beim Paarungstest der Hefe, um festzustellen, ob das Bank-Protein zur Aktivierung der Reportergene tatsächlich das Fusionsprotein Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne benötigt. Der Paarungstest ist unter 3.2.5 beschrieben.

Zweitens: Die falsch positiven Klone enthalten ein Fusionsprotein (cDNA-Bank/GAL4-Aktivierungsdomäne), welches ohne die Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne direkt beide Reportergene aktivieren kann. Daher mußten positive LacZ und positive HIS3 Transfektanten weiter getestet werden. Es mußte nachgewiesen werden, daß nur durch eine Interaktion Reportergene aktiviert werden konnten.

4.12 Filterassay für die β-Galactosidase-Aktivität der pACTII-libIII/pGAD10-lib-Klone

Alle positiven Klone wurden auf ihre Galactosidaseaktivität hin getestet. Wie unter 3.2.3. beschrieben, wurden die zu testenden Kolonien auf einen Filter ausgestrichen, mit einer Bluo-Gal-Lösung behandelt und anschließend bei 37°C inkubiert. Dabei wurden alle Klone, die sich innerhalb von 8 h blau färbten, als Positive angesehen (siehe Abb. 7).

Es erwiesen sich 83 der 114 Klone der pACTII-libIII-Bank und 31 der 77 Klone der pGAD10-lib-Bank durch den β-Galactosidase-Test als positiv, bei den restlichen Klonen war keine Blaufärbung zu erkennen, sie konnten daher mit diesem Test nicht verifiziert werden.

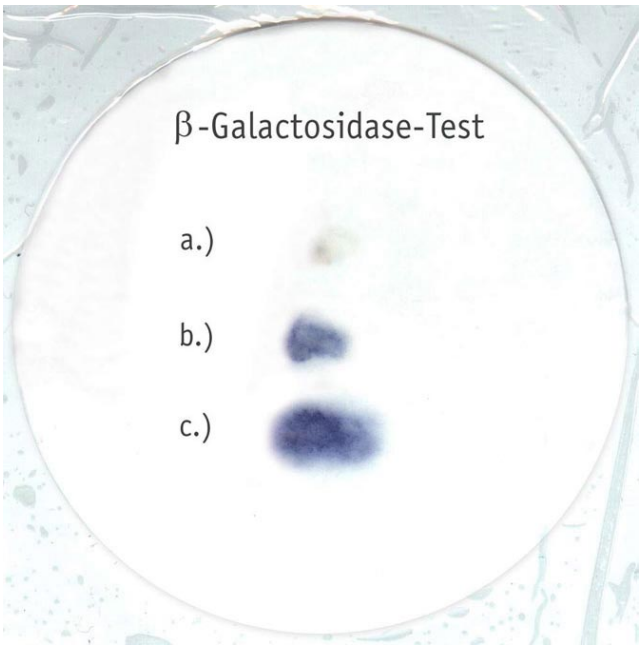

Abbildung 7: β-Galactosidase-Test eines positiven Bank Proteins: Die β-Isoform der 14-3-3-Proteine

Als Hefestamm wurde CG-1945 eingesetzt. Getestet wurde, ob das Fusionsprotein Bank-Protein-Aktivierungsdomäne in der Lage ist, allein das Reportergen LacZ zu aktivieren. Wie unter a) zu sehen, trifft dies nicht zu. Unter b) kann die Interaktion zwischen der Bank-Protein-Aktivierungsdomäne und der Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne durch die Blaufärbung bestätigt werden. Als Positivkontrolle kann man unter c) die zu erwartende Blaufärbung durch das Wildtyp GAL4-Protein erkennen.

4.13 Cycloheximid-Selektion

Ein weiterer Schritt zur Verifizierung der Spezifität der positiven Interaktionen besteht in der Herstellung von Hefezellen, die ausschließlich ein Plasmid der pACTII-libIII/pGAD10-lib-Bank tragen. Dieses wird durch eine Selektion auf Medien erreicht, die Cycloheximid enthalten. Dies läßt sich wie folgt erklären: Der Vektor pAS1-CYH2-arg3.1 trägt das dominante CYH2-Gen, welches die Sensitivität gegenüber Cycloheximid überträgt. Cycloheximid ist ein Inhibitor der eukaryoten Proteinbiosynthese. Es inhibiert die Polypeptid Elongation während der Translation. Das CYH2-Genprodukt ist das ribosomale Protein L29, eine Komponente der 60S ribosomalen Untereinheit. Cycloheximid interagiert mit dem L29-Protein und verhindert dadurch die Proteinbiosynthese.

Mutationen in dem CYH2-Gen können zur Cycloheximid-Resistenz führen: Eine Transversionsmutation, bei der Glutamin durch Glutaminsäure in Position 37 der Aminosäurenkette des Proteins L29 ersetzt wurde, verhindert die Interaktion zwischen Cycloheximid und dem Protein L29 und vermittelt dadurch Cycloheximid-Resistenz. Der Hefestamm CG-1945 trägt die mutierte, rezessive Form des CYH2-Gens, das cyh^{r}2-Gen. Der untransformierte Hefestamm wächst in Anwesenheit von Cycloheximid (Guthrie & Fink, 1991). Ist der Hefestamm jedoch mit dem Plasmid

pAS1-CYH2-arg3.1 transfektiert worden, welches das dominate CYH2-Gen trägt, ist er gegen Cycloheximid sensitiv. Das Wachstum der mit pAS1-CYH2-arg3.1 transfektierten Hefe ist somit unterbunden.

Kotransformanten wurden auf Selektionsmedium ohne Leucin aber mit Cycloheximid ausgestrichen. Dies selektionierte für Leucin-positive, Tryptophan-negative cyh^R Klone, also für jene Klone, die das Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 spontan verloren haben. Um festzustellen, ob die Klone das Plasmid pAS1-CYH2-arg3.1 tatsächlich verloren haben, wurden sie zur weiteren Kontrolle, auf –Tryptophan-Selektionsmedium ausgestrichen. Keiner der 83 positiven Klone war in der Lage, auf -Tryptophan-Platten zu wachsen. Diese Klone tragen also nur das Plasmid aus der pACTII-libIII/pGAD10-lib-Bank, das weder die Tryptophan-Synthese ermöglicht, noch Cycloheximid Sensitivität verleiht. Zur Kontrolle, ob cDNA-Klone aus der pACTII-libIII/pGAD10-lib-Bank die Reportergene allein aktivieren können, werden diese Klone auf Leucin defizientem Selektionsmedium ausgestrichen und danach einem β-Galactosidase-Test unterzogen.

4.14 Filterassay für β-Galactosidase nach Cycloheximid-Selektion der positiven Klone der pACTII-libIII/pGAD10-lib-Bank

Auf Cycloheximid Medium isolierte Klone wurden wieder einem β-Galactosidase-Assay unterzogen. Bei Klonen, die ein positives Signal gaben, war das Plasmid pACTII-libIII/pGAD10-lib allein für eine Blaufärbung verantwortlich, d.h. das Fusionsprotein aus Bankprotein und der GAL4-Aktivierungsdomäne aktivierte das LacZ-Gen ohne vorangegangene Interaktion. Bei diesem Test wurden 14 Klone der pACTII-libIII-Bank und 7 Klone der pGAD10-lib-Bank blau und benötigten daher keine Interaktion des libIII-Aktivierungsdomäne-Hybrids mit dem Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne-Hybrid zur Aktivierung des Reportergens. 69 Klone der pACTII-libIII-Bank und 24 Klone der pGAD10-lib-Bank zeigten innerhalb 8h keine Blaufärbung. Diese Klone benötigten eine Interaktion des libIII-Aktivierungsdomäne-Hybrids mit dem Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne Hybrid zur Aktivierung der Reportergene. Sie wurden weiter überprüft.

4.15 Hefe-Paarungstest (Mating-Test)

Der mit jeweils einem Bank-Protein transfektierte CG-1945 Hefestamm (*MAT* a) wurde mit dem Hefestamm Y-187 (*MAT* α), der verschiedene Kontrollplasmide trägt, gepaart. Nach der Paarung wurde der transfektierte Hefestamm auf -Tryptophan, -Leucin, -Histidin + 30 mM 3AT-Selektionsmedium plattiert und auf die Produktion von β-Galactosidase hin getestet.

69 positive Klone der pACTII-libIII-Bank und 24 positive Klone der pGAD10-lib-Bank wurden dem Hefe-Paarungstest unterzogen. Dabei wurden drei Plasmid-Kombinationen wie folgt getestet:

1) pAS1-CYH2-arg3.1 mit pACTII-libIII/pGAD10-lib

Hiermit erfolgte eine Reproduktion der Arg3.1-Bindung. Ließ sich keine Interaktion nachweisen, so konnte das positive Ergebnis nicht bestätigt werden.

2) pAS1 mit pACTII-libIII/pGAD10-lib

Kam es bei dieser Plasmid-Kombination zu einer Wechselwirkung, beruhte diese auf einer Interaktion zwischen der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und dem Bank-Protein. Diese Wechselwirkung war demnach Arg3.1 unabhängig.

3) pSE1112 mit pACTII-libIII/pGAD10-lib

Durch diese Plasmidkombination wurde überprüft, ob der potentielle Interaktionspartner tatsächlich mit Arg3.1 eine Wechselwirkung einging. Zeigte diese Plasmikombination eine Aktivierung der Reportergene, interagierte das Bank-Protein entweder mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne oder mit dem Protein SNF1. Auch diese Interaktion war Arg3.1 unspezifisch.

Die Ansätze wurden zu gleichen Mengen (100 µl) auf -Tryptophan, -Leucin, -Histidin + 30 mM 3AT Medium ausgestrichen. Weiterhin wurden sie, um die Paarung zu kontrollieren, auf -Tryptophan, -Leucin Medium ausgestrichen. Dabei wurden alle drei Plasmid-Kombinationen eines Klons auf eine gedrittelte Platte ausplattiert. Nach 4 Tagen wurde das Wachstum der Hefen untersucht.

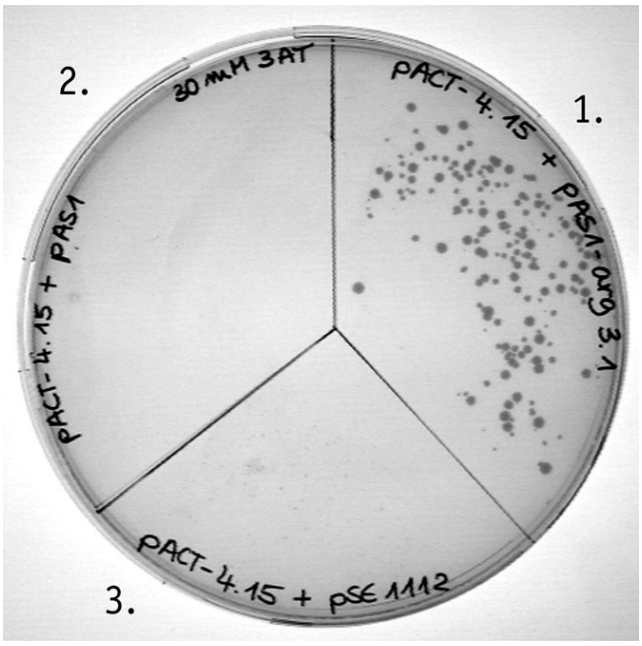

Abbildung 8: Mating-Test: Darstellung des positiven Ergebnisses die β-Isoform der 14-3-3-Proteine. Erläuterungen sind unter 4.18. zu finden.

4.16 Mating-Ergebnisse der pACTII-libIII/pGAD10-lib-Bank

Bei den 69 β-Galactosidase positiven Klonen der pACTII-libIII-Bank erwiesen sich 41 Klone im Mating-Test als positive Klone. Bei den 24 β-Galactosidase positiven Klonen der pGAD10-lib-Bank erwiesen sich zwölf Klone im Mating-Test als positive Klone. Dies äußerte sich dadurch, daß sie ausschließlich mit dem Arg3.1-Fusionsprotein interagierten und durch diese Interaktion in der Lage waren, Histidin zu bilden und somit auf Histidin defizientem Medium wachsen konnten. Die übrigen Klone interagierten entweder mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne allein oder mit dem SNF1-Fusionsprotein oder sie interagierten nicht mit dem Arg3.1-Fusionsprotein.

4.17 Sequenzierung der positiven Klone

Die positiven Klone wurden nach der Didesoxy-Methode nach Sanger im Service Labor des ZMNH sequenziert. Mit Hilfe der Sequenzen konnten die cDNA-Klone aus pACTII-libIII/pGAD10-lib und GAL4-Aktivierungsdomäne kontrolliert werden. Die cDNA der pACTII-libIII/pGAD10-lib Klone mußten im Leserahmen zur GAL4-Aktivierungsdomäne kloniert sein, damit ein Fusionsprotein gebildet werden konnte. 41 cDNA-Klone der pACTII-libIII-Bank wurden sequenziert, davon befanden sich sieben cDNA-Klone im richtigen Leserahmen. Von der pGAD10-lib-Bank wurden zwölf cDNA-Klone sequenziert und nur einer war im richtigen Leserahmen.

Nach dieser Kontrolle wurden die Sequenzen mit unterschiedlichen Datenbanken verglichen. Der Sequenzvergleich erfolgte sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene. Die Nukleotidsequenzen wurden als FastA mit der GenBank und der EMBL Datenbank verglichen. FastA

ist ein Suchprogramm von Pearson und Lipman (Pearson & Lipman, 1988). Die Nukleotidsequenz wurde im Computerprogramm GCG (Wisconsin Sequence Analysis Package) in die Proteinsequenz übersetzt. Die Proteinsequenzen wurden ebenfalls als FastA und zusätzlich als BLAST mit der SwissPro Datenbank verglichen. Weiterhin wurden die Proteinsequenzen als TBLASTX mit der GenBank und der EMBL Datenbank verglichen. Alle Sequenzvergleiche wurden im GCG Programm oder über Internet am National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchgeführt.

4.18 Positive Klone des Screens der pACTII-libIII/pGAD10-lib-Bank

Aus der pACTII-libIII-Bank interagierten 41 Klone nach den Kriterien des Two-Hybrid-Systems mit der Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne. Von diesen 41 Klonen waren sieben im richtigen Leserahmen. Bei fünf von ihnen handelte es sich, wie sich nach dem Datenbankvergleich zeigte, um unbekannte Klone. Die übrigen beiden Klone waren zum einen 100 %ig homolog zu dem β-Subtyp der 14-3-3-Proteine und zum anderen 92 %ig homolog zu Necdin (Maus). Aus der pGAD10-lib-Bank reagierten zwöf als positiv, aber nur ein Klon erwies sich als im Leserahmen befindlich. Dieser Klon war 100 %ig identisch mit Trypsinogen.

4.18.1 Ergebnisse der unbekannten Klone

Fünf Klone reagierten nach den Kriterien des Two-Hybrid-Systems spezifisch mit dem Arg3.1-Protein. Es handelt sich um gänzlich unbekannte Klone mit keiner feststellbaren Homologie zu bekannten Sequenzen in den Datenbanken.

4.18.1.1 pp4_4. DNA-Sequenz, Länge: 400.

```
  1  GTCTGGAGTG GTTGGACGCA TCTGGTTGCT AAGACAGAAA

 51  CTGGCAAGGT GTTTACCTGG GGTCGAGCAG ACTACGGTCA GCTTGGGAGG

101  ACGTTGGGGT CTCCTGAAGC TCAGAAACAC GGAGAGCAAG ATTCATCGCT

151  CGCCTTCCAG AGGCTGCAGA ACAGTGTGCC TTCACCCCTG CACTGCCTGA

201  CAGGAGCAGC AGAGGTTTCT TGTGGCTCAG AACACAATTT GGCGGTAATT

251  AGGGACAAGT GCTGCTCCTG GGGCTGGAAT GAACATGGCA TGTGTGGGGA
```

```
301  CGGCACCGAG TCCAATGTCT GGACTCCAAC TCCAGTGCAG GCCCTGCCGT

351  CACCATCAAG ACTCCTCCTC GTGGGCTGTG GGGCGGGCCA CTCCTTGG
```

4.18.1.2 pp4_4. Proteinsequenz, Länge: 150.

```
  1  VWSGWTHLVA XTETGKVFTW GRAXYGQLGR TLGSPEAXKH GEQDSSLAFQ

 51  RLQNSVPSPL HCLTGAAEVS CGSXHNLAVI RDKCCSWGWN EHGMCGDGTX

101  SNVWTPTPXX ALPSPSXLLL XGCGAGHSLAL CXLPAHPCT CQXSHXYLAH
```

4.18.1.3 pp4_29. DNA-Sequenz, Länge: 378.

```
  1  TCATTTAAGA AAGGAGACAC CGTCTACATC CTCAGGAAAA TTGACCAAAA

 51  CTGGTATGAG GGGGAGCACC ACGGAAGAGT GGGCATTTTC CCAATCTCAT

101  ACNTAGAGAA ACTAACACCC CCAGAAAAAG CGCAGCCCGC GAGACCACCA

151  CCCCCAGTCC AGCCGGGAGA GATTGGAGAA GCCATAGCCA AGTACAACTT

201  CAATGCAGAC ACAAATGTGG AACTCTCCCT GAGAAAGGGG GACAGGATTA

251  TTCTTCTCAA AAGAGTTGAT CAAAACTGGT ATGAAGGTAA AATCCCANGA

301  ACCAACAGAC AAGGCATCTT CCCTGTCTCC TACGTANAAN TTGTCAANA G

351  GAACACNAAN GGTTCTGAGA TTACCCCG
```

4.18.1.4 pp4_29. Proteinsequenz, Länge: 140.

```
  1  SFKKGDTVYI LRKIDQNWYE GEHHGRVGIF PISYaEKLTP PEKAQPARPP

 51  PPVQPGEIGE AIAKYNFNAD TNVELSLRKG DRIILLKRVD QNWYEGKIPa

101  TNRQGIFPVS YVXXVXRNTX GSEDYPDPPL PHXYSXDXIL
```

4.18.1.5 pp45_22. DNA-Sequenz, Länge: 317.

```
  1 CNGACGCGTG GGCGGACGCG TGGGCGGACG CGTGGGCGGA CNCGTGGGCG

 51 CTGGCCGCGC CACATCTCCT CGCTCTGTGT CCGCGCGTAT CCAGCCGGCT

101 CTTCTGCAGC GGGGTCTCGG GACGCGCCCA TGCGGCCACT CACCATGTCT

151 GGGCACTTTC TGCTAGCGCC CATCCCCGAN TCNTCNTCCG ACTACCTCCT

201 GCCCAAGGAC ATTAANCTGG CGGTGCTGGG CGCGANTTGT GTGGGCAANA

251 GCGCAATGAT TGTGCGCTTC TTGACCAANA NATTCATCGG CGACTACGAA

301 CCCAACACAG GCAAACT
```

4.18.1.6 pp45_22. Proteinsequenz, Länge: 132.

```
  1  XTRGRTRGRT RGRTRGRWPR HISSLCVRAY PAGSSAAGSR DAPMRPLTMS

 51  GHFLLAPIPX SSSDYLLPKD IXLAVLGAXC VGXSAMIVRF LTXXFIGDYE
```

```
101  PNTGKLYSXL VYVXGDQLXL XIXXTPGRHP XP
```

4.18.1.7 pp45_28. DNA-Sequenz, Länge: 499.

```
  1  GGGATCCCTA GGCTACGTTT TTTCCTTTCA AAATTAAACC TTATGGAGTC

 51  TCAAAGAAAT AGACTGCATA TAGCTCTGTT GGCCCTGTCA AGAGCTTCCA

101  GCCAGGAGGA GGGCACCTGT GTGGTCCTCA CACTGGCCCA CTCCCTTTCA

151  GGCAGTCTGC TCTGTTTCTG AGGTGACTCA GCCCTTGAGC CACATGTTTG

201  TTGTCTCCTC TGGTTGCCCA GAACTCAGTC CTGANATTTA GGGAATGTGC

251  TTTCAGATGT CAGGAGATGT GTCCATAGAG GTAGCCGGTG GGGACATCAA

301  CTCCTCTCTC CTACACACCA CCAGTGCCTG TTGTTCTTCA NCTTTGTGTG

351  ACACCAGGGT CTGTATGGAC AGACCACCCC GCCTTGCCTG GTGGCTCCTG

401  CACATCCCAC TCTACGCCTC ANCCTCCCTT CTAGGTGTTG TGTTCTTANC

451  TTGTGCAACT ACANAAGGGC GTTGGTTTGT TGGCTCAANC CCCTACCCA
```

4.18.1.8 pp45_28. Proteinsequenz, Länge: 56.

```
  1  GIPRLRCFLS KLNLMESQRN RLHIALLALS RASSQEEGTC VVLTLAHSLS

 51  GSLLCF
```

4.18.1.9 pp45_31. DNA-Sequenz, Länge : 339.

```
  1  GCCGAAAAGA AAAGAGGAGA CTGTGGTAAA GGCCTTCTCC TTTCCAGAGG

 51  TGGCTTCCGG CTCGAGGACC TTCGCAGTGG TCCCTGGCTG GGGAGCGTTA

101  GGGTCGACCC ACGCGTCCGG TCCCGGATGT GGGCCCGGCG GCAGGTGAAG

151  TANTTGGGTA GGAGCACATC GGGGACCGCA AGGCACAGCA GGTGTTTGTA

201  NATGAGGGCC ACACGGTGCA GTTCGTATGC CGGGCANATG GCGACCCTCC

251  ACCANCTATC CTTTGGCTCT CACCCCGCAA GCACTTGGTC TCANCCAANA

301  NCAATGGGCG GCTCACANTC TTCCCTGATG GCACGCTGG
```

4.18.1.10 pp45_31. Proteinsequenz, Länge: 115.

```
  1  AEKKRGDCGK GLLLSRGGFR LEDLRSGPWL GSVRVDPRVR SRMWARRQVK

 51  XLGRSTSGTA RHSRCLXMRA TRCSSYAGXM ATLHXLSFGS HPASTWSXPX

101  XMGGSXSSLM ARWXC
```

4.18.2 Beta-Subtyp der 14-3-3-Proteine

Der β-Subtyp der 14-3-3-Proteine zeigt eine Interaktion mit dem Arg3.1-Protein. Die Sequenzvergleiche sind im Folgenden dargestellt. Der Klon ist auf Nukleotid- und auf Proteinebene mit dem β-Subtyp der 14-3-3-Proteine identisch (Accessnnr.: s55223). Auf Proteinebene ist die Proteinsequenz über eine Länge von 130 Aminosäuren zu 100 % homolog. Auf Nukleotidebene zeigt sich eine nahezu 100 %ige Homlogie von 385/386 Nukleotiden. Mitglieder der hoch konservierten 14-3-3-Proteinfamilie wurden in vielen Organismen gefunden und sind an Signalmechanismen in verschiedenen Zelltypen beteiligt. Es ist allerdings nicht möglich, eine eindeutige Aussage über die Funktion der 14-3-3-Proteine zu machen (Aitken et al., 1996; Broadie et al., 1997; Tzivison et al., 1998; Matto-Yelin et al., 1997).

Sequenzvergleich auf Nukleotidebene (aus EMBL/GenBANK Datenbanken)

Query = Klon; Sbjct = 14-3-3-Protein

```
Query:    10 GATGATATGGCCGCAGCTATGAAGGCTGTAACAGAGCAGGGACATGAACTCTC 62
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   220 GATGATATGGCCGCAGCTATGAAGGCTGTAACAGAGCAGGGACATGAACTCTC 272

Query:    63 CAATGAAGAGAGGAATCTACTCTCTGTTGCCTACAAGAATGTGGTAGGTGCCCGCCGTTC 122
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   273 CAATGAAGAGAGGAATCTACTCTCTGTTGCCTACAAGAATGTGGTAGGTGCCCGCCGTTC 332

Query:   123 TTCCTGGCGAGTCATCTCCAGCATCGAACAGAAAACAGAGAGGAATGAGAAGAAGCAGCA 182
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   333 TTCCTGGCGAGTCATCTCCAGCATCGAACAGAAAACAGAGAGGAATGAGAAGAAGCAGCA 392

Query:   183 GATGGGCAAGGAGTACCGTGAGAAGATAGAGGCCGAGCTGCAGGACATCTGCAGTGACGT 242
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   393 GATGGGCAAGGAGTACCGTGAGAAGATAGAGGCCGAGCTGCAGGACATCTGCAGTGACGT 452
```

```
Query:   243 TCTGGAACTGTTGGACAAATATCTCATTCTCAATGCTACCCATGCAGAAAGCAAAGTGTT 302
             |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   453 TCTGGAGCTGTTGGACAAATATCTCATTCTCAATGCTACCCATGCAGAAAGCAAAGTGTT 512

Query:   303 CTACTTAAAAATGAAAGGAGACTATTTTAGGTATCTTTCTGAAGTTGCATCTGGAGATAA 362
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:   513 CTACTTAAAAATGAAAGGAGACTATTTTAGGTATCTTTCTGAAGTTGCATCTGGAGATAA 572

Query:   363 TAAACAAACCACTGTGTCAAACTCCCAGCAGGCGTTCCAAGAA 405
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct:   573 TAAACAAACCACTGTGTCAAACTCCCAGCAGGCGTACCAAGAA 615
```

Sequenzvergleich auf Proteinebene

Query = Klon; Sbjct = 14-3-3-Protein β-Subtyp

```
Query:     4 DDMAAAMKAVTEQGHELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVISSIEQKTERNEKKQQ 61
             DDMAAAMKAVTEQGHELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVISSIEQKTERNEKKQQ
Sbjct:   216 DDMAAAMKAVTEQGHELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVISSIEQKTERNEKKQQ 393

Query:    62 MGKEYREKIEAELQDICSDVLELLDKYLILNATHAESKVFYLKMKGDYFRYLSEVASGDN 121
             MGKEYREKIEAELQDICSDVLELLDKYLILNATHAESKVFYLKMKGDYFRYLSEVASGDN
Sbjct:   394 MGKEYREKIEAELQDICSDVLELLDKYLILNATHAESKVFYLKMKGDYFRYLSEVASGDN 573

Query:   122 KQTTVSNSQQA
             KQTTVSNSQQA
Sbjct:   574 KQTTVSNSQQA
```

4.18.3 Necdin

Necdin zeigt eine spezifische Interaktion mit dem Arg3.1-Fusionsprotein. Die Sequenzvergleiche sind im nachfolgenden Abschnitt zusammengefaßt. Der Klon zeigt eine 92 %ige Homologie zu der Necdin-cDNA der Maus auf Nukleotid- und Proteinebene. Necdin ist ein im Kern lokalisiertes Protein (Accessionnr.: M80840). Eine besonders hohe Expression konnte im Hypothalamus, Thalamus, Corpus amygdaloideum und in Pyramidenzellen des Hippocampus nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von Necdin spezifisch für postmitotische Neurone ist und aus diesem Grund als Indikator für neuronale Differenzierung sinnvoll zu sein scheint (Uetsuki et al., 1996).

Sequenzvergleich auf Nukleotidebene (aus EMBL/GenBANK Datenbanken)

Query = Klone; Sbjct = Necdin

```
Query:    58 ATGTCGGAACAAAGTAAGGACCTGAGCGACCCTAACTTTGCCGCTGAGGACCCCGACACT 117
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || |||| |||||||  |
Sbjct:    68 ATGTCGGAACAAAGTAAGGACCTGAGCGACCCTAACTTTGCAGCCGAGGTCCCCGACTGT 127

Query:   118 GAGATGCAGGTCAGCGATGCTGTTCCGGTGGGGGTCCCTCCTCCCGCTCCTCTGGCCGCG 177
             |||||||||| ||||||||| ||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||||
Sbjct:   128 GAGATGCAGGACAGCGATGCCGTTCCGGTGGGGATCCCTCCTCCCGCTTCTCTGGCCGCT 187

Query:   178 AACCTCTCAGGGCCATCGTGCGCTCCGGAAGGCCCTATGGCAGCCCCACAGGCCTCGCCA 237
             |||||| |||||||| |||||||||| ||||||||||||||||||| |||||||||||||
Sbjct:   188 AACCTCGCAGGGCCACCGTGCGCTCCCGAAGGCCCTATGGCAGCCCAACAGGCCTCGCCA 247

Query:   238 CCACCTGCAGAACGGTTTGAAGAGGTTGACCCTAAGATCCTGCAGCAGGCCGCAGAAGAN 297
             || || | ||||||| | ||||| ||||||||||| |||||||||||||||||||| ||
Sbjct:   248 CCGCCCGAAGAACGGATAGAAGATGTTGACCCTAAAATCCTGCAGCAGGCCGCAGAGGAG 307
```

```
Query:   298 GGCCGCGCCCACCANCCCCAGAGCCCANCCCGGCCGATCCCANCACCGCCGGCCCCTGCC 357
             ||||||||||||||| |||||||| ||| ||||||||||||||| ||||||| |||||||||
Sbjct:   308 GGCCGCGCCCACCAGCCCCAGAGTCCAGCCCGGCCGATCCCAGCACCGCCAGCCCCTGCC 367

Query:   358 CAGCTGGTGCAGAAGGCGCACGANCTCATGTTG 390
             ||||||||||||||||||||||| ||||||| |
Sbjct:   368 CAGCTGGTGCAGAAGGCGCACGAGCTCATGTGG 400
```

Sequenzvergleich auf Proteinebene

```
  Plus Strand HSPs:
Length = 325

 Score = 491 (218.7 bits), Expect = 2.2e-57, P = 2.2e-57
 Identities = 94/110 (85%), Positives = 97/110 (88%)

Query:     1 MSEQSKDLSDPNFAAEDPDTEMQVSDAVPVGVPPPAPLAANLSGPSCAPEGPMAAPQASP 60
             MSEQSKDLSDPNFAAE PD EMQ SDAVPVG+PPPA LAANL+GP CAPEGPMAA QASP
Sbjct:     1 MSEQSKDLSDPNFAAEAPDCEMQDSDAVPVGIPPPASLAANLAGPPCAPEGPMAAQQASP 60

Query:    61 PPAERFEEVDPKILQQAAEXGRAHXPQSPXRPIPXPPAPAQLVQKAHXLM 110
             PP ER E+VDPKILQQAAE GRAH PQSP RPIP PPAPAQLVQKAH LM
Sbjct:    61 PPEERIEDVDPKILQQAAEEGRAHQPQSPARPIPAPPAPAQLVQKAHELM 110
```

4.18.4 Trypsinogen

Nach dem mit dem Arg3.1-Fusionsprotein die pGAD10-lib-Bank nach Interaktionspartnern durchgescreent wurde, erwies sich Trypsinogen als ein spezifisch mit dem Arg3.1-Fusionsprotein interagierendes Protein. Der Klon ist sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene identisch mit

Trypsinogen. Trypsinogen wird durch die Abspaltung eines Peptids im N-Terminalen Bereich zu Trypsin (Hedstrom et al., 1996). Trypsin ist eine Serin-Protease. Der Klon ist auf Nukleotidebene mit über 288 Basenpaaren und auf Proteinebene mit über 95 Aminosäuren 100 % homolog (Accessionnr.: V 01273). Die Sequenzvergleiche sind im folgenden Abschnitt dargestellt.

Sequenzvergleich auf Nukleotidebene (aus EMBL/ GenBANK Datenbanken)

```
lib14     36 TGACAAGATCGTTGGAGGATACACCTGCCCGGAACATTCTGTCCCCTACCAGGTGTCCCT 95
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
tryp.     75 TGACAAGATCGTTGGAGGATACACCTGCCCGGAACATTCTGTCCCCTACCAGGTGTCCCT 134

lib14     96 GAACTCTGGCTACCACTTCTGTGGAGGTTCCCTCATCAATGACCAGTGGGTGGTGTCTGC 155
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
tryp.    135 GAACTCTGGCTACCACTTCTGTGGAGGTTCCCTCATCAATGACCAGTGGGTGGTGTCTGC 194

lib14    156 AGCTCACTGCTACAAATCCCGCATCCAAGTGAGACTGGGAGAGCACAACATCAATGTCCT 215
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
tryp.    195 AGCTCACTGCTACAAATCCCGCATCCAAGTGAGACTGGGAGAGCACAACATCAATGTCCT 254

lib14    216 TGAGGGCGATGAGCAATTTATCAATGCTGCCAAGATCATCAAGCACCCCAACTATAGTTC 275
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
tryp.    255 TGAGGGCGATGAGCAATTTATCAATGCTGCCAAGATCATCAAGCACCCCAACTATAGTTC 314


lib14    276 GTGGACCCTGAACAATGACATCATGCTGATCAAGCTCTCTTCCCCTGTGNAA 327
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
tryp.    315 GTGGACCCTGAACAATGACATCATGCTGATCAAGCTCTCTTCCCCTGTGAAA 366
```

Sequenzvergleich auf Proteinebene

```
lib14     13 DKIVGGYTCPEHSVPYQVSLNSGYHFCGGSLINDQWVVSAAHCYKSRIQV 62
             DKIVGGYTCPEHSVPYQVSLNSGYHFCGGSLINDQWVVSAAHCYKSRIQV
tryp.     56 DKIVGGYTCPEHSVPYQVSLNSGYHFCGGSLINDQWVVSAAHCYKSRIQV 225
```

```
lib14    63 RLGEHNINVLEGDEQFINAAKIIKHPNYSSWTLNNDIMLIKLSSPV 108
            RLGEHNINVLEGDEQFINAAKIIKHPNYSSWTLNNDIMLIKLSSPV
tryp.   226 RLGEHNINVLEGDEQFINAAKIIKHPNYSSWTLNNDIMLIKLSSPV 363
```

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems nach Interaktionspartnern des Arg3.1-Proteins gesucht. Bislang sind Proteine, welche möglicherweise mit dem Arg3.1-Protein interagieren, völlig unbekannt.

Zwei unterschiedliche Banken wurden eingesetzt: Eine induzierte Hippocampus Bank (Ratte), die pACT-libIII-Bank, und eine Bank des gesamten Gehirns (Ratte), die pGAD10-lib-Bank. Aus der pACT-libIII-Bank erwiesen sich 41 Klone als positiv. Davon befanden sich nur sieben im Leserahmen. Weitere fünf zeigten im Datenbank-Vergleich keine signifikante Homologie zu bekannten Proteinen, so daß man von bisher unbekannten Proteinen ausgehen muß. Bei den übrigen zwei Klonen handelte es sich zum einen um einen Klon, welcher 100 %ig homolog zu dem Beta-Subtyp der 14-3-3-Proteine war, zum anderen um einen Klon, der eine 92 %ige Homologie zu der cDNA von Necdin der Maus aufwies. Von den zwölf positiven Klonen der pGAD10-lib-Bank befand sich nur ein Klon im Leserahmen, welcher 100 %ig homolog zu Trypsinogen war.

Zunächst werden die Anwendungsmöglichkeiten und Problematiken des Two-Hybrid-Systems erläutert, im weiteren Verlauf werden die potentiellen Interaktionspartner des Arg3.1-Proteins diskutiert.

Neben der Identifikation von Interaktionspartnern des Arg3.1-Proteins ist die Interpretation der Ergebnisse von großer Bedeutung. Dazu ist es notwendig Vor- und Nachteile des Two-Hybrid-Systems näher zu beleuchten. Das Two-Hybrid-System bietet die Möglichkeit, Protein-Protein-Interaktion *in vivo* zu detektieren (Chien et al., 1991; Fields & Song, 1989; Fields & Sternglanz, 1994). Ein bestimmtes Protein, das sogenannte bait-Protein, wird in Hefe als Hybrid mit der DNA-Bindungsdomäne exprimiert. Zusätzlich werden Hybride, bestehend aus Aktivierungsdomäne und einer Bank, also einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine, in Hefe transformiert. Bei einer Interaktion zwischen dem bait-Protein und einem Protein der Bank entsteht ein funktionstüchtiger Transkriptionsfaktor mit DNA-Bindungsdomäne und Aktivierungsdomäne. Letztere enthält eine saure Region, die für die Aktivierung der Transkription notwendig ist (Keegan et al., 1986). Mittels Reportergenen kann diese Interaktion nachgewiesen werden.

Bei der Suche galt ein Klon nach den Kriterien des Two-Hybrid-Systems dann als positiv, wenn er ausschließlich in Interaktion mit der Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne in der Lage war, die beiden Reportergene, welche unter der Kontrolle zweier unterschiedlicher Promotoren standen, zu aktivieren. Die Transkription und die anschließende Translation der Reportergene ermöglichte die Synthese zweier Enzyme: Galaktosidase und Imidazol Glycerinphosphat (IGP) Dehydrogenase, ein Enzym, welches für die Histidin-Synthese notwendig ist. Nur wenn der Nachweis der oben genannten Enzyme in Abhängigkeit von der Interaktion mit der Arg3.1-GAL4-DNA-Bindungsdomäne erbracht wurde, galt ein Klon als positiv.

Durch die Wahl der Bank, die eingesetzt wird, kann die Wahrscheinlichkeit, Bindungspartner zu finden, beeinflußt werden. Für diese Arbeit wurde sowohl eine induzierte Hippocampus Bank (Ratte) als auch eine unstimulierte Bank des gesamten Gehirns (Ratte) eingesetzt. Da das Arg3.1-Gen im Hippocampus induzierbar ist (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995), erhöht die Wahl einer induzierten Hippocampus Bank die Wahrscheinlichkeit, potentielle Bindungspartner des Arg3.1-Proteins zu finden.

Das Two-Hybrid-System kann auch eingesetzt werden, um eine vermutete Interaktion zweier bekannter Proteine zu detektieren. Ferner ist es nach erfolgreicher Detektion eines Interaktionspartners möglich, durch Deletionen der kodierenden DNA die Domäne zu identifizieren, die für die Interaktion verantwortlich ist (Chien et al., 1991). Zusätzlich können durch gezielte Punktmutationen einzelne Aminosäuren identifiziert werden, welche für die Interaktion entscheidend sind (Li & Fields, 1993).

Vergleicht man das Two-Hybrid-System mit herkömmlichen Methoden zum Test von Protein-Protein-Interaktion, sind folgende Vor- und Nachteile festzustellen: Von Vorteil ist, daß das Two-Hybrid-System ein *in vivo* System ist. Die Detektion findet in Hefe, einem eukaryoten Organismus, statt. Es wird daher angenommen, daß die synthetisierten Proteine in ihrer nativen Konfiguration vorliegen (Allen et al., 1995; Nishimune et al., 1996). Zudem ist das Two-Hybrid-System sehr sensitiv, selbst schwache und transiente Interaktionen sind erfaßbar (Yang et al., 1995). Das Screenen einer Bank erlaubt die direkte Identifikation der cDNA, welche für das interagierende Protein kodiert. Das Protein muß nicht aus dem Gewebe isoliert werden. Im Gegensatz dazu liegen bei den herkömmlichen Methoden die zu testenden Proteine in denaturierter Form vor, starke Interaktionen sind zur Detektion meist notwendig, und die Proteine müssen vor Versuchsbeginn extrahiert und aufgereinigt werden.

Zu den Nachteilen des Two-Hybrid-Systems zählen folgende Eigenschaften: Sowohl das bait-Protein, als auch die Bank-Proteine müssen, um durch ihre Interaktion die Reportergene aktivieren zu können, in den Zellkern gelangen. Dies kann ein Problem für Proteine mit hydrophoben Domänen darstellen, das aber umgangen werden kann, indem man nur die hydrophilen Domänen des Proteins einsetzt (Nishimune et al., 1996). Vorausetzung dafür ist, daß die hydrophoben Domänen nicht für die gesuchte Interaktion verantwortlich sind. Zu bedenken gilt es weiterhin, daß einige Protein-Protein-Interaktionen von posttranslationellen Modifikationen abhängig sind, welche die Hefe nicht in derselben Art und Weise vollbringt wie die Säugerzelle, so daß einige Interaktionen fälschlicher Weise nicht detektiert werden, während auch falsch positive Interaktionen detektiert werden.

Einige in Hefe exprimierte Fusionsproteine sind für ihre Wirtszelle toxisch oder letal. Dies kommt unter anderem dadurch zustande, daß die Fusionsproteine in großer Anzahl in Hefe exprimiert werden. Um dieses Problem zu umgehen, können solche Proteine in Expressionsvektoren, welche die

Fusionsproteine in geringerer Anzahl exprimieren, sogenannte „low copy" Plasmide (Rose et al., 1987), umkloniert werden. Weiterhin muß ausgeschlossen werden, daß das bait-Protein allein, ohne Interaktion, in der Lage ist, die Reportergene zu aktivieren, dafür sind saure Bestandteile des bait-Proteins verantwortlich gemacht worden (Ma & Ptashne, 1987).

Kritischer Prüfung bedarf die Detektion zweier reell interagierender Partner, welche jedoch nie in der Säugerzelle interagierten, da die Proteine entweder in unterschiedlichen Zelltypen, oder in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind, oder aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung exprimiert werden.

Das größte Problem des Two-Hybrid-Systems ist jedoch die hohe Anzahl der falsch positiven Klone. Diese Klone sind unabhängig von dem bait-Protein in der Lage, die Reportergene zu aktivieren. Vermutlich besitzen Domänen dieser Klone Ähnlichkeiten zu Aktivierungsdomänen. Die Zahl der falsch positiven Klone kann durch die Tatsache, daß zwei Reportergene unter der Kontrolle zweier unterschiedlicher Promotoren liegen, reduziert werden. Ein Bankprotein, welches in der Lage ist, nur einen Promotor anzuschalten, kann im Rahmen der Kontrollversuche leicht erkannt werden. Stringentere Versuchsbedingungen können durch unterschiedlichen Konzentrationen von 3-Aminotriazol (3AT), einem kompetitiven Hemmers des Enzyms, welches für die Histidin-Synthese notwendig ist, erreicht werden (Durfee et al., 1993; Kishore & Shah, 1988). Trotz stringenter Versuchsbedingungen mit 30 mM 3AT und trotz Durchführung aller Kontrollen, welche im Ergebnisteil detailliert beschrieben sind, waren in der vorliegenden Arbeit aus der pACT-libIII-Bank 34 von 41 Klonen, aus der pGAD10-libIII-Bank 11 von 12 Klone als falsch positiv einzuordnen.

Als mögliche Interaktionspartner des Arg3.1-Proteins, die durch das Two-Hybrid-System identifiziert werden konnten, stellten sich drei bekannte und fünf unbekannte Proteine heraus. Es mußte untersucht werden, ob ihre Interaktion in Betracht gezogen werden kann. Sie werden in den nachfolgenden Abschnitten detailliert besprochen.

Ein möglicherweise mit dem Arg3.1-Protein interagierendes Protein ist Trypsinogen, welches das Precursor-Protein von Trypsin ist. Trypsin gehört zu den Serin Proteasen, die in einer Vielzahl biologischer Prozesse involviert sind: Proteolytisches Prozessierung, Blutgerinnung, Immunantworten und während der Entwicklung (Neurath, 1984).

Das humane Gehirn-Trypsinogen unterscheidet sich von dem humanen Pankreas Trypsinogen ausschließlich durch das erste Exon (Wiegand et al., 1993). Im Gegensatz zu den Signal-Peptiden der humanen Pankreas Trypsinogen-Formen I-III (Emi et al., 1986; Tani et al.,1990), welche sie zur Sekretion bestimmen, zeigt die humane Gehirn-Trypsinogen Form IV keine der relevanten Signal-Peptide. Dies ließ annehmen, daß es sich um ein zytoplasmatisches Protein handelt (Wiegand et al., 1993). Durch immunzytochemische Analysen konnte Gehirn-Trypsinogen Form IV im Zytoplasma nachgewiesen werden (Minn et al., 1998).

Von einer anderen Serin Protease, dem „Tissue Plasminogen Activator" (t-PA), welcher wie Arg3.1, von einem IEG (immediate early gene) codiert wird, wird eine Beteiligung bei plastischen Veränderungen aus folgenden Gründen angenommen: Zum einen wird durch Prozesse, welche neuronale Plastizität induzieren, die Transkription des t-PA-Genes ausgelöst (Quian, Z et al., 1993; Huang et al., 1996; Seeds et al., 1995), zum anderen konnte von Mataga gezeigt werden, daß sich im visuellen Cortex durch einen t-PA-Inhibitor plastische Prozesse unterdrücken ließen (Mataga et al., 1996). t-PA konvertiert, aktivitätsabhängig, das inaktive Plaminogen zum aktiven Plasmin. Man geht davon aus, daß die von t-PA katalysierte Proteolyse eine Reorganisation der Synapsen bei plastischen Veränderungen ermöglicht. t-PA ist extrazellulär lokalisiert und wird durch einen aktivitätsabhängigen Sekretionsmechanisums an neuronales Gewebe abgegeben (Gualandris et al., 1996). Die Arbeitsgrupe Matsuki hat im Rahmen ihrer Plasmin-Forschung festgestellt, daß Trypsin im Gegensatz zu Plasmin zwar nicht durch STP (short-term potentiation) induziert werden kann, daß es aber eine ähnliche Substratspezifität besitzt (Mizutani et al., 1996). Möglicherweise ist Trypsin durch seine proteolytische Aktivität an dem vorübergehenden Umbau des Zytoskeletts beteiligt und könnte auf diese Weise mit dem Arg3.1-Protein in Wechselwirkung treten.

Ein anderes, potentiell mit dem Arg3.1-Protein interagierendes Protein ist Necdin. Necdin ist ein Protein von 325 Aminosäuren Länge. Immunhistochemische Analysen weisen Necdin als ein für Neuronen des ZNS spezifisches, nukleäres Protein aus, welches nur in postmitotischen Zellen exprimiert wird. Eine hohe Expression von mRNA konnte im Hypothalamus, Corpus amygdaloideum und in den Pyramidenzellen des Hippocampus nachgewiesen werden. Necdin wird als Marker für den Differenzierungsgrad der Neurone genutzt (Maruyama et al., 1991; Aizawa et al., 1992). Es interagiert mit dem Onkogen SV 40T und dem Transkription-Faktor E2F1. Funktionell weist es Ähnlichkeiten mit dem Wachstumssupressor Retinoblastoma Protein auf (Taniura et al., 1998). Eine hohe Expression der Necdin-mRNA konnte im Kern der Pyramidenzellen des Hippocampus, eine hohe Expression der arg3.1-mRNA jedoch in den Körnerzellen des Hippocampus nachgewiesen werden. Eine mögliche Interaktion mit dem Arg3.1-Proteins muß durch weitere Protein-Bindungsstudien bestätigt werden. Weiterhin muß eine Kolokalisation des Arg3.1-Proteins und Necdins nachgewiesen werden.

Ein weiterer potentieller Interaktionspartner des Arg3.1-Proteins ist die β-Isoform der 14-3-3-Proteine. Die 14-3-3-Proteine wurden von Moore und Perez 1968 erstmals aus Rinderhirnen isoliert und beschrieben. Den Namen „14-3-3" erhielten sie aufgrund ihres Migrationsmusters der zweidimensionalen DEAE-Zellulose Chromatographie (Moore & Perez, 1968). Bisher sind sieben Isoformen im Säugergehirn beschrieben worden, benannt von α–η nach ihrer Elutionsposition in der HLPC (High Performance Liquid Chromatographie). Die 14-3-3-Proteine repräsentieren eine Familie dimerischer Proteine, ihr Vorkommen ist in geringer Anzahl ubiquitär, im ZNS jedoch besonders hoch (Watanabe et al., 1991, 1993). Ihr größter Anteil befindet sich im Zytosol. Die 14-3-

3-Proteine machen insgesamt 1 % der zytosolischen Proteine im Gehirn aus (Boston et al., 1982). Ein kleiner, aber signifikanter Teil läßt sich in synaptischen Membranen nachweisen (Martin et al., 1994). Im Vergleich dazu geht man beim Arg3.1-Protein aufgrund seiner hauptsächlich hydrophilen Eigenschaften und des Fehlens längerer hydrophober Domänen ebenfalls von einem zytosolischen Protein aus. Weiterhin wurde die arg3.1-mRNA in den Dendriten der Körnerzellen des Hippocampus nachgewiesen, diese Lokalisation weist auf eine mögliche Beteiligung an Prozessen der Synapse hin.

In Drosophila ist Leonardo, ein Mitglied der 14-3-3-Protein Familie, identifiziert worden. Dieses Protein spielt eine wesentliche Rolle bei Lernprozessen: Lebensfähige Leonardo-Mutanten zeigen, korrelierend zum Level des exprimierten Proteins, eine verringerte Lernkapazität (Skoulakis & Davis, 1996). Das Leonardo-Protein wird im ZNS stark exprimiert, eine bedeutende Anreicherung findet sich in den Pilzkörpern des adulten Gehirns der Drosophila (Han et al., 1996). Die Pilzkörper sind notwendig für Prozesse wie Lernen und Gedächtnis (Skoulakis & Davis, 1996). In der Ratte ist der Hippocampus notwendig für diese Prozesse. So kann durch hochfrequente Stimulation des Tractus perforans zum einen LTP, ein zelluläres Modell für bestimmte Formen des Lernens ausgelöst, zum anderen ein deutlicher Anstieg der arg3.1-mRNA im ipsilateralen Gyrus dentatus induziert werden (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Eine hohe Expression des Leonardo-Proteins in Drosophila kann immunologisch an Synapsen, besonders in den präsynaptischen Boutons der neuromuskulären Endplatte nachgewiesen werden. Elektrophysiologische Untersuchungen der Leonardo-Mutanten zeigen eine Erniedrigung der basalen synaptischen Übertragung und eine Abnahme der Amplitude und der Frequenz des exzitatorischen Endplattenstroms (Broadie et al., 1997). Die arg3.1-Transkripte wurden im Soma und in den Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus nachgewiesen (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Diese dendritische Lokalisation eröffnet die Möglichkeit der lokalen Proteinbiosynthese an aktivierten synaptischen Kontaktzonen.

Den 14-3-3-Proteinen wird weiterhin eine wichtige Funktion in den Signal-Transduktions-Kaskaden zugeschrieben. Der sicherlich am besten untersuchte Fall für eine 14-3-3-beeinflußte Signal-Transduktion ist die MAP-Signal-Transduktions-Kaskade. Die Aktivation der mitogen aktivierten Protein-Kinase (MAP-Kinase) Kaskade ist zentraler Bestandteil der Zell-Antwort auf mitogene Faktoren und in den meisten Fällen von aktivierter Ras-Kinase abhängig (Wood et al., 1992; Vries-Smits et al., 1992). Die zuvor von der Ras-Kinase aktivierte c-Raf-1 Kinase aktiviert durch Phosphorylierung die MAP-Kinase-Kinase (Howe et al., 1992; Kyriakis et al., 1992 Robinson et al., 1994; Fu et al., 1994; Irie et al., 1994). 14-3-3-Proteine sind als Raf-bindende Proteine identifiziert worden (Marais & Marshall 1995, Aitken, 1996). Auch mittels des Two-Hybrid-Systems konnten die Isoformen β und ζ der 14-3-3-Proteine, welche mit Raf interagieren, detektiert werden (Freed et al., 1994). Zusätzlich unterstützen einige *in vivo* und *in vitro* Experimente die These, 14-3-3-Proteine hätten eine Funktion bei der Ras-abhängigen Aktivation der Raf-Kinase-Aktivität (Fantl et al., 1994; Irie et al., 1994; Li et al., 1995). Solch eine Funktion der 14-3-3-Proteine ist jedoch auch

bezweifelt worden, da eine Interaktion beider Proteine per se nicht ausreicht, die Raf-Kinase zu aktivieren (Michaud et al., 1995; Suen et al., 1995). Daher wird spekuliert, ob 14-3-3-Proteine als zwischengeschalteter Faktor, nämlich als Chaperone, zwischen Raf und einem hypothetischen Raf-Aktivator fungieren (Braselmann & McCormick, 1995; Marais & Marshall, 1995), oder aber möglicherweise Raf vor der Inaktivierung durch Phosphatasen bewahren (Dent et al., 1995; Jelinek et al., 1996). 1998 konnte von Tzivion gezeigt werden, daß eine Interaktion von Raf mit dem 14-3-3-Protein, Raf in einer aktivierten Konformation stabilisiert (Tzivion et al., 1998).

Kürzlich konnte eine Interaktion der ζ Isoform der 14-3-3 Proteine mit Slob, einem Protein, das an einen Ca^{2+}-abhängigen Kalium-Kanal, dem Drosophila Slowpoke (dSlo), bindet, nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, daß eine Interaktion des 14-3-3-Proteins mit Slob zu einer dramatischen Beeinflussung der Spannungsempfindlichkeit führt (Zhou et al., 1999). Der genaue Mechanismus ist jedoch bisher nicht bekannt.

Die 14-3-3 Proteine gewinnen auch in einem anderen Zusammenhang zunehmend an Bedeutung: Bei der durch Prionen verusachten Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung. Der Nachweis der 14-3-3 Proteine im Liquor eines Patienten zusammen mit dem vorliegen einer Demenz des Patienten weist mit einer Spezifität von 96 % auf die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung hin. Die pathophysiologischen Mechansimen sind unklar. Zur Erhöhung der 14-3-3 Proteine im Liquor kommt es vermutlich durch massiven neuronalen Zerfall, welcher zu einem Austritt cerebraler Proteine in den Liquorraum führt (Hisch et al., 1996; Kropp et al., 1999).

Im Gehirn sind die 14-3-3-Proteine an synaptischen Kontaktzonen, besonders prä- aber auch postsynaptisch, angereichert (Martin et al., 1994; Zhou et al., 1999). In neurosekretorischen Zellen regulieren die Isoformen β und γ der 14-3-3-Proteine die Dynamik sekretorischer Vesikel durch Reorganisation des kortikalen Aktin-Netzwerkes. Es konnte gezeigt werden, daß die beiden Isoformen mit dem Aktin-Zytoskelett interagieren (Roth & Burgoyne, 1995). 14-3-3-Proteine scheinen als Mittler eine Schlüsselrolle zwischen sekretorischen Vesikeln, dem Zytoskelett und den regulierenden Kinase-Kaskaden zu spielen. Diese Beobachtungen könnten annehmen lassen, 14-3-3-Proteine regulierten die Dynamik der Vesikel während synaptischer Übertragung. Auch für das Arg3.1-Protein gibt es Hinweise für eine Interaktion mit Aktin, sowie Thesen über mögliche Funktionen des Arg3.1-Proteins bei plastischen Veränderungen des Zytoskeletts. Das C-terminale Ende des Arg3.1-Proteins zeigt Spektrin-ähnliche Domänen mit einer 77 %igen Ähnlichkeit zu Gehirn α-Spektrin (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Gehirn α-Spektrin ist für die Aktin-Bindung verantwortlich (Perrin & Aunis, 1985). Es ist ein Protein des Zytoskeletts, welches an den Prozessen der synaptischen Plastizität beteiligt zu sein scheint. Die Stimulation von NMDA-Rezeptoren und dem damit verbundenen Ca^{2+}-Einstrom induziert die Proteolyse des α-Spektrins im Hippocampus (Seubert et al., 1988). Um den durch Proteolyse entstandenen Verlust an Spektrin zu kompensieren, könnte Arg3.1 in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität schnell synthetisiert

werden. Das Zytoskelett würde nur kurzfristig und teilweise aufgelöst werden, so daß für die Reorganisation spektrinartige Proteine zur Verfügung ständen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Arg3.1-Protein mit dem Aktin-Zytoskelett selektiv interagiert (Lyford et al., 1995). Durch diese Aktin-Bindungsstelle könnte das Arg3.1-Protein auch auf andere Weise an den plastischen Veränderungen beteiligt sein, denn viele Proteine des Zytoskeletts konkurrieren um die Bindung zu Aktin, welches an deren Vernetzung beteiligt ist (Bennett, 1985; Alberts et al., 1989). So verdrängt möglicherweise das Arg3.1-Protein andere Proteine aus der Bindung zu Aktin, und beteiligt sich auf diese Weise an der teilweisen Auflösung des Zytoskeletts.

Eine Interaktion der 14-3-3-Proteine mit anderen Proteinen des Zytoskeletts konnte in Fibroblasten nachgewiesen werden. Sie interagieren mit zytoplasmatischen Intermediär-Filamenten, dem Keratin. Auch in Zellkulturen konnte eine reversible, Zell-Zyklus-abhängige Interaktion der 14-3-3-Proteine mit Keratin nachgewiesen werden (Liao & Omary, 1996). Diese Interaktion findet in Abhängigkeit der Phosphorylierung des Serinrestes des Keratins statt (Ku et al., 1998). In einer Vielzahl von gut untersuchten Fällen konnte der Kontakt zwischen dem 14-3-3-Protein und dem zu untersuchendem Protein an einem Serin- oder Threonin-Rest ausgemacht werden. Eine Interaktion findet allerdings nur dann statt, wenn diese Seitenketten phosphoryliert worden sind (Michaud et al., 1995; Muslin et al., 1996; Zha et al., 1996). Für das 14-3-3-Protein sind zwei Bindungs-Motive identifiziert worden: $RSX_{1,2}SpXP$ (Muslin et al., 1996) und $RX_{1-2}SX_{2-3}Sp$ (Liu et al., 1997). Das Arg3.1-Protein weist zwar keines der beiden auf, es besitzt jedoch an seinem C-Terminus eine serin- und threoninreiche Region, welche für eine mögliche Bindung mit 14-3-3-Protein erforderlich ist (Broadie et al., 1997).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems erstmals nach Proteinen, welche mit dem Arg3.1-Protein interagieren, gesucht. Bislang waren solche Proteine völlig unbekannt. Als potentiell mit dem Arg3.1-Protein interagierend erwiesen sich acht Proteine, wovon drei bekannt sind: Trypsinogen, Necdin und der β-Subtyp der 14-3-3-Proteine; für die weiteren fünf Proteine konnte bisher keine Homologie in den Aminosäuren-Sequenz Analysen nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf zukünftige Arbeiten wird es notwendig sein, die Interaktionen des Arg3.1-Proteins mit den möglichen Interaktionspartnern durch ergänzende Methoden zu bestätigen, insbesondere, da das Two-Hybrid-System eine hohe Anzahl falsch positiver Klone detektiert. Zur Überprüfung der Protein-Protein-Interaktion sind folgende Methoden etabliert: Die Protein-Affinitäts-Chromatographie (Smith & Johnson, 1988), der „Blot-Overlay-Assay" (Wade & Soutar, 1989; Walker et al., 1993) und die Koimmunopräzipitation (Kessler, 1981). Des weiteren ist es notwendig eine Kolokalisation des Arg3.1-Proteins und der zu testenden Proteine nachzuweisen. Dies erreicht man am besten durch immunhistochemische Methoden. Bestätigt sich die mit dem Two-Hybrid-System detektierte Interaktion zwischen dem Arg3.1-Protein und dem 14-3-3-Protein (Beta-Subtyp),

Necdin und Trypsinogen, ermöglicht dies weitere Interpretationen zum Verständnis der Funktionen des Arg3.1-Proteins.

6 Zusammenfassung

Die synaptische Übertragung neuronaler Verbindungen läßt sich aktivitätsabhängig verändern. Dies ist ein Charakteristikum plastischer Prozesse des Nervensystems. Die zu Plastizität führende Aktivität kann sowohl physiologisch, pathologisch als auch experimentellen Ursprungs sein. So leitet z. B. ein epileptischer Anfall eine Kaskade von Ereignissen ein, die das Auswachsen von Neuriten und das Etablieren neuer synaptischer Kontakte einschließt. Diese langandauernden Veränderungen sind auffallend ähnlich den Prozessen, die während der Langzeitpotenzierung (LTP) stattfinden. LTP ist ein wichtiges zelluläres Modell für Prozesse wie Lernen und Gedächtnis im Säugergehirn. Um diese plastischen Prozesse besser verstehen zu können, ist es wichtig, Gene, die aktivitätsabhängig exprimiert werden, zu charakterisieren. Von besonderem Interesse sind unmittelbar früh induzierte Gene (IEGs, immediate early genes), die eine Effektorfunktion besitzen und strukturelle Veränderungen an den Synapsen bewirken.

Von Kuhl und Mitarbeitern wurde das durch synaptische Aktivität reguliert IEG arg3.1 identifiziert. Durch die Induktion von LTP tritt die arg3.1-mRNA verstärkt in den Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus, einem Teil des Hippocampus, auf. Weiterhin ist das Arg3.1-Protein entfernt mit dem Gehirn α-Spektrin, einem Protein des Zytoskeletts, verwandt. Sowohl die differentielle Lokalisation der arg3.1-mRNA in den Dendriten als auch eine mögliche Interaktion des Arg3.1-Proteins mit Proteinen des Zytoskeletts, könnten bei plastischen Veränderungen der Synapse während LTP eine wichtige Rolle spielen. Um die Funktionsweise des Arg3.1-Proteins besser verstehen zu können, ist es von Bedeutung Interaktionspartner des Arg3.1-Proteins zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden potentielle Bindungspartner des Arg3.1-Proteins unter Verwendung des Two-Hybrid-Systems identifiziert. Zwei unterschiedliche cDNA-Banken wurden eingesetzt: Eine induzierte Hippocampus-Bank (Ratte) und eine Bank des gesamtem Gehirns (Ratte). Aus der Hippocampus-Bank wurden 4.5×10^5, aus der Bank des gesamten Gehirns 10^5 verschiedene Klone auf eine mögliche Interaktion mit dem Arg3.1-Protein hin getestet. Zum Nachweis der Interaktionen wurde die Expression zweier Reportergene untersucht. Die dazu angewandten Tests waren das Wachstum auf Histidin defizientem Medium und der β-Galactosidase-Assay. Durch diese beiden Tests kamen 114 Klone der induzierten Hippocampus-Bank und 77 Klone aus der Bank des gesamtem Gehirns als pontielle Interaktionspartner des Arg3.1-Proteins in Betracht. Daraufhin wurde ein weiterer Test, der Mating-Test, durchgeführt. Durch den Mating-Test werden die identifizierten Proteine mit unterschiedlichen Fusionsproteinen in Hefe auf eine mögliche Interaktion hin getestet. Die so erhaltenen Hefen wurden mit ihren unterschiedlichen Fusionsprotein-Kombinationen erneut den obengenannten Tests unterzogen. Ein Klon galt als positiv, wenn er auschließlich in Interaktion mit dem Arg3.1-Protein, aber mit keinem anderen Protein bzw. allein, ohne Interaktion, in der Lage war eines der beiden Reportergene zu aktivieren.

Nach der Sequenzierung der Klone erwiesen sich sieben Proteine der induzierten Hippocampus-Bank, davon waren zwei bekannte und fünf unbekannte, sowie ein bereits bekanntes Protein aus der Bank des gesamten Gehirns, als potentielle Interaktionspartner für das Arg3.1-Protein. Bei den bereits bekannten Proteinen handelt es sich um Trypsinogen, Necdin und die β-Isoform der 14-3-3-Proteine. Von besonderem Interesse ist hierbei das 14-3-3-Protein, welches an unterschiedlichen Aspekten intrazellulärer Signal-Transduktions-Kaskaden beteiligt ist. Drei Punkte sind im Hinblick auf eine mögliche Interaktion mit dem Arg3.1-Protein interessant: Erstens eine Mutation des 14-3-3-Proteins führt bei Drosophila zum Verlust von Gedächtnisfunktionen. Zweitens sind sowohl das Arg3.1-Protein als auch das 14-3-3-Protein an plastischen Veränderung an der Synapse beteiligt. Drittens gibt es Hinweise, daß das Arg3.1-Protein, wie auch das 14-3-3-Protein mit Aktin interagiert.

Die im Two-Hybrid-System gefundenen Proteine sind potentielle zelluläre Interaktionspartner des Arg3.1-Proteins, allerdings müssen diese Interaktionen mit unabhängigen biochemischen Methoden sowie Experimenten zu deren physiologischen Bedeutung in Neuronen weiter untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

Aitken, A. (1995). 14-3-3-Proteins on the MAP. *TIBS* 20: 95-97.

Aitken, A., (1996). 14-3-3 and a possible role in co-ordinating multiple signaling pathways. *Trends Cell Biol.* **6**: 341-347.

Aitken A., Collinge D.B., van Heusden G.P.H., Rosenboom P.H., Isobe T., Rosenfeld G. and Soll J. (1992). 14-3-3-Proteins: a highly conserved widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 498-501.

Aizawa, A., Maruyama, K., Kondo, H. and Yoshikawa, K. (1992). Expression of necdin, an embryonal carcinoma-derived protein, in developing mouse brain. *Dev. Brain Res.* **68**: 265-274.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1989). Molecular biology of the cell (2nd edn). Garland Publishing, New York.

Allen, J., Walberg, M., Edwards, M. and Elledge, S. (1995). Finding prospective partners in the library: the two hybrid system and phage display find a match. *TIBS* **20**: 511-516.

Bailey, C.H. and Kandel, E.R. (1993). Structural changes accompanying memory storage. *Annu. Rev. Physiol.* **55**: 397-426.

Baudry, M., Bundman, M.C., Smith, E.K. and Lynch, G. (1981). Micromolar calcium stimulates proteolysis and glutamate binding in the rat brain synaptic membranes. *Science* 212: 937-938.

Bear, M. (1996). A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93***:* 13 453-13459.

Bennet, V. (1985). The membran skeleton of human erythrocytes and its implication for more complex cells. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 273-304.

Bi, X., Chen, J. and Baudry, M. (1997). Developmental changes in calpain activity, GluR1 receptors and in the effect of kainic acid treatment in rat brain. *Neurosci.* **81**:1123-1135.

Bliss, T.V. and Lomo T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. Lond.* **232**: 331-356.

Bliss, T.V. and Collgridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in hippocampus. *Nature* **361**: 31-39.

Bonnefoy-Bérard, N., Liu, Y.-C., von Willebrand, M., Sung, A., Elly, C., Mustelin, T., Yoshida, H., Ishizaka, K. and Altman, A. (1995). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase cativity by association with 14-3-3-Proteins in T-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 10 142-10 146.

Boston, P.F., Jackson, P. and Thompson, R.J. (1982). Human 14-3-3-Protein: radioimmunoassay, tissue distribution and cerebrospinal fluid levels in patients with neurological disorder. *J. Neurochem.* **38**: 1475-1482.

Bradford, M.M. (1997). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Braselmann, S. and McCormick F. (1995). Bcr and Raf form a complex *in vivo* via 14-3-3 proteins. *EMBO J.* **14**: 4839-4848.

Brent, R. and Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specifity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**: 729-736.

Broadie, K., Rushton, E., Skoulakis, E.M.C. and Davis, R.L. (1997). Leonardo, a Drosophila 14-3-3 protein involved in learning, regulates presynaptic function. *Neuron* **19**: 391-402.

Castelluci, V.F., Blumenfeld, H., Goelet, P. and Kandel, E.R. (1989). Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of aplysia. *J. Neurobiol.* **20**: 1-9.

Chang, F.L.F. and Greenough, W.T. (1984). Transiente and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res.* **309**: 35-46.

Chien, C.T., Bartels, P.L., Sternglanz, R. and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**: 9578-9582.

Constatine-Paton, M., Cline, H.T. and Debski, E.A. (1990). Patterned activity, synaptic convergence, and the NMDA receptor in developing visual pathways. *Annu Rev Neurosci.* **13**: 129-154.

Cotman, C.W., Monaghan, D.T. and Ganong, A.H.A. (1988). Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* **11**: 61-80.

Davis, R.L. and Squire, L. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.* **96**: 518-559.

Dent, P., Jelinek, T., Morrison, D.K., Weber, M.J. and Sturgill, T.W. (1995). Reversal of Raf-1 activation by purified and membrane-associated protein phosphatases. *Science* **268**: 1902-1906.

Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilbburn, A.E., Lee, W.H. and Elledge, S.J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phophatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* **7**: 555-569.

Elledge, S.J., Mulligan, J.T., Ramer, S.W., Spottswood, M. and Davis, R.W. (1991). lYES: A multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and Escherichia coli mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1731-1735.

Emi, M., Nakamura, Y., Ogawa, M., Yamamoto, T., Nishidi, T., Mori, T. and Matsubara, K. (1986). Cloning, characterization and nucleotide sequences of two cDNAs encoding human pancreatic trypsinogens. *Gene*, **41**: 305-310.

Fantl., W.J., Muslin, A.J., Kikuchi, A., Martin, J.A. MacNicol, A.M. Gross, R.W. and Williams, L.T. (1994). Activation of Raf by 14-3-3 proteins. *Nature* **371**: 612-614.

Feig, S. and Lipton, P. (1993). Pairing the cholinergic agonist carbachol with patterned Schaffer Collateral stimulation initiates protein synthesis in hippocampal CA 1 pyramidal cell dendrites via muscarinic, NMDA-dependent mechanism. *J. Neurosci.* **13**: 1010-1021.

Feilotter, H.E., Hannon, G.J., Ruddell, C.J. and Beach, D. (1994). Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Research* **22**: 1502-1503.

Fields, S. and Song, O. (1998). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-247.

Fields, S. and Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: An assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* **10**: 286-292.

Freed, E., Symons, M., Macdonald, S. G., McCormick, F. and Ruggieri, R. (1994). Binding of 14-3-3-Proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science* **265**: 1713-1716.

Frey, U., Mueller, M. and Kuhl, D. (1996). A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J. Neurosci.* **16**: 2057-2063-

Fu, H., Xia, K., Pallas, D. C., Cui, C., Conroy, K., Narsimhan, R. P., Mamon, H., Collier R. J. and Roberts, T. M. (1994). Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3-Proteins. *Science* **266**: 126-129.

Geinisman Y., Detoledo-Morell L., Morell L., Persina I.S. and Beatty, M.A. (1996). Synapse restructuring associated with the maintenance phase of hippocampal long-term potentiation. *J. Comp. Neurol.* **368:** 413-423.

Geinisman, Y., Morell, F. and de Toledo-Morell, L. (1992). Increase in the number of axiospinous synapses with segmented postsynaptic densities following hippocampal kindling. *Brain Res.* **569**: 341-347.

Giniger, E., Varnum, S.M. and Ptashne, M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* **40**: 767-774.

Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S. and Kandel, E.R. (1986). The long and the short of long term memory - a molecular framework. *Nature* **322**: 419-422.

Gualandris, A., Jones, T.E., Strickland, S., Tsirka, S.E. (1996). Membrane depolarization induced calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J. Neurosci.* **16**: 2220-2225.

Guthrie, C. and Fink, G.R. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzyme*. **194**: 306-310.

Han, P.l, Meller, V. and Davis, R.L. (1996). The Drosophila brain revisited by enhancer detection. *J. Neurobiol*. **31**: 88-102.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip 1 is potent inhibitor of G 1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816.

Harris, A.S. and Morrow, J.S. (1988). Proteolytic processing of human brain α-spectrin (fodrin): identification of a hypersensitive site. *J. Neurosci*. **8**: 2640-2651.

Hebb, D.O.(1949). The organisation of behavior: a neurophysiological theory. Wiley, New York.

Hedstrom, L., Lin, T.-Y. and Fast, W. (1996). Hydrophobic interactions control zymogen activation in the trypsin family of serine proteases. *Biochemistry* **35**: 4515-4523.

Hisch, G., Kenney, K., Gibbs, C., Lee, K. and Harrington, M. (1996). The 14-3-3 brain protein in the cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies *N. Engl. J. Med*. **335**: 924-930.

Hope, I.A. and Struhl, K. (1986). Functional dissection of eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of Yeast. *Cell* **46**: 885-894.

Howe, L., Leevers, S., Gòmez, N., Nakielny, S., Cohen, P. and Marshall, C. (1992). Activation of MAP Kinase Pathway by the Protein Kinase raf. *Cell* **71**: 335-342.

Huang, Y.Y., Bach, M.E., Lipp, H.P., Zhuo, M., Wolfer, D.P., Hawkins, R.D., Schoonjans, L., Kandel, E.R., Godfraind, J.M., Mulligan, R., Collen, D., Carmeliet, P. (1996). Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8699-8704.

Ichimura T., Isobe T., Okuyama T., Takahashi N., Araki K., Kuwano R. and Takahashi Y. (1988). Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3-Protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7084-7088.

Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1987). Brain 14-3-3-Protein is an activator that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca^{2+}, calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett.* **219**: 79-81.

Irie, K.Y., Gotho, Y., Yashar, B.M., Errede, B., Nishida, E. and Matsumoto, K. (1994). Stimulatory effects of Yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the raf protein kinase. *Science* **265**: 1716-1719.

Jelinek, T., Dent, P., Sturgill, T.W. and Weber, M.J. (1996). Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phophorylation. *Mol. Cell Biol.* **16**: 1027-1034.

Johnston, S.A., Zavortink, C., Debouck, C. and Hopper, J.E. (1986). Functional domains of the yeast regulatory protein GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6553-6557.

Keegan, L., Gill, G. and Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activation function of eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**: 699-704.

Kennedy, T.E., Kuhl, D., Barzilai, A., Sweatt, J.D. and Kandel E.R. (1992). Long-term sensitization training in aplysia leads to an increase in calreticulin, a major presynaptic calcium-binding protein. *Neuron* **9**: 1013-1042.

Kishore, G.M. and Shah, D.M. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 627-633.

Koch, C. and Zandor, A. (1993). The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *J. Neurosci.* **13**: 413-422.

Kropp, S., Zerr, I., Schulz-Schaeffer, W., Riedemann, C., Bodemer, M., Laske, C., Kretzschmar, H. and Poser, S. (1999). Increase of neuron-specific enolase in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci. Lett.* **261**: 124-126.

Krug, M., Lössner, B. and Ott, T. (1984). Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res. Bull.* **13**: 39-42.

Ku, N.-O., Liao, J. and Omary, M.B. (1998). Phosphorylation of human keratin 18 serin 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J.* **17**: 1892-1906.

Kuhl D. and Skehel P. (1998). Dendritic localisation of mRNAs. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**: 600-606.

Kuhl, D., Kennedy, T.E., Barzilai, A. and Kandel, E.R. (1992). Long-term sensitization training in aplysia leads to an increase in the expression of BiP, the major chaperon of the E.R. *J. Cell. Biol.* **119**: 1069-1076.

Kuo, C.-H., Uetsuki, T., Kim, C.-H., Tanaka, H., Li, B.-S., Taira, E. Higuchi, H., Okamoto, H., Yoshikawa, K. and Miki, N. (1995). Determination of a necdin cis-acting element required for neuron specific expression by using zebra fish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**: 438-446.

Kyriakis, J., App, H., Zhang, X.-F., Banerjee, P., Brautigan, D., Repp, U. and Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase kinase. *Nature:* **358**: 417-421.

Lee, W., Schottler, F., Oliver, M. and Lynch, G. (1980). Brief bursts of high frequency stimulation produce two types of structural change in rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* **44**: 247-258.

Li, B. and Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* **7**: 957-963.

Li, S., Janosch, P., Tanji, M., Rosenfeld, G.C., Waymire, J.C., Mischak, H., Kölch, W. and Sedivy J.M. (1995).

Regulation of Raf-1 kinase activity by the 14-3-3 family of proteins. *EMBO J.* **14**: 685-696.

Liao, J., Ku, N.-O. and Omary, M.B. (1996). Two-dimensional gel analysis of glandular keratin intermediate filamente phosphorylation. *Electrophorese* **17**: 1671-1676.

Link, W., Konietzko, U., Krug, M., Kauselmann, G., Frey, U. and Kuhl D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5734-5738.

Liu, Y.-C., Liu, Y., Elly, C., Yoshida, H., Lipkowitz, S., Altman, A. (1997). Serine phophorylation of Cbl induced by phorbol ester enhances its association with 14-3-3 proteins in T cells via novel serine-rich 14-3-3-binding motif. *J. Biol. Chem.* **272**: 9979-9985.

Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A. and Woreley, P.F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**: 433-445.

Lynch, G. and Baudry, M. (1987). Brain spectrin, calpain and long-term changes in synaptic efficacy. *Brain Res. Bull.* **18**: 809-815.

Lynch, G., Dunwiddie, T. and Gibkoff V. (1977). Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature* **266**: 737-739.

Lynch, G., Muller, D., Seubert, P. and Larson, J. (1988). Long term potentiation: persisting problems and recent results. *Brain Res. Bull.* **21**: 363-372.

Ma, J. and Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51: 113-119.

Ma, J. and Ptashne, M. (1988). Converting an eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* **55**: 443-446.

Marais, R. and Marshall, C. (1995). 14-3-3 proteins: Structure resolved, function less clear. *Structure* **3**: 751-753.

Martin H., Rostas J., Patel Y. and Aitken A. (1994). Subcellular localisation of 14-3-3 Isoforms in rat brain using specific antibodies. *J. Neurochem.* **63**: 2259-2265.

Maruyama, K., Usami, M., Aizawa, T. and Yoshikawa, K. (1991). A novel brain-specific mRNA encoding nuclear protein (necdin) expressed in neurally differentiated embryonal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 291-296.

Mataga, N., Imamura, K., Shiomitu, T., Yoshimura, Y., Fukamauchi, K., Watanabe, Y. (1996). Enhancement of mRNA expression of tissue-type plasminogen activator by L-threo-3,4,-dihydroxyphenylserine in association with ocular dominance plasticity. *Neurosci. Lett.* **218**: 149-152.

Matthies, H. (1991). Long-lasting maintenance of long-term potentiation and macromolecular synthesis. *Cambridge, Mass: MIT Press.*

Matto-Yelin, M., Aitken, A. and Ravid, S. (1997). 14-3-3 inhibits the dictyostemlium myosin II heavy-chain-specific protein kinase C activity by a direct interaction: identification of the 14-3-3 binding domain. *Mol. Biol. Cell* **8**: 1889-1899.

Michaud, N.R., Fabian, J.R., Mathes, K.D. and Morrison, D.K. (1995). 14-3-3 is not essential for Raf-1 function: Identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in 14-3-3- and Ras-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3390-3397.

Minn, A., Schubert, M., Neiss, W. and Müller-Hill, B. (1998). Enhanced GFAP expression in Astrocytes of transgenic mice expressing the human brain-specific trypsinogen IV. *Glia* **22**: 338-347.

Mody, I., Baimbridge, K.G. and Miller, J.J. (1984). Blockade of tetanic- and calcium-induced long-term potentiation in the hippocampal slice preparation by neuroleptics. *Neuropharmacology* **23**: 625-631.

Moore, B.W., and Perez, V.J. (1968). Specific acidic proteins of the nervous system. In physiological and biochemical aspects of nervous integration, F.D. Carlson, ed. (Englewood Hills, New Jersey: Prentice-Hall), pp. 345-358.

Morgan, A: and Burgoyne, D. (1992). Exo1 and Exo2 proteins stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. *Nature* **355**: 833-836.

Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M. and Shaw, A.S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins mediated by recognition of phosphoserine. *Cell* **84**: 889-897.

Nedivi, E., Hevroni, D., Naor, D., Israeli, D. and Citi, Y. (1993). Numerous canditates plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. *Nature* **363**: 718-722.

Neurath, H. (1984). Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**: 350-357.

Nishimune, A., Nash, S., Nakanishi, S. and Henley, J. (1996). Detection of protein-protein interaction in the nervous system using the two-hybrid system. *TINS* **19**: 261-266.

Pawson, T., Olivier, P., Rozakis-Adcock, M., McGlade, J. and Henkemeyer, M. (1993). Proteins with SH2 and SH3 domains couple receptor tyrosine kinases to intracellular signaling pathways. Philos. *Trans. R. Soc. Lond. Biol.* **340**:279-285.

Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448.

Perrin, D. and Aunis, D. (1985). Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature* **315**: 589-592.

Quian, Z., Gilbert, M.E., Colicos M.A., Kandel, E.R., Kuhl, D. (1993). Tissue-plasminogen activator is

induced as an immediate early gene during seizure, kindling and long-term potentiatio. *Nature* **361**: 453-457.

Rall, W., ed Mechanisms subserving changes in neuronal activity (1974). Brain Information Service Research Report No.3, ed. C.D. Woody et al., Univ. of Calif. Press, Los Angeles. 13-21.

Reuther, G. W., Fu, H., Cripe L. D., Collier R. J. and Pendergast, A. M. (1994). Association of protein kinase c-Brc and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* **266**: 129-133.

Robinson, K., Jones, D., Patel, Y., Martin, H., Madarazo, J., Martin, S., Howell, S., Elmore, M., Finnen, M. J. and Aitken, A. (1994). Mechanism of inhibition of protein kinase C by 14-3-3 isoforms. *Biochem. J.* **299**: 853-861.

Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D. and Fink, G.R. (1987). A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* **60**: 237-243.

Rosenboom, P., Weller, J., Babila, T., Aitken, A., Sellers, L., Moffet, J., Namboodiri, M.A.A. and Klein, D.C. (1994). Cloning and characterization of the eta and zeta isoforms of the 14-3-3-Proteins. *DNA Cell Biol.* **13**: 629-640.

Roth, D. and Burgoyne, R.D. (1995). Stimulation of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells by 14-3-3 proteins is due to reorganisation of cortical actin network. *FEBS Lett.* **374**: 77-81.

Seeds, N.W., Williams, B.L., Bickford, P.C. (1995). Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science* **270**: 1992-1994.

Seubert, P., Larson, J., Oliver, M., Jung, M.W., Baudry, M. and Lynch, G. (1988). Stimulation of NMDA receptors induces proteolysis of spectrin in hippocampus. *Brain Res.* **460**: 189-194.

Sheng, M. and Greenberg, M.E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**: 477-485.

Siman, R. and Noszek, J.C. (1988). Excitory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown *in vivo*. *Neuron* **1**: 279-287.

Skoulakis, E.M.C. and Davis, R.L. (1996). Olfactory learning deficits in mutants for leonardo, a Drosophila gene encoding a 14-3-3-Protein. *Neuron* **17**: 931-944.

Smith, D.B. and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with Glutathion S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.

Stanton P.K. and Sarvey, J.M. (1984). Blockage of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region by inhibitors of protein synthesis. *J. Neurosci.* **4**: 3080-3088.

Staubli, U., Larson, J., Thibault, O., Baudry, M. and Lynch G. (1988). Chronic administation of thiol-proteinase inhibitor blocks long-term potentiation of synaptic responses. *Brain Res.* **444**: 153-158.

Steward, O. and Levy, W.B. (1982). Preferential localisation of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of dentate gyrus. *J. Neurosci.* **2**: 284-291.

Suen, K.L., Bustelo, X.R. and Barbacid, M. (1995). Lack of evidence for activation of Ras/Raf mitogenic pathway by 14-3-3 proteins in mammalian cells. *Oncogene* **11**: 825-831.

Tani, T., Kawashima, I., Mita, K. and Takigushi, Y. (1990). Nucleotide sequence of human pancreatic trypsinogen III cDNA. *Nucl. Acid. Res.* **18**: 1631.

Taniura, H., Taniguchi, N., Hara, M. and Yoshikawa, K.(1998). Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming protein and cellular transcription factor E2F1. *J. Biol. Chem.* **273**: 720-728.

Toker, A., Ellis, C.A., Sellers, L.A. and Aitekin, A. (1990). Protein kinase C inhibitor proteins: purification from sheep brain and sequence similarity to lipocortins and 14-3-3-Protein. *Eur. J- Biochem.* **191**: 421-429.

Torre, E. and Steward, O. (1992). Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. *J. Neurosci.* **12**: 762-772.

Tzivion, G., Luo, Z. and Avruch, J. (1998). A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* **394**: 88-92.

Uetsuki, T., Takagi, K., Sugiura, H. and Yoshikawa, K. (1996). Structure and expression of the mouse necdin gene. *J. Biol. Chem.* **271**: 918-924.

Vries-Smits, A., Burgering, B., Leevers, S., Marshall, C. and Bos, J. (1992). Involvement of $p21^{ras}$ in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* **357**: 602-604.

Wade, D.P. and Soutar, A.K. (1989). Ligand blotting. In: Creighton, T.E., Protein function, a practical approach. *Oxford, New York, Tokyo: IRL Press at Oxford University Press.*

Walker, R.G., Hudspeth, A.J. and Gillespie, P.G. (1993). Calmodulin and calmodulin-binding proteins in hair bundles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2807-2811.

Wallace, C.S., Lyford, G.L., Worley, P.F. and Steward, O. (1998). Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *J. Neurosci.* **18**: 26-35.

Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J. and Müller-Hill, B. (1993). Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. *Gene* **136**: 167-175.

Wilimzig, M. (1985). LiCl-boiling method for plasmid mini-preps. *Trends Genetics* **6**:185.

Wood, K., Sarnecki, C., Roberts, T. and Blenis, J. (1992). Ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1 and RSK. *Cell* **687**: 1041-

1050.

Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A. and Worley, P.F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* **11**: 371-386.

Yamagata, K., Sanders, L.K., Kaufmann, W.E., Yee, W., Barnes, C.A., Nathans, D. and Worley, P.F. (1994). Rheb, a growth factor and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel ras-related protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 16333-16339.

Yamauchi, T., Nakata, H. and Fujisawa, H, (1981). A new activation protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca^{2+}-calmodulin-dependent protein kinase. Purifikation and characterization. *J. Biol. Chem.* **256**: 5404-5409.

Yang, M., Wu, Z. and Fields, S. (1995). Protein-peptide interactions analysed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1152-1156.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. and Korsmeyer, S:J. (1996). Serine phosphorilation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3- not BCL-X_L. *Cell* **87**: 619-628.

Zhou, Y., Schopperle, M., Murrey, H., Jaramillo, A., Dagan, D., Griffith, L. and Levitan, I. (1999). A dynamically regulated 14-3-3, Slob, and Slowpoke potassium channel complex in *Drosophila* presynaptic nerve terminals. *Neuron* **22**: 809-818.

Zola-Morgan, S., Squire, L.R. and Amaral, D.G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* **6**: 2950-2967.

Abkürzungen

Aminosäuren

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

Allgemeine Abkürzungen

3AT	3-Amino-1,2,4-triazol
AD	Aktivierungsdomäne
arg3.1	activity regulated gene (3100)
AS	Aminosäure
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaare
CA1-CA4	Cornu Ammonis Region 1-4
CaMKII	Ca2+/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHX	Cycloheximid
CYH2	Gen für das Protein L29
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
ER	endoplasmatisches Retikulum
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAL4	Gen für Transkriptionsaktivator im Galaktose Stoffwechsel
GST	Glutathion-S-Transferase (Schistosoma japonicum)
h	Stunde
HIS3	Gen des Histidin Stoffwechsels
IEG	Immediate Early Gene
IPTG	Isopropyl-1-Thio-β-D-Galactosid

kb	Kilobasen
lacZ	Gen für β-Galactosidase
LEU2	Gen des Leucinstoffwechsels
LTP	long-term potentiation (Langzeitpotenzierung)
MAP	mitogen-activated protein
mM	milliMolar
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
OD	optische Dichte
p.A.	pro analysis
PEG	Polyethylenglykol
Pro	Promotor
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
SV40	simian virus 40, Papovavirus
Ter	Terminator
t-PA	tissue-plasminogen activator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TRP1	Gen des Tryptophan Stoffwechsels
UAS	upstream activating sequence
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Chica Schaller für die Betreuung der Arbeit und Herrn Dr. Dietmar Kuhl für die Bereitstellung des Themas, für die hilfreiche Diskussionsbereitschaft und für die Begleitung der Arbeit.

Für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit und die vielen Anregungen möchte ich Dr. Gunther S. Kauselmann, Birgit H. Schwanke, Dr. Ulrich Putz, Dr. Stefan Spiess, Dr. Uwe Konietzko, Robert Waltereit, Dr. Björn Dammermann und Jessica Oder aus der Arbeitsgruppe Kuhl danken.

Dr. Blanche Schwappach und Dr. Michael Wegener danke ich für ihre anregenden, zahlreichen Diskussionen.

Herrn Professor S. Elledge möchte ich für die Überlassung der Hefestämme danken.

Weiterhin möchte ich Mirko Horntrich für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bezüglich des Layouts herzlich danken.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich ganz besonders für jegliche Form ihrer Unterstützung.

Lebenslauf

Béatrice Dorothée Mühlberger

Ligsalzstraße 27

D - 80339 München

(089) 540 71 331

B.Muehlberger@gmx.de

Persönliche Angaben

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdatum: 12. März 1971

Geburtsort: Marburg/Lahn

Eltern: Françoise und Georg Mühlberger

Ausbildung

04/1990	Abitur *Gymnasium Philippinum*, Marburg/Lahn
10/1990	Beginn des Medizinstudiums *Universität Hamburg*
03/1993	Physikum
04/1994	1. Staatsexamen
10/1994-02/1995	Praktikum am *Zentrum für Molekulare Neurobiologie*, Hamburg
1995 - 1996	Promotion am *Zentrum für Molekulare Neurobiologie*, Hamburg
04/1997	2. Staatsexamen
04/1998	3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

04/1997 - 06/1997	*General Hospital Johannesburg*, Südafrika (Traumatologie und Chirurgie)
06/1997 - 08/1997	*Chris Hani Baragwanath Hospital*, Südafrika (Chirurgie)
08/1997 - 12/1997	*General Hospital Johannesburg*, Südafrika (Neurologie)
12/1997 - 03/1998	*Universitätskrankenhaus Eppendorf*, Hamburg (Innere Medizin)

Arzt im Praktikum

09/1998 - 02/2000	*Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität*, München (Neurologie)

Hamburg, den 16. November 1999

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

_____