

Aus der Abteilung  
Zelluläre Signaltransduktion  
des Instituts für  
medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
Direktor: Prof. Dr. G. W. Mayr

*in vivo* Lokalisation der humanen  
Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat  
bindenden Proteine  
Centaurin alpha 1 und 2

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von  
Christopher Illies  
aus Hamburg

Hamburg, 2002

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	5
1.1 Signaltransduktion durch Inositolphosphate und Phosphoinositide .....	5
1.1.1 Der Signalweg der Inositolphosphate .....	5
1.1.2 Die Phosphoinositide .....	8
1.2 Phospholipidbindungsdomänen .....	12
1.3 Die Centaurine .....	14
1.4 Rolle der Arf-GTPasen im intrazellulären Vesikeltransport .....	17
1.4.1 Allgemeine Aspekte zu Ras-Proteinen .....	17
1.4.2 Grundlagen zum intrazellulären Vesikeltransport .....	18
1.4.3 Steuerung der Vesikelknospung („budding“) durch ARF-GTPasen .....	19
1.5 Das grün fluoreszierende Protein (GFP) .....	20
1.5 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit .....	22
2 Material und Methoden .....	24
2.1 Materialien .....	24
2.1.1 Verwendete Oligonukleotide: .....	24
2.1.2 Verwendete Kits und Fertiglösungen .....	26
2.1.3 Verwendete cDNA Bank .....	26
2.1.4 Lösungen .....	26
2.2 Molekularbiologische Methoden .....	30
2.2.1 RNA Präparation aus Rattenhirnen .....	30
2.2.2 Polymerase Kettenreaktion .....	31
2.2.3 Polymerase Kettenreaktion mit reverser Transkription (RT-PCR) .....	32
2.2.4 Agarosegelelektrophorese .....	34
2.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	34
2.2.6 Fällung von DNA .....	34
2.2.7 Photometrische Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration .....	35
2.2.8 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	35
2.2.9 Ligation von DNA .....	36
2.2.10 Klonierung von DNA-Fragmenten .....	36
2.2.11 Präparative Gewinnung von Plasmiden aus E. Coli .....	40
2.2.12 DNA Sequenzierung .....	40
2.2.13 Northernblotting .....	41
2.3 Mikrobiologische Methoden .....	44
2.3.1 Erstellung von Medium und Agarplattem für die Bakterienkultur .....	44
2.3.2 Erzeugung transformationskompetenter E. Coli .....	45
2.3.3 Transformation von E. Coli .....	45

## Inhaltsverzeichnis

---

2.4 Zellbiologische Methoden .....	46
2.4.1 Kultur von eukaryotischen Zellen .....	46
2.4.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	48
2.4.3 Stimulation von PC12 Zellen mit EGF .....	49
2.5 Mikroskopische Methoden .....	50
2.6 Computerbasierte Methoden.....	51
3 Ergebnisse.....	52
3.1 Klonierung des Centaurin $\alpha$ 1b der Ratte.....	52
3.1.2 Klonierung des humanen Centaurin $\alpha$ 1 .....	63
3.1.3 Klonierung des humanen Centaurin alpha 2.....	70
3.2 Northernblots der humanen Centaurine.....	72
3.2.1 Synthese der Sonde für das humane Centaurin alpha1.....	72
3.2.2 Synthese der Sonde für das Centaurin alpha2 .....	73
3.2.3 Synthese der $\beta$ -Actin Sonde .....	73
3.2.4 Ergebnisse der Northernblots .....	73
3.3 Umklonierung der humanen Centaurine $\alpha$ 1 und $\alpha$ 2 in die eukaryotischen Expressionsvektoren für die GFP Fusionsproteine .....	75
3.3.1 Vektor zur Expression des EYFP-HsCentaurin $\alpha$ 1 Fusionsgens .....	76
3.3.2 Vektor zur Expression des HsCentaurin $\alpha$ 1-EGFP Fusionsgens .....	78
3.3.3 Vektor zur Expression des EYFP-HsCentaurin $\alpha$ 2 Fusionsgens .....	79
3.4 In vivo Lokalisationsexperimente in verschiedenen Zelllinien.....	81
3.4.1 Jurkat T-Lymphozyten .....	81
3.4.2 NT2 Zellen.....	84
3.4.3 PC12 Zellen.....	86
3.4.4 CHO Zellen .....	88
3.5 Zeitverläufe nach Stimulation .....	90
3.5.1 Verhalten des EYFP nach Stimulation.....	91
3.5.2 Verhalten des EYFP-Centaurin $\alpha$ 1 Fusionsproteins nach Stimulation .....	92
Verhalten des EYFP-Centaurin $\alpha$ 2 Fusionsproteins nach Stimulation .....	94
4 Diskussion .....	96
4.1 Bedeutung der Unterschiede in der Sequenz des Centaurin $\alpha$ der Ratte.....	96
4.1.1 Putative Spleißvarianten des Centaurin $\alpha$ der Ratte.....	97
4.2 Genstruktur des humanen Centaurin $\alpha$ 1 und die putative Splicevarianten .....	98
4.3 Genstruktur des humanen Centaurin $\alpha$ 2.....	100
4.3.1 Das Centaurin $\alpha$ 2 im Vergleich zum Centaurin $\alpha$ 1 auf Sequenzebene .....	101
4.4 Vergleich des unterschiedlichen Expressionsmusters der humanen Centaurine $\alpha$ 1 und $\alpha$ 2.....	101
4.5 Allgemeine Aspekte zu in vivo Lokalisationsstudien .....	102
4.5.1 Vorteile quasikonfokaler gegenüber konventioneller Mikroskopie .....	103

## Inhaltsverzeichnis

---

4.5.2 Lokalisationsstudien durch Überexpression von fluoreszierenden Fusionsproteinen.....	104
4.5.3 Der Einfluss des GFPs.....	104
4.5.4 Auswirkungen der Überexpression .....	106
4.6 in vivo Lokalisation des humanen Centaurin $\alpha$ 1.....	106
4.7 Translokationsverhalten des Centaurins nach Stimulation.....	109
4.8 Mögliche Rolle der Centaurine in der Regulation des intrazellulären Vesikeltransports.....	110
4.9 Lokalisation des Centaurin $\alpha$ 2.....	112
4.10 Möglichkeit, durch Fusionsproteine Phosphoinositide sichtbar zu machen.....	113
4.11 Welchen Vorteil bietet die durch PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> ausgelöste Membrantranslokation von Proteinen?.....	115
5 Zusammenfassung .....	118
6 Abkürzungen .....	120
6.1 allgemeine Abkürzungen.....	120
6.2 Abkürzungen der Inositolphosphate und Phosphoinositide .....	122
6.3 Abkürzungen von Nukleotiden in Sequenzen .....	122
6.3 Abkürzungen von Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstaben-Code.....	122
7 Literaturverzeichnis.....	123
8 Danksagung .....	133
9 Lebenslauf .....	134
Erklärung .....	135

# 1 Einleitung

## **1.1 Signaltransduktion durch Inositolphosphate und Phosphoinositide**

Inositolphosphate und Phosphoinositide spielen eine herausragende Rolle als second messenger in der Signaltransduktion und in der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Vesikeltransport, Calciumstoffwechsel, Endo- und Exozytose oder Arrangement von Zytoskelett. Durch die vielfältigen Möglichkeiten der Phosphorylierung des Inositols ergibt sich eine große Anzahl von unterschiedlichen Metaboliten und Stoffwechselwegen für Inositolderivate. Dieser Umstand macht Inositol zu einer sehr geeigneten Grundsubstanz zur Vermittlung von Signalvorgängen und macht verständlich, dass Inositolderivate an der Regulation von so verschiedenen Prozessen beteiligt sind. Von diesen ist sicher der bekannteste der klassische Weg, der von der Spaltung des Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat/PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> durch Phospholipasen vom Typ C zum Inositol 1,4,5-Trisphosphat/Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> führt, welches in der Funktion eines klassischen second Messengers für die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern verantwortlich ist.

Es sei zur Einführung noch erwähnt, dass mit Inositolphosphaten alle die Substanzen gemeint sind, die nur durch Phosphorylierungen aus dem Inositol hervorgehen. Dagegen sind mit Phosphoinositiden lipophile Substanzen gemeint, bei denen, wie zum Beispiel beim PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, das Inositol 4,5-Bisphosphat an einen Phosphatidsäurerest gekoppelt ist. Zusammenfassend spricht man von Phosphoinositiden. [Irvine u. Schell, 2001, Abel et al., 2001]

### **1.1.1 Der Signalweg der Inositolphosphate**

Eine zentrale Substanz im Inositidstoffwechsel ist das PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Es ist mit seinen beiden Fettsäureresten im inneren Blatt der Plasmamembran verankert, während hydrophile Inositolphosphatkopfgruppe zum Zytosol zeigt und somit verschiedenen Proteinen wie z.B. Enzymen oder Bindungsproteinen zugänglich ist. So entstehen durch Spaltung des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> durch Phospholipasen vom Typ C die beiden second Messenger Diacylglycerol (DAG) und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. [Stryer, 1996]

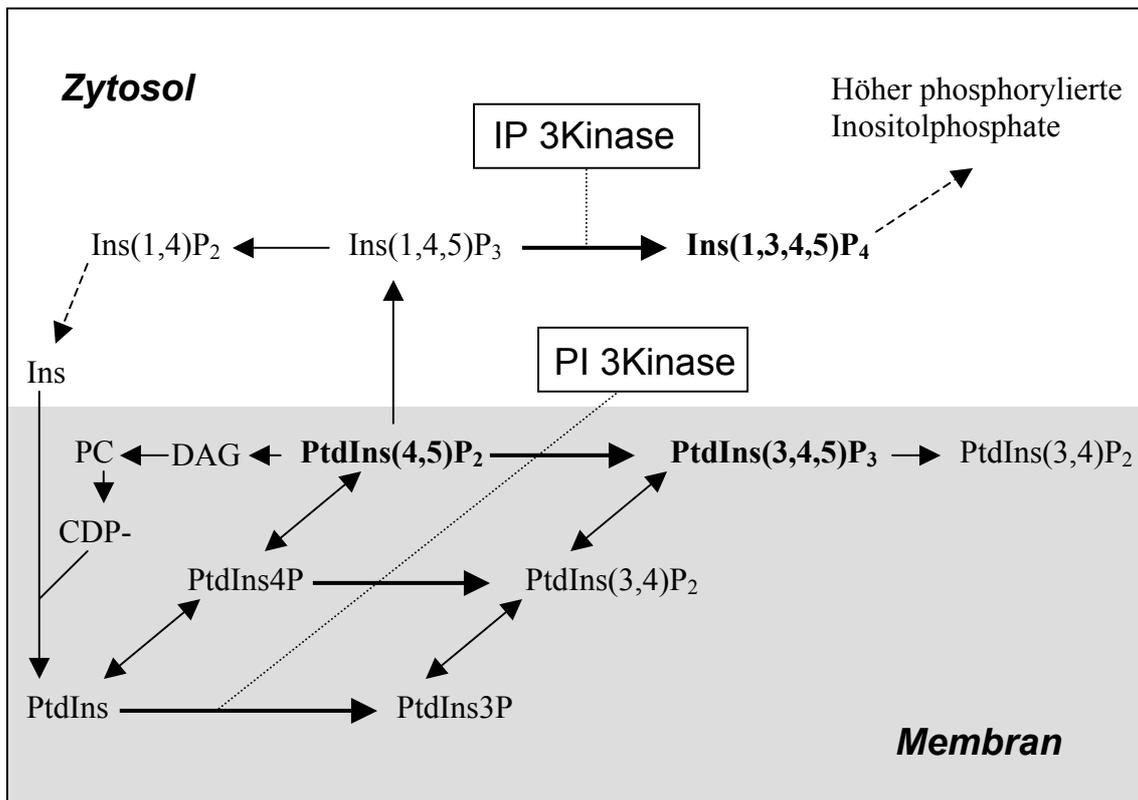
Die Phospholipasen vom Typ C werden in drei Familien eingeteilt, die sich in der Art ihrer Aktivierung unterscheiden: Die Phospholipasen vom Typ C $\beta$  werden durch G<sub>q</sub>-

## 1 Einleitung

Proteine, und damit letztlich durch Sieben-Transmembran-Helix Rezeptoren aktiviert, während der Typ C $\gamma$  durch Tyrosinkinaserzeptoren aktiviert werden. Der Mechanismus der Aktivierung der Phospholipase C $\delta$  ist nicht vollständig etabliert, jedoch scheint Ca<sup>2+</sup> ein Aktivator zu sein [Katan, 1998].

Beide Produkte der Phospholipase C üben eine Signalwirkung aus. Das lösliche Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> vermittelt über den tetrameren Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Rezeptor des ER eine Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum, während das membranständige DAG zur Aktivierung der Proteinkinase C beiträgt. [Berridge u. Irvine, 1984]

Eine Regeneration des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> findet auf folgendem Wege statt: In einem ersten Schritt wird das DAG durch die DAG-Kinase phosphoryliert, so dass Phosphatidsäure



**Abbildung 1.1: Gegenüberstellung von Inositolphosphat und Phosphoinositidstoffwechsel. Ausgehend vom PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kann entweder durch die PLC der Weg zu den löslichen Inositolphosphaten oder durch die PI 3Kinase zu den membranständigen Phosphoinositiden eingeschlagen werden. Das der PI 3 Kinase bei den Inositolphosphaten entsprechende Enzym, die IP 3Kinase, hat als Produkt das Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>. Dieses unterscheidet sich vom PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> durch das Fehlen des DAG, besitzt aber die gleiche Kopfgruppe. Dieser Umstand erschwert das Identifizieren von spezifischen Bindungspartnern der beiden Metabolite.**

## 1 Einleitung

---

entsteht. Die Phosphatidsäure wird dann durch CTP aktiviert, bevor dann freies Inositol an das CDP-DAG gekoppelt wird. Aus dem PtdIns entsteht schließlich in zwei Phosphorylierungsschritten das PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. [Krauss, 1999]

Das durch die PLC entstandene Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> kann nun entweder durch verschiedene 5-Phosphatasen zum Ins(1,4)P<sub>2</sub> abgebaut [Erneux et al., 1998] oder durch IP<sub>3</sub>-3-Kinasen zum Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> hochphosphoryliert werden. Vom Ins(1,4)P<sub>2</sub> führt der Weg über weitere Dephosphorylierungen zum Inositol, das dann zur Regeneration des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> beiträgt.

Das Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> dagegen bildet nach derzeitiger Kenntnis die Ausgangssubstanz zu allem höher phosphorylierten Inositolen [Fukuda et al. 1997] und besitzt auch eine Funktion in der Regulation des Calziumeinstroms in Zellen. Es entsteht durch die Aktivität der IP<sub>3</sub>-3-Kinasen, von denen drei Typen (A/B/C) unterschieden werden. Sie unterscheiden sich in ihrer gewebespezifischen Expression und in der Aktivierbarkeit durch Kalzium-Calmodulin. [VanWeyenberg et al., 1995] [Dewaste et al., 2000]

Es sind eine Vielzahl von höher phosphorylierten Inositolphosphaten beschrieben, wobei durch Pyrophosphorylierungen über das Ins-P<sub>6</sub> auch Inositle mit bis zu acht Phosphatresten bekannt sind. Die Stoffwechselwege sind sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Für viele dieser Inositolphosphate wird eine Funktion in der Signaltransduktion vermutet. [Irvine u.Schell, 2001]

Auch für das Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> hat eine eigene Funktion in der Signaltransduktion. So konnte gezeigt werden, dass Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> an der Kontrolle des Kalziumeinstroms in Zellen beteiligt ist. Die Suche nach dem physiologischen Bindungspartner des Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, und damit nach Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> bindenden Proteinen ist nun ein wichtiger Schritt zur weiteren Aufklärung der genauen Funktion dieses second Messengers. Die Suche gestaltete sich aber schwierig, da einerseits zwar viele Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> bindende Proteine identifiziert werden konnten, sich aber die Affinität und vor allem die Spezifität gegenüber anderen Inositolphosphaten als nicht hoch genug erwies. Andererseits ergeben sich Probleme durch die Abtrennung zu dem strukturell ähnlichen, membranständigen PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Mittlerweile ist allerdings ein GTPase aktivierendes Protein der GAP1 Familie identifiziert worden, das als Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> Rezeptor angesehen werden kann. [Cullen, 1998]

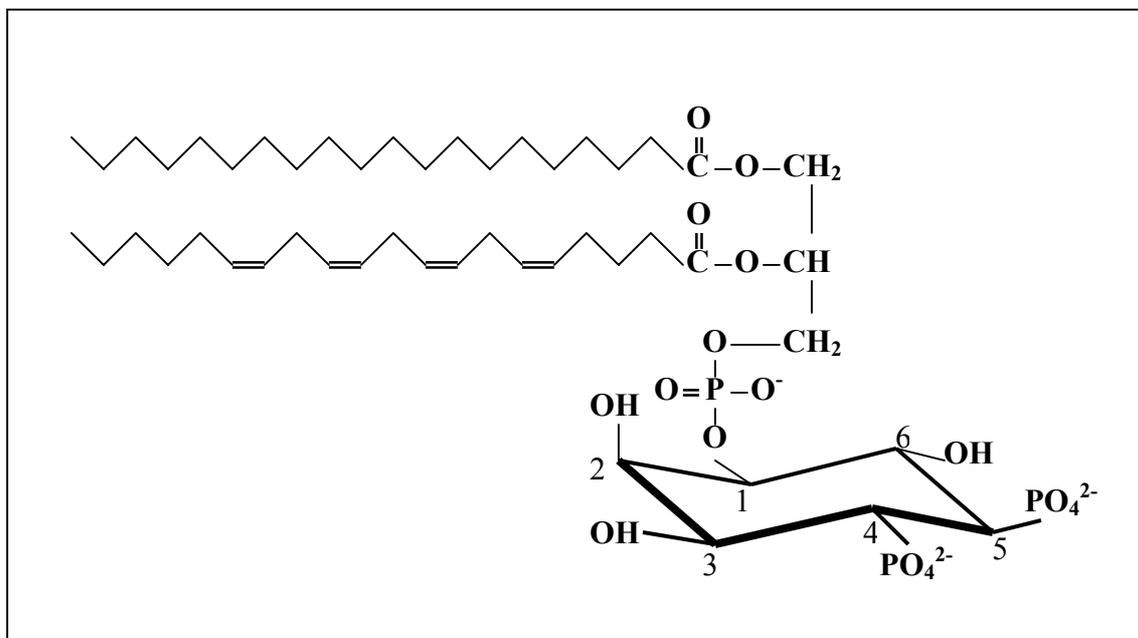
## 1.1.2 Die Phosphoinositide

Im Gegensatz zu den Inositolphosphaten ist die Gruppe der Phosphoinositide etwas überschaubarer. Das kommt daher, dass bei den Phosphoinositiden Phosphorylierungen bislang nur an den Positionen D-3, D-4 und D-5 gefunden wurden. Von besonderem Interesse sind hier das schon erwähnte  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  und die an der D-3 Position phosphorylierten  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  und  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ .

### 1.1.2.1 Das $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ als Signalmolekül

An der Synthese des  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  aus  $\text{PtdIns}$  sind zwei Gruppen von Enzymen beteiligt. Die PI 4-Kinasen phosphorylieren spezifisch die D-4 Position des Inositolrests. Aufgrund ihrer Hemmbarkeit durch Adenosin werden sie in zwei Gruppen eingeteilt (Typ II und Typ III). PI 4-Kinasen konnten sowohl an der Plasmamembran, als auch am Golgiapparat, am ER und im Zytosol nachgewiesen werden. Auch eine Rolle in der Organisation des Actin-Zytoskeletts wird ihnen zugeschrieben [Balla, 1998]. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass auch ARF-Proteine eine Aktivierung der PI 4-Kinaseaktivität vermögen [Godi et al., 1999]

Die früher  $\text{PtdIns}(4)\text{P}$  5-Kinasen genannten Enzyme werden heute als PIPKinasen, da ihre Spezifität gegenüber Substrat und Produkt nicht so groß ist, wie ursprünglich



**Abbildung 1.2:** Dargestellt ist das Phosphoinositid  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ , in der natürlich vorkommenden 1-Stearoyl, 2-Arachonidyl Form. Die einzelnen Positionen am Inositolring sind durchnummeriert. Die Hydroxylgruppe an Position 1 steht als einzige axial.

angenommen [Hinchliffe et al., 1998]. Sie werden aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften in zwei Gruppen eingeteilt (TypI und TypII), von denen jeweils 3 Isoformen ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) kloniert wurden. Der Hauptanteil der Synthese des  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  aus  $\text{PtdIns}(4)\text{P}$  wird durch die  $\text{PIPkinaseI}\alpha$  und  $\beta$  geleistet [Fruman et al., 1998]. Eine Aktivierung der  $\text{PIPkinaseI}\alpha$  kann durch Phosphatidsäure, als dem Produkt der Phospholipase D und dem kleinen G-Protein ARF6 stattfinden [Honda et al., 1999].

Die Bedeutung vielfältiger Regulationsmöglichkeiten der  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  Synthese liegt darin, dass diese Substanz nicht nur der Vorläufer für second Messenger wie dem  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  oder dem  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  ist, sondern auch eigene Funktionen besitzt [Czech, 2000]. Diese beinhalten vor allem Membrantransfer und Verbindung der Plasmamembran mit dem Actinzytoskelett. Viele Proteine, welche die Organisation des Actinzytoskelett regulieren, wie Gelsolin oder Profilin, binden an  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ . Eine Schlüsselfunktion von  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  bei der Bildung von Actinfilamenten in der Nähe von sogenannten rafts konnte nachgewiesen werden [Caroni, 2001]. Weiterhin binden viele an der Regulation von Clathrin-Vesikeln beteiligten Proteine, wie AP-2, AP180, Dynamin oder Synaptotagmin an  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ . [Czech, 2000]

### **1.1.2.2 Die D-3 phosphorylierten Phosphoinositide**

Neben dieser klassischen Signalkaskade der Inositolphosphate bildet das  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  auch die Ausgangssubstanz zu dem Signalweg der Phosphoinositide. Aufgrund der asymmetrischen Verteilung des  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ , das sich fast ausschließlich an der Innenseite der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran befindet, sind die Phosphoinositide auch nur an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert. Hier entsteht als erstes der Botenstoff  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  durch die Aktivität der Phosphoinositid 3-OH Kinasen (PI 3-Kinasen). Die PI 3-Kinasen können aufgrund struktureller und enzymatischer Merkmale in drei Klassen aufgeteilt werden [Wymann u. Pirola 1998; Toker u. Cantley 1997]:

Die PI 3-Kinasen der Klasse I sind Heterodimere, bestehend aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit und werden durch extrazelluläre Stimuli mittels Rezeptoren aktiviert. Anhand der regulatorischen Untereinheit wird die Klasse I noch einmal in IA und IB unterteilt: Die regulatorische Untereinheit der Klasse IA (3 Gene:  $p85\alpha, \beta$  und  $\gamma$ ; aber durch alternatives Spleißen werden mindestens sieben verschiedene Proteine produziert) ist konstitutiv mit der katalytischen Untereinheit (3 Gene:  $p110\alpha,$

## 1 Einleitung

---

$\beta$  und  $\gamma$ ) verbunden und besitzt mehrere Proteinbindungsdomänen, unter anderem zwei SH2 (Src homology2) und eine SH3 (Src homology3) Domäne. Die Aktivierung dieser PI 3-Kinasen kann auf zwei Wegen erfolgen: Erstens durch Bindung der regulatorischen Untereinheit mittels der SH2- Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste von Rezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinaseaktivität, das sind vor allem Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, wie z.B. der EGF-Rezeptor oder der Insulinrezeptor. Bei letzterem findet die Bindung der regulatorischen Untereinheit an die Tyrosinreste des Insulinrezeptorsubstrats (IRS) statt [Alessi u. Downes 1998]. Zweitens durch Bindung von GTP-Ras an die katalytische Untereinheit. Beide Signalwege bewirken eine Translokation der PtdIns 3-Kinase vom Zytosol zur Plasmamembran, wo die Kinase dann in Kontakt zu ihrem Hauptsubstrat, dem PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kommt.

Bei den PI 3-Kinasen vom Typ IB assoziiert die katalytische Untereinheit (PI3K $\gamma$ /p120) mit einer 101kDa regulatorischen Untereinheit, die eine Bindung an und Aktivierung durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen ermöglicht. Diese Enzyme sind in der Signaltransduktion von Siebentransmembranhelix-Rezeptoren (z.B. muskarinerge Rezeptoren) beteiligt. Weiterhin konnte bei der PI 3-Kinase  $\gamma$  des Gehirns eine Proteinkinaseaktivität festgestellt werden, durch welche der MAP-Kinase Signalweg aktiviert werden kann [Bondeva et al. 1998]. Die PI 3-Kinase  $\gamma$  ist somit möglicherweise für Auslösung von zwei verschiedenen Signalwegen verantwortlich. Die PI 3-Kinasen der Klasse I können sowohl PtdIns, als auch PtdIns 4-P PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> als Substrat nehmen. Ein weiteres und wichtiges Merkmal der PI 3-Kinasen der Klasse I ist ihre Sensitivität gegenüber den Hemmstoffen Wortmannin und LY 294002.

Die PI 3-Kinasen der Klassen II und III sind Monomere und können nicht PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> als Substrat nehmen, sondern phosphorylieren nur PtdIns und PtdIns 4-P (Klasse II) oder nur PtdIns (Klasse III). Sie kommen als Produzenten von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> nicht in Betracht. Über die PI 3-Kinasen vom Typ II ist nur wenig bekannt. PI 3-Kinasen vom TYP III haben als Produkt das PtdIns 3-P, das eine Rolle im endosomalen Membrantransfer eine Rolle spielt. Es dient als Interaktionspartner von Proteinen mit FYVE Finger Domänen, wie dem endosomal antigen1 (EEA1) [Simonson et al. 1998].

Das PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und alle anderen D3-phosphorylierten Phosphoinositide lassen sich nicht durch die Phospholipasen C hydrolysieren und bilden somit einen örtlich auf Membranen beschränkten Signalweg. Während die Inositolphosphate schon seit

## 1 Einleitung

---

längerem intensiv beforscht werden, sind die Phosphoinositide in letzter Zeit vermehrt in Zentrum des Interesses gerückt. Den Anstoß dazu haben unter anderem die Identifizierung einer PtdIns 3-Kinaseaktivität in Assoziation mit dem middle T-Antigen des Polyoma Virus und die Entdeckung des bis dahin unbekanntes Lipids PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in aktivierten Neutophilen gegeben. [Whitman 1985]

Mittlerweile können Phospholipiden eine ganze Reihe verschiedener Funktionen zugeschrieben werden, wie in der Signaltransduktion, insbesondere von Wachstumsfaktoren und somit eine Rolle in der Regulation des Zellwachstums oder einer onkogenen Transformation. Weiterhin ist es wichtig im Membrantransport, da spielt es zum Beispiel eine Rolle in dem insulinvermittelten Glucoseeinstrom in Zellen, oder im Rearrangement von Actinzytoskelett. [Payastre et al. 2001 ; Corvera et al. 99]

Die Identifizierung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-bindenden Proteinen bildete den nächsten Schritt zur Aufklärung des genauen Wirkmechanismus des durch die PtdIns 3-Kinasen ausgelösten Signalweges. Ein wichtiges Protein downstream der PtdIns 3-Kinase ist die Proteinkinase B/Akt. PKB/Akt wirkt antiapoptotisch und wurde ursprünglich als Onkogen eines Retrovirus entdeckt [Staal, 1988] und wird durch die Phosphoinositide Dependent Kinase 1 (PDK1) aktiviert. Beide Proteine binden an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Weitere PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-bindende Proteine sind zum Beispiel die Bruton's Tyrosine Kinase und einige Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) und GTPase activating proteins (GAPs), also am Signalweg der kleinen G-Proteine beteiligte Moleküle. Insgesamt wirkt die PtdIns 3-Kinase auf viele verschiedene Effektoren auch benachbarter Signalwege im Sinne eines cross-talks. [Wymann u. Pirola 1998]

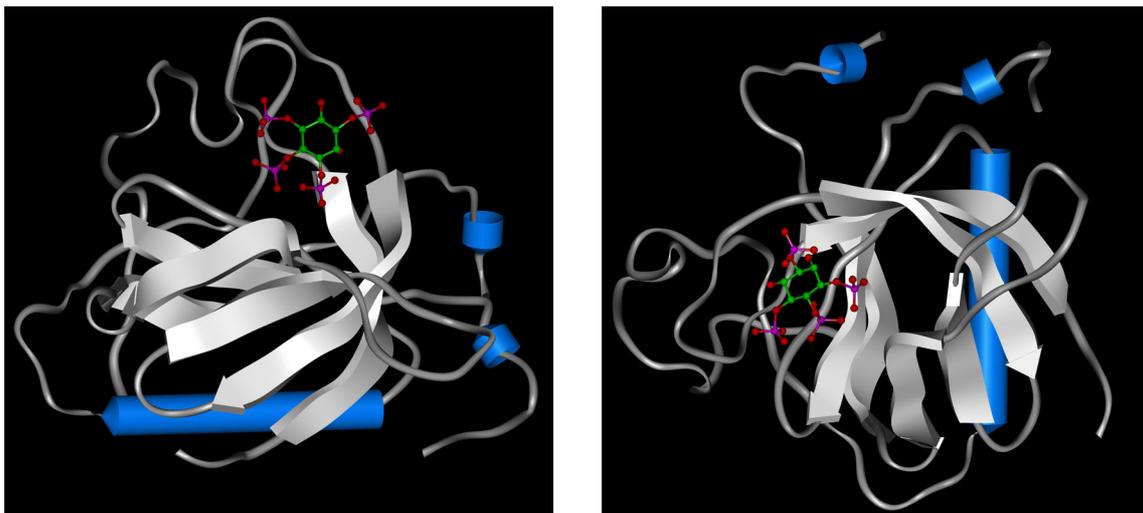
Als gemeinsamer Wirkmechanismus der 3-OH phosphorylierten Phosphoinositide hat sich herausgestellt, dass sie als ein temporärer Membrananker wirken. Nach Aktivierung der PtdIns 3-Kinase ermöglicht das neu gebildete PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> eine Translokation seiner Bindungsproteine vom Zytosol an die Membran. Die Bindung an die PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> wird durch bestimmte Phosphoinositidbindungsdomänen ermöglicht, von denen die PH-Domäne die zur Zeit am besten charakterisierte ist. Durch diese lokale, auf die Membran beschränkte Signalwirkung kommen nun die verschiedenen downstream liegende Effektorproteine in Kontakt zu einander und können aufeinander wirken. Als weiter Effekt kommt hinzu, daß durch die Bindung an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> Konformationsänderungen stattfinden können, die mit einer Funktionsänderung einhergehen.

## 1.2 Phospholipidbindungsdomänen

Die Interaktion von Proteinen mit Phospholipiden geschieht durch bestimmte Domänen. Von diesen Domänen konnten in letzter Zeit mehrere definiert werden. Die besten untersuchte ist die Pleckstrin Homologie-Domäne, oder kurz PH-Domäne. [Bottomly et al. 1998]

PH-Domänen wurden zuerst an dem Protein Pleckstrin beschrieben, das sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus von eine PH-Domäne begrenzt wird. Die etwa 100 bis 120 Aminosäuren großen Domänen weisen eine Sequenzhomologie von nur 10-20% auf. Dagegen ist die 3-D Struktur stark konserviert: Sie hat eine fassähnlichen Struktur aus zwei  $\beta$ -Faltblättern mit jeweils drei und vier antiparallelen  $\beta$ -Strängen. Dieses sogenannte  $\beta$ -Fass wird an einem Ende durch eine  $\alpha$ -Helix abgeschlossen, die einen hochkonservierten Tryptophanrest enthält. Die Bindung an die Targets findet an der gegenüberliegenden Seite des  $\beta$ -Fasses durch variable Loops statt. Allgemein werden die stark konservierten Sekundärstrukturelemente durch sehr variable Loops verbunden. In einigen PH-Domänen, wie z.B. denen von  $\beta$ -Spectrin und der PLC- $\delta_1$ , können die Loops Insertionen von weiteren Sekundärstrukturelementen oder sogar ganzen Domänen enthalten. [Bottomley et. al. 1998]

Durch Affinitätsmessungen konnte für viele PH-Domänen eine Präferenz zu bestimmten Phosphoinositiden oder Inositolphosphaten gezeigt werden. Dennoch ist bei



**Abbildung 1.3: Struktur der PH-Domäne der BTK mit Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> als Liganden, aus zwei Perspektiven.  $\beta$ -Stränge sind in Weiß, die  $\alpha$ -Helices in Blau und die Loop-Bereiche in Grau dargestellt. Als Grundlage dienten die Strukturdaten der Protein Data Bank (PDB).**

## 1 Einleitung

---

diesen *in vitro* Affinitätsmessungen Vorsicht angebracht, denn es ist nicht klar, in wie weit sie die Bedingungen in der Zelle *in vivo* widerspiegeln. So schwanken die  $K_d$ -Werte verschiedener PH-Domänen für einzelne Phosphoinositide zwischen 400nM und 40 $\mu$ M und liegen damit Größenordnungen auseinander. Weiterhin ergeben sich technische Probleme beim Messen der Affinitäten der hydrophilen Proteine zu den hydrophoben Phosphoinositiden. Hier wurden synthetische Analoga zu den Phosphoinositiden benutzt, bei denen teilweise die Fettsäurereste sogar ganz entfernt wurden, sogenannte Glycerophosphorylinositole, oder verkürzte (C6 oder C8) und damit wasserlösliche Fettsäuren enthielten. Es konnte aber gezeigt werden, daß die PDK1 vermittelte Aktivierung von PKB/Akt durch synthetisches PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, das zwei Palmitoylreste (C16) enthält, deutlich schwächer ist, als durch das natürlich vorkommende 1-Stearoyl, 2-Arachidonoyl PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Wahrscheinlich ist dieser Effekt dadurch zu erklären, dass die ungesättigten Fettsäure ein weiteres Herausragen des Inositolrestes bewirken, der damit besser zugänglich ist. Dies ist ein weiterer Grund viele *in vitro* Messungen mit Skepsis zu betrachten.

PH-Domänen binden Phosphoinositide und Inositolphosphate mit verschiedenen Präferenzen. Bei nur etwa 10% der bekannten PH-Domänen ist die Affinität zu ihnen so hoch, dass von einer Bindung der Domäne unter physiologischen Umständen ausgegangen werden kann [Lemmon et al., 2000]. Einige der hochaffin-bindenden PH-Domänen sind auf Grund ihrer Affinität zu PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> oder anderen Phosphoinositiden an der Signaltransduktion beteiligt, wie z.B. die vom Btk, PKB/Akt, PDK1, Vav, SOS1, oder PLC $\gamma$ .

Es stellt sich aber die Frage nach der Bedeutung der überwiegend niedrig-affinbindenden PH-Domänen. Hierbei sollte beachtet werden, dass schon durch Aneinanderkoppeln von zwei PH-Domänen sich Aviditätseffekte ergeben, die eine Steigerung der effektiven Bindungsstärke bis zu einem Faktor um Tausend bewirken können. Solche Effekte können entweder durch Multimerisierung von Proteinen mit jeweils einer PH-Domäne geschehen, oder eben dadurch, dass in einem Protein mehrere PH-Domänen vorhanden sind [Lemmon et al., 2000]. Letzteres ist zum Beispiel bei dem noch näher zu besprechenden Centaurin $\alpha$  der Fall.

Weiterhin sei erwähnt, dass es Hinweise gibt, die auch auf Proteine als mögliche Bindungspartner von PH-Domänen hindeuten. Mögliche Kandidaten sind hier die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von Heterotrimeren G-Proteinen oder die Proteinkinase C.

Weitere Domänen, von denen gezeigt werden konnte, dass sie an Phosphoinositide binden sind die C2 Domänen, die SH2-Domänen und die FYVE Finger Domänen. Die C2-Domänen wurden ursprünglich als kalziumabhängige Inositolphosphatbindungsdomäne der Proteinkinase C beschrieben. Mittlerweile wurden aber auch kalziumunabhängige Bindung an Inositolphosphate und Phosphoinositide von C2-Domänen gefunden, und weiterhin ebenso wie bei PH-Domänen auch spezifische Bindung an Proteine. Von der SH2-Domäne der p110 $\alpha$ /p85 $\alpha$  PI 3-Kinase konnte gezeigt werden, dass sie an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> bindet und dadurch die Bindung an Phosphotyrosine gehemmt wird, so dass sich hier eine Art negative Rückkopplung ergibt. Die FYVE Finger Domäne ist eine Zink-Finger Domäne und konnte bei über 30 Proteinen nachgewiesen werden, die in verschiedenen Membrantransportprozessen beteiligt sind. Sie bindet sehr spezifisch an das PtdIns(3)P. Weitere Proteine mit anderen Phosphoinositidbindungsdomänen sind zytoskelettassoziierte Proteine wie Ezrin, Radixin, Moesin und Vinculin. [Bottomley et al. 1998]

### **1.3 Die Centaurine**

Die Centaurine besitzen als gemeinsames Merkmal eine oder mehrere PH-Domänen, Ankyrinrepeats und eine Zinkfingerdomäne mit ERF-GAP Homologie. [Jackson et al., 2000] Aufgrund ihrer chimären Struktur und der Tatsache, dass der Name Chimärine bereits vergeben war, wurden sie von ihren Erstbeschreibern Centaurine genannt. [Hammonds-Odie et al., 1996]

Das Centaurin $\alpha$  wurden ursprünglich auf der Suche nach Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> bindenden Proteinen kloniert, indem man Lysate aus Rattenhirn über eine Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-Affinitätsmatrix aufgereinigt hat und dabei auf ein etwa 43- 46kDa großes Protein aufmerksam wurde. Dieses eluierte als letztes von der Matrix, so dass zuerst angenommen wurde, es besäße eine besonders hohe Affinität zu Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>. Eine darauf folgende Messung der Bindungseigenschaften durch Photoaffinitätsmarkierung zeigte jedoch, dass PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> mit einer fünfmal höheren Affinität gebunden wurde als Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>. [Hammonds-Odie et al., 1996]

Kurz darauf wurden auf ähnliche Weise die homologe Proteine aus dem Rind (PIP3BP) [Tanaka et al., 1997] und dem Schwein (p42<sup>IP4</sup>) [Stricker et al., 1997] isoliert und kloniert. Das entsprechende Centaurin vom Rind weist ebenso eine hohe Affinität zu PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> auf, während das Centaurin des Schweines in einem Bindungsassay das

## 1 Einleitung

---

Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> bevorzugte, so dass es von den Beschreibern p42<sup>IP4</sup> genannt wurde. Insofern herrscht Unklarheit über den physiologischen Bindungspartner des Centaurins.

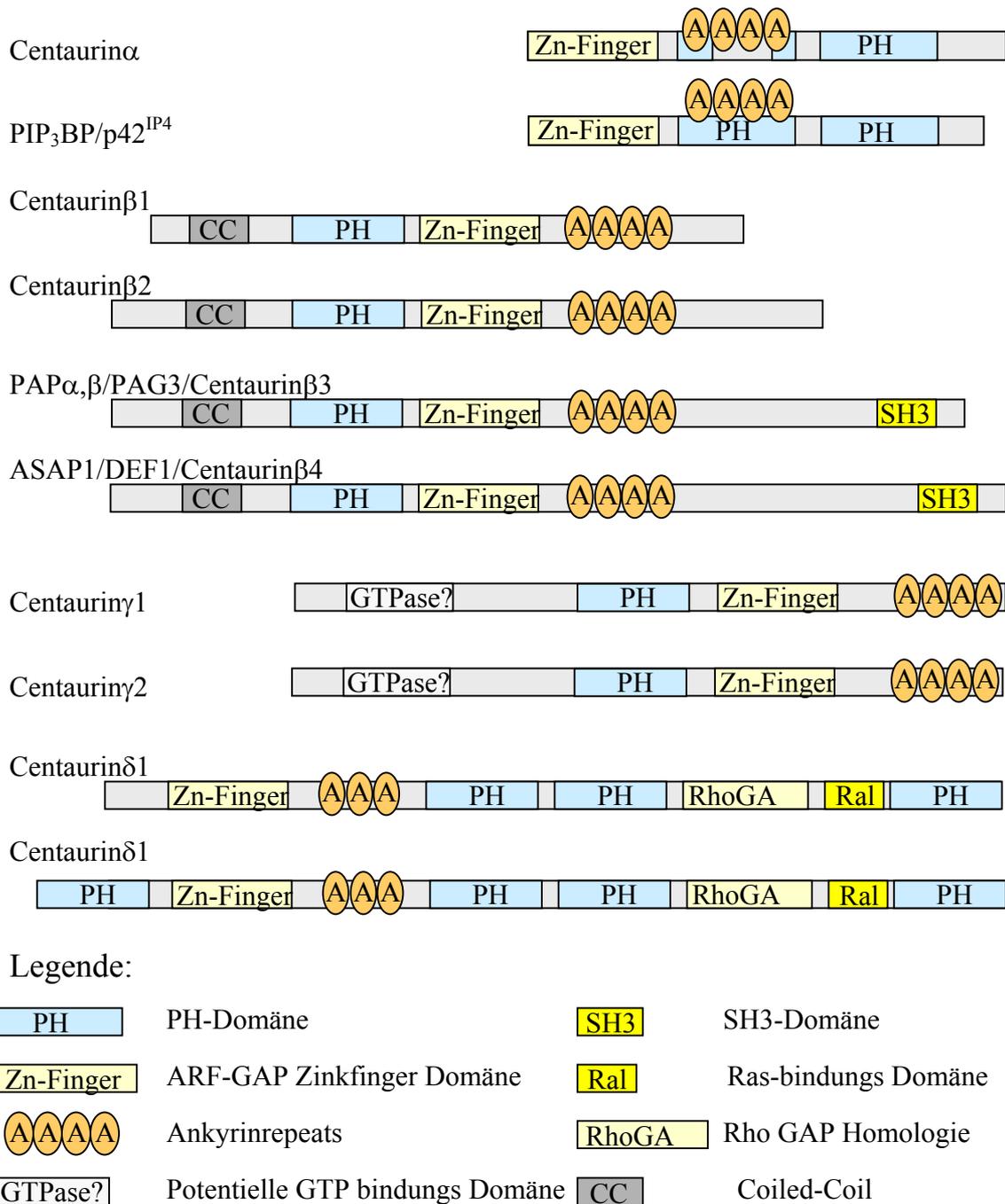
Obwohl die Centaurine eine hohe interspezies Homologie untereinander aufweisen, unterscheidet sich das Centaurin der Ratte in seiner Sequenz in ein paar Punkten wesentlich von denen des Schweines und des Rindes. Zum einen weist es einen etwa 45 Aminosäuren längeren C-Terminus auf und dann besitzt es auch nicht die in den beiden anderen Proteinen vorhandene erste PH-Domäne.

Nach Northernblotanalysen findet sich das Centaurin  $\alpha$  vor allem im Gehirn exprimiert, eine deutlich geringere Expression findet sich in der Niere und der Milz [Hammonds-Odie et al., 1996]. Bei in situ Hybridisierung an Rattenhirnen findet sich eine bevorzugte Expression in neuronreichen Gebieten wie dem Cortex, Thalamus, Hippocampus und Kleinhirn. Hierbei zeigt sich aber eine deutliche Abhängigkeit vom Lebensalter: So ist die Expression am vierten postpartalen Tag am stärksten ausgeprägt und nimmt dann mit zunehmendem Alter ab. Auf subzellulärer Ebene ist das Centaurin  $\alpha$  vor allem an der axonalen Membran, an der präsynaptischen Membran und an präsynaptischen Vesikeln. [Kreutz et al. 1997]

Eine Bestätigung, dass Centaurin  $\alpha$  ARF-GAP Aktivität besitzt, konnte durch einen sogenannten Rescue-Versuch an einem Hefestamm nachgewiesen werden, bei dem das Gcs1-Gen, das dem ARF-GAP der Hefe entspricht, nachgewiesen werden. Bei diesem Versuch konnte transfiziertes Centaurin $\alpha$  den ursprünglichen Phänotyp wieder herstellen. [Venkateswarlu et al., 1999]

Die Identifizierung der weiteren Centaurine  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  erfolgte durch Datenbandsuche nach Sequenzen mit centaurinähnlicher PH-Domäne und Arf-Gap-Domäne. Einige dieser Proteine enthalten auch noch weitere Domänen [Jackson et al., 2000]. Es konnten auch einige Mitglieder der Centaurinfamilie kloniert und funktionell untersucht werden.

Das ASAP1/Centaurin $\beta$ 4 der Maus wurde als phospholipidabhängiges ARF1/ARF5-GAP und zugleich SH3-bindendes Protein identifiziert [Brown et al., 1998]. Es bindet mit seiner PH-Domäne an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und ist an der Regulation des Actin Zytoskeletts beteiligt [Randazzo et al. 2000]. Das DEF1/Centaurin $\beta$ 4 aus Rind wurde ebenso als SH3-bindendes Protein kloniert [King et al. 1999]. Dem Centaurin $\beta$ 3 werden die PAPs (Pyk2-associated Proteins) aus Maus [Andreev et al. 1999] und das humane PAG3 (paxillin-associated protein with Arf GAP activity) [Kondo et al. 2000]



**Abbildung 1.4: Schematische Übersicht der Centaurin Familie. Die Bezeichnung der Domänen folgt der Legende. Beachtenswert sind die Unterschiede zwischen dem Centaurin $\alpha$  (Ratte) und den Homologen aus Rind (PIP3BP) und Schwein (p42<sup>IP4</sup>): Die Form der Ratte verfügt über nur über die C-terminale PH-Domäne und besitzt außerdem einen verlängerten C-Terminus.**

zugerechnet. In dieser Arbeit wird außerdem die Klonierung eines neuen Mitglieds der Centaurine, dem humanen Centaurin $\alpha$ 2 erstmals berichtet.

Über die physiologische Funktion der Centaurine ist zur Zeit noch nicht viel bekannt. Die N-Terminale Zinkfingerdomäne des Centaurins weist eine Homologie auf zu der

Zinkfingerdomäne des GTPase Aktivierenden Proteins des kleinen G-Proteins ARF1, dem ARF1-GAP. Experimente mit gezielter Mutagenese deuten darauf hin, daß dieser Zinkfinger Träger der GAP-Aktivität ist[Cukierman et al. 1999]. Das ARF1 spielt eine wichtige Rolle im Vesikeltransport indem es Interaktion von Coatomer Proteinen mit der Golgimembran reguliert. Insofern kann vermutet werden, daß das Centaurin auch eine (ARF)-GAP Funktion ausübt. Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, daß Centaurin  $\alpha 1$  in der Lage ist, die Funktion von Gcs1, dem ARF GTPase aktivierendem Protein der Hefe, in einem Gcs1 defizientem Hefestamm zu übernehmen.

### **1.4 Rolle der Arf-GTPasen im intrazellulären Vesikeltransport**

Die ARFs (ADP ribosylation factors) gehören zu der Gruppe der kleinen G-Proteine, die auch Ras/GTPase Superfamilie genannt wird. Sie haben ihren Namen von der Eigenschaft, die ADP-Ribosylierung von  $G_{s\alpha}$  durch Cholera toxin zu stimulieren [Kahn u. Gilman, 1984]. Ihre physiologische Funktion besteht aber vor allem in der Regulation des intrazellulären Vesikeltransports.

#### **1.4.1 Allgemeine Aspekte zu Ras-Proteinen**

GTP-bindende Proteine, kurz G-Proteine genannt, wirken in verschiedenen Regulationsprozessen als molekulare Schalter. In der GTP-gebundenen Form sind sie aktiv und können regulatorisch auf ihre Effektorproteine einwirken. Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität kann das GTP zu GDP hydrolysiert werden. Das GDP bleibt am G-Protein gebunden und bewirkt eine Inaktivierung. Eine erneute Aktivierung kann erst durch Austausch des gebundenen GDP durch GTP erreicht werden. Die G-Proteine wirken also als Schalter, indem sie einen unidirektionalen Zyklus zwischen einer aktiven, GTP-gebundenen und einer inaktiven, GDP-gebundenen Form durchlaufen.

Die Proteine der Ras/GTPase-Superfamilie sind etwa 20kDa große Monomere, die zum Durchlaufen des oben erwähnten GTPase-Zyklus weitere Proteine benötigen, die zu einer der drei folgenden Gruppen gehören. Die GTPase-aktivierenden Proteine, kurz GAPs, bewirken eine Aktivierung der intrinsischen GTPase-Aktivität und damit eine Inaktivierung des durch das G-Protein vermittelten Signals. Dagegen beschleunigen die Guanin nucleotide exchange factors den Austausch eines an das G-Protein gebundenen

GDPs durch ein GTP und bewirken damit eine Aktivierung. Bei einigen Proteinen der Ras-Superfamilie sind noch Proteine beschrieben, die den GEFs entgegenwirken, indem sie einem GDP/GTP-Austausch behindern. Diese werden Guanin nucleotide dissociation inhibitors, kurz GDIs, genannt. [Krauss, 1999]

### **1.4.2 Grundlagen zum intrazellulären Vesikeltransport**

Eukaryotische Zellen sind durch Membranen in verschiedene Kompartimente unterteilt, die für ihre jeweiligen Funktionen mit speziellen Proteinen ausgestattet sind. Eine Kommunikation zwischen den verschiedenen Kompartimente findet durch membranumschlossene Vesikel statt. Dieser Vesikeltransport muss auf vielfältige Weise reguliert werden, damit die für die Zelle lebenswichtige Unterteilung in spezialisierte Kompartimente nicht gestört wird.

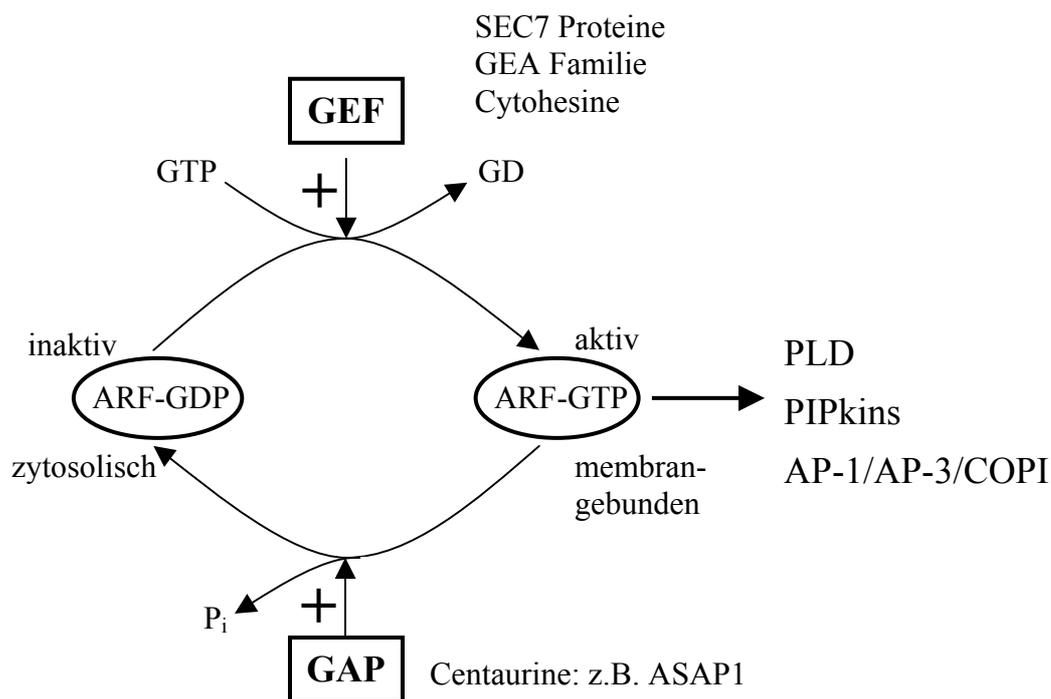
Die Vesikel werden von einem Proteinmantel („coat“) umgeben. Diese werden in Clathrin- und Nicht-Clathrin-, bzw. Coatomer Komplexe eingeteilt. Das trimere Clathrin bildet ein hexagonales und pentagonales Gerüst um die Vesikel. Es benötigt für seine Formation Adaptorproteine, von denen vier bekannt sind: AP-1 bis AP-4. AP-1 kommt vor bei Vesikeln die aus dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) entstammen, während AP-2 bei Endozytoseprozessen beteiligt ist. Die Rolle des neuronalen AP-3 ist nicht ganz geklärt, es wird vermutet, dass es nicht mit Clathrin interagiert. Die Adaptorproteine AP-1 und AP-3 werden durch ARF an die Membran rekrutiert. [Kirchhausen et al. 1997]

Auf der anderen Seite gibt es die Coatomer Komplexe. Diese bestehen aus zwei verschiedenen Coat Protein Komplexen: COPI und COPII. COPI wird eine Rolle im Transport vom ER zum Golgi Apparat und möglicherweise im retrograden Transport und bei der Endozytose zugeschrieben. [Cosson U. Letourneur, 1997] Der COPI Mantel besteht aus sieben Untereinheiten und benötigt ARF zu seiner Zusammenfügung. [Nickel u. Wienand, 1999]. COPII Vesikel sind im anterograden Transport vom ER involviert. Der COPII Komplex benötigt für seine Formation die kleinen G-Proteine Sar1p. [Kuehn u. Schekman, 1997]

### 1.4.3 Steuerung der Vesikelknospung („budding“) durch ARF-GTPasen

Die Gruppe der ubiquitär vorhandenen ARFs besteht aus 6 Genen, die für ARF1 bis ARF6 kodieren, und lässt sich anhand von Sequenzmerkmalen in 3 Klassen eingeteilt. Dabei werden ARF1, ARF2 und ARF3 der Klasse I, ARF4 und ARF5 der Klasse II und ARF6 als einziges Mitglied der Klasse III zugerechnet. Alle ARFs sind etwa 20kDa große Proteine und sind N-terminal myristoyliert. Die Rollen des ARF1 und des ARF3 im Transport vom ER zum Golgiapparat oder im intra-Golgi Transport sind mittlerweile gut charakterisiert. [Moss u. Vaughan, 1998]

Das ARF1 ist das am besten untersuchte ARF. Deshalb soll hier am Beispiel des ARF1 auf die Rolle dieser GTPasen beim Vesikelknospung („budding“) eingegangen werden. Das inaktive ARF1-GDP ist im Zytosol lokalisiert. Ein Austausch des GDP durch ein GTP bewirkt eine Konformationsänderung, wodurch die N-terminale, myristoylierte Helix des ARF1 mit der Lipiddoppelschicht von Membranen interagieren kann. Das



**Abbildung 1.5: Darstellung der Regulation von ARF Proteinen. In der GDP gebundenen Form ist das ARF zytosolisch und inaktiv. Nach Austausch des GDP durch GTP durch GEF transloziert das ARF an Membranen und kann Zielproteine wie PLD und PIPkins aktivieren und eine Konstruktion des Vesikelmantels bewirken. GAPs wie die Centaurine bewirken durch eine Hydrolyse des GTPs wieder eine Inaktivierung des Signals. Durch die Produkte der von ARF-GTP aktivierten Enzyme ergeben sich vielfältige weitere Regulationsmöglichkeiten (siehe Text).**

## 1 Einleitung

---

ARF1-GTP ist nun membrangebunden und bewirkt seinerseits eine Rekrutierung von Clathrin (AP-1, AP-3) und Nicht-Clathrin (COPI) Proteinen. Es resultiert in der Bildung von Coatmer-Komplexen und in der Abknospung des Membranvesikels. Weiterhin aktiviert ARF-GTP die Phospholipase D und die PIPkins. Der durch die PLD entstandenen Phosphatidsäure wird eine Rolle bei der Membranfusion zugeschrieben. Außerdem bewirkt die Phosphatidsäure eine Stimulation der PIPkin $\alpha$  und  $\beta$  und damit eine Erhöhung der lokalen PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> Produktion. Da die PLD ihrerseits durch das PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> weiter stimuliert wird, ergibt sich hier die Möglichkeit einer Feed-forward Schleife. Von dem PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, das lokal durch die PIPkins gebildet wird, wird vermutet, dass es als Anker für Zytoskelettanteile dient. [Moss u. Vaughan, 1998] [Jackson et al., 2000]

Für die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran ist eine Abdissoziation des Coatmer-Mantels nach vorhergegangener Hydrolyse des ARF1-GTPs zum ARF-GDP nötig. Da die basale GTPase-Aktivität der ARFs nahe Null ist, kommt den ARF-GAPs eine wichtige Funktion zu.

Das ARF6 als einziges Mitglied der Klasse III weicht in seiner Funktion etwas von den anderen ARFs ab. Während bei diesen die GDP-gebundene Form zytosolisch und die GTP-gebundene Form membranständig ist, beeinflusst beim ARF6 das gebundene Nukleotid die subzelluläre Lokalisation: So ist ARF6-GTP vorwiegend an der Plasmamembran zu finden, ARF6-GDP dagegen an Endosomen. ARF6 vermag als einziges ARF ein Rearrangement des Actin Zytoskelett zu bewirken und wird mit Funktionen wie Exozytose und cell spreading in Zusammenhang gebracht. [Chavrier u. Goud, 1999] [Jackson et al., 2000]

Von den für die Steuerung von ARFs nötigen Proteinen konnten mehrere Proteine identifiziert werden. Zu den ARF GEF zählt man die SEC7 Familie, die GEA Familie und die Cytohesine [Roth, 1999]. Zu den Cytohesinen gehört auch das GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1), das auch eine PH-Domäne besitzt, und mit hoher Affinität an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> bindet [Klarlund et al. 1997]. Als Proteine mit ARF GAP-Aktivität konnten die bereits erwähnten Centaurine identifiziert werden.

### **1.5 Das grün fluoreszierende Protein (GFP)**

Fluoreszierende Proteine haben sich zu einem sehr nützlichen Werkzeug in der Zellbiochemie entwickelt. Die zur Zeit am besten charakterisierten stammen von

## 1 Einleitung

---

marinen Coelenteraten, wie z.B. die grünfluoreszierenden Proteine (GFPs) der pazifischen Qualle *Aequoria victoria* oder der Seeanemone *Renilla reniformis* und das rotfluoreszierende DsRed von Indopazifischen Seeanomane *Discosoma sp.* Das in dieser Arbeit benutzte GFP kommt von *Aequoria victoria*. Dort wird es natürlicherweise durch das blaue Licht des lumineszierenden Proteins Aequorin angeregt und emittiert es dann als grünes Licht. [Cubitt et al. 1995]

Das GFP ist ein 238 Aminosäuren großes, 27kDa schweres Protein. Es weist eine sehr kompakte Tertiärstruktur auf, bestehend aus einer zentralen alpha-Helix auf der das Fluorophor lokalisiert ist und die von einem 11-strängigem beta-Faß umgeben wird. Dadurch kommt dem GFP eine hohe Resistenz gegenüber Proteasen, Hitze, Detergenzien und alkalischem pH zu. Der Fluorophor entsteht durch zyklische intramolekulare Addition dreier Aminosäuren ( Serin 65, Tyrosin 66 und Glycin 67) und einer anschließenden Oxidation durch molekularen Sauerstoff. Diese Reaktionen finden wahrscheinlich autokatalytisch statt oder benötigen ubiquitär vorkommende Kofaktoren. Zumindest hat sich in allem bislang getesteten Zellen ein funktionsfähiges Protein gebildet. Das GFP selber ist in der Regel ohne wesentlichen Einfluss auf den Stoffwechsel der Zelle.

Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich das GFP hervorragend als biologischer Marker für den Einsatz in lebenden Zellen [Chalfie et al. 1994]. Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen läßt sich durch die Fusion mit dem GFP und dem Einsatz fluoreszenzmikroskopischen Methoden *in vivo* bestimmen. Dabei sind im Gegensatz zur Immunzytochemie auch Beobachtungen einer lebenden Zelle über einen bestimmten Zeitraum möglich.

Durch Austausch von bestimmten Aminosäuren lassen sich GFP-Mutanten mit verbesserten Fluoreszenzeigenschaften erstellen. Zu den sogenannten rot-verschobenen GFP-Varianten gehören das GFP-S65T [Heim et al. 1995] und das EGFP (enhanced GFP: F64L, S65T) [Cormack at al. 1996]. Das EGFP hat ein einzelnes Absorptionsmaximum bei 488nm und ein Emissionsmaximum bei 507nm. Weiterhin bietet es eine 35x höhere Leuchtkraft als das wtGFP, eine schnellere Bildung und ein langsames Ausbleichen des Fluorophors. Bei dem EYFP handelt es sich um eine weitere Mutante des GFP, bei der vier Aminosäureaustausche ( S65G, V68L, S72A, T203Y) zu einer weiteren Verschiebung des Absorptions- und Emissionsspektrums geführt haben (Maxima bei 513nm und 527nm), so daß es gelb (yellow) fluoreszierendes Protein genannt wurde [Ormö et al. 1996].

## **1.5 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit**

Ein Vergleich des Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte mit denen des Schweins und des Rinds ergab, dass sich das Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte wie bereits erwähnt in zwei Bereichen von den anderen unterscheidet: Einer dieser divergierenden Bereiche befindet sich in der N-terminalen PH-Domäne der Centaurine von Schwein und Rind. Das Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte besitzt durch diese Veränderung keine N-terminale PH-Domäne, sondern nur eine C-terminale. Da die PH-Domänen für die Bindung an Phosphoinositide verantwortlich gemacht werden, kann so ein UNterschied von entscheidender Bedeutung für die Bindungseigenschaften sein. Der zweite der divergierenden Bereiche ist der um 40 Aminosäuren verlängerte C-Terminus. In Anbetracht der ansonsten hohen interspezies Homologie der Centaurine sind solche Unterschiede auffällig. Vor allem vor dem Hintergrund der Regulationsfunktion, welche die Phosphoinositide ausüben, stellte sich die Frage, ob diese Unterschiede darauf beruhen, dass die Centaurine von verschiedenen Spezies kommen, ob es sich um verschiedene Gene handelt oder ob spezielle Regulationsmechanismen wie z.B. alternative Spleißvorgänge eine Rolle spielen. Es könnte sich aber auch um Artefakte handeln. Diese Frage zu beantworten steht an erster Stelle dieser Arbeit.

Ein humanes Centaurin $\alpha$ 1 war zu Beginn der Arbeit noch nicht kloniert. Dennoch gab es Hinweise, wie eine humane Form zumindest teilweise aussehen würde: Eine Datenbanksuche nach Homologen zu den bekannten Centaurin $\alpha$ 1 aus Ratte, Schwein und Rind lieferte einige humane ESTs. Hieraus ließ sich zumindest ein Teil der Sequenz des humanen Centaurin $\alpha$ 1 rekonstruieren. Gleichzeitig bot sich hieraus ein Ansatz zur Klonierung des humanen Centaurin $\alpha$ 1. Die Klonierung des humanen Centaurin $\alpha$ 1 mit Hilfe dieser Daten war das nächste Ziel dieser Arbeit.

Zusätzlich wird hier von der Klonierung eines humanen Centaurin $\alpha$ 2, einer hier neu entdeckten Isoform, berichtet. Zur Charakterisierung des Centaurin $\alpha$ 2 im Vergleich zum Centaurin $\alpha$ 1 wurden eine Northernblotanalyse und *in vivo* Lokalisationsexperimente (s.u.) durchgeführt.

Der nächste Punkt dieser Arbeit ist die funktionsabhängige intrazelluläre *in vivo* Lokalisation der Centaurine  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2. Diese wurden vor allem zur Ergänzung der *in vitro* Daten über die Bindungseigenschaften des Centaurin $\alpha$ 1 durchgeführt. Dies

## 1 Einleitung

---

betrifft vor allem die Frage, ob das lipophile PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> oder sein hydrophiles Gegenstück, das Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> nun der physiologische Interaktionspartner ist. Aus der intrazellulären Lokalisation von Proteinen kann man Rückschlüsse auf deren physiologische Bindungspartner ziehen. Bei dem Centaurin $\alpha$ 1 waren bereits immunhistochemische Untersuchungen gemacht worden, die das Centaurin $\alpha$ 1 in der Nähe von Membranen zeigten [Kreutz et. al, 1997]. Dies könnte für eine bevorzugte Bindung an das membranständige, lipophile PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> sprechen. Diese Versuche sind aber statisch, weil sie an fixierten Zellen gemacht wurden. Mehr Gewicht hätten Versuche, bei denen eine funktionelle Translokation des Centaurins an den Ort einer erhöhten PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> nachgewiesen werden kann. Die PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> Synthese durch die PI 3-Kinase lässt sich in Zellen vor allem durch Wachstumsfaktoren anregen. In diesem Fall wäre eine Translokation des Proteins an die Plasmamembran als den Ort der PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> Synthese zu erwarten. weiterhin ist zu fordern, dass die Translokation durch spezifische Inhibitoren der PI 3-Kinase, wie Wortmannin oder LY294002 zu hemmen ist. Die entsprechenden Experimente wurden in dieser Arbeit an mit EGF stimulierten PC12 Zellen durchgeführt.

Um die intrazelluläre Lokalisation der Centaurine überhaupt *in vivo* untersuchen zu können, wurde eine Fusion mit GFP angestrebt. Diese Fusionsproteine ließen sich in dieser Form mit Fluoreszenzmikroskopie mit quasikonfokalen Methoden in lebenden Zellen untersuchen. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im letzten Teil der Arbeit vorgestellt.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Die Beschreibung der verwendeten Enzyme, Chemikalien, Plasmide, Bakterienstämme, Zelllinien und Zellkulturmaterial erfolgt im Methodenteil. Die Beschreibung spezieller Geräte ist ebenfalls im Methodenteil abgelegt. Dort sind auch die jeweiligen Hersteller angegeben.

#### 2.1.1 Verwendete Oligonukleotide:

Oligonukleotide wurden von MWG, Ebersberg bezogen. Für Klonierungszwecke eingefügte Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen dargestellt.

Klonierung und Subklonierung des humanen Centaurin  $\alpha$  1:

IO01 5'-CAT GCT CGA GCT GAG CTG CTC GGG AAT CCA CCG G-3'

IO02 5'-CAT GCT CGA GCC CAA GTG GAG TTC ATG GCC TCC C-3'

IO03 5'-ATC GAA TTC TAG GGC TCC TGC TTC TCC GGG TAG ATG-3'

IO04 5'-ATC GAA TTC GGC AGC ATG GGC CTG TCC ACC ACC TTC-3'

HsCent07 5'-CCT GTC CAC CAC CTT CTG AAA G-3'

HsCent08 5'-GCC GTG ATG AAG ATC GAG CAC CTG-3'

HsCent10 5'-GCG GTC ATC CAT GGT GAA CCA GCG-3'

HsCent14 5'-CGC (AG)GC CAT GGC C(AG)(AG) GGA GC(GT) GCG-3'

HsCent15 5'-CTA GGG (CT)TT (AG)TG CTT GAA GTG GGC-3'

HsCent17 5'-GCA TCG GCA TCG CGG GCG CAT CG-3'

HsCent18 5'-TCC GTG GTC CTC CAG CCG CAC TCG-3'

HsCent19 5'-GCG GGC CTC GAG CGG CCA TGG CCA AGG AGC GG-3'

HsCent20 5'-GCA CTC GCC CGG GTT TAT GCT TGA AGT GCG-3'

HsCent21 5'-CAT CGA GCT CAT GGC CAA GGC GCG GCG C-3'

HsCent22 5'-CAC TCG CAC CGG TTT ATG CTT GAA GTG CG-3'

## 2 Material und Methoden

---

### Subklonierung des humanen Centaurin $\alpha$ 2 :

HsCenthom3 5' -ACT ACT CTC GAG CTA TGG GCG ATC GCA ACA AG-3'

HsCenthom4 5' -ACT GTT CCC GGG TCA CCT GCT GCT GCG G-3'

### Erstellung der Sonden für die Northernblots:

HsCent26 5' -CCC AGG TCA GCA AGG TGA AGT CC-3'

HsCent27 5' -CGG AGG GCG TGG GCC GGT A-3'

HsCenthom5 5' -GGC CAC AAT GGA AAC CTC CG-3'

HsCenthom6 5' -CGT TGG CCT GGG GGA TGC-3'

RnActin1 5' -ATG ATG ACG ATA TCG CTG GCG-3'

RnActin2 5' -ATG AGG AAG TCT GTC AGG TCC C-3'

### Klonierung der Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte:

RnCent1 5' -TCA CTC GAG TTG AGC TGC TCT GGG ATC CAC C-3'

RnCent2 5' -TCA TCT AGA GGC AGC ATG GGC CTG TCC ACC-3'

RnCent3 5' -GTG GCC TCG AGG CTA TGG CCG GGG AGC TGC GC-3'

RnCent4 5' -TTC TGT CTA GAC TGT CTA TCT GAT GGG CTT G-3'

RnCent7 5' -GAA GGC TAC ATG GAG AAG ACA GGG-3'

RnCent23 5' -CAT GTG GAG AAA CAG GAA TAC TCT AC-3'

RnCent24 5' -GTG GCCGAT CTT GGC TGG CTG GAA GGT GGC-3'

### Sequenzierung:

CMV ie Prom1 5' -AAA TGT CGT AAC TCC GCC-3'

EGFP-N1 Seq1 5' -GAA CTT GTG GCC GTT TAC GTC-3'

EGFP C-Term 5' -CCT GAG CAA AGA CCC CAA CG-3'

SV40 polyA rev 5' -TTC AGG GGG AGG TGT GGG AGG-3'

## 2.1.2 Verwendete Kits und Fertiglösungen

### Northernblotting:

Strip-EZ PCR Kit (Ambion Inc., USA)

Human 12-Lane MTN Blot (Clontech, Heidelberg)

ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech, Heidelberg)

### Molekularbiologie:

Plasmid Miniprep Kit (Whatman Biometra)

QIAEX II (QIAGEN, Hilden)

QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden)

Big Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)

### Transfektion:

LipofectAMINE Plus System (Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenstein)

## 2.1.3 Verwendete cDNA Bank

Für die Klonierungsversuche wurde die  $\lambda$ -Phagen cDNA Bank  $\lambda$ -gt10 human Brain (Clontech) verwendet.

## 2.1.4 Lösungen

<b>5,7M CsCl</b>	95,96g	Cäsiumchlorid
	2,5ml	1M NaAc pH 5,0

ad 100ml H<sub>2</sub>O; DEPC behandeln; autoklavieren

<b>6x DNA loading</b>	10mM	EDTA
<b>Puffer</b>	15%	Ficoll 400 (w/v)
	~ 0,03%	Bromphenolblau
	~0,03%	Xylencyanol

<b>4M GCN</b>	47,26g	Guanidiniumthiocyanat
---------------	--------	-----------------------

## 2 Material und Methoden

---

2,5ml 1M NaCitrat  
ad 100ml H<sub>2</sub>O  
700µl beta-Mercaptoethanol  
In lichtgeschütztem Gefäß aufbewahren

**LB-Medium** 10g Bacto-Trypton  
5g Hefeextrakt  
10g NaCl  
ad 1l H<sub>2</sub>O; autoklavieren

**1M NaAc pH5,0** 8,2g Natriumacetat  
ad 100ml H<sub>2</sub>O  
pH Einstellung auf pH5,0 mit Eisessig  
DEPC behandeln; autoklavieren

**2M NaAc pH5,5** 16,4g Natriumacetat  
ad 100ml H<sub>2</sub>O  
pH Einstellung auf pH5,5 mit Eisessig  
DEPC behandeln; autoklavieren

**1M NaCitrat** 1M Natriumcitrat  
pH Einstellung auf pH 7,0 mit Zitronensäure  
DEPC behandeln; autoklavieren

**PBS** 8g NaCl  
0,2g KCl  
1,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 800ml H<sub>2</sub>O  
pH Einstellung auf pH 7,4 mit HCl  
ad 1l H<sub>2</sub>O; autoklavieren

## 2 Material und Methoden

---

<b>PCI</b>	25ml	Phenol
	24ml	Chloroform
	1ml	Isoamylalkohol
<b>RF-1-Puffer</b>	100mM	RbCl <sub>2</sub>
	50mM	MnCl <sub>2</sub>
	30mM	Kaliumacetat
	10mM	CaCl <sub>2</sub>
	15%	Glycerin
	pH Einstellung auf pH 5,8; sterilfiltrieren	
<b>RF-2-Puffer</b>	10mM	MOPS
	10mM	RbCl <sub>2</sub>
	75mM	CaCl <sub>2</sub>
	15%	Glycerin
	pH Einstellung auf pH 6,8; sterilfiltrieren	
<b>20x SSC</b>	3M	NaCl
	0,3M	Natriumzitat (pH 7,0)
	DEPC behandeln	
<b>TAE-Puffer</b>	ansetzen aus 50x TAE-Puffer; entspricht:	
	40mM	Tris Azetat
	1mM	EDTA
<b>50x TAE-Puffer</b>	242,00g	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
	57,10ml	Eisessig
	100,00ml	0,5 M EDTA, pH8,0 mit NaOH
	ad 1l H <sub>2</sub> O	
<b>10x Taq Puffer</b>	100mM	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
	500mM	KCl
	1%	Gelatine (w/v)



## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 RNA Präparation aus Rattenhirnen**

Die Präparation von RNA erfolgte mittels Ultrazentrifugation über ein Cäsiumchloridkissen. Während der Präparation diente Guanidiniumthiozyanat als chaotropes Salz zur Kontrolle der RNaseaktivität. Ansonsten wurde RNasefrei gearbeitet.

#### **2.2.1.1 RNasefreies Arbeiten**

Um die Zerstörung der RNA durch die ubiquitär vorhandenen, sehr resistenten RNasen zu verhindern wird RNasefrei gearbeitet. Ein häufiger Handschuhwechsel diente zur Prävention einer Verunreinigung durch die als Hauptkontaminationsquellen geltenden Hände. Wo industrieverpackte, RNasefreie Materialien und Einmalartikel nicht verwendet werden konnten, mussten die verwendeten Materialien und Geräte vor Verwendung RNasefrei gemacht werden: Die in Lösungen vorhandenen RNasen wurden durch Zugabe von 0,1% DEPC und anschließendes 4 bis 5 stündiges Rühren zerstört. Anschließendes Autoklavieren zersetzt dann das DEPC zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O. Glaswaren wurden durch mindestens vierstündiges backen bei 180°C RNasefrei gemacht. Plastikgeräte, die nicht so hoch erhitzt werden konnten, wurden für 30 Minuten in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gespült. Anschließendes Waschen mit DEPC-behandeltem Wasser diente zur Entfernung von restlichem Wasserstoffperoxyd.

#### **2.2.1.2 Präparation von total RNA**

Das frische Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrohren und dann bei -80°C gelagert. Für die Präparation wurden dann jeweils etwa 2g noch gefrorenes Gewebe mit einem Mörser zerstoßen, mit 20ml 4M GCN-Lösung in ein 50ml Falcon Tube gegeben und mit einem Ultra-Turrax zerkleinert. Das Röhrchen wurde 10 Minuten bei 12000g und 12°C zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Es wurden 1,8ml 20% Sarcosyl (entspricht einer Endkonzentration von 0,1 vol%) zugegeben und die Lysate 2 Minuten auf 65°C erhitzt und danach auf Eis gestellt.

Frische, autoklavierte SW40 Ultrazentrifugationsröhrchen wurden mit 4M GCN-Lösung ausgespült und über Kopf trocken gelassen. Dann wurden 3,5ml 5,7M CsCl Lösung vorgelegt, der CsCl-Spiegel mit einem Stift markiert und 7,5ml Lysat vorsichtig darauf pipettiert ohne die beiden Flüssigkeiten zu vermischen. Nach dem Austarieren erfolgte

die Zentrifugation für 20 Stunden bei 32000rpm unter Vakuum in einer Ultrazentrifuge.

Nach der Pelletierung der RNA wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, wobei an der Grenze zum Cäsiumchloridkissen die Pipettenspitze gewechselt wurde, um nicht RNasen aus dem Lysat zu verschleppen. Der letzte Rest der Lösung wurde dekantiert und das Röhrchen für 1 Stunde über Kopf trocknen gelassen. Mit einem heißen Skalpell wurde das Röhrchen dann knapp unter der Cäsiumchloridmerkung abgeschnitten. Dieser Schritt stellt sicher, dass später keine RNasen aus der oberen Phase resuspendiert werden. Das RNA-Pellet wurde in 1ml warmen DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine Extraktion von weiteren Kontaminationen mit PCI-Lösung. Dazu wurde 1ml PCI zugegeben, 10 Sekunden gevortext und 5 Minuten bei 5000rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein 10ml Greiner®-Röhrchen überführt. Die Phenolphase wurde erneut mit 1ml DEPC-Wasser extrahiert. Zur Fällung der 2ml wässrigen RNA-Lösung wurden 200µl 2M NaAc und 5,5ml 100% Ethanol zugegeben, die Lösung gevortext und über Nacht bei -20°C fällen gelassen.

Die Pelletierung der RNA-Präzipitate erfolgte durch Zentrifugation mit 10.000g bei 4°C für 30 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet für 15 Minuten über Kopf trocknen gelassen. Eventuelle Ethanolreste wurden durch 20 minütige Behandlung in einem Vacuum Concentrator (Bachofner Laborgeräte, Reutlingen) entfernt. Jedes Pellet wurde in 100µl DEPC-Wasser aufgenommen und 4 Pellets zu jeweils 400µl vereinigt. Durch weiteres Ausspülen der vier Röhrchen mit 100µl ergab sich schließlich eine Menge von 500µl RNA-Lösung. Es erfolgte eine weitere Fällung durch Zugabe von 50µl 2M NaAc und 1375µl 100% Ethanol. In dieser Lösung wurde die RNA bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

### **2.2.2 Polymerase Kettenreaktion**

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation und zur Mutation von DNA Fragmenten benutzt. Die PCR ist eine sehr vielseitige Methode und wurde in dieser Arbeit mehrfach eingesetzt.

Bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten zur anschließenden Klonierung wurde die *Pfu* DNA-Polymerase (Invitrogen) benutzt. Dabei wurde im allgemeinen der folgende Reaktionsansatz in einem Eisbad zusammenpipettiert: 5µl 10x *Pfu* Reaktionpuffer, 2U

## 2 Material und Methoden

*Pfu* DNA-Polymerase (beides von Promega), 0,4µl 25mM dNTPs, jeweils 2,5µl 10µM Forward- und Reverse-Primer, Template und Wasser zu einem Gesamtvolumen von 50µl. Die genauen Angaben, welche Starteroligonukleotide und welches Template bei den einzelnen Reaktionen benutzt wurden finden sich im Ergebnisse Teil der Arbeit.

Bei PCRs zur anschließenden Klonierung in den pGEM-Teasy Vektor oder bei analytischen PCR zum Screenen von Klonen wurde dagegen die *Taq* DNA-Polymerase verwendet. Für einen 50µl Ansatz wurden folgende Komponenten verwendet. 5µl 10x Taq Reaktionspuffer, 0,4µl *Taq* DNA-Polymerase (Promega), 1µl 50mM MgCl<sub>2</sub>, Primer und Template wie für einen Ansatz mit *Pfu* DNA-Polymerase.

Als Thermocycler wurde ein Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf) benutzt. Dieser bietet die Möglichkeit, die Reaktionskammer statt einer einzigen Temperatur mit einem Temperaturgradienten zu belegen. Dadurch können z.B. mit einem Programmablauf mehrere Annealingtemperaturen zugleich ausprobiert werden. Die Programmierung war wie folgt, wobei auch hier die genauen Angaben zur wechselnden Annealingtemperatur (hier kursiv) im Ergebnisse Teil aufgeführt sind:

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Gradient [°C]</i>	<i>Zeit [hh:mm:ss]</i>	<i>Zeitinkrement [s/Zyklus]</i>	<i>Schleife</i>
1	95		00:01:30		
2	95		00:00:30		10x
3	68	2	00:00:20		
4	72		00:02:00		
5	95		00:00:30		20x
6	68	2	00:00:20		
7	72		00:02:00	2	
8	72		00:05:00		
9	4		Bis Ende		

### 2.2.3 Polymerase Kettenreaktion mit reverser Transkription (RT-PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion mit reverser Transkription (RT-PCR) ist eine Abwandlung der PCR, die von RNA als Matrize ausgeht und mit einer reversen Transkription als erstem Schritt beginnt. Verwendet wurde das Titan ® One Tube RT-

## 2 Material und Methoden

PCR System (Boehringer Mannheim). Dieses System beruht auf einer Ein-Schritt RT-PCR Methode, bei der die Schritte der reversen Transkription und der DNA-Synthese nacheinander ohne zwischenzeitliche Zugabe von Reagenzien und damit ohne Öffnen des Reaktionsgefäßes durchgeführt werden können. Dazu wird ein Enzymmix aus AMV Reverser Transkriptase für die Erststrangsynthese und den DNA Polymerasen *Taq* und *Pwo* und ein optimierter Puffer eingesetzt.

Für einen 50µl Ansatz wurden folgende Reagenzien RNasefrei auch Eis zusammenpipettiert, wobei genaue Angaben zu Starteroligonukleotiden und Template im Ergebnis Teil zu finden sind:

<i>Reagenz</i>	
5x RT-PCR Puffer	10µl
Enzym-Mix	1µl
dNTPs 10mM	2µl
DTT 100mM	2,5µl
RNasin (10U/µl)	1µl
Total RNA	~1µg
DEPC H <sub>2</sub> O	ad 50µl

Der fertige Reaktionsansatz wurde dann in einen auf 50°C äquilibrierten Thermocycler, der nach folgendem Programm gesteuert wurde:

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeit [hh:mm:ss]</i>	<i>Zeitinkrement [s/Zyklus]</i>	<i>Schleife</i>
1	50	00:30:00		
2	95	00:02:00		
3	95	00:00:30		10x
4	50	00:00:20		
5	68	00:02:00		
6	95	00:00:30		25x
7	50	00:00:20		
8	68	00:02:00	5	
9	68	00:05:00		
10	4	Bis Ende		

### **2.2.4 Agarosegelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach der Größe wurde die Elektrophorese mit Agarosegelen verwendet. Je nach erwarteter Länge der DNA variierte die Gelstärke zwischen 0,5% und 4%. Bei Gelstärken größer als 2% wurde anstatt der gewöhnlichen low-melting Agarose Nu-Sieve Agarose (Sigma) benutzt.

Die der gewünschten Gelstärke entsprechende Menge an Agarose wurde mit TAE-Puffer versetzt und in einer Mikrowelle so lange gekocht bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Nachdem das heiße Gel 5 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt ist, wurde es mit Ethidiumbromid versetzt, (5µl einer 0.2 %igen (w/v) Ethidiumbromidlösung auf 50ml Gel) , in die Form gegossen und erstarren gelassen.

Als Laufpuffer zum Auffüllen der Elektrophoresekammer diente TAE-Puffer. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 6xDNA-loading-Puffer versetzt. Für die Auftrennung wurde eine feste Spannung von etwa 80V für 30 bis 60 Minuten angelegt.

Als Marker wurde für DNA-Fragmente bis etwa 1000bp der  $\Phi$ X-174-RF DNA-Hae III Digest (Pharmacia) verwendet. Für größere DNA-Fragmente wurde der Lambda DNA-HindIII/  $\Phi$ X-174 DNA-HaeIII Digest (Pharmacia) eingesetzt.

### **2.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Kits QIAEX II (QIAGEN) nach dem Protokoll der Hersteller. Das Prinzip dieses Kits beruht darauf, daß die DNA zuerst mit Hitze und Hochsalzpuffer, der chaotrope Salze enthält, aus der Agarose gelöst und an eine Silicamatrix gebunden wird. Nach einigen Waschschritten wird die DNA durch TE Puffer wieder von der Matrix eluiert.

### **2.2.6 Fällung von DNA**

Um DNA von Lösungen zu befreien oder um sie zu Konzentrieren wurde die Ethanolfällung benutzt. Hierbei wurde die Ausgangslösung mit dem doppelten Volumen reinem Ethanol und einem zehntel Volumen 3 molarem Natriumacetat versetzt und sorgfältig gemischt. Nachdem die DNA für 20 Minuten bei -20°C ausgefällt ist, wurde sie in einer Tischzentrifuge bei 1400rpm für 25 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Unter Umständen folgte noch ein Waschschriff mit 70% Ethanol. Die Zentrifugation erfolgte wie oben beschrieben.

### 2.2.7 Photometrische Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA und RNA-Konzentration einer Lösung und auch der Reinheit der Nukleinsäuren erfolgte über photometrische Messung der Absorption bei 260nm. Um genaue Messungen im UV-Bereich zu gewährleisten wurden entweder Quarzküvetten oder spezielle, UV-durchlässige Plastikkuvetten (UVetten®, Eppendorf) verwendet. Bestimmt wurden die Extinktionsdifferenzen bei 280nm und bei 260nm,  $\Delta E_{280nm}$  und  $\Delta E_{260nm}$ . Die Konzentrationen errechneten sich nach den Formeln: DNA-Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]=  $\Delta E_{260nm} \times 50$ , bzw. RNA-Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]=  $\Delta E_{260nm} \times 40$ . Die Reinheit der DNA wurde anhand des Quotienten  $\Delta E_{260nm}/\Delta E_{280nm}$  abgeschätzt, wobei ein Quotient kleiner als 1,8 auf eine Verunreinigung hindeutet.

### 2.2.8 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen diente zur Klonierung und zum Screenen von Vektoren nach Klonierung. In dieser Arbeit wurden die in der unten stehenden Tabelle aufgezählten Restriktionsendonukleasen benutzt, wobei jeweils noch der Hersteller, die Reaktionstemperatur und der empfohlene Puffer verwendet wurden. Die Restriktionsverdauungen wurden in 20 $\mu\text{l}$  wässriger Lösung durchgeführt, wobei 2Units Enzym zur Spaltung von 1 $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt wurden. Die Inkubationszeiten betragen bei 37°C 30 Minuten und bei 25°C 1 Stunde. BSA wurde, wenn erforderlich, zu einer Endkonzentration von 0,2mg/ml zugesetzt. Die Hitzeinaktivierung der Enzyme erfolgte durch Inkubation bei 65°C für 20 Minuten.

Die Enzyme und Puffer wurden von folgenden Firmen bezogen:

Boehringer-Mannheim GmbH: *EcoRI, EcoRV, XbaI, XhoI*, Puffer H

New England Biolabs: *AgeI, ApaI*, NEBuffer1, NEBuffer4

MBI Fermentas: *SacI, SmaI*, SacI Puffer, PufferY<sup>+</sup>/Tango

<i>Enzym</i>	<i>Erkennungssequenz</i>	<i>Puffer</i>	<i>Temperatur</i>
<i>AgeI</i>	A $\downarrow$ CCGGT	NEBuffer1	25°C
<i>ApaI</i>	GGGCC $\downarrow$ C	NEBuffer4 + BSA	25°C
<i>EcoRI</i>	G $\downarrow$ AATTC	Puffer H	37°C
<i>EcoRV</i>	GAT $\downarrow$ ATC	Puffer H	37°C

## 2 Material und Methoden

<i>Enzym</i>	<i>Erkennungssequenz</i>	<i>Puffer</i>	<i>Temperatur</i>
<i>SacI</i>	GAGCT↓C	SacI Puffer	37°C
<i>SmaI</i>	CCC↓GGG	Puffer Y+/Tango	37°C
<i>XbaI</i>	T↓CTAGA	PufferH	37°C
<i>XhoI</i>	C↓TCGAG	PufferH	37°C

Folgende sequentielle Doppelverdau wurden durchgeführt, wobei nach dem ersten Verdau das Enzym hitzeinaktiviert wurde:

<i>Enzyme</i>	<i>Puffer</i>	<i>Bemerkung</i>
<i>ApaI/XbaI</i>	NEBuffer4+ BSA	Erst 25°C, dann 37°C
<i>ApaI/XhoI</i>	1x/2xOnePhorAll	Zwischendurch Zugabe von Puffer
<i>SacI/AgeI</i>	SacI Puffer+ BSA	Erst 37°C, dann 25°C
<i>SmaI/XhoI</i>	1x/2x Y+/Tango	Zwischendurch Zugabe von Puffer

### 2.2.9 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA wurde für Klonierungen eingesetzt um die zu klonierenden DNA-Fragmente (Inserts) in den entsprechend geschnittenen Vektor einzubringen. Verwendet wurde in diese Arbeit die T4 Ligase mit dem T4 Ligase Puffer. Der Ligationsansatz wurde wie folgt zusammengesellt, wobei das Insert oder die Inserts in einem molaren Verhältnis von 3:1 zum Vektor eingesetzt wurden:

<i>Reagenz</i>	<i>Ligationsansatz [µl]</i>
Geschnittener Vektor (100ng)	X
Insert(s)	X
5xT <sub>4</sub> -Ligase Puffer	2
T <sub>4</sub> -Ligase	2
H <sub>2</sub> O	ad 10

Eine anschließende Inkubation erfolgte für 4 bis 6 Stunden bei 14°C bis 16°C.

### 2.2.10 Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von DNA wurden verschiedene Plasmide als Vektoren benutzt, die

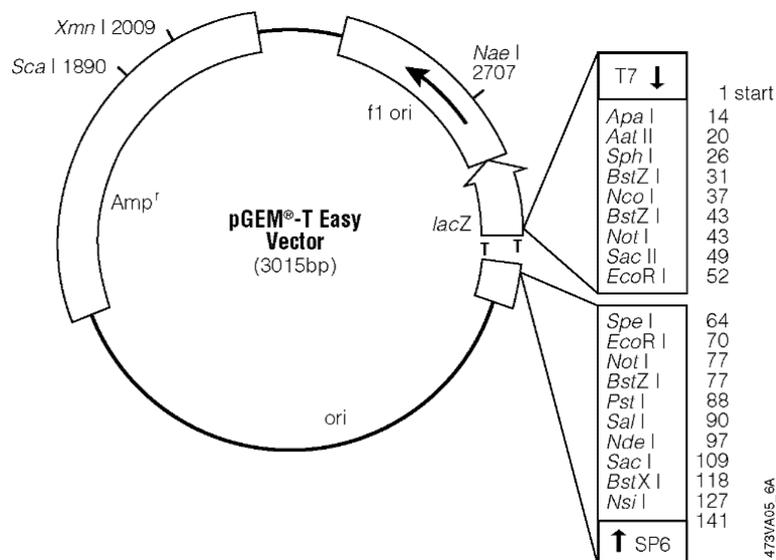
unterschiedlichen Zwecken dienen und teilweise auch unterschiedliche Klonierungsstrategien erforderten. Deshalb werden die Vektoren auch einzeln aufgeführt.

### 2.2.10.1 Klonierung in pGEM-T Easy®

Der Vektor pGEM-T Easy (Promega, Mannheim) ist ein Klonierungsvektor, der speziell zur schnellen Klonierung von PCR-Produkten entwickelt wurde. Bei diesem System wird ausgenutzt, dass einige DNA-Polymerasen, wie z.B. die *Taq*-Polymerase, dazu neigen, Adenosinreste an ihre PCR-Produkte anzuhängen. Der Vektor hat nun Thymidinreste überhängen, am die sich das überhängende Adenosin der PCR-Produkte binden kann. PGEM-T Easy besitzt ein Resistenzgen gegen Ampicillin und eignet sich wegen des *LacZ* Gens für das bewährte Blue-White-Screening. Die Ligation wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

Der Ligationsansatz wurde wie folgt erstellt, wobei bei *Taq*-PCR-Produkt in einem molaren Verhältnis von etwa 3:1 zum Vektor eingesetzt wurde:

<i>Reagenz</i>	<i>[µl]</i>
2x Rapid Ligation Buffer	5
pGEM-T Easy® (50ng/µl)	1
T4 DNA Ligase (3U/µl)	1
Taq-PCR-Produkt	s.o.
H <sub>2</sub> O	ad 10

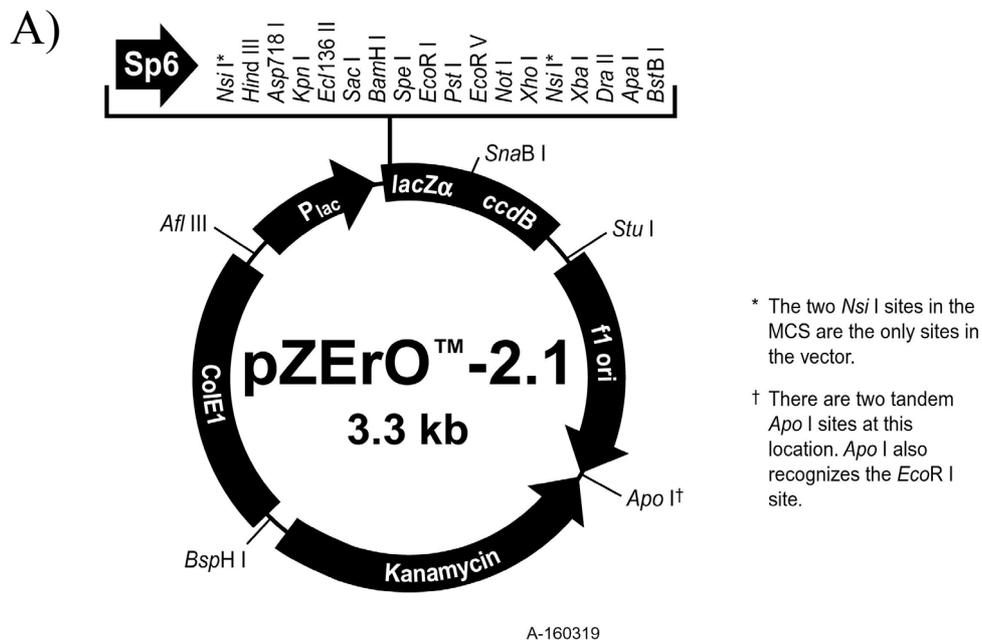


**Abbildung 1: Vektorkarte von pGEM-T Easy. (Quelle: Promega)**

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die nachfolgenden Schritte wie Transformation, ausplattieren und Screening der Klone auf einklonierte DNA-Fragmente erfolgte nach Standardprotokollen, wobei die analytischen Restriktionsverdau der Miniprepprodukte insofern vereinfacht ist, als daß die multiple cloning site Schnittstellen für Eco RI an beiden Seiten der Klonierungsstelle besitzt. Dadurch kann ein mögliches Insert in einem Verdau mit einem einzigen Enzym herausgeschnitten werden.

### 2.2.10.2 Klonierung in pZErO®

Der Klonierungsvektor pZErO®-2.1 (Invitrogen, Niederlande) ist entwickelt worden, um Klonierungen mit niedrigem Hintergrund durch negative Selektion von nicht rekombinierte Vektoren zu erreichen. Er eignet sich somit besonders zur sogenannten blunt-end Ligation. Das System basiert darauf, daß das für E. Coli Bakterien lethal wirkende *ccdB* Gen an den C-Terminus von LacZalpha fusioniert ist. Das *LacZalpha-ccdB* Gen steht unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren Lac Promotors. Insertion von DNA Fragmenten in die zwischen dem *LacZalpha* und dem *ccdB* Gen befindliche



**Abbildung 2: Vektorkarte von pZErO 2.1 (Quelle: Invitrogen)**

multiple cloning site verhindert die Expression eines funktionellen und damit lethal wirkenden Fusionsgenes und ermöglicht damit das Wachstum von rekombinanten Klonen. Der Vektor enthält weiterhin ein Kanamycinresistenzgen zur positiven Selektion von transformierten Bakterien.

### 2.2.10.3 Klonierung in die eukaroytischen Expressionsvektoren

#### pEGFP-N1 ® und pEYFP-C1 ®

Die beiden Vektoren pEGFP-N1 und pEYFP-C1 (beide: Clontech, Heidelberg) wurden zur Expression von EGFP und EYFP beziehungsweise deren Fusionskonstrukte mit Centaurin alpha 1 und - alpha 2 in eukaryotischen Zelllinien eingesetzt. Bei der Erstellung von Fusionskonstrukten muß bei der Klonierung notwendigerweise auf die Einhaltung des Leserasters geachtet werden.

Die beiden Vektoren unterscheiden sich, abgesehen von den Unterschieden zwischen EGFP und EYFP, vor allem in der Position der multiple cloning site. Der pEGFP-N1 Vektor ermöglicht die Einfügung einer cDNA in eine N-terminal vom EGFP gelegene multiple cloning site. In dem entstandenem Fusionskonstrukt befindet sich das EGFP also C-terminal von dem zu untersuchenden Protein. Während sich bei pEYFP-C1 die multiple cloning site C-terminal vom EYFP Gen befindet. Die Expression des Fusionskonstrukts befindet sich unter der Kontrolle eines CMV imediate early Promotors.

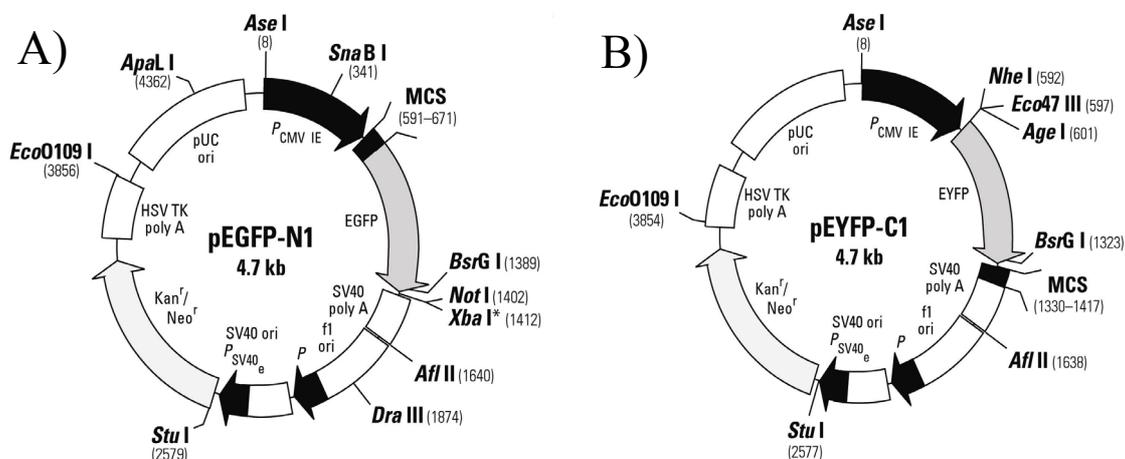


Abbildung 3: Vektorkarten (Quelle: Clontech) und multiple cloning sites der Plasmide pEGFP-N1 (A) und pEYFP-C1 (B)

Weiterhin enthält der Vektor ein Kanamycin/Neomycin Resistenzgen. Diesem sind sowohl ein prokaryotischer, als auch ein eukaryotischer Promotor vorgeschaltet. Dies ermöglicht in Bakterien die positive Selektion von Transformanten durch Zugabe von Kanamycin. In eukaryotischen Zellen ist hierdurch die Möglichkeit zur Selektion stabiler Transfektanten durch Neomycin gegeben.

### **2.2.11 Präparative Gewinnung von Plasmiden aus E. Coli**

Bei der präparativen Gewinnung von Plasmiden aus transfizierten E. Coli Bakterien wird je nach zu gewinnender Menge zwischen einer Miniprep (bis etwa 30µg DNA) und einer Maxiprep (bis etwa 500µg DNA) unterschieden. Beide Systeme basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und anschließender Aufreinigung der Plasmid-DNA über Silicamatrix.

#### **2.2.11.1 Miniprep**

Minipreps wurden mit dem Silica Spin Kit ® für Plasmid DNA Minipräparation von Whatman/ Biometra nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Die endgültige Elution der Plasmid-DNA von der Säule erfolgte in 50µ TE Puffer.

#### **2.2.11.2 Maxiprep**

Für Maxipreps wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) verwendet. Die Handhabung folgte den Empfehlungen des Handbuchs. Die Plasmid DNA wurde nach Eluation von der Säule gefällt und in 1,5ml TE Puffer aufgenommen.

### **2.2.12 DNA Sequenzierung**

Die Überprüfung von klonierten DNA Sequenzen erfolgte durch Sequenzierung mittels fluoreszenzmerkierter Didesoxynukleotide, in Anlehnung an die der Didesoxymethode nach Sanger. In dieser Arbeit wurden der Big Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) und der Puffer Half Term (Genpak) benutzt.

Für einen Reaktionsansatz von 20µl wurden 400ng Plasmid, 15pmol Starteroligonukleotid, 3µl Big Dye Terminator Mix und 5µl Half Term Puffer eingesetzt. Die genauen Angaben für die jeweiligen Ansätze sind im Ergebnisteil beschrieben.

Die Reaktion erfolgte im Eppendorf Mastercycler® bei folgendem Programm:

## 2 Material und Methoden

10s	96°C	25 Zyklen
5s	50°C	
4min	60°C	

Danach wurde der Ansatz durch Zugabe von 40µl reinem Ethanol und anschließender Zentrifugation bei 1400 rpm über 25 Minuten in einer Tischzentrifuge gefällt. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet an das Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (UKE) gegeben, wo dort die Gelelektrophorese und die Bestimmung der Sequenzen mit dem ABI-Sequenator 377 (Applied Biosystems) durchgeführt wurden.

### 2.2.13 Northernblotting

Die RNA-Blot Methode auch Northernblotting genannt, wurde in dieser Arbeit dazu benutzt, die Gewebeverteilung und die Länge von den mRNA-Molekülen des humanen Centaurin $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 zu bestimmen. Als Blot diente der humane Multiple Tissue Northern (MTN®) Blot der Firma Clontech. Auf diesem vorgefertigten Blot sind jeweils etwa 1µg bereits aufgetrennte poly A<sup>+</sup> aufgereinigte RNA aus 12 humanen Geweben (Gehirn, Herz, Skelettmuskel, Kolon (ohne Mukosa), Thymus, Milz, Niere, Leber, Dünndarm, Plazenta, Lunge und Leukozyten aus peripherem Blut) auf einer Nylonmembran fixiert.

#### 2.2.13.1 Erstellung der Sonden

Die Sonden für den Nachweis der Centaurin $\alpha$  mRNAs wurden mit dem Kit Strip-EZ PCR ® von der Firma Ambion hergestellt. Die von Ambion patentierte Strip-EZ ® Technologie beinhaltet den Einbau eines modifizierten Cytidins in die Sonde, das durch eine Substanz in dem mitgelieferten Probe Degradation Buffer gespalten werden kann. Hierdurch wird die hybridisierte Sonde in kleine Oligonukleotide degradiert, die sich schon bei Temperaturen um 68°C und damit viel schonender abwaschen ("stripen") lassen. So kann ein einmal erstellter Northernblot viele Male ohne Sensitivitätsverlust verwendet werden. Zur Markierung der Sonde wird radioaktiv markiertes [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]dATP verwendet.

Die Synthese der Sonden erfolgte durch PCR nach Angaben des Herstellers entweder als normale Amplifikation oder als asymmetrische Amplifikation. Bei letzterer wird der

## 2 Material und Methoden

Gegenstrangprimer in einem hundertfachen Überschuss zum Sinnstrangprimer benutzt. In der Reaktion wird dann vor allem einzelsträngige DNA gebildet. Dadurch wird die Sensitivität erhöht, weil die Hybridisierung der Sonde an die Ziel-RNA nicht durch die konkurrierende Hybridisierung mit dem Sinnstrang beeinträchtigt wird. Außerdem entfällt die Denaturierung der Sonde.

Die Reaktionen wurden nach untenstehenden Protokoll angesetzt. Dabei wurde als Positivkontrolle ein paralleler Ansatz ohne radioaktives Nukleotid genommen, der anschließend mit Gelelektrophorese überprüft wurde. Die Reaktion wurde über 35 Zyklen ausgeführt, die aus 3 Schritten bestanden: 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 20 Sekunden Annealing bei 60°C und 60 Sekunden Synthese bei 72°C.

<i>Reagenz</i>	<i>PCR</i>	<i>asym. Amplifikation</i>
10x PCR Puffer	2µl	2µl
10x dNTP Lösung	2µl	2µl
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP, 10mCi/ml	2µl	2µl
Gegenstrangprimer 10µM	2µl	2µl
Sinnstrangprimer 10µM	2µl	-
Sinnstrangprimer 0,1µM	-	2µl
Plasmid Template	~1ng	~1ng
Taq DNA-Polymerase	0,2µl	0,2µl
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,4µl	0,4µl
Wasser	ad 20µl	ad 20µl

Nach der Synthese wurden beide Reaktionsansätze gefällt, um die nicht eingebauten, radioaktiven Nukleotide zu entfernen. Dies geschah durch Zugabe von jeweils 2,2µl 5M NH<sub>4</sub>OAcetat und 45 µl Ethanol und einer anschließenden Inkubation bei -20°C für 15 Minuten. Danach wurde die DNA in einer Tischzentrifuge bei höchster Geschwindigkeit für 15 Minuten abzentrifugiert und in 50µl TE Puffer aufgenommen, nach dem der Überstand abpipettiert wurde.

### 2.2.13.2 Prähybridisierung und Hybridisierung des Blottes

Die Prähybridisierung, Hybridisierung und das Waschen des Blottes erfolgte im Wesentlichen den Empfehlungen der Firma Clontech.

Als Lösung zur Prähybridisierung und Hybridisierung diente ExpressHyb® (Clontech). Vor Gebrauch wurde die Lösung auf 68°C erwärmt und gerührt, um alle Präzipitate aufzulösen. Zur Prähybridisierung wurde der Blot 30min in 5ml ExpressHyb® bei 68°C im Hybridisierofen unter ständiger Bewegung äquilibriert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Blot vollständig befeuchtet war und sich keine Luftblasen unter ihm befanden.

Die eingefrorenen Sonden wurden in 50ml TE resuspendiert. Die Denaturierung der dsDNA-Sonde des HsCentaurin $\alpha$ 1 erfolgte bei 95°C für 5min und anschließender Kühlung auf Eis. Die ssDNA-Sonde des HsCentaurin $\alpha$ 2 brauchte nicht denaturiert zu werden.

Die so behandelten Sonden wurden in 5ml vorgewärmtes ExpressHyb® überführt und gründlich untergemischt. Das alte ExpressHyb® wurde gegen das neue, das die radioaktiv markierte Sonde enthielt, ausgetauscht und der Blot für 60 Minuten bei 68°C unter ständiger Bewegung inkubiert.

### **2.2.13.3 Waschungen des Blotts**

Danach erfolgten zwei Waschschriffe. Zuerst wurde der Blot 45 Minuten in einer Waschlösung aus 2x SSC und 0,05% SDS bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator gewaschen, wobei die Waschlösung alle 10 Minuten gewechselt wurde. Darauf folgte eine Waschung in 0,1x SSC und 0,1% SDS bei 50°C für 40 Minuten.

### **2.2.13.4 Exposition und Bildbearbeitung**

Der gewaschene Blot wurde in Folie eingeschweißt für 12h auf einem Storage Phosphor Screen® (Molecular Dynamics) exponiert und mit dem PhosphoImager SF® (Molecular Dynamics) abgelesen. Zur Auswertung wurde das Programm Image Quant (Molecular Dynamics) genutzt.

### **2.2.13.5 Entfernung der Sonden**

Die Entfernung der Sonden war aufgrund des Strip-EZ® Technologie einfach und schonend möglich. Dadurch dass der Blot ständig in Folie eingeschweißt war, blieb er immer feucht.

Die Degradation der Sonden erfolgte durch Inkubation im Degradationspuffer der durch

## 2 Material und Methoden

Zugabe von 100 µl 100x Probe Degradation Dilution Buffer und 50 µl 200x Probe Degradation Buffer (beide von Ambion) zu 10 ml RNasefreiem Wasser erstellt wurde. Dieser Puffer wurde bei Raumtemperatur zu dem Blot gegeben und dann für 10 Minuten bei 68°C inkubiert. Nach dieser Behandlung hat sich die Membran leicht orange verfärbt. Der Puffer wurde verworfen.

Zur Rekonstitution der Membran wurde der Blot 10 Minuten in einem Puffer aus 10ml Wasser, 50 µl 20% SDS und 100µl Blot Reconstitution Buffer (Ambion) bei 68 °C inkubiert. Nach diesem Schritt war die Membran wieder weiß. Der Blot wurde in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert. Eine erneute Exposition des gewaschenen Blots über 24 Stunden stellte eine Entfernung der Sonde sicher.

### 2.3 Mikrobiologische Methoden

#### 2.3.1 Erstellung von Medium und Agarplattem für die Bakterienkultur

Die Kultur von Bakterien, in diesem Fall E. Coli, wurde zum einem in flüssigem LB-Medium und zum anderen auf Agarplatten durchgeführt.

Das LB-Medium wurde nach dem im Materialenteil beschriebenen Rezept hergestellt und für die Amplifikation bestimmter Bakterienklone verwendet. Für Minipreps wurden Reagenzgläser mit jeweils 3ml und für Maxipreps Erlenmeyerkolben mit 250ml LB-Medium verwendet. Die Gefäße wurden steril verschlossen und autoklaviert.

Für die Herstellung von 10 Agarplatten wurden wurden 2g Bacto-Trypon, 1g Hefeextrakt und 3g Bacto-Agar eingewogen, auf 200ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und nach Zugabe von 0,5ml 4M NaCl in einer steril verschließbaren Glasflasche, in der sich ein Rührfisch befand, autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde die Agarmasse unter ständigem Rühren auf etwa 50°C abgekühlt. Dann wurden, je nach gewünschter Plattenart die in der untenstehenden Tabelle aufgelisteten Reagenzien zugegeben, erneut gerührt und der Agar auf Petrischalen verteilt.

<i>Verwendungszweck</i>	<i>Zugegebene Reagenzien pro 200ml</i>	<i>Endkonzentration</i>
pZErO	200µl Kanamycin (50mg/ml)	50µg/ml
	200µl 1M IPTG	1mM

## 2 Material und Methoden

<i>Verwendungszweck</i>	<i>Zugegebene Reagenzien</i> <i>pro 200ml</i>	<i>Endkonzentration</i>
Blue/white Screening	100µl Ampicillin (100mg/ml)	50µg/ml
	500µl X-GAL (24mg/ml)	6µg/ml
	50µl 1M IPTG	250µM

### 2.3.2 Erzeugung transformationskompetenter E. Coli

Um eine möglichst hohe Transformationsrate zu erreichen, wurde eine Methode mit Rubidiumchlorid gewählt. Als Bakterien für die Transformation wurde der E. Coli Stamm X1 Blue [Bullock et al, 1987] genommen.

Für die Präparation wurde von einer frischen XL1 Blue Kolonie eine Übernachtskultur in 3ml LB Medium (ohne Antibiotikum) angelegt. Hiervon wurden 500µl in einen Erlenmeyerkolben mit 50ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) überimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C bis zu einer Zelldichte von  $4-7 \times 10^7$  Zellen pro Milliliter, entsprechend einer  $OD_{600nm}$  von etwa 0,6, hochwachsen gelassen. Nach einer 15 Minuten dauernden Inkubation der Zellen auf Eis wurden die Zellen 15 Minuten bei 4°C und 2500rpm in einer Eppendorffzentrifuge pelletiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde vorsichtig in 16,7ml RF-1-Puffer (entsprechend einem Drittel des Ausgangsvolumen) resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (s.o.) und Verwerfung des Überstandes wurde das Pellet in 4ml RF-1-Puffer resuspendiert und nochmals 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Schließlich wurden hiervon Aliquots zu je 100µl abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

### 2.3.3 Transformation von E. Coli

Die Aliquots transformationskompetenter XL1 Blue wurden langsam auf Eis aufgetaut. Das Plasmid wurde vorsichtig hinzu pipettiert, der Ansatz durch Schnippen gemischt und für weitere 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Darauf folgte ein Hitzeschock für 60-90 Sekunden bei 42°C. Zur Expression der mit dem transformierten Plasmid vermittelten Resistenzgene wurden die Bakterien darauf in 1ml LB-Medium überführt

und für 1 Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Von diesem Ansatz wurden dann jeweils 200µl auf eine Agarplatte ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C wachsen gelassen.

### **2.4 Zellbiologische Methoden**

#### **2.4.1 Kultur von eukaryotischen Zellen**

In dieser Arbeit wurden verschiedene Zelllinien kultiviert um die in vivo Lokalisation des Centaurins zu testen. Da die Zelllinien teilweise unterschiedliche Materialien benötigten, werden sie auch getrennt behandelt. Allgemein wurde die Zellkultur unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 100%iger Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> gehalten.

##### **2.4.1.1 Trypsinierung von adhärennten Zellen**

Das Ablösen von adhärennt wachsenden Zellen, zum Beispiel zur Passagierung, wurde mit einer Trypsin/EDTA Lösung (Gibco) durchgeführt. Hierzu wurde das überstehende Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig zweimal mit warmen PBS gewaschen. Dann wurde gerade soviel Trypsin zugegeben, dass die Zellen knapp bedeckt waren, das entspricht etwa 1ml bei einer Kulturflasche mit 75cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche. Je nach Zelltyp folgte eine ein- bis fünfminütige Inkubation bei 37°C. Durch Klopfen an die Wand der Kulturflasche wurde die Ablösung der Zellen unterstützt. Schließlich wurde die fünffache Menge an supplementiertem Kulturmedium zugegeben und die Zellen noch einmal durch Auf- und Abpipettieren voneinander gelöst.

##### **2.4.1.2 Einfrieren von Zellen**

Zur Sicherung der Stammerhaltung wurden von den benutzten Zelllinien gelegentlich Aliquots eingefrohren. Hierzu wurde eine größere Menge an Zellen herangezüchtet (~1x10<sup>7</sup> Zellen), und adhärennte Zellen wurden danach abtrypsiniert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 400g, 4°C für 5 Minuten pellettiert und in mit 10% DMSO versetzten Kulturmedium resuspendiert, dass sich eine Konzentration von 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml ergab. Von dieser Suspension wurden 1ml Aliquots in vorgekühlteKryotubes

gefüllt und über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Danach wurden sie unter flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.4.1.3 Kultur von NT2 Zellen**

NT2 Zellen sind aus einem humanem Teratokarzinom isoliert worden [Andrews et al., 1984] und weisen die besondere Eigenschaft auf, dass sie unter Behandlung mit Retinsäure permanent in Neuronen differenzieren, so dass sie als neuronale Vorläuferzellen bezeichnet werden können [Andrews, P. W. 1984]. NT2 Zellen wachsen adhärent.

Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, high glucose), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), gehalten und alle 2 bis 3 Tage durch Trypsinierung in einem Verhältnis von 1:6 aufgesplittet. Die Zellen reagieren sehr sensibel auf lange Trypsinierung oder auf zu große Verdünnung, so dass hier Vorsicht geboten war.

### **2.4.1.4 Kultur von Jurkat T-Lymphozyten**

Jurkat T-Lymphozyten sind eine in Suspension wachsende Zelllinie. Sie wurden aus dem peripheren Blut eines 14jährigen leukämiekranken Jungen isoliert [Schneider et al. 1977]. Die Kultur erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin und 100 U/ml Penicillin. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen auf eine Dichte von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml verdünnt.

### **2.4.1.5 Kultur von PC12 Zellen**

PC12 Zellen stammen aus einem Phäochromozytom der Ratte und differenzieren unter NGF zu neuronalen Zellen [Greene u. Tischler 1976]. Sie wachsen in RPMI 1640 Medium, dem 10% Pferdeserum (HS), 5% fötales Kälberserum (FCS), 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin und 100 U/ml Penicillin zugesetzt wurden. Dreimal in der Woche wurden die Zellen passagiert, in dem die adhärennten Zellen abtrypsiniert und in einem Verhältnis von 1:3 aufgeteilt wurden.

### **2.4.1.6 Kultur von CHO Zellen**

Chinese hamster ovary (CHO) Zellen sind eine adhärent wachsende Zelllinie, die aus der Biopsie eines Hamsterovars isoliert wurden [Puck et al. 1958]. Die Kultur erfolgte in

DMEM mit 10% fötales Kälberserum (FCS), 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin. Die Zellen wurden zweimal in der Woche in einem Verhältnis von 1:6 aufgesplittet, nachdem sie durch Trypsin von der Unterlage gelöst wurden.

### **2.4.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen**

Es gibt verschiedene Methoden eukaryotische Zellen zu transfizieren, die je nach benutzter Zelllinie eine unterschiedliche Effizienz aufweisen. In dieser Arbeit wurde die Transfektion mit Kalziumphosphat, die Lipofektion und die Elektroporation verwendet. Die Transfektion von adhärennten Zellen wurde auf Chambered Cover Glas (Gibco BRL) durchgeführt, so dass die Zellen sich gut im Mikroskop beobachten ließen.

#### **2.4.2.1 Transfektion von NT2 und CHO Zellen mit Kalziumphosphat**

NT2 und CHO Zellen wurden mit der Kalziumphosphatmethode transfiziert. Am Vortag wurden die Zellen mit einer Dichte von  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät, so daß am Tag der Transfektion eine Konfluenz von etwa 80% vorlag. Zwei bis vier Stunden vor Beginn der Transfektion wurde noch einmal das Medium gewechselt.

Die folgenden Angaben gelten pro  $\text{cm}^2$  Kulturfläche, in Klammern verwendeten Mengen für eine Kammer (Fläche:  $4\text{cm}^2$ ) in einem Chambered Cover Glas mit zwei Kammern. Da stets mehrere Kammern zugleich transfiziert wurden, ergaben sich in gemeinsamen Ansätzen handlichere Mengen. Es wurden 500ng ( $2\mu\text{g}$ ) Plasmid DNA gefällt, in  $6\mu\text{l}$  ( $24\mu\text{l}$ ) destillierten Wasser resuspendiert und  $0,6\mu\text{l}$  ( $2,4\mu\text{l}$ )  $2,5\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  zugegeben. In ein Polystyrolröhrchen wurden  $6,6\mu\text{l}$  ( $26,4\mu\text{l}$ )  $2\times\text{HeBS}$  vorgelegt. Während mit einem PipettBoy und einer Pasteurpipette Blasen in das  $2\times\text{HeBS}$  gepustet wurden erfolgte die langsame Zugabe der Plasmid-DNA- Lösung. Sofort danach wurde der Ansatz für 5 Sekunden auf einem Whirlmix gemischt und anschließend 20 Minuten lang bei Raumtemperatur zum Fällen lassen inkubiert.

Das Präzipitat wurde mit einer Pipette gleichmäßig über die Zellen verteilt und diese dann für 6 Stunden im Brutschrank stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS von Präzipitat befreit, bevor sie dann wieder in ihr ursprüngliches Kulturmedium kamen. Die Auswertung fand am folgenden Tag statt.

#### **2.4.2.2 Transfektion von PC12 Zellen mit LipofectAMINE Plus®**

PC12 Zellen wurden mit dem LipofectAMINE Plus® System von Gibco, das auf der

liposomenvermittelten Einschleusung von DNA beruht, transfiziert. Am Tag vor der Transfektion erfolgte die Assaat der Zellen mit einer Dichte von  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ , entsprechend  $2 \times 10^4$  Zellen pro Kammer bei einem Chambered Cover Glas mit 8 Kammern. Kurz vor der Transfektion wurden die Kammern mit PBS gewaschen, und die Zellen mit serumfreiem OptiMEM® Medium (Gibco) bedeckt ( $120 \mu\text{l}$  pro  $\text{cm}^2$ ).

Alle folgenden Mengenangaben sind auf  $1 \text{ cm}^2$  Kulturfläche normiert, in Klammer stehen die benutzten Mengen für eine Kammer eines achtkammerigen Chambered Cover Glas. In ein erstes Polystyrolröhrchen wurden  $12 \mu\text{l}$  ( $10 \mu\text{l}$ ) OptiMEM,  $120 \text{ng}$  ( $100 \text{ng}$ ) des zu transfizierenden Plasmids und  $0,4 \mu\text{l}$  ( $0,3 \mu\text{l}$ ) Plus-Reagenz® gegeben. Der Ansatz wurde 1 Sekunde lang gevortext und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

In ein zweites Polystyrolröhrchen kamen  $12 \mu\text{l}$  ( $10 \mu\text{l}$ ) OptiMEM und  $1,2 \mu\text{l}$  ( $1 \mu\text{l}$ ) LipofectAMINE® Reagenz. Dieser Ansatz wurde auch gemischt und zu dem Ansatz im ersten Röhrchen gegeben. Es folgten eine Mischung der Ansätze durch Vortexen und 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Das Transfektionsgemisch wurde nun auf die Zellen geträufelt und diese im Brutschrank inkubiert. Nach 5 Stunden wurden die Zellen noch zweimal mit PBS gewaschen bevor sie wieder in Vollmedium, d.h. mit Serum versetzten Medium gehalten wurden. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag.

### **2.4.2.3 Elektroporation von Jurkat T-Lymphozyten**

Bei Jurkat T-Lymphozyten wurde die Elektroporation eingesetzt. Dafür wurde der Gene Pulser® Transfection Apparatus und der Capacitance Extender (beide:Bio Rad Laboratories) benutzt.

Hierzu wurden  $2 \times 10^7$  Zellen in  $200 \mu\text{l}$  Medium suspendiert und  $25 \mu\text{g}$  des jeweiligen Plasmids zugegeben. Die Elektroporation wurde durch einen Puls von  $200 \text{V}$  und  $960 \mu\text{F}$  durchgeführt. Die elektroportierten Zellen wurden darauf noch 20 Minuten bei Raumtemperatur in der Küvette belassen, bevor sie das in  $10 \text{ml}$  Kulturmedium überführt wurden. Die mikroskopische Auswertung fand am folgenden Tag statt.

### **2.4.3 Stimulation von PC12 Zellen mit EGF**

Die Stimulationsversuche wurden wie alle anderen Mikroskopischen Untersuchungen am Tag nach der Transfektion durchgeführt. Vor jeder Messung sollte entschieden werden, ob nur eine Stimulation mit EGF (Endkonzentration  $20 \text{nM}$ ) oder eine

Stimulation unter Hemmung durch Wortmannin (Endkonzentration 100nM) durchgeführt werden soll. Die Beschreibungen gelten im folgenden für Chambered Cover Glasses mit 8 Kammern.

Das überstehende Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 2 Stunden in RPMI Medium ohne Serumzusätze (=Hungermedium) belassen. Danach wurden die Zellen erneut in PBS gewaschen und in 150 $\mu$ l PBS für reine Stimulationsversuche oder in 140 $\mu$ l PBS für Stimulationshemmversuche belassen. Für die Hemmversuche erfolgte nun eine Zugabe von 10 $\mu$ l 2 $\mu$ M Wortmannin (Endkonzentration: 100nM) und eine anschließende Inkubation für 10 Minuten unter Wortmannin. Unter dem Mikroskop wurde nun eine geeignete Zelle ausgesucht. Direkt nach Zugabe von 50 $\mu$ l 80nM EGF (Endkonzentration:20nM) wurde das Messprogramm (siehe Teil: Mikroskopische Methoden) gestartet.

### **2.5 Mikroskopische Methoden**

Die transfizierten Zellen wurden durch quasikonfokale Mikroskopie untersucht. Im Gegensatz zu konfokaler Lasermikroskopie, bei der die Schnittbilder direkt gebildet werden, wird bei dieser Technik das einzelne Schnittbild mit einer Software aus Bildern darüber und darunter liegender Fokusebenen errechnet.

Die Mikroskopie wurde an einen Laica DM IRBE® Fluoreszenzmikroskop mit Monochromator durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer Hamamatsu C4742-98 CCD Kamera gemacht und mit dem Softwarepaket Openlab 2.1.3 (Improvision) ausgewertet. Mit dieser Software lässt sich auch das Mikroskop, hier insbesondere die Fokusebene, die Kamera und der Monochromator ansteuern. Für die Fluoreszenzbilder mit EYFP wurde der GFP-Filter benutzt und die Exzitationswellenlänge wurde auf 485nm gesetzt.

Pro Zelle wurden zu einem Zeitpunkt etwa jeweils 20 bis 30 Bilder in einem Abstand der horizontalen Fokusebenen von je 0,5 $\mu$ m. Aus diesem Bildersatz wurden die konfokalen Schnittbilder durch die Confocal Imaging Funktion von Openlab 2.1.3 errechnet. Dabei wurden jeweils die zwei nach oben und unten folgenden Bilder mit einberechnet (nearest two neighbours), und die Funktion Haze Removal wurde auf 50% bis 60% gesetzt. Da die eingesetzte CCD Kamera nur Helligkeitsunterschiede erkennen kann, erscheinen die Bilder auf dem Computer in Grautönen. Der Anschaulichkeit halber sind die Bilder aber nachkoloriert in der Farbe, wie sie für das menschliche Auge durch den GFP-Filter erscheinen.

Die Aufnahmen von Zeitverläufen wurde die Programmierungsfunktion von Openlab genutzt. Dabei wurde zu den eingegebenen Zeitpunkten bis zu einer Stunde Bildsätze von jeweils 7 Bilder gemacht.

### **2.6 Computerbasierte Methoden**

Computerbasierte Datenbanksuche spielte bei der Klonierung der humanen Centaurine eine wichtige Rolle. Benutzt wurde das Programm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) auf des über den Server des National Center for Biological Information (NCBI) über die Internetadresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> zugegriffen wurde [Altschul et al. 1990]. Als Suchfunktion wurde tblastn gewählt. Bei dieser Funktion wird eine eingegebene Aminosäuresequenz gegen in den Datenbanken vorhandene Nukleinsäuresequenzen, die dazu in alle sechs möglichen Leseraster übersetzt werden, verglichen und in einem Alignment gegenübergestellt.

Durchsucht wurden humane EST Datenbanken. Expressed sequence tags (ESTs) sind kurze cDNA Sequenzen die von verschiedenen Labors durch randomisierte partielle DNA Sequenzierung gewonnen und in die Datenbank eingegeben wurden [Adams et al. 1991]. Das EST-Projekt dient vor allem der Identifizierung von exprimierten Genen [Boguski 1995].

### 3 Ergebnisse

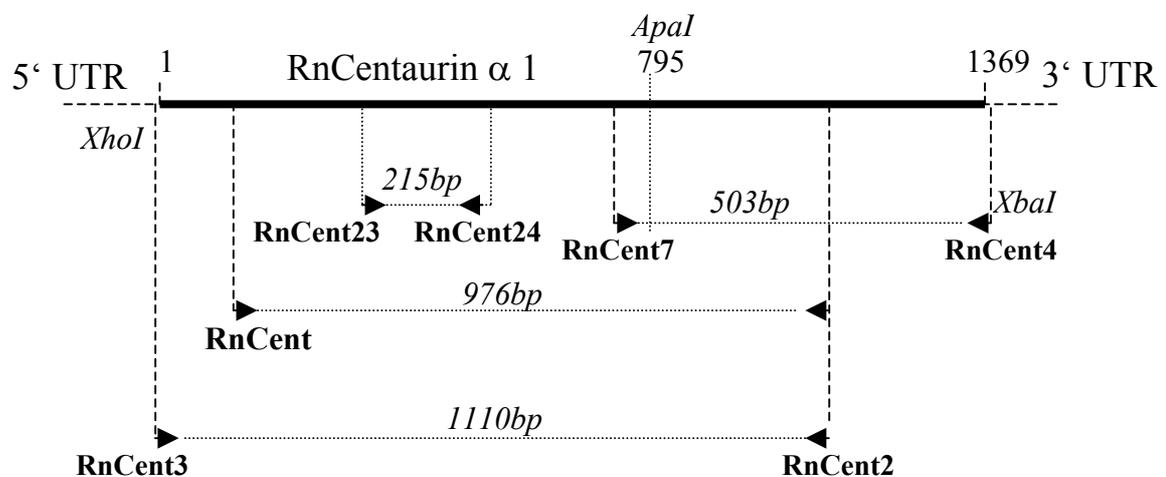
#### 3.1 Klonierung des Centaurin $\alpha$ 1b der Ratte

Eine erneute Klonierung des Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte erfolgte zur Aufklärung der auffälligen Sequenzunterschiede zwischen dem Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte und dem des Schweins (p42<sup>IP4</sup>) und des Rinds (PIP3BP). Das Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte unterscheidet sich wie bereits erwähnt in zwei Sequenzabschnitten von dem des Hausschweins und dem des Rinds, während die restliche Sequenz deutlich stärkere Homologien aufweist.

Der erste Versuch zielte auf eine Bestätigung der publizierten Sequenz des Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte [Hammonds-Odie et al., 1996]. Als Methode für die Klonierung wurde die RT-PCR gewählt. Für die Auswahl von Primern diente die bereits veröffentlichte cDNA Sequenz des Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte als Grundlage. Abbildung 2.1 zeigt schematisch die Lage der verwendeten Primer. Das Primerpaar RnCent3 und RnCent4 wurde so gewählt, dass es den kompletten kodierenden Bereich umfasst.

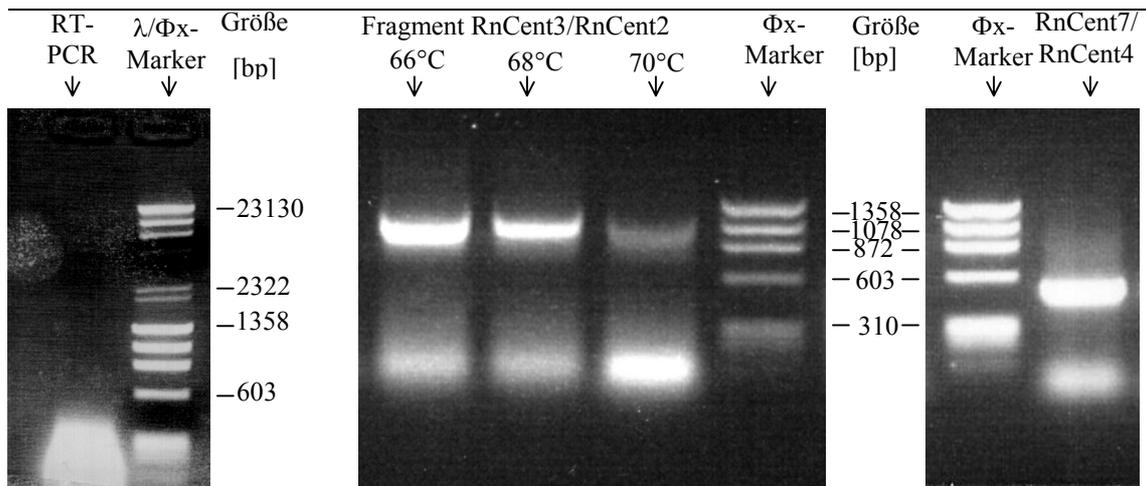
Die für diesen Versuch benötigte RNA wurde für diesen Versuch wie im Methodenteil beschrieben mittels Ultrazentrifugation über ein Cäsiumchloridkissen gewonnen. Für die Präparation wurde ein halbes Großhirn einer adulten Ratte (500mg) eingesetzt. Die Gesamtmenge der erhaltenen gesamt RNA betrug photometrisch bestimmt 33 $\mu$ g.

Eine erste RT-PCR mit den Primern RnCent3 und RnCent4 zur Amplifikation der Vollängen cDNA war nicht erfolgreich. Ebenso erbrachten weitere



**Abbildung 3.1: Lage und Ausrichtung (durch Pfeil dargestellt) der Primer an der cDNA des Centaurins  $\alpha$ 1 der Ratte.**

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.2: Klonierung des Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte. Ganz links: RT-PCR mit einer RNA Präparation aus Rattenhirn als Template und RnCent3 und RnCent4 als Primer. Es ist kein Amplifikat sichtbar. Mitte und links: Ergebnis der PCRs zur Amplifikation der Fragmente RnCentaurin32 (Primer RnCent3/RnCent2, erwartete Größe: 1110bp) und RnCentaurin74 (Primer RnCent7/RnCent4, erwartete Größe: 503bp). Als Template diente in beiden Fällen 1 $\mu$ l der RT-PCR aus 1)**

Reamplifikationsversuche mit den gleichen Primern kein Amplifikat, so dass eine andere Klonierungsstrategie verwendet wurde: Die cDNA wurde aus zwei Teilstücken zusammengesetzt, die über die Primerpaare RnCent3/RnCent2 und RnCent7/RnCent4 amplifiziert wurden und RnCentaurin32 und RnCentaurin74 heißen. Die beiden Teilstücke können dann über eine im Gen gelegene *ApaI*-Schnittstelle ligiert werden. Abbildung 2.1 zeigt schematisch die Position und Orientierung der bei der Klonierung verwendeten Primer.

Das Fragment RnCentaurin32 wurde in einer PCR mit *Taq* DNA-Polymerase gewonnen. Als Template diente 1 $\mu$ l des direkten RT-PCR-Produktes der oben erwähnten RT-PCR. Die Annealingtemperatur wurde mit einem Gradienten so eingestellt, dass sich für die einzelnen Reaktionen Temperaturen von 66°C, 68°C und 70°C ergaben. Die PCR ergab eine Bande in der erwarteten Größe von etwa 1110bp.

Die Bande wurde aus dem Gel extrahiert, in pGEM-T Easy ligiert und anschließend transformiert. Am nächsten Tag zeigten sich mehrere weiße Kolonien, von denen fünf für eine Miniprep ausgewählt wurden. Die Miniprepprodukte wurden für einen analytischen Verdau mit *EcoRI* inkubiert und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Das Plasmid pGEM-T Easy besitzt an beiden Seiten der Klonierungsstelle eine *EcoRI*-Erkennungssequenz, so dass mit einem einfachen Verdau das Insert aus dem Vektor

### 3 Ergebnisse

---

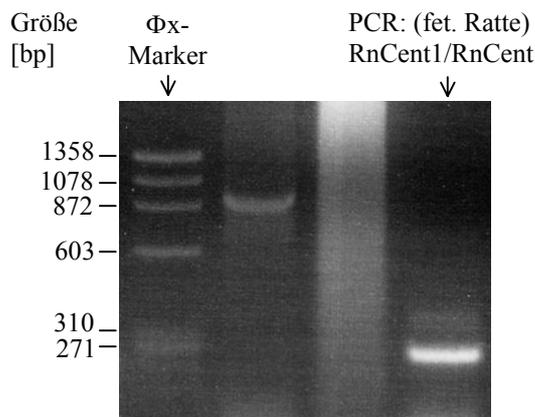
herausgeschnitten werden kann. Da RnCentaurin auch eine *EcoRI*-Schnittstelle besitzt, wurden drei Fragmente der Längen 71bp, 758bp und 2999bp erwartet. Diese wurden in der Gelelektrophorese gesehen, so dass alle fünf Klone als positiv angesehen wurden. Die zusätzlichen Banden von 1129bp und 4128bp in den Bahnen 2,3 und 5 kommen durch einen unvollständigen Verdau zustande.

Das Fragment RnCentaurin74 wurde mit einer PCR-Reaktion unter Benutzung von *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Als Template wurde wiederum 1µl des RT-PCR Produktes eingesetzt, die Starteroligonukleotide waren RnCent7 und RnCent4, und die Annealingtemperatur wurde auf 65°C gesetzt. Die PCR ergab ein Fragment in der gewünschten Größe. Die Bande wurde aus dem Gel extrahiert und für die Klonierung mit den Restriktionsenzymen *ApaI* und *XhoI* verdaut. Als Vektor wurde das Plasmid pZErO gewählt und ebenso mit *ApaI* und *XhoI* geschnitten. Zur Abtrennung der nicht weiter benötigten DNA-Fragmente, wurden die Restriktionsansätze über ein Agarosegel aufgetrennt und die beiden gewünschten Fragmente extrahiert. Die Ligation erfolgte bei 16°C für fünf Stunden. Nach der Transformation zeigten sich 3 Kolonien, die alle im analytischen Verdau der Minipreprodukte ein Insert der richtigen Größe aufwiesen.

Zur Erstellung der volllängigen cDNA des Centaurins der Ratte wurde eine Dreifragmentligation durchgeführt. Als Vektor für die Klonierung wurde pZErO gewählt und in einem Doppelrestriktionsverdau mit *XhoI* und *XbaI* geschnitten. Das in den pGEM-T Easy Vektor klonierte Fragment RnCentaurin32 wurde mit dem Restriktionsenzymen *XhoI* und *ApaI* und das in pZErO klonierte Fragment RnCentaurin74 mit *ApaI* und *XbaI* herausgeschnitten. Die drei Restriktionsverdau wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die weiter verwendenden Fragmente wurden extrahiert und anschließend in einer Dreifragmentligation für fünf Stunden bei 16°C ligiert und transformiert. Die Transformation lieferte vier Kolonien, die alle nach analytischem Restriktionsverdau der Minipreprodukte mit *XbaI* und *XhoI* ein Insert von erwarteter Größe zeigten. Eine Sequenzierung ergab, dass das Centaurin-alpha1 der Ratte vollständig und korrekt einkloniert war.

### 3 Ergebnisse

Wie bereits erwähnt, war die primäre RT-PCR zur Amplifikation des Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte erfolglos und die Klonierung erfolgte schließlich durch Reamplifikations PCRs aus dem RT-PCR Produkt. Neben den oben beschriebenen Reaktionen, die letztendlich zur erfolgreichen Klonierung führten, wurden auch Amplifikationen mit anderen Primerpaaren ausprobiert, um ein Amplifikat zu erhalten. Mit dem Primerpaar RnCent1 und RnCent2 wurde auf diese Weise ein 271bp großen DNA-Fragment amplifiziert.. Dieses war 706bp kleiner als die eigentlich erwartete Größe von 976bp. Es konnte in pZErO kloniert.



**Abbildung 3.3: Amplifikation der putativen Spleißvariante. Die erwartete Größe für das PCR-Produkt mit den Primern RnCent1 und RnCent3 in Bahn 3 ist 976bp. Stattdessen findet sich nur eine Bande mit einer Größe von 261bp.**

Eine Sequenzierung ergab, dass es sich bei dem verkürzten Fragment um Centaurin $\alpha$ 1 handelt. Die Verkürzung kommt durch eine einzige Deletion von 706bp zustande. Abgesehen von der Deletion ist die Sequenz vollständig identisch zu der kompletten cDNA des Centaurin $\alpha$ 1. Dargestellt ist diese verkürzte Sequenz in Abbildung 3.4 als eine blaue Leiste unter der vollständigen cDNA-Sequenz.

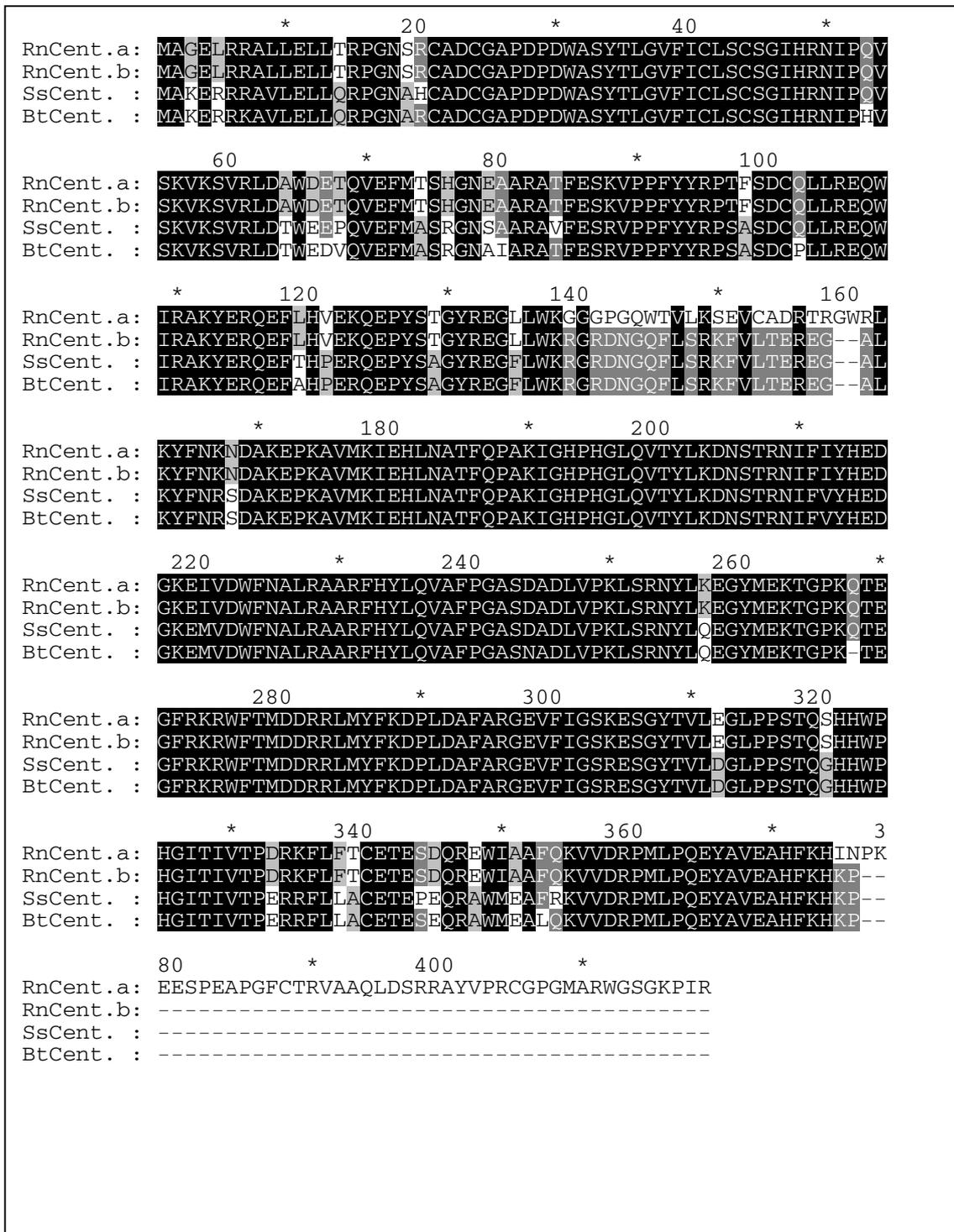
### 3 Ergebnisse

cDNA Sequenz Centaurin $\alpha$ 1b:	
0:	ATGGCCGGGGAGCTGCGCCGGGCGCTGCTGGAGCTGCTGACGCGTCCGGG : 50
51:	GA <del>ACTCGCGCTGCGCTGACTGCGGAGCCCCGGATCCTGACTGGGCGTCCT</del> : 100
101:	ACACCCTGGGTGTGTTTCATCTGTTT <del>GAGCTGCTCTGGGATCCACCGAAC</del> : 150
151:	<del>ATCCCCCAGGTCAGCAAGGTGAAGTCAGTTCGTCTGGATGCCTGGGATGA</del> : 200
201:	<del>GACCCAAGTTGAGTTCATGACATCTCATGGGAACGAGGCTGCCAGAGCCA</del> : 250
251:	<del>CATTTGAGTCCAAAGTACCACCCTTCTACTACCGGCCACGTTCTCCGAC</del> : 300
301:	<del>TGCCAACTCCTACGTGAGCAGTGGATCCGTGCCAAGTATGAGAGGCAAGA</del> : 350
351:	<del>ATTCCTTCATGTGGAGAAACAGGAACCGTACTCTACAGGATACCGTGAGG</del> : 400
401:	<del>GCCTTCTCTGGAAGCGTGGCCGGGACAACGGACAGTTCTTAAGTCGGAAG</del> : 450
451:	<del>TTTGTGCTGACAGAACGAGAGGGTGCCTCTGAAATACTTCAACAAAATGA</del> : 500
501:	<del>CGCTAAGGAGCCTAAGGCTGTCATGAAGATTGAGCACCTGAATGCCACCT</del> : 550
551:	<del>TCCAGCCAGCCAAGATCGGCCACCCCATGGCCTGCAGGTCACCTACTTG</del> : 600
601:	<del>AAGGACAACAGCACTCGCAACATCTTTATCTACCACGAGGATGGCAAGGA</del> : 650
651:	<del>GATCGTGGACTGGTTCAATGCGCTGCGAGCAGCCCGCTTCCACTACCTGC</del> : 700
701:	<del>AGGTGGCTTTCCAGGAGCCAGTGACGCAGATCTGGTGCCCAAGCTCTCT</del> : 750
751:	<del>AGGAACTACCTGAAGGAAGGCTACATGGAGAAGACAGGGCCCAAGCAGAC</del> : 800
801:	<del>AGAAGGCTTTCGGAAGCGCTGGTTCACCATGGACGACCGGAGGCTCATGT</del> : 850
851:	<del>ACTTCAAAGACCCTCTGGATGCCTTTGCCCGAGGGGAAGTCTTCATTGGC</del> : 900
901:	<del>AGCAAGGAAAGTGGTTACACGGTCTGGAGGGCTCCCACCGTCAACCCA</del> : 950
951:	<del>GAGTCACCACTGGCCCCATGGCATCACCATTTGTCACCCCTGACCGAAAAT</del> :1000
1001:	<del>TCCTGTTACAGTGTGAGACAGAGTCAGACCAGAGGGAGTGGATAGCAGCC</del> :1050
1051:	<del>TTCCAGAAGGTGGTGGACAGGCCCATGCTGCCTCAGGAGTACGCAGTGGA</del> :1100
1101:	<del>AGCCCACTTCAAGCATAAACCCTAAGGAAGAGAGCCCGGAGGCCCCAGGA</del> :1150
1151:	<del>TTCTGCACCTCGTGTGGCGGCGCTGGACAGCAGGAGAGCCTCTGTTCCCTCG</del> :1200
1201:	<del>GTGTGGCCCAGGCATGGCCAGGTGGGGCTCAGGCAAGCCCATCAGATAG</del> :1249

**Abbildung 3.4: codierende Sequenz des Centaurin $\alpha$ 1b der Ratte. Darunter durch farbige Striche die verkürzten Sequenzen dargestellt, wenn gegen der vollständige Sequenz aufgetragen werden. Die rote Sequenz wurde auf adultem und die grüne und die blauen aus fetalem Gewebe isoliert. Die unvollständigen 3'- bzw. 5'-Enden entsprechen der Position der Primer. Auffällig sind die Deletionen mitten in der Sequenz. Weitere Erläuterung im Text.**

### 3.1.1.1 Vergleich der verschiedene cDNA-Sequenzen

Ein Vergleich der von mir gewonnen cDNA Sequenz mit der publizierten Form ergab einige bedeutsame Unterschiede. Im folgenden ist dann auch die von mir klonierte Form

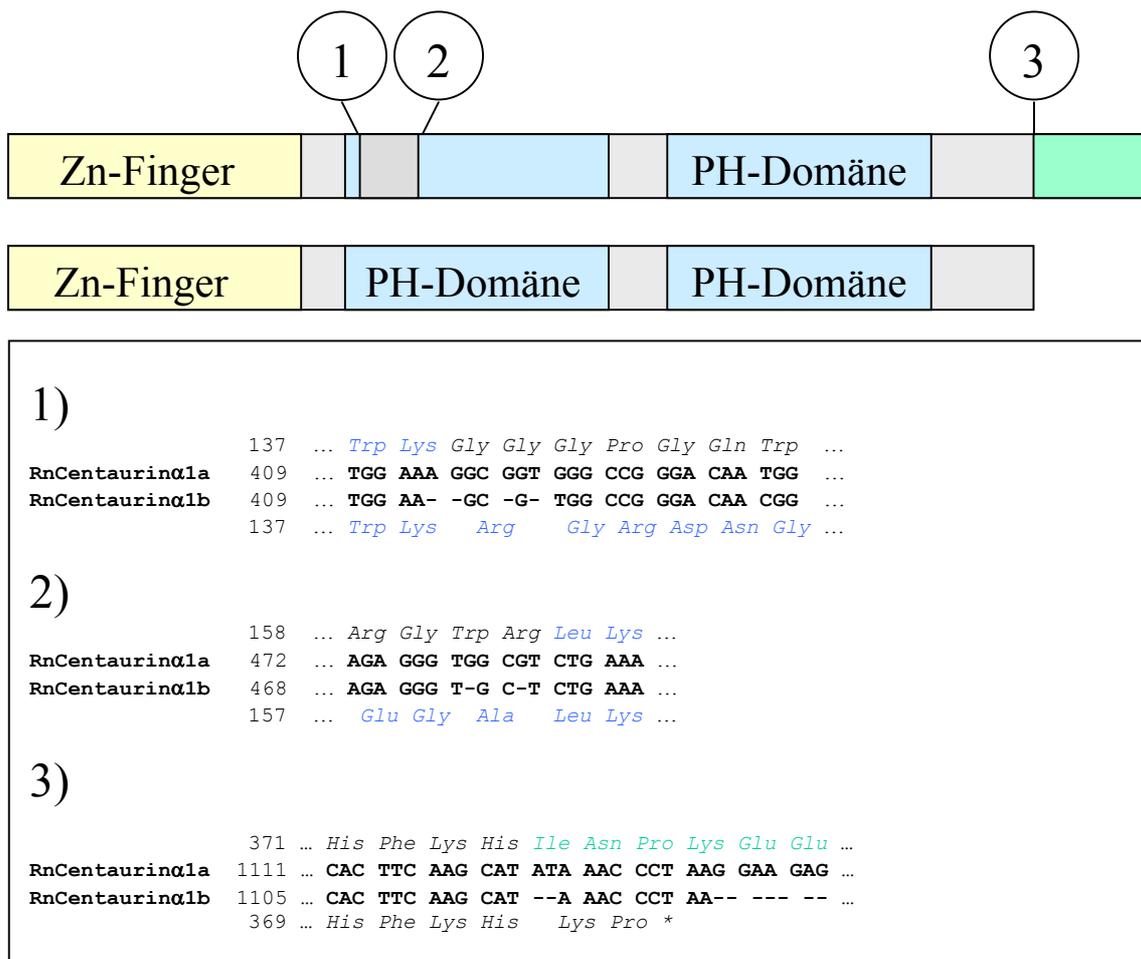


**Abbildung 3.5:** Vergleich der Aminosäuresequenzen des ursprünglich veröffentlichten Centaurin $\alpha$ 1a der Ratte (RnCent.a) mit dem von mir klonierten Centaurin $\alpha$ 1b (RnCent.b) und den Centaurinen des Hausschweins (SsCent.) und des Rinds (BtCent.).

### 3 Ergebnisse

als RnCentauring $\alpha$ 1b bezeichnet und der ursprünglich publizierten cDNA, genannt RnCentauring $\alpha$ 1a gegenübergestellt. Außerdem seien hier die Unterschiede des zuerst publizierten RnCentauring $\alpha$ 1a gegenüber des später klonierten RnCentauring $\alpha$ 1b dargestellt und nicht umgekehrt. Dies erfolgt aus Gründen der besseren Darstellung.

Das RnCentauring $\alpha$ 1a weist dem RnCentauring $\alpha$ 1b gegenüber 11 Insertionen auf, die in vier Gruppen angeordnet auftreten: In der ersten Gruppe, die sich am Anfang der N-terminalen PH-Domäne befindet, sorgen 4 Insertionen für eine Verschiebung im



**Abbildung 3.6 : Gegenüberstellung der Unterschiede zwischen der ursprünglich publizierten Sequenz der Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte (RnCentauring $\alpha$ 1a) und der von mir klonierten (RnCentauring $\alpha$ 1b). Bei Punkt 1) in der ersten PH-Domäne erfolgte beim Centaurin $\alpha$ 1a durch die Insertion von vier Basen eine Verschiebung des Leserasters, wodurch die PH-Domäne nicht mehr als solche abgelesen werden kann. Bei Punkt 2), etwa 60 Basen weiter 3'-wärts, kommt es durch die Insertion von zwei weiteren Basen wieder zu einer Rückverschiebung des Leserasters und die Proteinsequenzen gleichen sich wieder bis es bei Punkt 3) kurz vor dem Stopcodon wiederum durch einer Insertion von zwei Basen zu einem erneuten Sprung in ein anderes Leseraster kommt. So entsteht dieser verlängerte C-Terminus.**

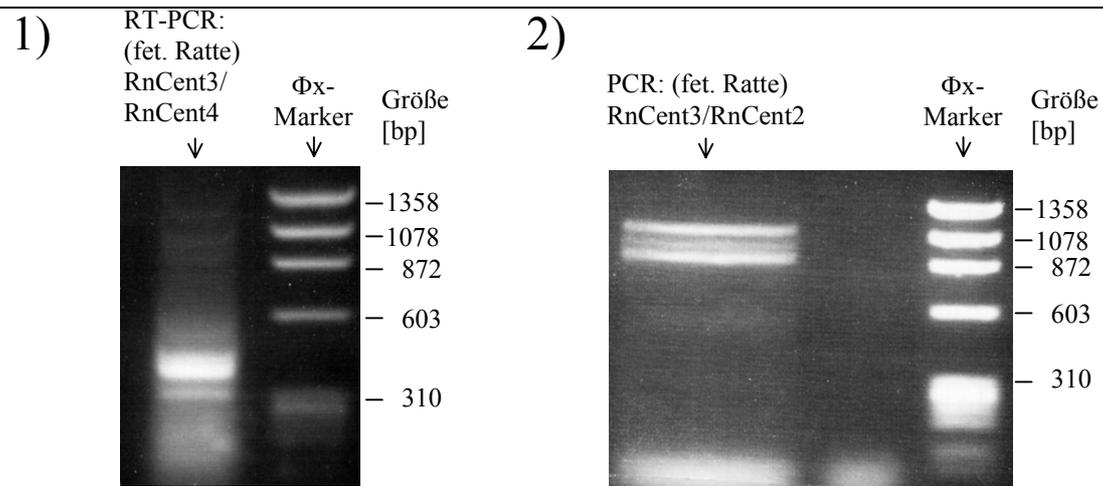
Leseraster, so dass ab Aminosäure 139 eine andere Sequenz entsteht. In einer zweiten Gruppe folgen etwa 75 Basenpaare 3'-wärts zwei weitere Insertionen die ein Zurückspringen in das alte Leseraster bewirken, so dass sich ab Aminosäure 162 die beiden Proteine wieder gleichen. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, besitzt das RnCentaurin $\alpha$ 1a im Gegensatz zu den Centaurinen der Hausschweins und des Rinds keine N-terminale PH-Domäne. Das RnCentaurin $\alpha$ 1b dagegen hat eine und gleicht damit den Formen der anderen Spezies.

Eine Dritte Gruppe kurz vor dem Stopkodon mit zwei Insertionen bewirkt, wieder durch eine Verschiebung des Leserasters, dass ein weiter stromabwärts gelegenes Stopkodon entsteht und damit beim RnCentaurin $\alpha$ 1a ein um 45 Aminosäuren verlängerter N-Terminus. Das RnCentaurin $\alpha$ 1b hat dagegen den gleichen N-Terminus wie die Centaurine der anderen Spezies. Etwa 60 Basen 3'-wärts und damit im 3'-untranslatierten Bereich des RnCentaurin $\alpha$ 1b findet sich eine weitere Insertion von 3 Nukleotiden. Diese hat natürlich keine Auswirkungen auf die Proteinsequenz. Als weiterer Unterschied auf cDNA-Ebene ist noch eine Punktmutation zu erwähnen. Im RnCentaurin $\alpha$ 1b befindet sich vom Startcodon an gezählt an Position 430 ein Cytidin anstatt eines Thymidins wie beim RnCentaurin $\alpha$ 1a an der entsprechenden Position. Diese Punktmutation hat keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz des RnCentaurin $\alpha$ 1b, da sie sich an der dritten Stelle eines Asparagincodons befindet.

Die von mir klonierte Form weist durch diese Unterschiede bedingt eine größere Ähnlichkeit zu den bereits bekannten Centaurin $\alpha$ 1 der anderen Spezies (p42IP4/PIP3B) auf, wie ein Alingment zeigt. Sie besitzt nun auch zwei PH-Domänen und hat nicht mehr einen verlängerten N-Terminus. Das RnCentaurin $\alpha$ 1b scheint somit das

#### **3.1.1.2 Weitere Versuche der Reproduktion der ursprünglich klonierten Sequenz des Centaurin $\alpha$ 1a der Ratte**

Zur weiteren Aufklärung des Zusammenhangs zwischen dem Centaurin $\alpha$ 1a und Centaurin $\alpha$ 1b wurde eine Reproduktion des Centaurin $\alpha$ 1a als nächster Schritt angestrebt. Um auszuschließen, dass es sich bei dem Centaurin $\alpha$ 1b um ein Klonierungsartefakt oder ein zum Centaurin $\alpha$ 1a parallel exprimiertes Gen handelt, wurden zunächst weitere Klone sequenziert. Eine Sequenzierung von fünf weiteren Klonen bestätigten aber in allen Fällen die hier von mir angegebene Sequenz. Eine



**Abbildung 3.7: RT-PCR des Centaurin $\alpha$ 1 aus der RNA von fetalem Rattenhirn. 1) RT-PCR mit Primern RnCent3 und RnCent4. In der Größe des erwarteten Amplifikats von 1110bp ist nur eine schwache Bande zu sehen. 2) Reamplifikations-PCR mit dem Primerpaar RnCent3/RnCent2. Es sind drei Banden mit Größen zwischen etwa 900bp und 1100bp zu sehen. Das größte Fragment war die vollständige cDNA-Sequenz des Centaurin $\alpha$ 1b. Die beiden kleineren Fragmente enthielten Deletionen von 131bp bzw. 93bp, sie werden im Text als putative Spleißvarianten bezeichnet.**

zweite, unabhängige RT-PCR erbrachte das gleiche Ergebnis.

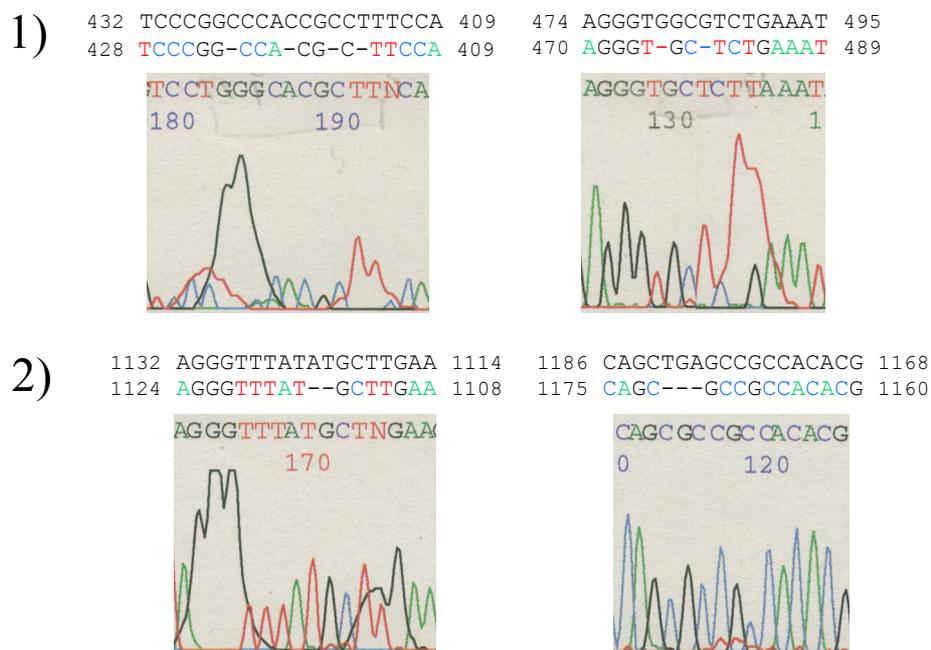
Angeregt durch die deutliche Abhängigkeit der Expression des Centaurins vom Lebensalter, entstand die Überlegung, dass es sich bei der publizierten Version vielleicht um fetale, bzw. ontogenetisch früher exprimierte Form des Centaurins handelt. Aus diesem Grund wurde eine RNA-Präparation aus fetalem Rattenhirn (20 Tage post conceptionem) durchgeführt. Eine erste RT-PCR mit den Primern RnCent3 und RnCent4 erbrachte mehrere Banden, von denen die meisten aber kleiner als die erwarteten 1110bp sind. Es wurden wie bereits vorher bei der Klonierung aus adultem Rattenhirn Reamplifikations-PCRs aus dem RT-PCR Produkt durchgeführt. Die Reamplifikations-PCRs mit den Primerpaaren RnCent3/RnCent2 und RnCent7/RnCent4 wurden unter den gleichen Bedingungen wie oben erwähnt. Die Reamplifikations-PCR mit dem Primerpaar RnCent3/RnCent2 lieferte allerdings 3 DNA-Fragmente mit Längen zwischen etwa 1100bp und 900bp (siehe Abbildung). Es konnten alle drei Fragmente in pGEM-T Easy kloniert werden. Eine Sequenzierung bestätigte, dass es sich bei dem größten Fragment um die cDNA-Sequenz des Centaurin $\alpha$ 1b handelt. Von fünfzehn untersuchten Klonen zeigte keiner die publizierte Sequenz.

Die beiden kürzeren Fragmente enthielten auch Centaurinsequenz, allerdings fanden

### 3 Ergebnisse

sich darin eine bzw. zwei Deletionen von 131bp und 93bp. Ansonsten sind die Sequenzen identisch zu dem Centaurin $\alpha$ 1b. Abbildung 3.4 zeigt ein Alignment der beiden putativen Spleißvarianten aus fetalem Rattenhirn (dargestellt als blauer und grüner Strich) gegen die vollständige cDNA.

Als weiterer Versuch zum Nachweis des RnCentaurin $\alpha$ 1a wurde eine direkte Sequenzierung von RT-PCR Produkten durchgeführt. Dies erfolgte unter der Vorstellung, so einer Selektion durch die Klonierung zu umgehen und ein eventuelles Vorliegen von parallel vorliegenden Sequenzen zu erkennen. Für die Amplifikation und Sequenzierung des Bereichs am 3'-Ende, der zwei Insertionsgruppen enthält, von denen die eine für den verlängerten N-Terminus zuständig ist, wurde das Primerpaar RnCent7 und RnCent4 ausgewählt. Für die beiden Insertionsgruppen im Bereich der für die N-terminale PH-Gruppe kodierenden Sequenz wurde das Primerpaar RnCent23 und RnCent24 konstruiert. Diese beiden Primer amplifizieren ein 215bp langes Fragment, das die beiden Insertionsgruppen enthält. Eine RT-PCR mit RNA aus den Gehirnen von adulten Ratten erzeugte mit beiden Primerpaaren RnCent7/RnCent4 und RnCent23/RnCent24 DNA-Fragmente der erwarteten Länge. Die RT-PCR-Produkte



**Abbildung 3.8: Sequenzierungen der RT-PCR Produkte zum Ausschluß parallel vorliegender Sequenzen. Die Sequenz des RnCentaurin $\alpha$ 1a ist zum Vergleich darüber geschrieben. Einige Sequenzen sind revers abgebildet. 1) RT-PCR Produkt RnCent23/24: Die Insertionsgruppen im der N-terminalen PH-Domäne. 2) RT-PCR Produkt RnCent 7/4: Die Insertionsgruppen im Bereich des 3'-Endes.**

### 3 Ergebnisse

---

wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und extrahiert. Anschließend wurden die extrahierten Fragmente von beiden Seiten mit entsprechenden Primern sequenziert. Die Sequenzen waren, von ein paar Artefakten abgesehen, gut lesbar und zeigten kein paralleles Vorliegen von mehreren Sequenzen. Das RnCentaurin $\alpha$ 1a ließ sich also auch auf diesem Weg nicht nachweisen.

### 3.1.2 Klonierung des humanen Centaurin $\alpha$ 1

Die Klonierung des humanen Centaurin $\alpha$ 1 stellte das nächste Ziel dieser Arbeit dar. Die bekannten Formen des Centaurin $\alpha$ 1 von Ratte, Schwein und Rind zeigten eine hohe Interspezieshomologie. Deshalb war davon auszugehen, dass auch das humane Centaurin $\alpha$ 1 diesen sehr ähnlich sein würde. Ein erster Hinweis, wie das humane Centaurin $\alpha$ 1 aussehen könnte, lieferte eine computergestützte Suche nach humanen Expressed sequence tags (ESTs).

ESTs sind durch automatisierte, randomisierte Sequenzierung von cDNA-Banken gewonnene etwa dreißig bis einige hundert Basenpaare lange Sequenzen. Sie werden von verschiedenen, an dem EST-Projekt beteiligten Labors gewonnen und dann in den Datenbank Genbank veröffentlicht [Adams et al. 1991]. Die Qualität der Sequenz ist wegen der rein automatisierten Erstellung etwas eingeschränkt, so dass man oft genötigt ist, manuelle Korrekturen vorzunehmen. Das EST-Projekt bietet trotzdem einen guten Überblick über exprimierte Gene und dient zur Identifizierung neuer Gene [Boguski 1995].

Zugegriffen wurde auf die EST Datenbank durch das Programm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) auf des über den Server des National Center for Biological Information (NCBI) über die Internetadresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

Anhand der ESTs T09325, AA326859, H17347 und R19692 zusammengestellte putative Sequenz des humanen Centaurin $\alpha$ :

```

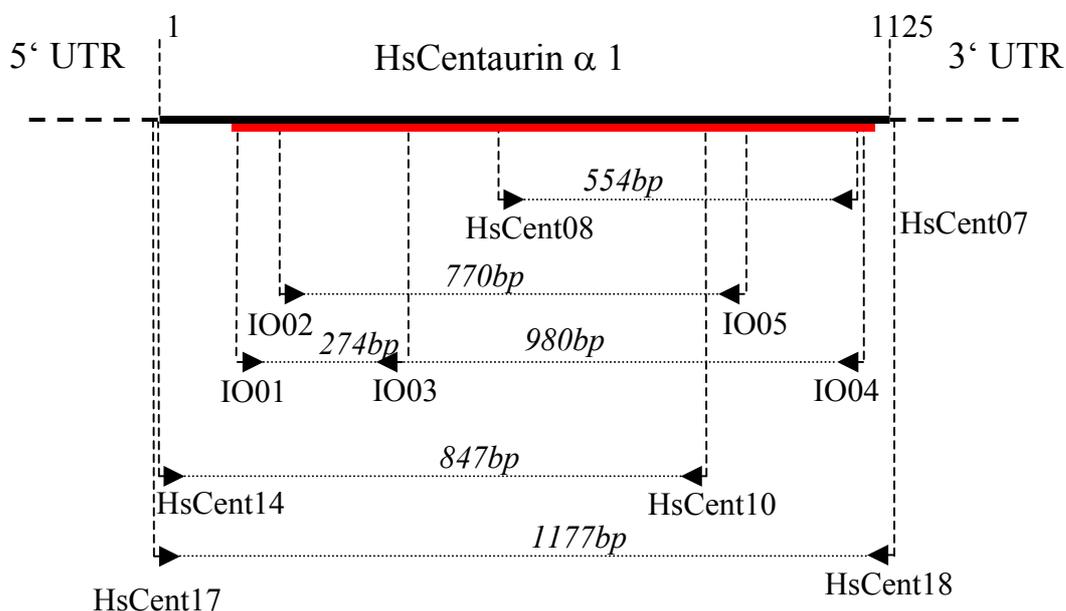
CTGAGCTGCTCGGGAATCCACCGGAATATCCCCCAGGTCAGCAAGGTGAA : 50
GTCCGTCGCCCTGGACGCCTGGNAGGAGGCCCAAGTGGAGTTCATGGCCT : 100
CCCACGGGAACGACGCCGCGAGAGCCAGGTTTNNAGTCCAAAGTACCCTCC : 150
TTCTACTACCGGCCACGCCCTCCGACTGCCAGCTCCTTCGAGAGCAGTG : 200
GATCCGGGCCAAGTACGAGCGACAGGAGTTCATCTACCCGGAGAAGCAGG : 250
AGCCCTACTTCGGCAGGNTACCTGAGGNTTCTCTGGAAGCGTCGCCGGG : 300
ACAACGGGCAGTTTTTTGAGCCGGAAGTTTGTNCTGACAGAACGAGAGGGT : 350
GCTCTGAAGTATTTCAACAGAAATGATGCCAAGGAGCCCAAGGCCGTGAT : 400
GAAGATCGAGCACCTGAACGCCACCTTCCAGCCGGNCAAGATCGGCCACC : 450
TCTAACGGCCTTCAGGTCACCTACCTGAAGGACAACAGNACCCGTAACAT : 500
CTTCATCTCCATNAGGACGGGAAGGAGATTGTGGACTGGTTCAATGCACT : 550
CCGAGCTGCTCGCTTCCACTACCTGCAGGTGGCATTCCCAGGGGCCAGCG : 600
ACGCAGATCTGGTGCCAAAGCTCTCCAGGAACTACCTGAAGGAAGGCTAC : 650
ATGGAGAAGACGGGGCCCAAGCAAACCGGAAGGCTTCCGGAAGCGCTGGTT : 700
CACCATNGATGACCGCAGCTCATGTACTTCAAAGACCCCTGGACGCCTT : 750
CGCCCGAGGGGAAGTCTTCATTGGCAGCAAGGAGAGTGCTACACGGTGC : 800
TGCATGGTTTTCCCGNCGTCCACCCAGGGCCACCCTNGCCACATGGNATC : 850
ACCATCGTNACGCCCGACCGCAAGTTTCTGTTTGCCTGCAAGACGGAGTC : 900
CGNNCAGAGGGAGTTGGTGGCNGACTTTCAGAAGGTGGTGGACAGGCCCA : 950
TGCTGCCCCAGG : 962
    
```

### 3 Ergebnisse

zugegriffen wurde [Altschul et al. 1990]. Als Suchfunktion wurde tblastn gewählt. Bei dieser Funktion wird eine eingegebene Aminosäuresequenz gegen in den Datenbanken vorhandene Nukleinsäuresequenzen, die dazu in alle sechs möglichen Leseraster übersetzt werden, verglichen und in einem Alignment gegenübergestellt. Durchsucht wurde eine Datenbank, in der ausschließlich humane ESTs abgespeichert sind (hEST).

Die Eingabe der Aminosäuresequenzen vom Centaurin $\alpha$  der Ratte, dem Rind und dem Schwein lieferte im Juli 1997 eine Reihe von ESTs, die für ein humanes Centaurin $\alpha$  zu kodieren schienen. Aus den ESTs mit den Zugriffsnummern (accession numbers) T09325, AA326859, H17347 und R19692 ließ sich eine 962bp lange Konsensussequenz zusammenstellen. Dieser fehlten zwar das 5'- und das 3'-Ende und sie wies einige unklar besetzte Nukleinsäurepositionen in der Sequenz auf, die hier durch den Buchstaben „N“ dargestellt sind. Dennoch konnten anhand dieser Zusammenstellung Primer konstruiert werden.

Die Strategie zur Klonierung des humanen Centaurin $\alpha$  sah nun vor, mit den oben erwähnten Primern per PCR verschiedene Phagen-cDNA-Banken zu durchsuchen. Eine



**Abbildung 3.9: Übersicht über die für die Klonierung des humanen Centaurin  $\alpha$ 1 verwendeten Primer.**

**Die Lage der aus den ESTs zusammengestellten putativen humanen Centaurin $\alpha$  Sequenz ist durch einen roten Balken im Vergleich zur erwarteten, vollständigen kodierenden Sequenz aufgetragen. Es ist ersichtlich, dass sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende ein Bereich fehlt.**

### 3 Ergebnisse

---

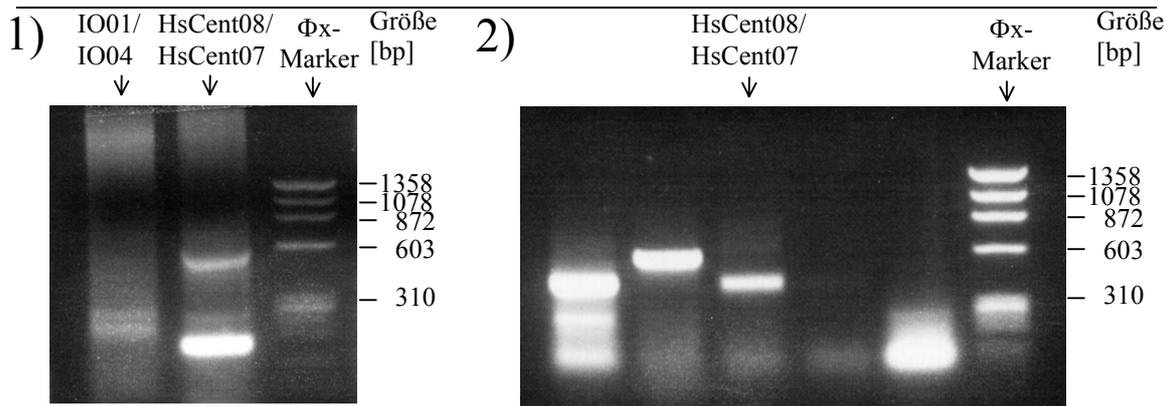
Amplifikat würde darauf hinweisen, dass die entsprechende Phagen-cDNA-Banken die cDNA des Centaurins enthält. In einem weiteren Schritt würde das Amplifikat als Sonde eingesetzt werden, um die Phagenklone zu identifizieren, welche die gesuchte cDNA enthalten.

Als Grundlage für die PCR diente die  $\lambda$ -gt 10 Bank human brain. Diese cDNA-Bank aus humanem Hirngewebe wurde als geeignete Quelle für ein vor allem in Neuronen exprimiertes Gen wie das Centaurin $\alpha$  angesehen. Es wurden 41 PCRs durchgeführt. Die Konzentration der eingesetzten  $\lambda$ -gt 10 Bank wurde in Verdünnungen von 1:10 bis 1:1000 variiert. Die Annealingtemperatur wurde in verschiedenen Ansätzen auf 55°C, 60°C und 65°C gesetzt. Primerpaare waren IO01/IO03, IO01/IO04 und IO02/IO05. In keiner Reaktion wurde ein Amplifikat erzeugt. Eine Positivkontrolle auf Calmodulin dagegen zeigte eine Bande, so dass davon ausgegangen werden musste, dass die cDNA Bank an sich in Ordnung war. Auch mit den danach konstruierten Primern HsCent5 bis HsCent8 ließ sich kein Amplifikat erhalten.

Eine daraufhin untersuchte cDNA Bank aus humanem Lebergewebe (H.Hep) erwies sich ebenso als negativ. Mit keiner der verwendeten Primerkombinationen konnte aus dieser cDNA Bank ein Amplifikat erhalten werden. Offensichtlich lag in keiner der Banken ein der gewünschten Amplifikation entsprechendes oder gar kein spezifisches Amplifikat vor.

Nachdem die Versuche einer Klonierung des humanen Centaurin $\alpha$ 1 aus einer cDNA Bank gescheitert waren, musste nach einer weiteren Quelle für das humane Centaurin $\alpha$ 1 gesucht werden. Hier bot sich die NT2 Zelllinie an. Diese Zellen wurden aus einem Teratokarzinom isoliert und können durch sechswöchige Behandlung mit Retinsäure in Zellen neuronalen Phänotyps ausdifferenziert werden und behalten diesen Phänotyp auch wenn die Retinsäurebehandlung danach ausgesetzt wird [Andrews et al. 1984]. Sie können somit als neuronale Vorläuferzellen bezeichnet werden. Es bestand die Hoffnung, dass das Centaurin $\alpha$ 1 als neuronenspezifisches Protein auch schon in den Vorläuferzellen exprimiert wird. Dies würde die Klonierung erleichtern, denn die nicht ausdifferenzierten NT2 Zellen lassen sich schneller und in größerem Maßstab gewinnen als die ausdifferenzierten Neuronen oder gar humanes, neuronales Gewebe. Eine cDNA Präparation aus NT2 Zellen wurde mir freundlicherweise von Frau Dr. Gerlach (Lübeck) zur Verfügung gestellt.

### 3 Ergebnisse

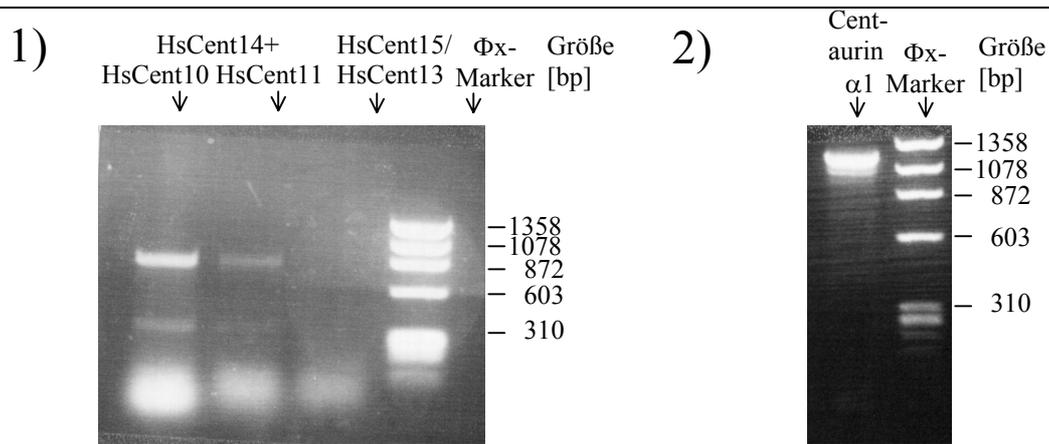


**Abbildung 3.10: 1) zeigt das Ergebnis der ersten beiden PCRs aus NT2 cDNA. Das Primerpaar HsCent08/HsCent07 liefert eine Bande der erwarteten Größe. 2) Ergebnis der Reamplifikationsversuche. In Bahn 3 ist die gelungene Reamplifikation der Bande aus 1) zu sehen.**

Eine erste PCR zur Amplifikation des humanen Centaurin $\alpha$ 1 aus der NT2 cDNA wurde mit den Primerpaaren mit den Primerpaaren IO01/IO04 und HsCent7/HsCent8 durchgeführt (Abb3.10). Während die PCR mit IO01 und IO04 kein Amplifikat zeigte, lieferte das Primerpaar HsCent08/HsCent07 eine Bande in der erwarteten Größe von 554bp. Die Bande wurde für weitere Versuche extrahiert. Da alle direkten Klonierungsversuche scheiterten wurde eine Reamplifikation aus dem ersten PCR-Produkt versucht. Die etwa 550bp große Bande ließ sich in einer Reamplifikation mit dem Primerpaar HsCent08/HsCent07 reproduzieren. Das reamplifizierte DNA-Fragment wurde extrahiert und ließ sich problemlos in pGEM T-Easy klonieren. Eine Sequenzierung des Fragments ergab, dass es sich hierbei um das gesuchte humane Centaurin $\alpha$ 1 handelt. (Abb. 3.10). Die NT2 Zellen exprimieren also auch im unausdifferenzierten Zustand Centaurin $\alpha$ 1 und eignen sich für weitere Klonierungsexperimente.

Es fehlten aber weiterhin ein Teil vom 3'-Ende und ein beträchtlicher Teil des 5'-Endes. Da das Ausgangsmaterial nun aber reine cDNA und keine Phagenbibliothek war, konnte das klonierte Fragment nicht, wie ursprünglich geplant, als Sonde zur Identifizierung eines möglichst die komplette kodierende Sequenz des Centaurin $\alpha$ 1 enthaltenen Phagens benutzt werden und es musste ein anderer Weg zur Komplettierung der Sequenz gesucht werden: Ein Vergleich der drei bisher veröffentlichten Centaurinsequenzen zeigt auch auf cDNA-Ebene eine deutliche Homologie, zumindest im kodierenden Bereich. Aufgrund dieser Tatsache ließen sich zwei degenerierte Primer

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.11: 1) PCR mit degenerierten Primern. In den beiden ersten Bahnen sind neben den erwarteten Banden auch etwa 500bp kleinere Amplifikate zusehen. 2) Ergebnis der PCR mit den Primern HsCent17 und HsCent18 zur Amplifikation der kompletten codierenden Sequenz des humanen Centaurin $\alpha$ 1**

entwerfen, einer für den 5'-Bereich und einer für den 3'-Bereich, mit deren Hilfe die Amplifikation der fehlenden Sequenzabschnitte möglich sein sollte.

In einer nächsten PCR wurden die degenerierten Primer gegen Primer, die in dem nun bekannten Sequenzbereich lagen, eingesetzt. Für die genaue Position der Primer siehe Abbildung 3.11. HsCent14 sollte mit dem Primer HsCent10 ein 847bp großes Fragment ergeben. HsCent11 liegt etwas weiter 5'-wärts als HsCent10 und sollte dementsprechend ein etwa 50bp kleineres Fragment ergeben. Bei der Reaktion der Primer HsCent15 und HsCent 13 wurde ein etwa 490bp großes Amplifikat erwartet.

Die Amplifikation des 5'-Endes zeigte in beiden Reaktionen eine Bande in der erwarteten Größe. Weiterverwendet wurde das Produkt der Primer HsCent15/HsCent10, da es erstens größer und zweitens abundanter war. Es wurde extrahiert und ließ sich problemlos glattendig (blunt-end) in pZErO klonieren. Auffällig war, dass in beiden Reaktionen zur Amplifikation des 5'-Endes eine etwa 500bp kleinere Bande zu sehen war. Dieser Umstand und die Erfahrungen mit dem Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte ließen vermuten, dass es sich hierbei um ähnliche Produkte handelt.

Die Amplifikation des 3'-Endes war auf diesem Weg aber nicht erfolgreich. Auch folgende PCRs, bei denen der Gegenprimer zu HsCent14 oder die Annealingtemperatur geändert wurden, waren nicht erfolgreich, ebenso wenig der Versuch, das 3'-Ende mit einem Oligo-dT Primer zu erhalten. Es fehlten also weiterhin 40 Basenpaare bis zum

### 3 Ergebnisse

erwarteten Stopcodon.

Als nächster Ansatz zur Vervollständigung der Sequenz war die Methode der Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE). Er war aus einer neuen RNA Präparation von NT2 Zellen eingeplant, erwies sich als überflüssig, da zu diesem Zeitpunkt die

Sequenz des humanen Centaurin $\alpha$ 1 :

```
ATGGCCAAGGAGCGGCGCAGGGCGGTCTGGAGCTGCTGCAGCGGCCGGG : 50
GAACGCGCGCTGCGCGGACTGCGGCGCCCCGGATCCCGACTGGGCCTCCT : 100
ACACTCTGGGCGTCTTCATCTGCCTGAGCTGCTCGGGAATCCACCGGAAT : 150
ATCCCCAGGTCAGCAAGGTGAAGTCCGTCCGCTGGACGCCTGGGAGGA : 200
GGCCCAAGTGGAGTTCATGGCCTCCACGGGAACGACGCCGCGAGAGCCA : 250
GGTTTGAGTCCAAAGTACCCTCCTTCTACTACCGGCCACGCCCTCCGAC : 300
TGCCAGCTCCTTCGAGAGCAGTGGATCCGGGCCAAGTACGAGCGACAGGA : 350
GTTTCATCTACCCGGAGAAGCAGGAGCCCTACTCGGCAGGGTACCGTGAGG : 400
GTTTTCTCTGGAAGCGTGGCCGGGACAACGGGCAGTTTTTTGAGCCGGAAG : 450
TTTGTGCTGACAGAACGAGAGGGTGCTCTGAAGTATTTCAACAGAAATGA : 500
TGCCAAGGAGCCCAAGGCCGTGATGAAGATCGAGCACCTGAACGCCACCT : 550
TCCAGCCGGCCAAGATCGGCCACCCCCACGGCCTGCAGGTCACCTACCTG : 600
AAGGACAACAGCACCCGTAACATCTTCATCTACCATGAGGACGGGAAGGA : 650
GATTGTGGACTGGTTCAATGCACTCCGAGCTGCTCGCTTCCACTACCTGC : 700
AGGTGGCATTCCCAGGGGCCAGCGACGCAGATCTGGTGCCAAAGCTCTCC : 750
AGGAACTACCTGAAGGAAGGCTACATGGAGAAGACGGGGCCCAAGCAAAC : 800
GGAAGGCTTCCGGAAGCGCTGGTTACCATGGATGACCGCAGGCTCATGT : 850
ACTTCAAAGACCCCCCTGGACGCCTTCGCCCCAGGGGAAGTCTTCATTGGC : 900
AGCAAGGAGAGTGGCTACACGGTGCTGCATGGGTTCCCGCCGTCCACCCA : 950
GGGCCACCACTGGCCACATGGCATCACCATCGTCACGCCGACCGCAAGT : 1000
TTCTGTTTGCCTGCGAGACGGAGTCCGACCAGAGGGAGTGGGTGGCGGCC : 1050
TTCCAGAAGGCGGTGGACAGGCCCATGCTGCCCCAGGAGTACGCAGTGGA : 1100
GGCGCACTTCAAGCATAAACCTTAG : 1125
```

**Abbildung 3.12: Codierende Sequenz des humanen Centaurin $\alpha$ 1. Darunter durch farbig markiert die Bereiche der verkürzten Formen. Näheres dazu im Text.**

### 3 Ergebnisse

---

vollständige cDNA des humanen Centaurin $\alpha$ 1 in der Datenbank veröffentlicht wurde (Accession number AJ006422 [Venkateswarlu et al., 1999]). Die veröffentlichte Sequenz entsprach genau den von mir bis dahin klonierten Teilen.

Anhand der nun veröffentlichten Sequenz wurden die beiden Starteroligonukleotide HsCent17 und HsCent18 zur Amplifikation der vollständigen kodierenden Sequenz des humanen Centaurins erstellt. Die PCR erbrachte ein DNA-Fragment von der erwarteten Größe von etwa 1200bp, das sich in pGEM-Teasy® klonieren ließ. Die Sequenzierung ergab die vollständige, korrekte cDNA-Sequenz des Centaurins.

#### 3.1.3 Klonierung des humanen Centaurin alpha 2

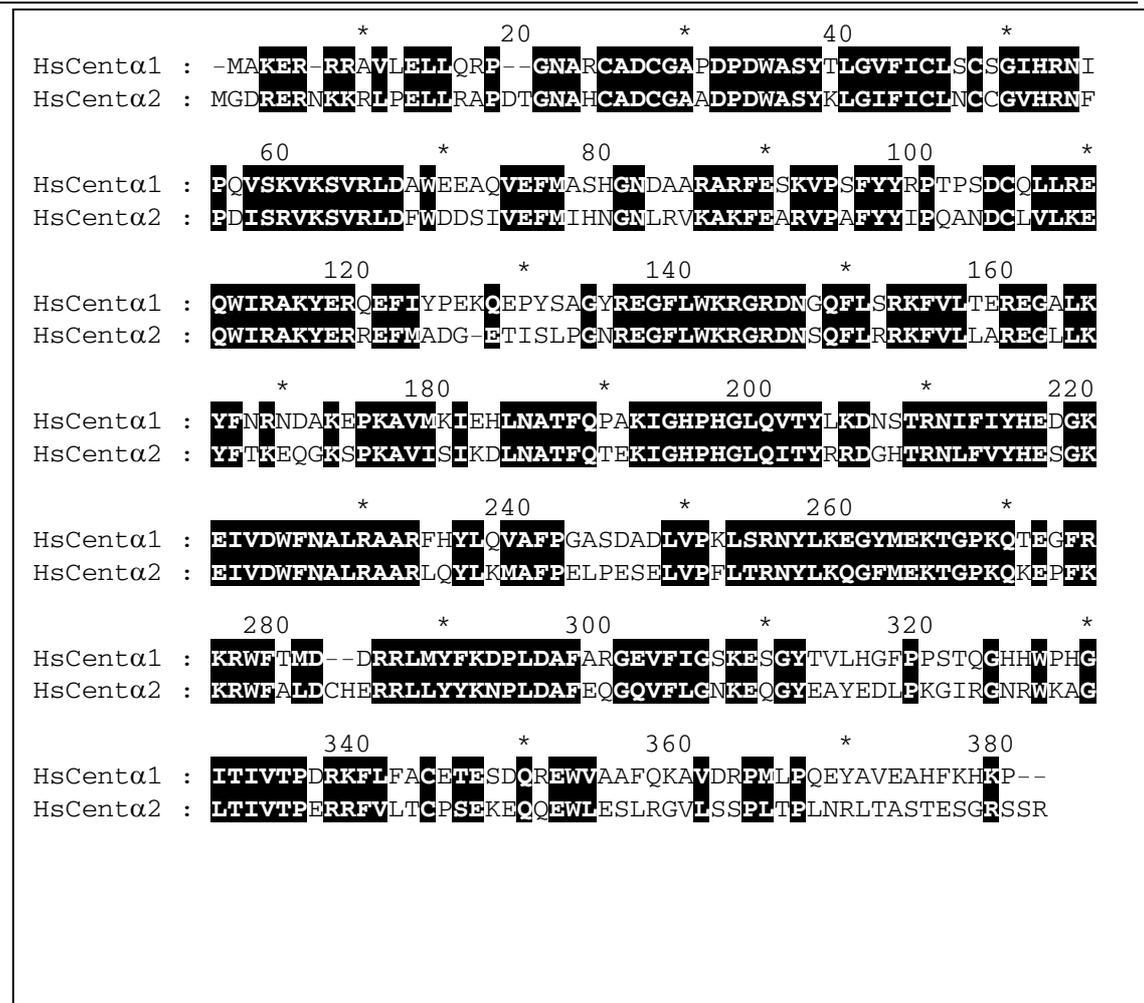
Bei einer erneuten Datenbanksuche von Genbank mit tblastn nach humanen EST-Sequenzen fielen einige Sequenz auf, die zu dem Centaurin $\alpha$ 1 eine große Homologie aufwiesen, aber dennoch so verschieden waren, dass ein homologes Gen vermutet werden kann. Der entsprechende I.M.A.G.E. Klone 685913 (RZPD Klone Nr.: IMAGEp998I181676) wurde vom I.M.A.G.E. Consortium [Lennon et al. 1996] bestellt und sequenziert. Er wies die vollständige kodierende Sequenz eines zum Centaurin $\alpha$ 1 homologen Genes auf, das Centaurin $\alpha$ 2 genannt wurde.

Das Centaurin $\alpha$ 2 ist mit 381 Aminosäuren etwas länger als das Centaurin $\alpha$ 1, weist aber wie diesen eine Struktur aus N-terminalem Zinkfinger und zwei PH-Domänen auf.

codierende Sequenz des humanen Centaurin $\alpha$ 2:

```
1 : ATGGGCGATCGCGAGCGCAACAAGAAGCGGCTGCCGGAGCTGCTGCGTG  
51 : GCCGGACACAGGCAACGCGCACTGCGCCGACTGCGGGCGGCAGATCCC  
101 : ACTGGGCCTCTTACAAGCTGGGGATCTTCATCTGTCTCAACTGCTGCGGC  
151 : GTCCACCGTAACTTCCCTGACATCAGCAGAGTTAAATCTGTGCGACTTGA  
201 : CTTCTGGGACGACAGTATTGTGGAGTTTATGATCCACAATGGAAACCTCC  
251 : GTGTGAAGGCCAAGTTCGAAGCCAGAGTCCCAGCTTTCTACTACATCCCC  
301 : CAGGCCAACGACTGCCTGGTCTTAAAGGAACAATGGATTCGAGCTAAGTA  
351 : TGAGAGACGGGAATTTATGGCTGATGGGGAAACCATCTCGCTCCCAGGTA  
401 : ACCGAGAAGGATTCCTGTGGAAGCGAGGAAGGGACAACCTCACAGTTTCTG  
451 : AGAAGGAAGTTTGTACTTCTGGCAAGAGAAGGCCTCCTGAAGTACTTCAC  
501 : AAAGGAACAGGGTAAAAGCCCCAAAGCTGTCATCAGCATTAAGGACTTGA  
551 : ATGCCACCTTCCAGACAGAGAAGATAGGGCACCCCCATGGGCTGCAGATC  
601 : ACCTACAGGAGAGATGGCCACACCAGGAACCTGTTTGTGTATCATGAAAG  
651 : TGGGAAGGAGATAGTGGACTGGTTCAATGCCCTCCGTGCAGCCCCTCTGC  
701 : AGTACCTAAAAATGGCCTTTCCTGAACTCCCAGAGTCTGAGCTCGTGCCA  
751 : TTCCTCACCAGGAACCTCAACAAGGCTTCATGGAAAAGACTGGGCC  
801 : AAAGCAGAAAGAACCTTTCAAGAAAAGGTGGTTCGCCCTGGATTGCCATG  
851 : AGCGGAGGCTGCTCTATTACAAGAACCCACTGGATGCCTTCGAGCAGGGC  
901 : CAGGTTTTTCTTGGGAACAAGGAGCAGGGATATGAAGCCTACGAAGACCT  
951 : GCCCAAGGGCATCCGAGGAAATCGCTGGAAAGCCGGACTCACCATTGTCA  
1001 : CCCAGAGCGGAGATTTGTCTCACTTGCCCCAGTGAGAAGGAACAGCAG  
1051 : GAATGGCTGGAAAGTTTGGCGGGTGTCTGTCCAGCCCCCTTGACGCCCT  
1101 : CAACCGGCTTACTGCATCAACAGAGAGTGGCCGCAGCAGCAGGTGA
```

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.13: Alignment der humanen Centaurine $\alpha$ 1 (HsCent $\alpha$ 1) und Centaurine $\alpha$ 2 (HsCent $\alpha$ 2)**

### 3.2 Northernblots der humanen Centaurine

Um die Gewebsverteilungen der beiden humanen Centaurine  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  zu ermitteln und miteinander zu vergleichen wurden Northernblotanalysen durchgeführt. Um trotz der hohen Homologie die beiden Formen zu unterscheiden, sind für die Sonden anhand eines cDNA-Alignments Bereiche gewählt worden, an denen sich die beiden Formen stärker unterscheiden. Die unten stehende Abbildung zeigt die Position der Sonden. Als Blot diente ein Multiple Tissue Northernblot der Firma Clontech. Auf diesem käuflich zu erwerbenden Blot sind die mRNAs 12 verschiedenen humanen Geweben bereits fixiert.

```

Centaurin $\alpha$ 1 139 ATCCACCGGAATATCCCCAGGTCAGCAAGGTGAAGTC CGTCCGCTGGACGCCTGGGAG
Centaurin $\alpha$ 2 151 GTCCACCGTAACTTCCTTGACATCAGCAGAGTTAAATCTGTGCGACTTGACTTCTGGGAC
Sonde Cent. $\alpha$ 1 1 -----CCCAGGTCAGCAAGGTGAAGTCCGTCCGCTGGACGCCTGGGAG
Sonde Cent. $\alpha$ 2 1 -----

Centaurin $\alpha$ 1 199 GAGGCCCAAGTGGAGTTCATGGCTCCACGGGAACGACGCCGCGAGAGCCAGGTTTGAG
Centaurin $\alpha$ 2 211 GACAGTATTGTGGAGTTTATGATCCACAATGGAAACCTCCGTGTGAAGGCCAAGTTGGA
Sonde Cent. $\alpha$ 1 45 GAGGCCCAAGTGGAGTTCATGGCTCCACGGGAACGACGCCGCGAGAGCCAGGTTTGAG
Sonde Cent. $\alpha$ 2 1 -----ATCCACAATGGAAACCTCCGTGTGAAGGCCAAGTTGGA

Centaurin $\alpha$ 1 259 TCCAAAGTACCCTCCTTCTACTACCGGCCACGCCCTCCGACTGCCAGCTCCTTCGAGAG
Centaurin $\alpha$ 2 271 GCCAGAGTCCCAGCTTTCTACTACATCCCCAGGCCAACGACTGCCCTGGTCTTAAAGGAA
Sonde Cent. $\alpha$ 1 105 TCCAAAGTACCCTCCTTCTACTACCGGCCACGCCCTCCG-----
Sonde Cent. $\alpha$ 2 40 GCCAGAGTCCCAGCTTTCTACTACATCCCCAGGCCAACG-----

```

**Abbildung 3.14:** Diese Abbildung zeigt ein Alignment der Centaurine  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  mit den für die Northernblots verwendeten Sonden. Es wurde ein Bereich gewählt, an dem die beiden Formen möglichst stark divergieren, um eine gute Unterscheidung zu ermöglichen.

#### 3.2.1 Synthese der Sonde für das humane Centaurin alpha1

Die Sonde für das HsCentaurin alpha1 wurde als [ $^{32}$ P]-markierte dsDNA per PCR synthetisiert. Die Herstellung einer ssDNA Sonde mittels asymmetrischer PCR wurde ursprünglich versucht, war aber nicht erfolgreich. Als Primer wurden HsCent26 und HsCent27 eingesetzt und als Template diente das Minipreprodukt der klonierten Volllänge des humanen Centaurin $\alpha$ 1. Die Synthese wurde nach dem beschriebenen Protokoll durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Reaktion ohne radioaktiv markiertes

dATP als Positivkontrolle mitlaufen gelassen. Der Erfolg der Synthese wurde durch eine Gelelektrophorese der Positivkontrolle bestätigt.

Die Aktivität der Sonde wurde von der Fällung als Gesamtaktivität und nach der Fällung getrennt nach Sonde und Überstand gemessen, um einen Anhalt dafür zu bekommen, wie hoch der Einbau der radioaktiven Nukleotide in der Sonde war. Dieser betrug 75,9%. Schließlich wurde die Aktivität des leeren Reaktionsgefäßes bestimmt, in dem die Fällung durchgeführt wurde, nachdem die Sonde eluiert und zu dem Blot gegeben wurde. Alle weitere Schritte erfolgten wie im Methodenteil beschrieben.

#### **3.2.2 Synthese der Sonde für das Centaurin alpha2**

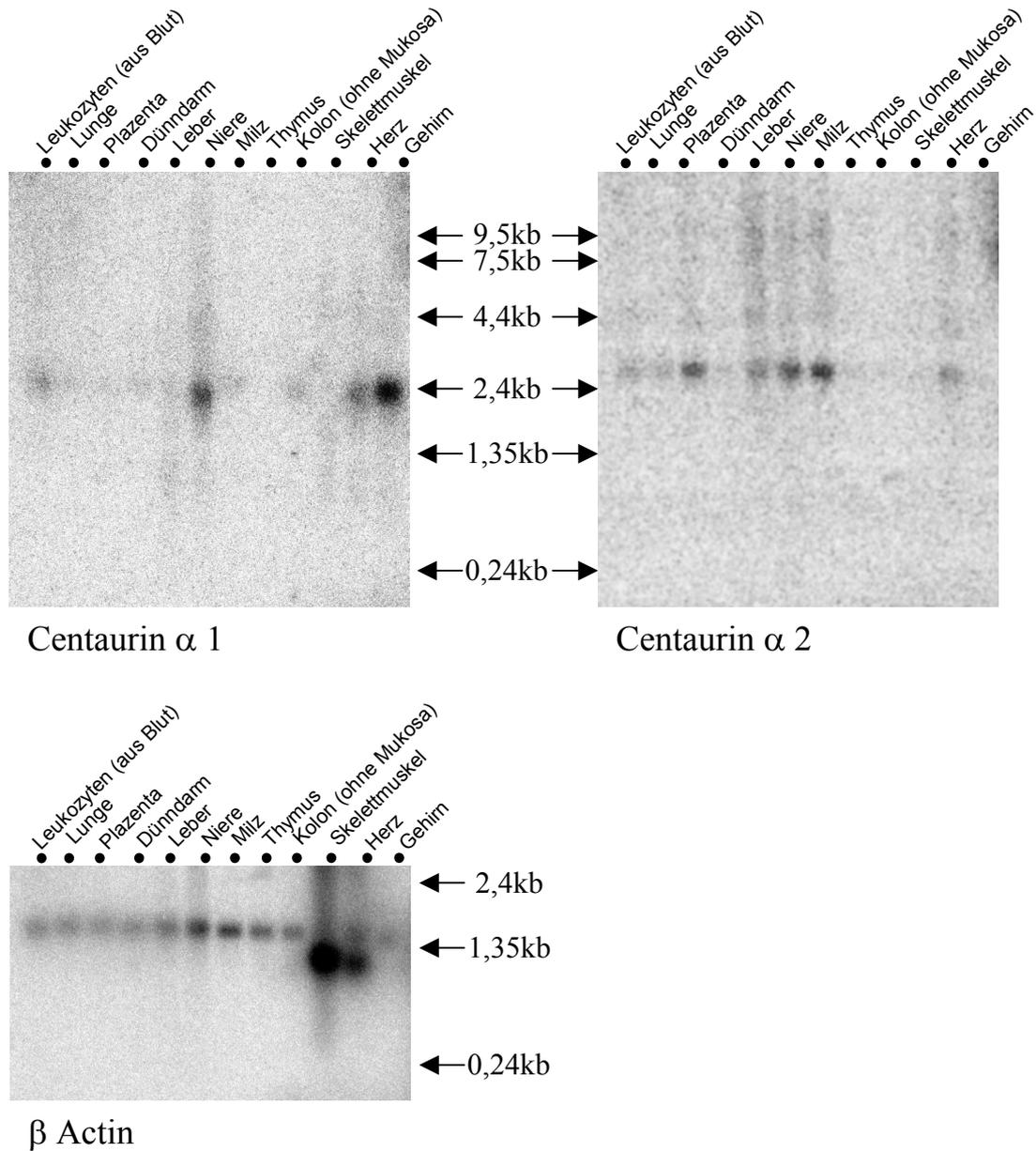
Die Sonde für des HsCentaurin alpha2 wurde mit der Methode der asymmetrischen PCR erstellt, um eine höhere Sensitivität zu erlangen. Als Sinnstrangprimer wurde HsCenthom5 und als Gegenstrangprimer HsCenthom6 eingesetzt. 1ng des Plasmids I.M.A.G.E. clone 685913 diente als Template. Die Synthese der Sonde und alle weiteren Schritte erfolgten nach dem im Methodenteil beschriebenen Protokoll. Dabei wurde ein Einbau der Radioaktivität von 69,8% erzielt.

#### **3.2.3 Synthese der $\beta$ -Actin Sonde**

Zur Kontrolle des MTN-Blottes wurde eine Hybridisierung mit einer  $\beta$ -Actinsonde durchgeführt. Da keine humane  $\beta$ -Actin cDNA vorlag wurde eine Sonde aus dem  $\beta$ -Actin der Ratte konsturiert, das im Labor in klonierter Form vorlag. In dem in Frage kommenden Bereich sind die beiden Sequenzen ausreichend homolog, so dass die Verwendung einer  $\beta$ -Actinsonde der Ratte auf einem humanen Northernblot problemlos ist. Die Sonde wurde durch eine Doppelstrang-PCR mit den Primern RnActin1 und RnActin2 synthetisiert. Die weitere Behandlung und Hybridisierung erfolgte wie im Methodenteil beschrieben.

#### **3.2.4 Ergebnisse der Northernblots**

Das Ergebnis der Northernblots ist aus dem unten stehendem Bild ersichtlich. Die mRNA des Centaurin alpha 1 in etwa 2,4kb lang und wird vor allem im Gehirn und etwas schwächer in Herz, Niere und in Leukozyten exprimiert. Spuren finden sich in der Lunge, Plazenta, Dünndarm, Leber, Milz und Kolongewebe ohne Mukosa, was hauptsächlich aus glatter Muskulatur besteht.



**Abbildung 3.15: Ergebnisse der Northernblots für Centaurin $\alpha$ 1 (links), Centaurin  $\alpha$ 2 (Mitte) und  $\beta$ Actin (Kontrolle, rechts)**

Das Centaurin $\alpha$ 2 dagegen unterscheidet sich in der Gewebeverteilung sehr deutlich vom Centaurin $\alpha$ 1 und weist mit ungefähr 2,8kb auch ein etwas längeres mRNA-Transkript auf. Centaurin $\alpha$ 2 wird vor allem transkribiert in Milz, Plazenta, Niere und Leber. Eine schwächere Expression findet in Leukozyten, Lunge Dünndarm und Herz statt. Im Gehirn lässt sich eine Expression des Centaurin $\alpha$ 2 im Northernblot nicht nachweisen.

Als Positivkontrolle ist eine Hybridisierung des MTN-Blots mit einer  $\beta$ Actin Sonde

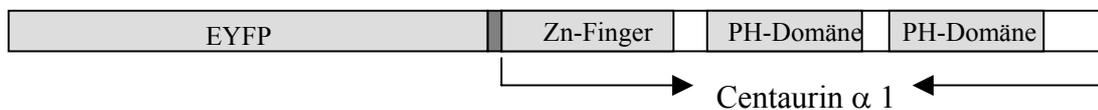
durchgeführt worden, die in allen Bahnen ein deutliches Signal ergab.

### 3.3 Umklonierung der humanen Centaurine $\alpha$ 1 und $\alpha$ 2 in die eukaryotischen Expressionsvektoren für die GFP

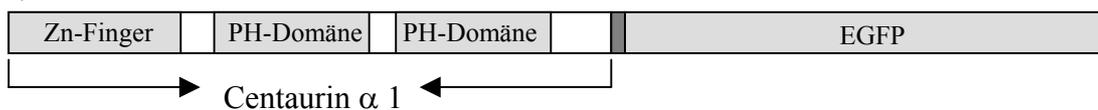
#### Fusionsproteine

Für die geplante *in vivo* Lokalisation der Centaurine ist eine Expression der entsprechenden Fusionsproteine von Centaurin mit einem fluoreszierenden Protein in den zu untersuchenden eukaryotischen Zellen nötig. Bei der Konstruktion des Fusionsproteins gibt es natürlicherweise zwei Möglichkeiten: Das GFP kann einmal N-terminal oder aber C-terminal an das zu untersuchende Protein fusioniert werden. Bei dem Centaurin $\alpha$ 1 wurden beide Konstrukte erstellt. Dies wurde unter der Vorstellung gemacht, dass durch Vergleich der beiden Konstrukte sterische Effekte des GFP auf die Bindungseigenschaften des Centaurin $\alpha$ 1 hat, erkannt werden können. Aufgrund der Erfahrungen mit dem Centaurin $\alpha$ 1 wurde von dem Centaurin $\alpha$ 2 nur ein Fusionsprotein

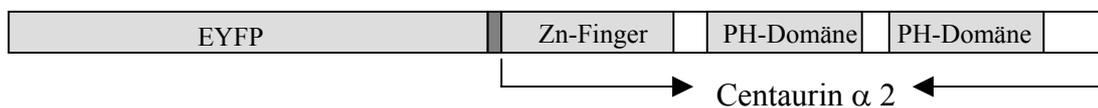
#### 1) EYFP-HsCent $\alpha$ 1



#### 2) HsCent $\alpha$ 1-EGFP



#### 3) EYFP-HsCent $\alpha$ 2



**Abbildung 3.16:** Diese Abbildung zeigt die drei Fusionsproteine wie sie von den konstruierten Vektoren exprimiert werden. 1) Fusionskonstrukt aus Centaurin $\alpha$ 1 mit C-terminalem EGFP; 2) Fusionskonstrukt aus Centaurin $\alpha$ 1 mit N-terminalem EYFP; 3) Fusionskonstrukt aus Centaurin $\alpha$ 2 mit N-terminalem EYFP. Die Länge der beiden Proteine ist proportional zur Anzahl der Aminosäuren. In Dunkelgrau ist der durch den Vektor vorgegebene drei bis elf Aminosäuren umfassende Bereich zwischen den beiden Fusionspartnern gekennzeichnet.

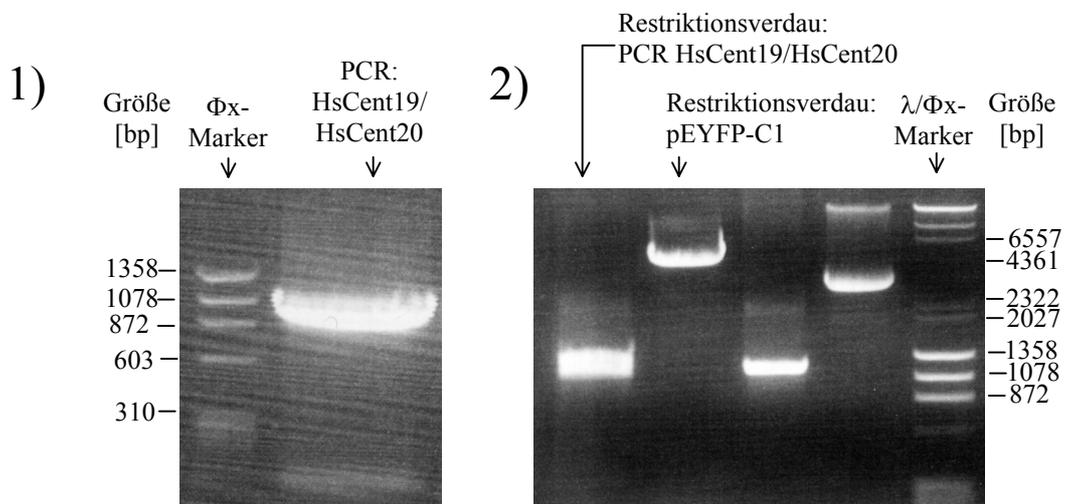
mit N-terminalem EYFP erstellt.

Für die Expression der Fusionsproteine wurden die Plasmide pEGFP-N1 und pEYFP-C1 von Clontech genutzt. Dabei wurde pEGFP-N1, bei dem sich die multiple Klonierungsstelle 5'-wärts des EGFP-Genes befindet, zur Konstruktion und Expression eines EGFP mit N-terminalem Lokalisationsprotein genutzt, während pEYFP-C1 zur Expression des EYFP mit C-terminalem Centaurin genutzt wurde. Die Expression der Fusionsproteine wird von dem CMV imidiate early Promotor gesteuert. Eine genauere Beschreibung der Plasmide findet sich im Methodenteil.

Die Klonierungsschritte zur Konstruktion der verschiedenen Expressionsvektoren sind am Beispiel des pEYFP-HsCent $\alpha$ 1 detailliert und mit Abbildungen dargestellt. Da sich die einzelnen Schritte bei den anderen Vektoren wiederholen, ist dort auf Abbildungen verzichtet.

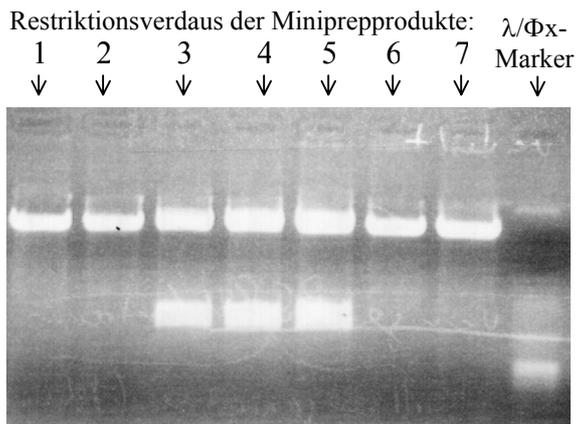
### 3.3.1 Vektor zur Expression des EYFP-HsCentaurin $\alpha$ 1 Fusionsgens

Für die Konstruktion eines HsCentaurin-Fusionsgenes mit einem N-terminalen GFP wurde der Vektor pEYFP-C1 benutzt. Für die Klonierung wurden die Schnittstellen *XhoI* und *SmaI* gewählt. Um diese Schnittstellen unter Berücksichtigung des Leserasters an den Enden der Centaurin  $\alpha$ 1 cDNA anzubringen, wurden die Primer HsCent19 und



**Abbildung 3.17:** 1) Ergebnis des PCR mit den Primern HsCent19 und HsCent20 zur Amplifikation des humanen Centaurin $\alpha$ 1 mit flankierenden *SmaI* und *XhoI* Schnittstellen. Erwartete Größe: 1148bp; Die Bande wurde für den folgenden Restriktionsverdau extrahiert. 2) Gelelektrophorese der *SmaI* und *XhoI* Restriktionsverdaus von Insert [PCR aus 1)] und pEYFP-C1. Beide Banden wurden für die Ligation extrahiert. Die 4361bp Markerbande ist durch das Bromphenolblau verdeckt und deshalb schlecht sichtbar.

### 3 Ergebnisse

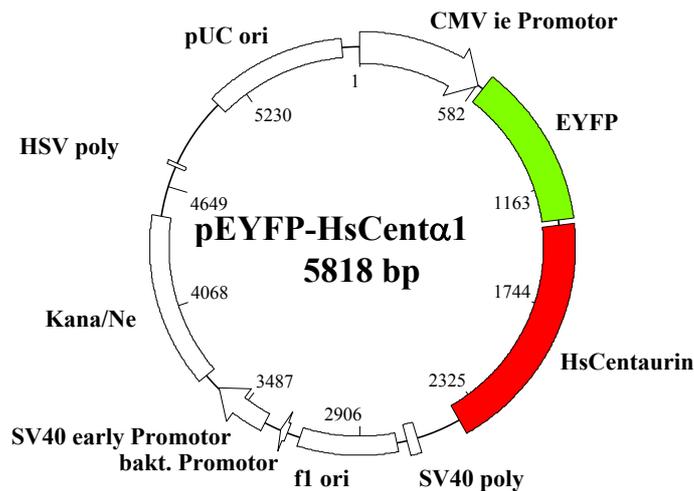


**Abbildung 3.17: Gelelektrophorese der analytischen Restriktionsverdau der Miniprepprodukte pEYFP-HsCent $\alpha$ 1 mit *SmaI* und *XhoI*. In den Bahnen 3 bis 5 ist ein Insert zu sehen. Miniprepprodukt 3 wurde durch Sequenzierung als positiv bestätigt.**

HsCent20 entworfen. Diese flankieren die cDNA des Centaurin  $\alpha$ 1, besitzen aber an ihren 5'-Enden die jeweilige Schnittstelle. Mit diesen Primern wurde mittels einer *Pfu*-PCR aus dem in pGEM-T Easy klonierten Centaurin  $\alpha$ 1 das entsprechend mutierte Fragment amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel aufgetrennt, bei dem sich eine Bande von erwarteter Länge zeigte. Diese wurde mit QIAEX II extrahiert.

Das extrahierte Fragment und das Plasmid pEYFP-C1 wurden in einem sequentiellen Verdau nacheinander mit den Enzymen *SmaI* und *XhoI* geschnitten. Die beiden Verdau wurden erneut über ein Agarosegel aufgetrennt, das geschnittene Plasmid und Fragment extrahiert und für vier Stunden bei 16°C ligiert.

Die Transformation ergab ca. 100 Kolonien. Von 10 Klonen wurde eine Miniprep durchgeführt. Von diesen wiesen 3 nach einem analytischen Verdau und anschließender Gelelektrophorese ein Insert von erwarteter Größe auf. Um eine korrekte Position des einklonierten Centaurin  $\alpha$ 1 zu bestätigen wurden die beiden Übergänge zwischen Vektor und Insert sequenziert. Hierzu dienten die beiden Primer EGFP C-Term und SV40 polyA rev. Dieses Plasmid wurde pEYFP-HsCent $\alpha$ 1 genannt. Für spätere Transfektionsexperimente wurde eine Maxiprep durchgeführt



1309	GGC	ATG	GAC	GAG	CTG	TAC	AAG	TCC	GGA	CTC	AGA	TCT	CGA	GCG	GCC	ATG	GCC	AAG	GAG
233	G	M	D	E	L	Y	K	S	G	L	R	S	R	A	A	M	A	K	E
....																			
2437	CAG	GAG	TAC	GCA	GTG	GAG	GCG	CAC	TTC	AAG	CAT	AAA	CCC	GGG	ATC	CAC	CGG	ATC	TAG
609	Q	E	Y	A	V	E	A	H	F	K	H	K	P	G	I	H	R	I	*

**Abbildung 3.18:** Diese Abbildung stellt die Übergänge zwischen pEYFP-C1 und Centaurin  $\alpha 1$  dar. Die Nummerierung der Nukleotide bezieht sich auf den willkürlich gesetzten Ursprung, während die Aminosäuren vom Start des Fusionsproteins gezählt werden. Das EYFP ist grün und das Centaurin rot markiert. Die Schnittstellen sind angegeben.

### 3.3.2 Vektor zur Expression des HsCentaurin $\alpha 1$ -EGFP Fusionsgens

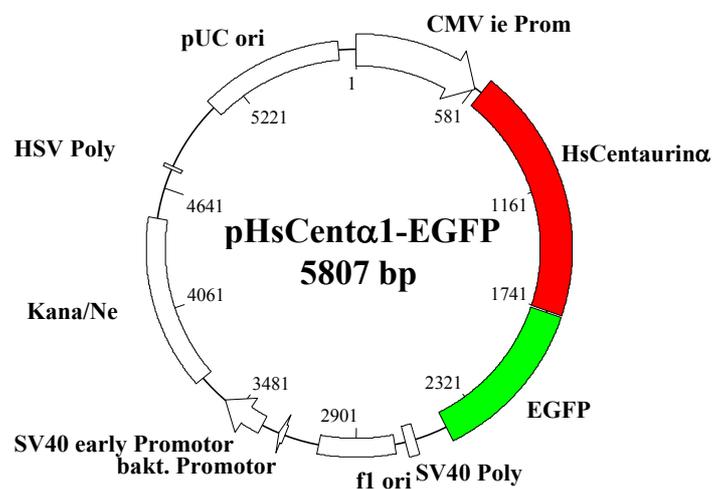
Als Vektor für die Expression Centaurinfusionsgenes mit einem C-terminalen GFP wurde der Vektor pEGFP-N1 gewählt. Das Centaurin $\alpha 1$  wurde über die Schnittstellen *SacI* und *AgeI* inkloniert. Die Primer HsCent21 und HsCent22 wurden so konstruiert, das sich das Centaurin $\alpha 1$  nach seiner Amplifikation über diese Schnittstellen unter Berücksichtigung des Leserasters in den Vektor inklonieren lässt.

In einer ersten PCR wurde das Centaurin mit den Primern HsCent 21 und HsCent22 amplifiziert. Als Template diente das in pGEM-T Easy klonierten Centaurin  $\alpha 1$ . Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und zeigte eine Bande von der erwarteten Größe von 1141bp, die extrahiert wurde. Da eine direkte Klonierung in pEGFP-N1 nicht erfolgreich war erfolgte zuerst eine direkte Zwischenklonierung der extrahierten Bande in pGEM T-Easy. Diese erste Klonierung lieferte zahlreiche Kolonien. Von 10 dieser Klone wurden Minipreps durchgeführt. Eine Miniprep, genannt 9-1, die im analytischen Verdau ein Insert von erwarteter Größe aufwies, wurde

### 3 Ergebnisse

weiterverwendet.

Im nächsten Schritt wurden das Miniprepprodukt 9-1 und der Vektor pEGFP-N1 mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* und *AgeI* geschnitten, die Verdau über ein Agarosegel aufgetrennt und die beiden für die Ligation verwendeten Banden extrahiert. Die Ligation wurde für 5 Stunden bei 16°C durchgeführt. Die Transformation lieferte zahlreiche Kolonien. Von neun Klonen wurde eine Miniprep durchgeführt, von denen acht im analytischen Verdau ein Insert von etwa 1110 bp aufwiesen. Eine anschließende Sequenzierung mit den Primern CMV ie Prom1 und EGFP-N1 Seq1 bestätigte eine korrekte Position des einklonierten Centaurin  $\alpha 1$ . Das Plasmid wurde pHsCent $\alpha 1$ -EGFP genannt. Um für die folgenden Transfektionsexperimente genug DNA zu haben, wurde eine Maxiprep durchgeführt.



601	CCG	GAC	TCA	GAT	CTC	GAG	CTC	ATG	GCC	AAG	GAG	CGG	CGC	AGG	GCG	GTC	CTG	GAG	CTG
1	-	-	-	-	-	-	-	M	A	K	E	R	R	R	A	V	L	E	L
.....																			
1714	GCA	GTG	GAG	GCG	CAC	TTC	AAG	CAT	AAA	CCG	GTC	GCC	ACC	ATG	GTG	AGC	AAG	GGC	GAG
365	A	V	E	A	H	F	K	H	K	P	V	A	T	M	V	S	K	G	E

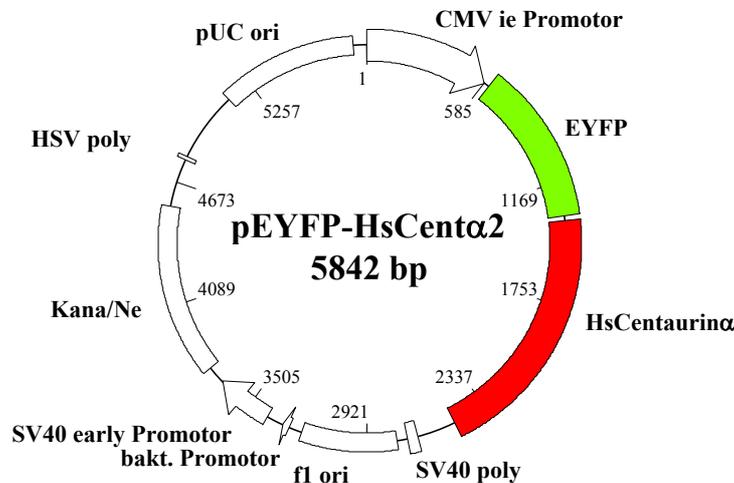
**Abbildung 3.19:** Diese Abbildung stellt die Übergänge zwischen pEGFP-N1 und Centaurin  $\alpha 1$  dar. Die Nummerierung der Nukleotide bezieht sich auf den willkürlich gesetzten Ursprung, während die Aminosäuren vom Start des Fusionsproteins gezählt werden. Das EGFP ist grün und das Centaurin rot markiert. Die Schnittstellen sind angegeben.

#### 3.3.3 Vektor zur Expression des EYFP-HsCentaurin $\alpha 2$ Fusionsgens

Die Klonierung des Centaurin $\alpha 1$  in den Vektor pEYFP-C1 erfolgte über ein 5'-gelegene *XhoI* und eine 3'-gelegene *SmaI* Schnittstelle. In einem ersten Schritt wurde mit einer

### 3 Ergebnisse

*Pfu*-PCR und den Primern HsCenthom3 und HsCenthom4 die Centaurin $\alpha$ 2 cDNA mit den entsprechenden Schnittstellen amplifiziert. Als Template diente der oben erwähnte Vektor I.M.A.G.E. Klon 685913. Das PCR Produkt wurde über ein Agarosegel



1309	GGC	ATG	GAC	GAG	CTG	TAC	AAG	TCC	GGA	CTC	AGA	TCT	CGA	GCT	ATG	GGC	GAT	CGC	GAG
233	G	M	D	E	L	Y	K	S	G	L	R	S	R	A	M	G	D	R	E
....																			
2452	AAC	CGG	CTT	ACT	GCA	TCA	ACA	GAG	AGT	GGC	CGC	AGC	AGC	AGG	TGA	CCC	GGG	ATC	CAC
614	N	R	L	T	A	S	T	E	S	G	R	S	S	R	*	P	G	I	H

**Abbildung 3.20:** Diese Abbildung stellt die Übergänge zwischen pEYFP-C1 und Centaurin  $\alpha$ 2 dar. Die Nummerierung der Nukleotide bezieht sich auf den willkürlich gesetzten Ursprung, während die Aminosäuren vom Start des Fusionsproteins gezählt werden. Das EYFP ist grün und das Centaurin rot markiert. Die Schnittstellen sind angegeben.

aufgetrennt und lieferte ein Bande in der Höhe der erwarteten 1172bp. Die Bande wurde extrahiert. Das extrahierte Centaurin $\alpha$ 1-Fragment und das Plasmid pEYFP-N1 wurden mit den Enzymen *SmaI* und *XhoI* geschnitten, mit einem Agarosegel aufgetrennt und extrahiert. Die Ligation erfolgte bei 16°C für 5 Stunden. Nach der Transformation fanden sich 5 Kolonien, von denen Minipreps angefertigt wurden. Ein analytischer Verdau zeigte in allen 5 Klonen ein Insert von etwa 1200bp. Eine Sequenzierung mit den Primern P EGFP C-Term und SV40 polyA rev zeigte ein korrekt im Leseraster eingefügtes Centaurin $\alpha$ 2. Der Klon wurde pEYFP-HsCent $\alpha$ 2 genannt und für die weitere Verwendung wurde eine Maxiprep angefertigt.

### **3.4 *In vivo* Lokalisationsexperimente in verschiedenen Zelllinien**

Die im vorhergegangenen Abschnitt beschriebenen Plasmide für die Expression der Fusionsproteine der Centaurine mit EYFP bzw. EGFP dienten als Grundlage für alle nun folgenden Experimente. Die Plasmide wurden in verschiedene Zelllinien transfiziert und am nächsten Tag konnte die Lokalisation der Fusionsproteine über die Verteilung der beobachteten Fluoreszenz beobachtet werden. Zur besseren Beurteilung des Fluoreszenzmusters wurde die quasikonfokale Fluoreszenzmikroskopie angewendet. Die hierdurch errechneten Schnittbilder sollen ein besseres Erkennen von Details durch Ausschalten von Überlagerungsartefakten ermöglichen. Als Kontrolle wurde in einem parallelen Ansatz jeweils der Vektor pEYFP-C1 transfiziert und untersucht. Dieser diente als Kontrolle um eventuelle durch das EYFP bedingte Lokalisierungseffekte zu erkennen.

Neben der rein deskriptiven Beschreibung der Lokalisation der Centaurin in lebenden Zellen diente die Transfektion in die Jurkat T-Lymphozyten vor allem als Test für die Funktionalität der Fusionsproteine.

#### **3.4.1 Jurkat T-Lymphozyten**

Jurkat T-Lymphozyten sind eine Zelllinie humaner T-Lymphozyten, die aus dem peripheren Blut eines 14jährigen leukämiekranken Jungen gewonnen wurden [Schneider et al. 1977].

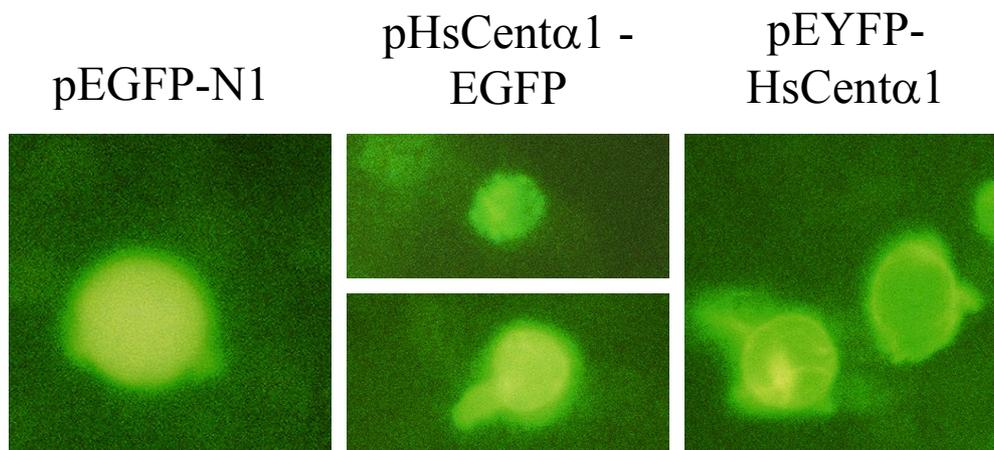
Von dieser Zelllinie ist bekannt, dass sie schon basal eine hohe PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Konzentration aufweist. Dieses Wissen wurde ausgenutzt, um in einem ersten Experiment die Funktionalität der Konstrukte zu testen. Bei Fusionskonstrukten stellt sich die Frage, ob und in wie weit das angehängte EGFP oder EYFP die Funktionalität des zu untersuchenden Proteins beeinflusst. In diesem Fall war die Bindungseigenschaft des Centaurins das Entscheidende. Da die Jurkat T-Lymphozyten hohe Mengen von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in der Plasmamembran aufweisen [Mayr, unveröffentlichte Daten], ist bei ungestörten Bindungseigenschaften eine Lokalisation der Fluoreszenz an der Plasmamembran zu erwarten.

In dem ersten Experiment wurden dann auch die Plasmide pEYFP-HsCentaurin alpha1 und pHsCentaurin alpha1-EGFP parallel in Jurkat Zellen transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Elektroporation. Als Kontrolle zur Darstellung einer homogenen

### 3 Ergebnisse

zytoplasmatischen Lokalisation wurde ein pEGFP-N1 Vektor transfiziert.

(Bei diesem Versuch ist deutlich zu sehen, dass die Lokalisation der Fluoreszenz bei dem Konstrukt mit dem n-terminalen EYFP viel deutlicher und bei einem größeren Anteil an transfizierten Zellen zu finden ist, als wenn das GFP c-terminal angehängt ist. Dieses deutet darauf hin, dass die Bindungseigenschaften durch das c-terminale GFP beeinflusst werden. Dieser Befund macht auch insofern Sinn, als dass er durch den sterischen Einfluss eines in der Nähe der für die Bindung verantwortlichen gemachten PH-Domänen sich befindenden GFPs erklärt werden kann.



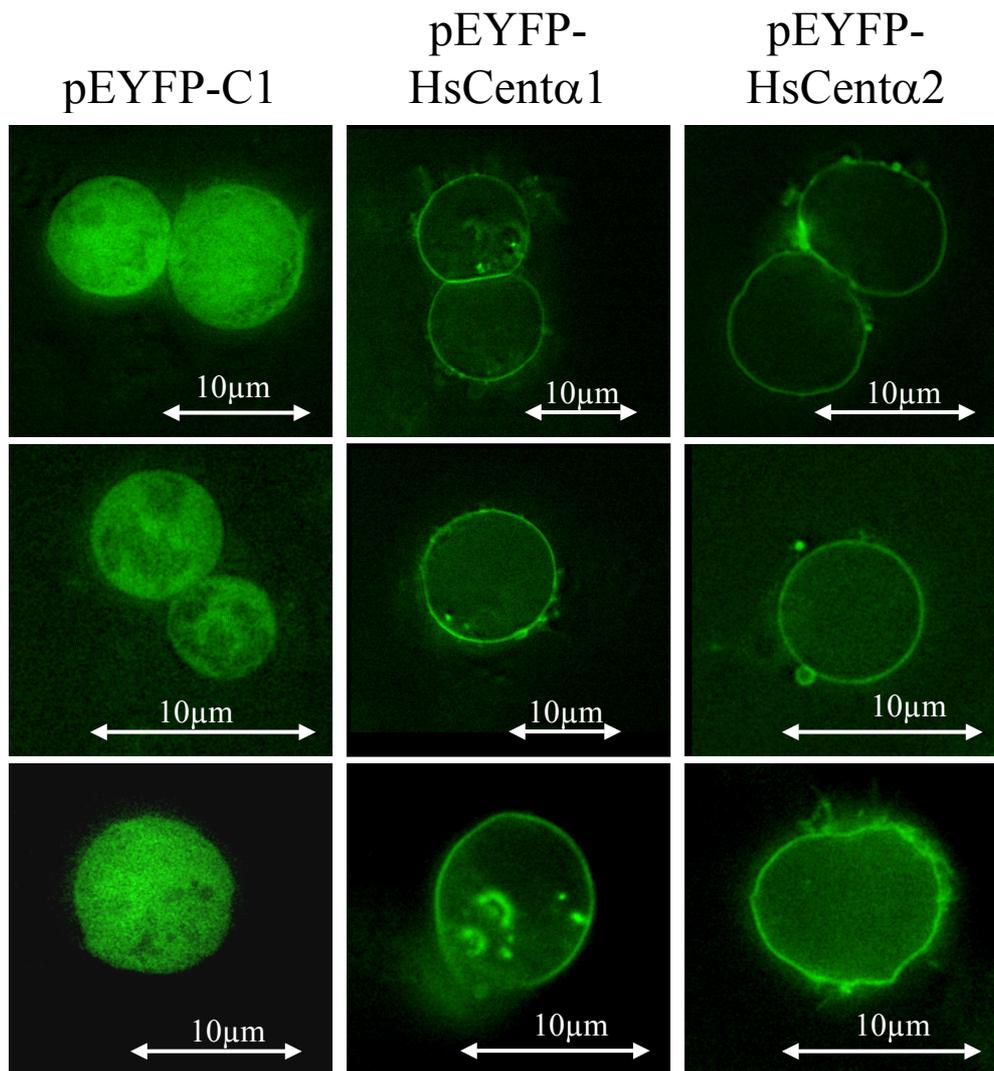
**Abbildung 3.21: Jurkat Zellen transfiziert mit den Plasmiden pEGFP-N1 (links), pHsCent $\alpha$ 1-EGFP (mitte) und pEYFP-HsCent $\alpha$ 1 (rechts). Die erwartete Lokalisation der Fluoreszenz an der Zellmembran ist bei einem Fusionsprotein mit N-terminalen Centaurin $\alpha$ 1 (mitte) deutlich schwächer als wenn sich das Centaurin C-terminal des fluoreszierenden Protein befindet. Diese Bilder sind im Gegensatz zu allen folgenden nicht konfokal mit einer Spiegelreflexkamera und einem Diafilm aufgenommen. Der Qualitätsunterschied ist deutlich erkennbar.**

Als Konsequenz aus diesem Versuch wurde von dem HsCentaurin alpha2 nur ein Vektor mit n-terminalem EYFP hergestellt: pEYFP-HsCentaurin alpha2.

Das EYFP ohne fusioniertes Centaurin verteilt sich recht gleichmäßig über die ganze Zelle, ohne einen unterschied zwischen Zytoplasma oder Zellkern erkennen zu lassen. Dennoch erkennt man einige Bereiche mit deutlich geringerer Fluoreszenz. Diese sind teilweise größere, zusammenhängende Bereiche im Zellkern, teilweise kleinere, vesikuläre Strukturen. Eine bevorzugte Assoziation der Fluoreszenz, wie bei den EYFP-Centaurin-Fusionskonstrukten ist aber nicht zu erkennen.

### 3 Ergebnisse

Dagegen lokalisieren sowohl das Centaurin alpha1 als auch HsCentaurin alpha2 in einem scharf begrenzten Saum an der Plasmamembran. Eine gleichmäßig flächen-, bzw. raumfüllende Zytoplasmatische oder nukleäre Lokalisation ist, wenn sie überhaupt zu erkennen ist, nur sehr schwach ausgeprägt. Wenn stärkere Fluoreszenz außerhalb des Plasmamembransaaumes zu finden ist, dann ist sie auch hier wieder scharf lokalisiert und oft mit vesikulären Ausstülpungen assoziiert, wobei sie auch hier die Vesikelmembran markiert.

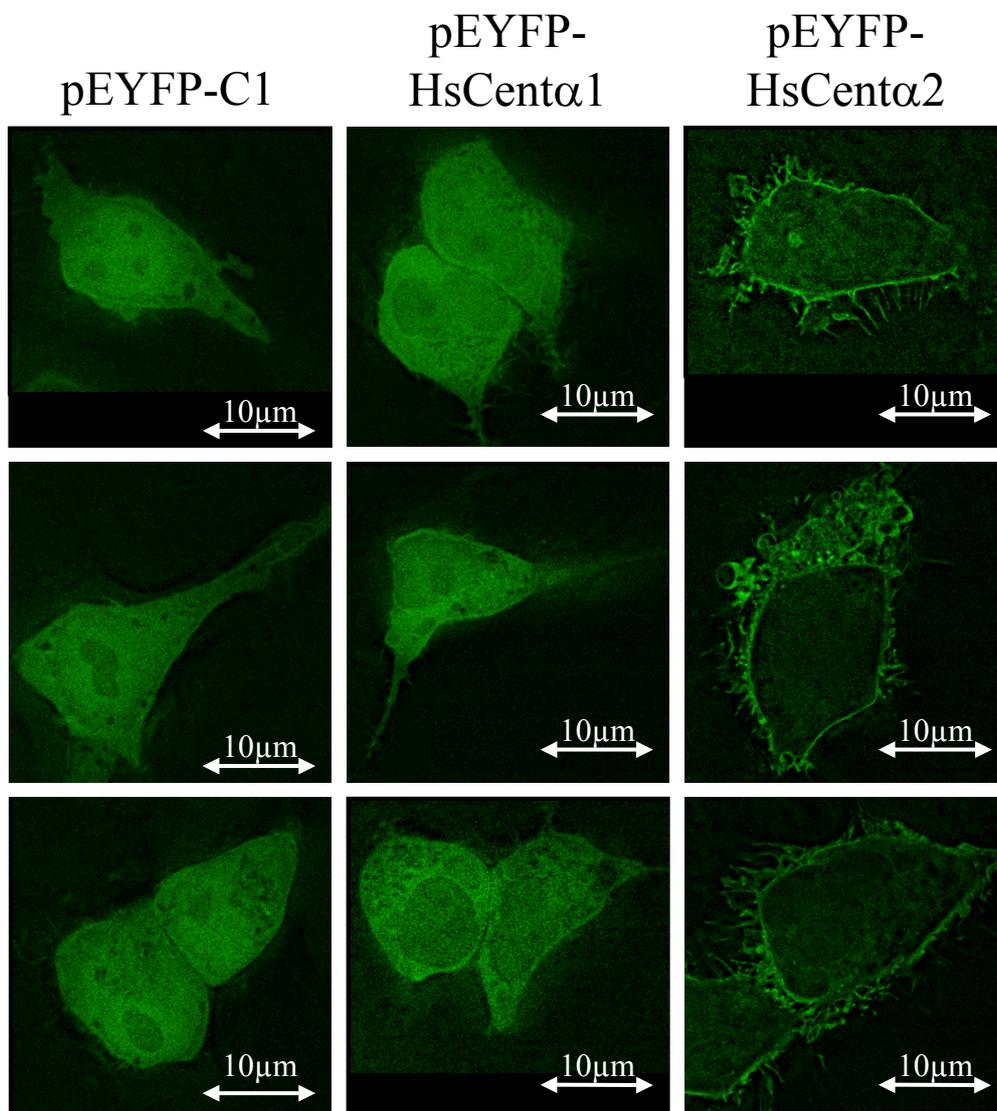


**Abbildung 3.22: Jurkat T-Lymphozyten transfiziert mit pEYFP-C1 (linke Spalte), pEYFP-HsCent $\alpha$ 1 (Mitte) und pEYFP-HsCent $\alpha$ 2 (rechts). Zum Vergleich sind jeweils mindestens drei verschiedene Zellen abgebildet.**

### 3.4.2 NT2 Zellen

Die Lokalisation in NT2 Zellen ist in sofern interessant, als dass das Centaurin $\alpha$ 1 in diesen Zellen exprimiert wird. Die Transfektion erfolgte wie im Methodenteil beschrieben mit Calciumphosphat. Es handelt sich um neuronale Vorläuferzellen, die aus einem humanem Teratokarzinom isoliert wurden [Andrews et al. 1984].

Für die Fluoreszenzverteilung des EYFPs gilt ähnliches, wie es bereits bei den Jurkat Zellen erwähnt ist. Da NT2 Zellen einen breiteren Zytoplasmaraum als Jurkat Zellen haben, ist nun die Verteilung im Zytoplasma besser zu beurteilen. Die Fluoreszenz des



**Abbildung 3.23:** NT2 transfiziert mit pEYFP-C1 (obere Reihe), pEYFP-HsCent $\alpha$ 1 (Mitte) und pEYFP-HsCent $\alpha$ 2 (unten). Zum Vergleich sind jeweils drei verschiedene Zellen abgebildet pro Reihe.

### 3 Ergebnisse

---

EYFP ist wieder recht gleichmäßig über die Zelle verteilt. Man meint zu erkennen, dass der Zellkern etwas stärker als das Zytoplasma markiert ist. Eine deutliche punktuelle Anreicherung, insbesondere der Zellmembran, ist nicht zu erkennen. Dafür gibt es Bereiche mit geringerer Fluoreszenz, sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma. Die Aussparungen im Zellkern sind im Hellfeld deutlich als Nukleoli zu erkennen, während es sich bei denen im Zytoplasma um nicht näher zu differenzierende Vesikel handelt.

Die Verteilung des EYFP-Centaurin alpha 1 Fusionsproteins weicht dagegen deutlich von dem Bild in Jurkat Zellen ab. Sie ist ähnlich dem des EYFP, dennoch ist der Zellkern etwas schwächer fluoreszierend als des Zytoplasma. Eine bevorzugte Lokalisation an der Zellmembran, wie bei den Jurkat Zellen, ist nicht zu finden. Für die Aussparungen, insbesondere der Nukleoli, gilt das gleiche wie oben bereits zum EYFP erwähnte.

Das EYFP-Centaurin alpha 2 Fusionskonstrukt dagegen zeigt auch in den NT2 Zellen eine bevorzugte Lokalisation an der gesamten Zellmembran. Dabei werden auch Zellausläufer und Vesikel markiert. Die Fluoreszenz im Zytoplasma ist nur sehr spärlich ausgeprägt. In einigen Zellen ist der Zellkern durch eine weitere Senke in der Intensität zu erkennen. Am auffälligsten ist aber die Markierung der gesamten Zellmembran, die auch eine Vielzahl kleiner Zellausläufer mit einschließt, die kaum Zytoplasma enthalten. Man kann somit einen guten Eindruck von der äußeren Form der Zellen erhalten.

### 3.4.3 PC12 Zellen

PC12 Zellen sind aus einem Phäochromozytom einer Ratte isoliert worden und somit wie die NT2 Zellen auch neuronalen Ursprungs [Greene u. Tischler 1976]. Diese Zellen sind in dieser Arbeit in sofern interessant, als dass an ihnen die in dem nächsten Abschnitt beschriebenen Lokalisationsexperimente nach Stimulation durchgeführt wurden.

Die Fluoreszenzverteilung des EYFP in den PC12 Zellen ist gleichmäßig im Zytoplasma und etwas stärker im Zellkern ausgeprägt. Andere Anreicherungen der

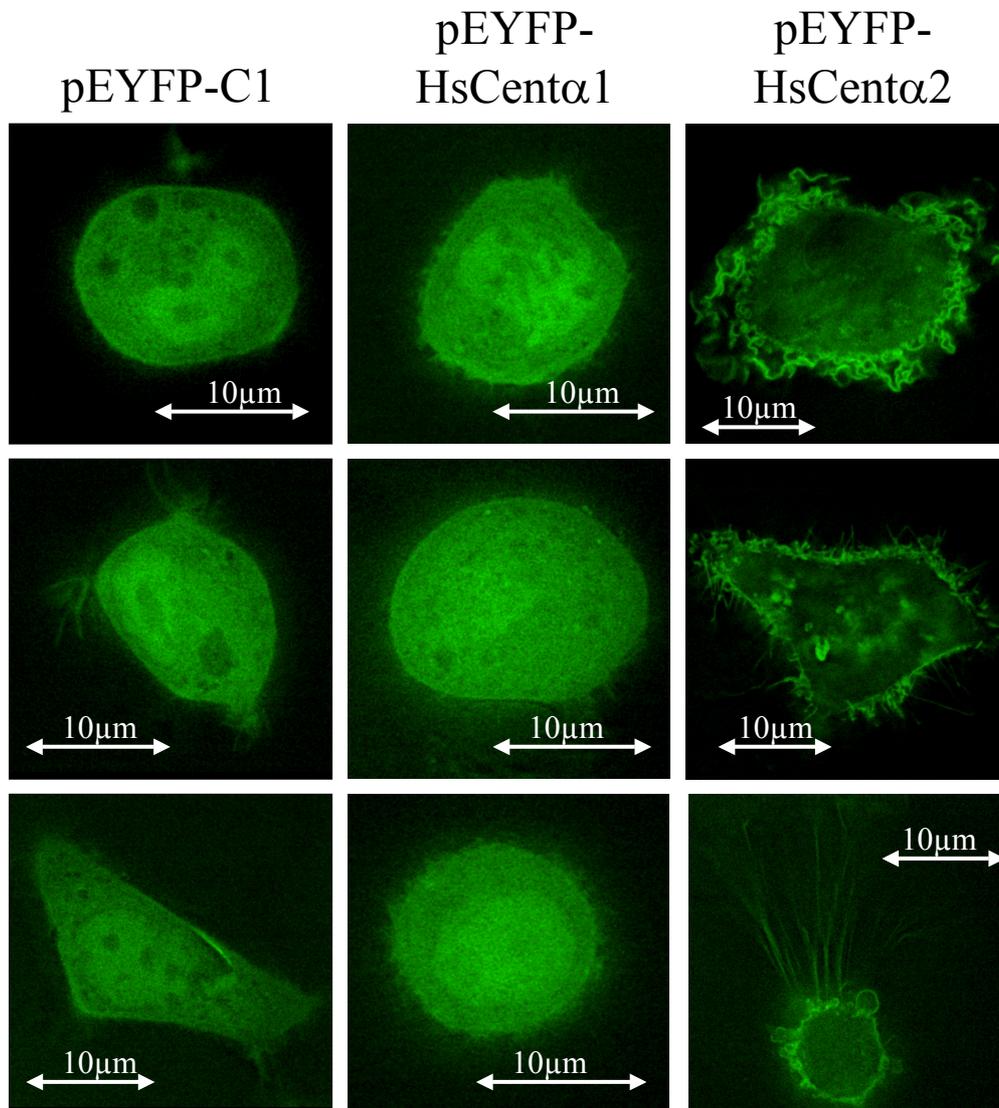


Abbildung 3.24: PC12 Zellen transfiziert mit pEYFP-C1 (linke Spalte), pEYFP-HsCent $\alpha$ 1 (Mitte) und pEYFP-HsCent $\alpha$ 2 (rechts). Zum Vergleich sind pro Plasmid jeweils drei verschiedene transfizierte Zellen abgebildet.

### 3 Ergebnisse

---

Fluoreszenz sind nicht erkennen. An der etwas schwächer ausgeprägten Fluoreszenz sind die Nukleoli und zytoplasmatische Granula zu erkennen.

Die Fluoreszenz in den EYFP-Centaurin  $\alpha 1$  transfizierten Zellen gleicht vom Verteilungsmuster der in den EYFP transfizierten Zellen.

Das EYFP-Centaurin  $\alpha 2$  Konstrukt weicht in seiner Verteilung dagegen in der schon bei den NT2 Zellen bemerkten Weise davon ab. Die Fluoreszenz ist an der gesamten Plasmamembran verteilt, was teilweise zu bizarren Mustern führen kann und stellt dabei auch längere, dendritische Zellausläufer da. Auffällig ist weiterhin, daß sich seltener die für PC12 Zellen normale runde Zellform, sondern die Zellen meist flacher und ausgebreiteter wachsen. Außerdem sieht man oft Zellen, die von vielen vesikulären Ausstülpungen umgeben sind, was den Anschein macht, als ob sie in Apoptose gehen würden.

### 3.4.4 CHO Zellen

CHO (chinese hamster ovary) sind nach einer Punktion des Ovars eines adulten Hamsters als Zelllinie etabliert worden [Puck et al. 1958].

Die Verteilung des EYFPs allein gleicht denen in den anderen Zellen. Dies beinhaltet eine Akzentuierung des Kerns, ansonsten keine bevorzugte Lokalisation. Bei einigen Zellen ist auch eine etwas stärkere Fluoreszenz am Rand zu erkennen, das Muster unterscheidet sich aber deutlich von dem des EYFP-Centaurin $\alpha$ 2 Fusionskonstrukts: Abgesehen von der Fluoreszenzverteilung im Zytoplasma und im Kern, ist der Rand nicht so vollständig und so scharf abgegrenzt und die Markierung der Zellausläufer

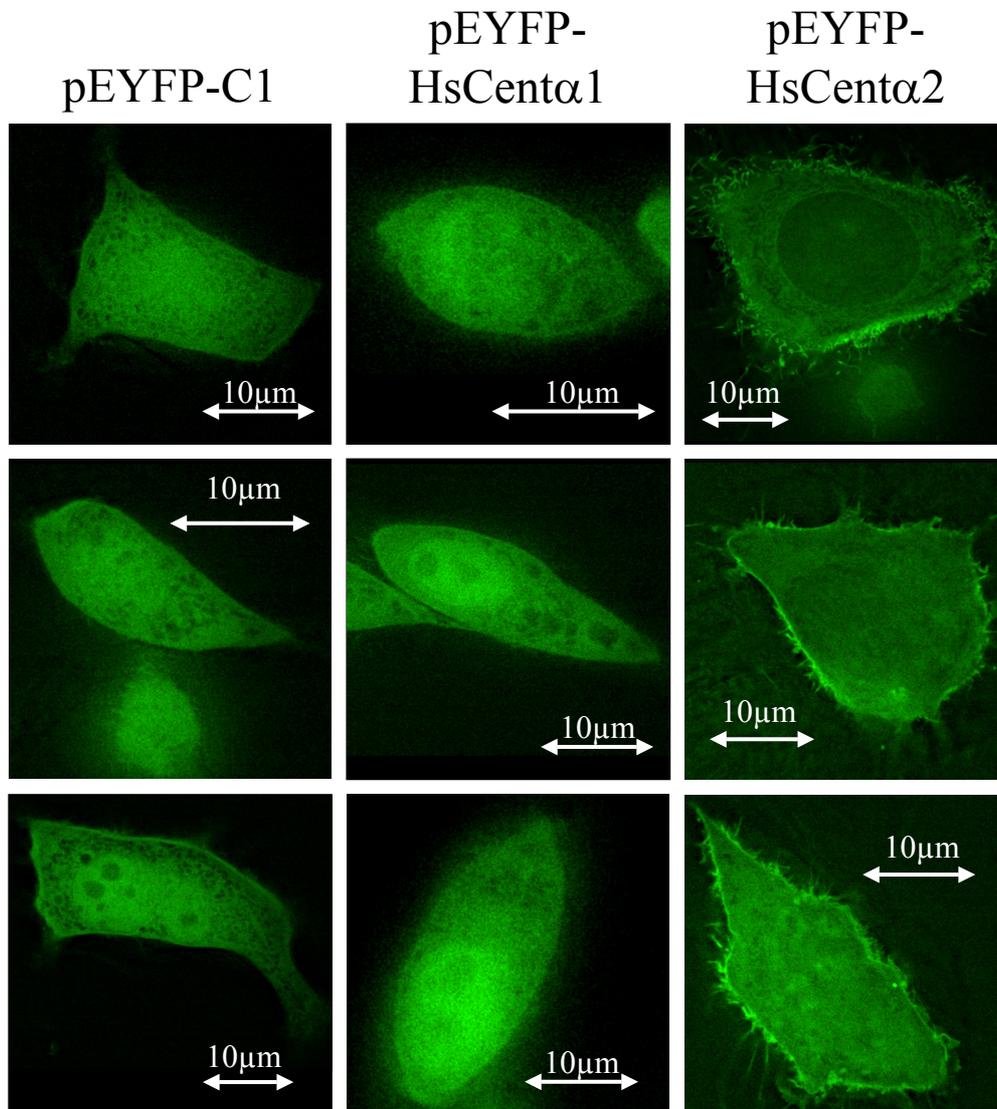


Abbildung 3.25: CHO Zellen transfiziert mit pEYFP-C1 (obere Reihe), pEYFP-HsCent $\alpha$ 1 (Mitte) und pEYFP-HsCent $\alpha$ 2 (unten). Zum Vergleich sind jeweils drei Zellen abgebildet pro Reihe abgebildet.

### 3 Ergebnisse

---

fehlt. Auffällig sind bei den CHO Zellen die vielen zytoplasmatischen Granula, die ausgespart bleiben.

Das Fluoreszenzmuster des EYFP-Centaurin $\alpha$ 1 Konstrukts gleicht dem des EYFPs. Wesentliche Unterschiede sind nicht zu erkennen.

Die Verteilung des EYFP-Centaurin $\alpha$ 2 dagegen weicht wieder deutlich von den anderen ab. Wieder ist bevorzugt die Zellmembran mit ihren vielen, kleinen Ausläufern markiert. Allerdings findet man hier, im Gegensatz zu den anderen Zelllinien, auch eine deutliche, gleichmäßige Fluoreszenz des Zytoplasmas in welcher die Lage des Zellkerns durch eine abgeschwächte Fluoreszenz zu erkennen ist.

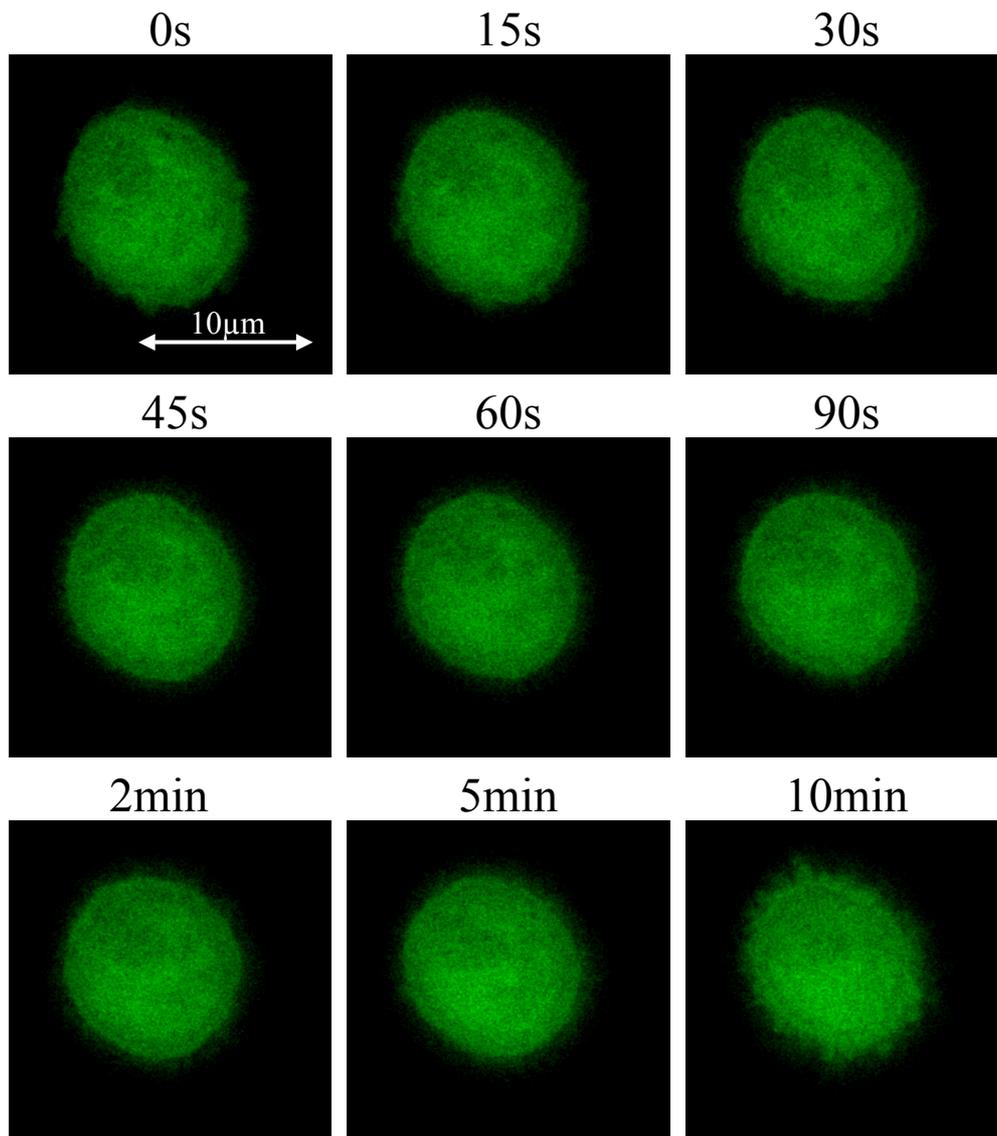
### **3.5 Zeitverläufe nach Stimulation**

Neben der Lokalisation der Centaurine in unstimulierten Zellen zu *einem* Zeitpunkt, die ja auch ohne weiteres durch Immunzytochemie in *fixierten* Zellen durchgeführt werden kann, lässt sich der Vorteil der *in vivo* Lokalisation durch Fusion mit EYFP vor allem bei der Beobachtung der Lokalisation über einen Zeitraum zu *mehreren* Zeitpunkten erkennen. In dieser Arbeit wurden transfizierte PC12 Zellen beobachtet, die durch 20nM EGF stimuliert wurden. Außerdem erfolgten Hemmversuche mit 100nM Wortmannin, einem spezifischen PtdIns 3-OH Kinase Hemmstoff. Die Beobachtung erfolgte dabei bis zu einer Stunde. Die PC12 Zellen wurden als Modellzelllinie gewählt, weil in diesen Zellen bereits in ähnlichen Versuchen eine Translokation von putativen PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> bindenden Proteinen wie dem GRP1 [Venkateswarlu et al. 1998b] und dem ARNO [Venkateswarlu et al. 1998] gezeigt werden konnte.

Als Negativkontrolle, um einen Effekt des EYFP auszuschließen, wurde immer noch eine parallele Transfektionsreihe mit EYFP stimuliert und beobachtet.

### 3.5.1 Verhalten des EYFP nach Stimulation

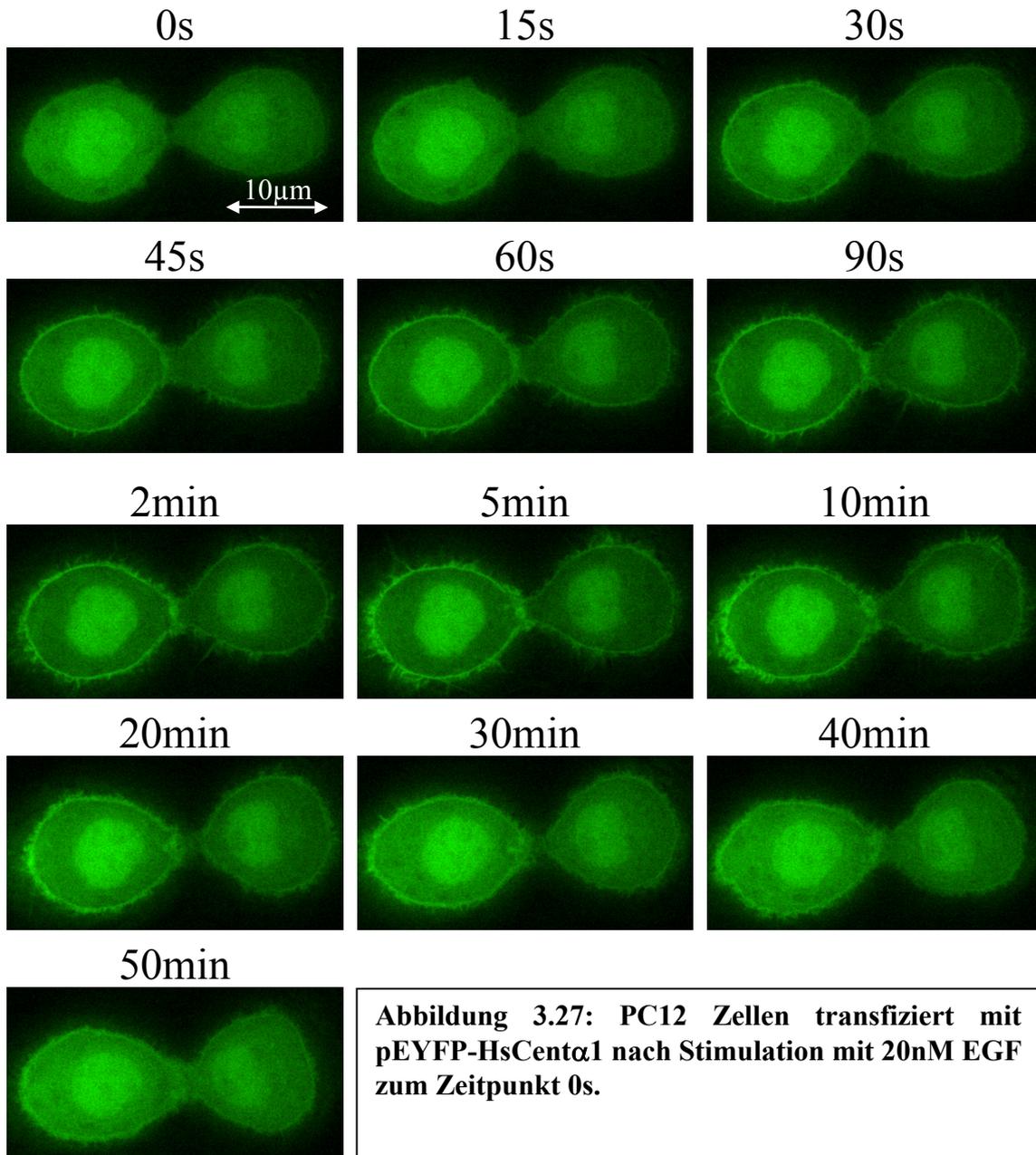
Nach Stimulation von pEYFP-C1 transfizierten PC12 Zellen mit 20nM EGF konnte keine Translokation der Fluoreszenz beobachtet werden. Der unten abgebildete Zeitverlauf über 10 Minuten ist typisch. Eine Translokation nach Stimulation in folgenden Experimenten kann also nicht auf den EYFP-Teil des Fusionsproteins zurückgeführt werden.



**Abbildung 3.26: Zeitverlauf einer PC12-Zelle transfiziert mit pEYFP-C1 nach Stimulation mit 20nM EGF zum Zeitpunkt 0s. Es ist keine Translokation der**

### 3.5.2 Verhalten des EYFP-Centaurin $\alpha$ 1 Fusionsproteins nach Stimulation

Das EYFP-Centaurin  $\alpha$  1 Fusionsprotein zeigt nach Stimulation mit 20nM EGF ein typisches Translokationsverhalten: Schon nach 15 Sekunden lässt sich in den quasikonfokalen Bildern eine Anreicherung der Fluoreszenz an der Zellmembran

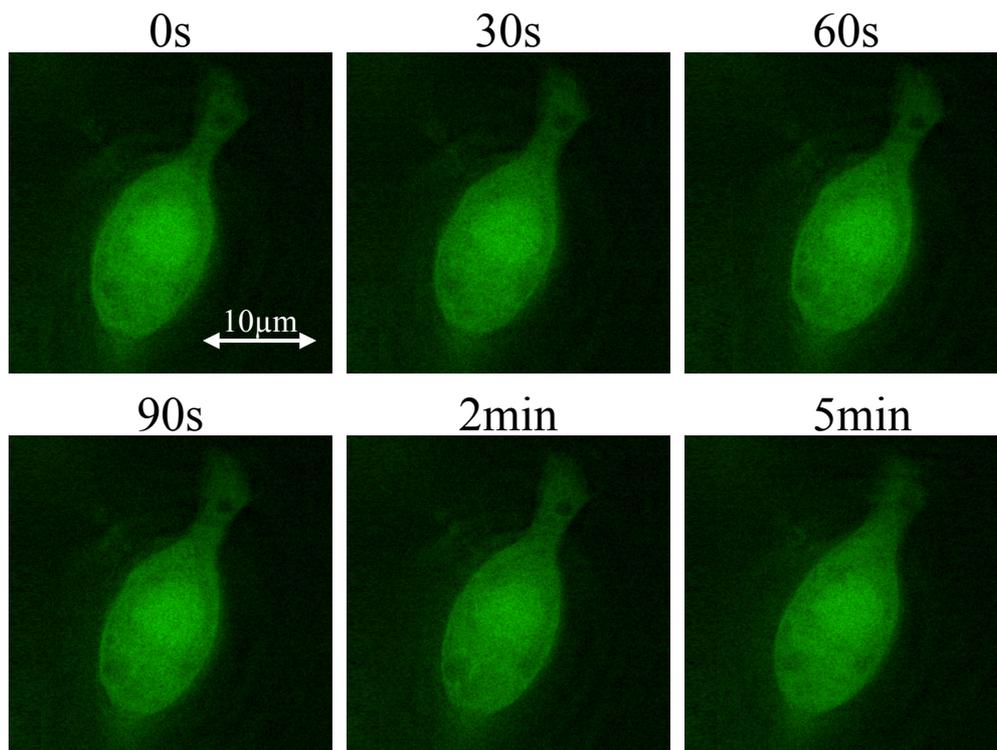


erkennen. Im weiteren Verlauf ist dann eine weitere Verschiebung der Fluoreszenz vom Zytoplasma zur Zellmembran zu beobachten, die zwischen 2 und 10 Minuten am deutlichsten ausgeprägt ist. Dabei werden auch kleine Zellausläufer sichtbar, die vorher

### 3 Ergebnisse

nicht zu sehen waren, wohl weil sie kaum Zytoplasma enthalten. Nach 20 Minuten beginnt eine Rückverteilung der Fluoreszenz zum Zytoplasma, so dass nach 50 Minuten nur noch wenig von der vorangegangenen Stimulation zu sehen ist. Die Fluoreszenzintensität im Zellkern ändert sich über diesen Zeitraum nicht erkennbar, nimmt aber relativ zum Zytoplasma, aus dem die Fluoreszenz zur Membran geht, zu. Bei sieben ebenso behandelten Zellen ließ sich eine vergleichbare Translokation beobachten.

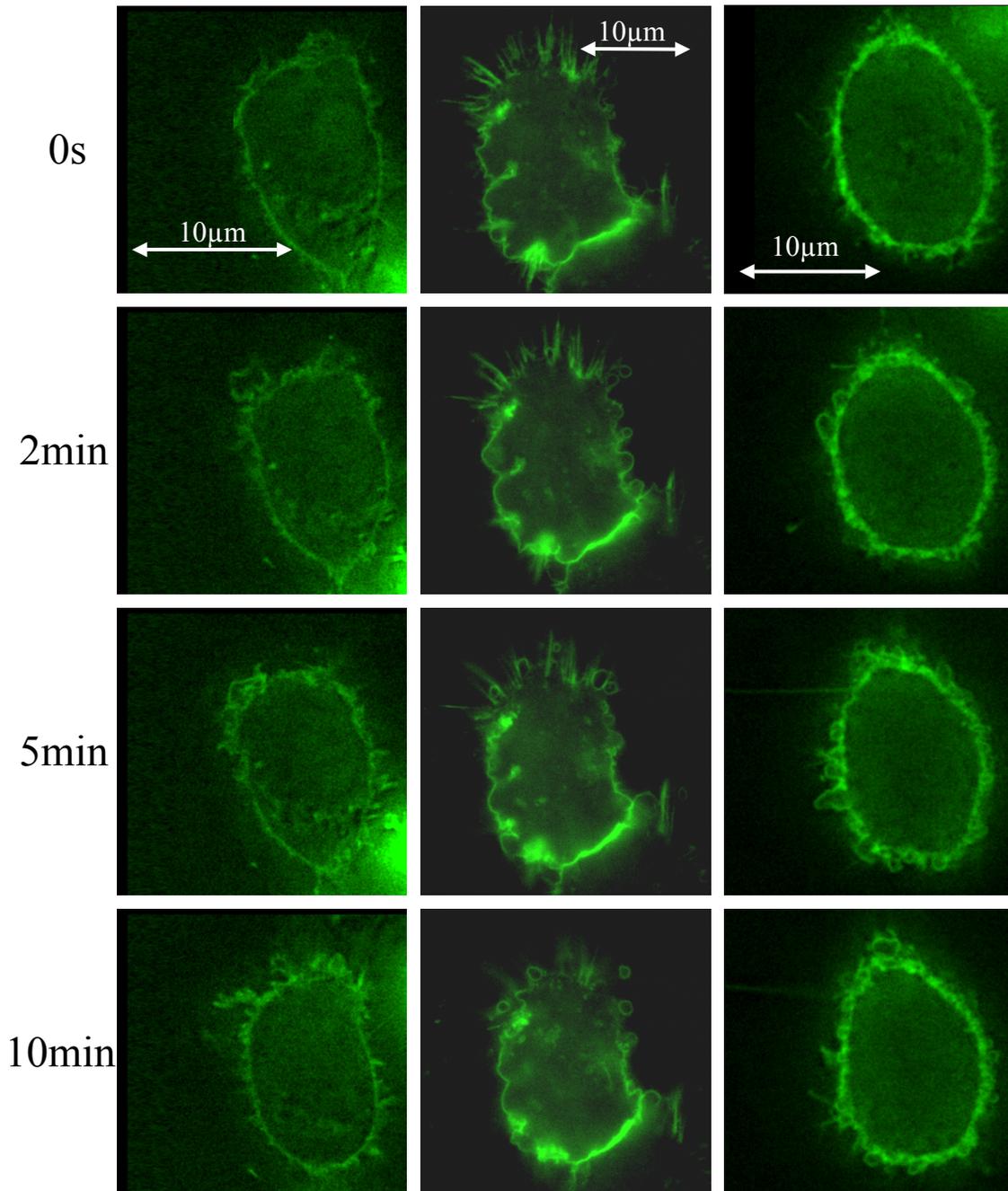
Der Translokationsvorgang lässt sich durch vorherige Inkubation der Zellen in 100mM Wortmannin vollständig verhindern. Wie der Abbildung ersichtlich ist nach Stimulation mit EGF bei vorausgegangener Inkubation mit Wortmannin keine Änderung des Fluoreszenzmusters auch nach mehreren Minuten zu sehen. Bei drei weiteren Zellen wurde ein ähnliches Resultat erzielt.



**Abbildung 3.28: Zeitverlauf einer PC12-Zelle transfiziert mit pEYFP-HsCent $\alpha$ 1 nach Stimulation mit 20nM EGF zum Zeitpunkt 0s. Die Zelle war vor Stimulation 10 Minuten mit 100mM Wortmannin inkubiert worden.**

### Verhalten des EYFP-Centaurin $\alpha$ 2 Fusionsproteins nach Stimulation

Das EYFP-Centaurin $\alpha$ 2 Fusionsprotein befindet sich schon im unstimulierten Zustand der Zellen bevorzugt an der Membran. Es wurden 5 Zellen mit 20nM EGF stimuliert und über einen Zeitraum bis zu 20 Minuten beobachtet. Dabei konnte in der direkten Beobachtung während des Versuchs und auch nach Betrachtung der konfokalen Bilder

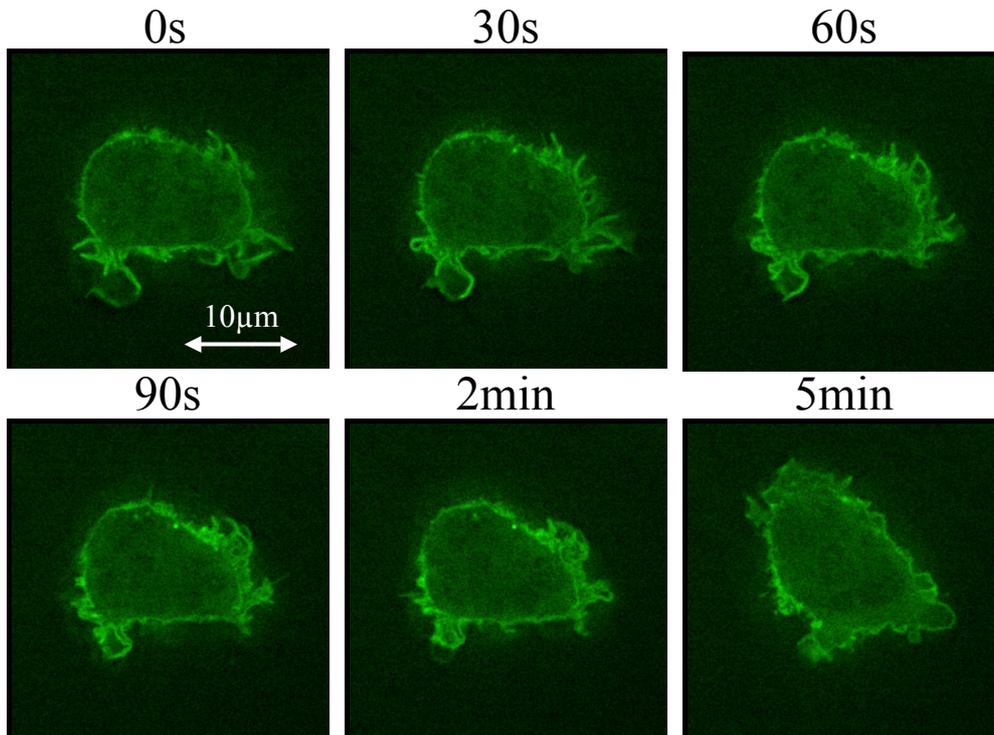


**Abbildung 3.29: Drei PC12 Zellen mit pEYFP-HsCent $\alpha$ 2 transfiziert und zum Zeitpunkt 0 Sekunden mit 20nM EGF stimuliert. Eine deutliche Translokation wie sie beim Centaurin $\alpha$ 1 zu beobachten war, ist nicht zu erkennen.**

### 3 Ergebnisse

keine Translokation oder sonst irgendeine Veränderung der Fluoreszenzverteilung beobachtet werden. Abbildung 3.29 zeigt dies an drei verschiedenen Zellen.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit Wortmannin erbrachte keinen Unterschied: Nach Stimulation der vorbehandelten Zellen war keine deutliche Verschiebung des Fluoreszenzmusters zu erkennen.



**Abbildung 3.29: Zeitverlauf einer PC12-Zelle transfiziert mit pEYFP-HsCent $\alpha$ 1 nach Stimulation mit 20nM EGF zum Zeitpunkt 0s bei vorheriger Inkubation mit Wortmannin. Es handelt sich hierbei um die gleiche Zelle. Der scheinbare Wechsel im Aussehen zum Zeitpunkt 5 Minuten ist durch ein Abrutschen der Fokusebene bedingt.**

## 4 Diskussion

### ***4.1 Bedeutung der Unterschiede in der Sequenz des Centaurin $\alpha$ der Ratte***

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere cDNAs z.T. erstmals kloniert. An erster Stelle war die Klonierung des Centaurin $\alpha$ 1 der Ratte beschrieben. Als Ausgangspunkt diente eine bereits veröffentlichte cDNA Sequenz [Hammonds-Odie et al., 1996]. Wie bereits erwähnt ließ sich die Sequenz in der Form auch nach mehreren Anstrengungen nicht bestätigen. Die statt dessen erhaltene cDNA-Sequenz, RnCentaurin $\alpha$ 1b genannt um sie von dem veröffentlichten RnCentaurin $\alpha$ 1a zu unterscheiden, kodiert für ein Protein, das den Formen der anderen Spezies (Rind, Schwein und Mensch) viel ähnlicher ist. Es stellt sich somit die Frage, welche Bedeutung diesen beiden Formen zukommt.

Eine genauere Untersuchung der beiden Sequenzen ergibt (Siehe auch Abbildung 3.6), dass es sich bei den Insertionen im RnCentaurin $\alpha$ 1a mit zwei Ausnahmen, und zwar dem letzten Guanin in der für die PH-Domäne kodierenden Bereich und der Insertion im 3'-nichtkodierenden Bereich, um Wiederholungen des vorausgegangenen oder der vorausgegangenen Nukleotide handelt. Dies deutet darauf in, dass es sich bei vielleicht um Artefakte handelt, die z.B. bei der Erstellung der cDNA oder der anschließenden Amplifikation der Sequenz aufgetreten sein könnten.

Zu einem gleichen Ergebnis kommt eine andere Arbeit [Aggensteiner et al., 1998], die in dem Labor von G. Reiser durchgeführt wurde, in dem das Centaurin $\alpha$ 1 Homologe des Schweins das p42<sup>IP4</sup> kloniert wurde. Auch in dieser Arbeit wurde versucht, durch RT-PCR aus den Gehirnen unterschiedlich alter Ratten (1 Tag und 14 Tage post natal und adult) das Centaurin $\alpha$  zu reamplifizieren. Dies ist nicht gelungen. Stattdessen wurde nur eine cDNA amplifiziert, die derjenigen von mir klonierten gleicht. Sie weist keine Insertionen auf und kodiert für ein 42kDa großes Protein mit zwei PH-Domänen und einem nicht verlängertem C-Terminus. Weiterhin wurden Westernblot Untersuchungen an Rattenhirnlysaten durchgeführt. Hier ließ sich nur eine etwa 42kDa große Bande, aber keine 46kDa Bande, wie sie dem Centaurin $\alpha$ 1a entsprechen würde, nachweisen. Das entsprechende Protein wurde von den Autoren p42<sup>IP4</sup>rat genannt und

entspricht dem RnCentaurin $\alpha$ 1b.

Die Tatsachen, dass zwei Labors unabhängig voneinander die Sequenz des Centaurin $\alpha$ 1a der Ratte nicht nachweisen konnten, dass sich kein 46kDa großes Protein im Westernblot nachweisen lässt und außerdem die Art der Insertionen und die viel höhere Homologie des RnCentaurin $\alpha$ 1b/p42<sup>IP4</sup> zu den Centaurinen der anderen Spezies, können als deutliche Hinweise gedeutet werden, dass es sich bei dem Centaurin $\alpha$ 1a um ein Artefakt handelt und dass das RnCentaurin $\alpha$ 1b/p42<sup>IP4</sup> als das eigentliche Gen angesehen werden muss.

### 4.1.1 Putative Spleißvarianten des Centaurin $\alpha$ der Ratte

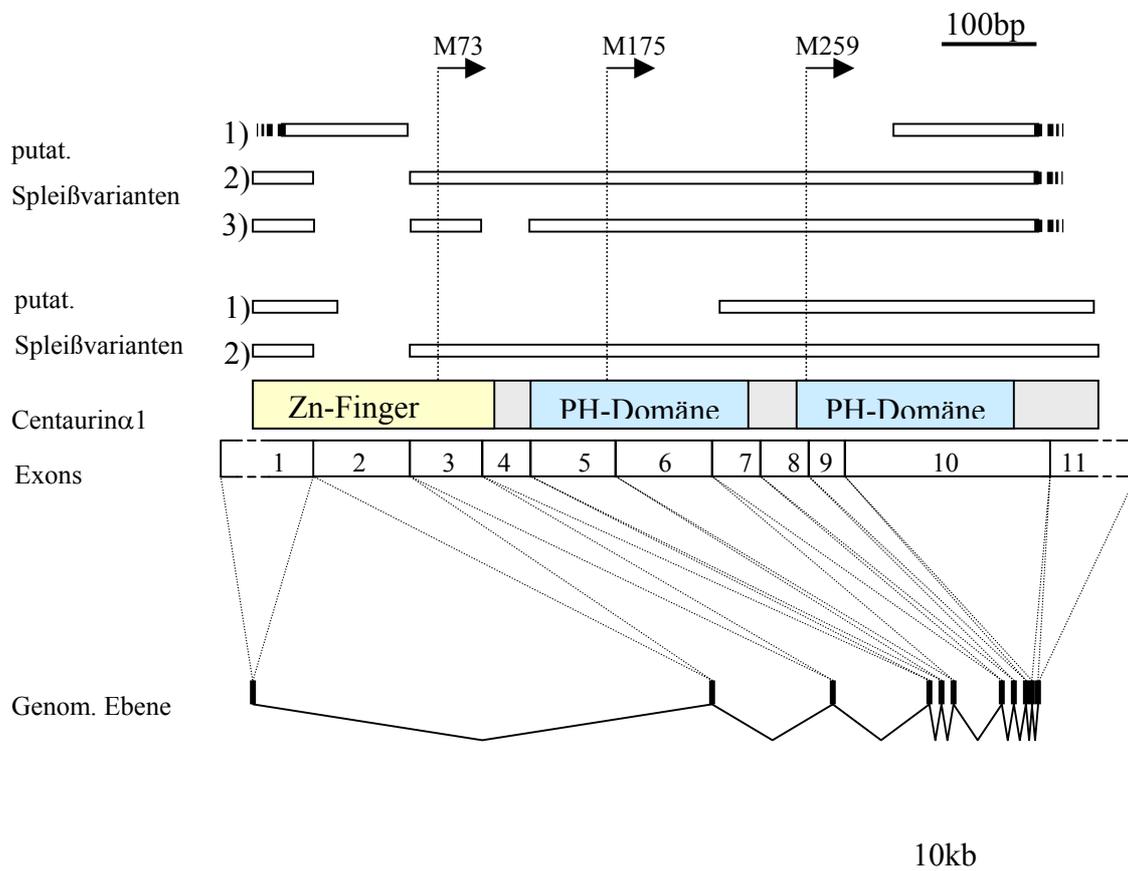
Weiterhin wurde die Klonierung von drei cDNA Sequenzen erwähnt, die eine und in einem Fall zwei größere Deletionen von teilweise über mehreren hundert Basenpaaren aufwiesen. Die Art dieser Deletionen lässt an Spleißvarianten denken, bei denen einzelne Exons herausgespleißt wurden. Deshalb wurde auch die Bezeichnung putative Spleißvarianten gewählt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass es sich um Artefakte handelt, die z. B. im Rahmen der PCR entstanden sind. Da sich bereits die verkürzten Banden in der Agarosegelelektrophorese nach PCR zeigten, ist eine Entstehung dieser Sequenzen als Klonierungsartefakte sehr unwahrscheinlich.

Einen Hinweis, ob es sich tatsächlich um Spleißvarianten handeln könnte, könnte eine Untersuchung auf genomischer Ebene bringen. Würde es sich hierbei herausstellen, dass es sich bei den deletierten Bereichen um Exons handelt, wäre dies eine Bestätigung für die Hypothese, dass es Spleißvarianten und nicht Artefakte sind. Eine BLAST-Suche gegen das Genom der Ratte erbrachte bis jetzt (Dezember 2001) leider keine Ergebnisse. Es wurden aber auch humane putative Spleißvarianten gefunden. Eine von diesen weist sogar in dem gleichen Bereich eine Deletion aufweist, wie eine Sequenz der Ratte. Dies legt nahe, dass es sich um vergleichbare Phänomene handelt. Außerdem ist von dem humanen Genom zumindest auf eine vorläufige Version zugreifbar. Aus diesen Gründen ist die Diskussion der putativen Spleißvarianten des Centaurin $\alpha$  der Ratte mit in das nächste Kapitel aufgenommen worden.

## 4.2 Genstruktur des humanen Centaurin $\alpha 1$ und die putative Splicevarianten

Eine BLAST-Suche mit der cDNA Sequenz des humanen Centaurin $\alpha 1$  gegen die in GenBank abgelegte vorläufige Sequenz des humanen Genoms lieferte einige Daten zur genomischen Struktur des Centaurin $\alpha 1$ -Gens (Durchgeführt: 10/2001). Das Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom7 lokalisiert. Es besteht aus 11 Exons, die sich über eine Länge von etwa 55kb aufteilen.

Eine besondere Rolle spielen die Intron-Exon-Grenzen bzw. die Exon-Exon-Grenzen bei der Beurteilung der beiden klonierten putative Spleißvarianten. Könnte man zeigen, dass die deletierten Bereiche mit Exons zusammenfallen, wäre dies ein wichtiges



**Abbildung 4.1: Vergleich der putativen Spleißvarianten von Ratte und Mensch mit der Exonstruktur des humanen Centaurin $\alpha 1$ . Unten ist die Organisation Exons auf genomischer Ebene angegeben. Das Symbol '|||' bei den putativen Spleißvarianten der Ratte sollen darstellen, dass die Unvollständigkeit der Sequenz an dieser Stelle nur durch die Lage der Primer bedingt ist. Weiterhin sind mögliche alternative Translationsstarts eingezeichnet, denen eine Bedeutung im Zusammenhang mit den putativen Spleißvarianten zukommen könnte.**

Humanes Centaurin $\alpha$ 1 :		Centaurin $\alpha$ 1b der Ratte:	
Kozak	GCCACCATGG	Kozak	GCCACCATGG
	G		G
Start	GCGGCCATGG	Start	GCAGGCCATGG
M73	GAGTTCATGG	M73	GAGTTCATGA
M175	GCCGTGATGA	M175	T T ATGA
M259	GGCTACATGG	M259	G TA ATG

**Abbildung 4.2: Vergleich der Sequenzen die für des realen und die putativen Startmethionine codieren mit der eukaryotischen Transkriptionsstartsequenz (Kozak, ganz oben) nach [Kozak, 1991]. Die hochkonservierten Basen (Purin an Position -3 und Guanin an Position 4) sind rot markiert. Alle homologen Basen sind gelb unterlegt.**

Argument in Richtung Authentizität der putative Spleißvarianten.

Weiterhin wurden die putativen Spleißvarianten der Ratte mit in diesen Teil aufgenommen. Eine schematische Übersicht aller klonierten putativen Spleißvarianten zusammen einer Skizze der Intron-Exon-Struktur findet sich in Abbildung 4.1. Diese Abbildung dient auch als Grundlage für folgende Ausführungen. Ein erster Vergleich der putativen Spleißvarianten des Menschen mit denen der Ratte ergibt, dass der deletierte Bereich der humanen putativen Spleißvariante 2) genau mit dem deletierten Bereich der putativen Spleißvarianten 2) und 3) der Ratte übereinstimmt. Die Formen 2) aus Mensch und Ratte stimmen damit völlig überein, während die putative Spleißvariante 2) der Ratte etwas 3'-wärts noch eine weitere Deletion aufweist. Allein schon dieser Umstand ist ein Hinweis, dass diese Sequenzen reelles Spleißen reflektieren können. Eine Vergleich mit der Exonstruktur des Centaurin $\alpha$ 1 des Menschen zeigt, dass alle Deletionen in diesen genau mit einzelnen Exons übereinstimmen. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass es sich um Spleißvarianten handelt und nicht um zufällig artifiziell entstandene Deletionen.

Bei den beiden putativen Spleißvarianten 1) des Menschen und der Ratte ist dies anders. Die Deletionen halten sich nicht an Intron-Exon-Grenzen und stimmen auch mit keiner der anderen Formen überein. Die 5'-Grenze der Deletion von Form 1) der Ratte liegt zwar sehr nah an der 3'-Grenze von Exon 2, stimmt aber nicht ganz mit dieser überein, sondern ist um 4 Basenpaare 5'-wärts verschoben. Bei diesen Formen handelt es sich also vermutlich nicht um Spleißvarianten. Die Bewertung der Entstehung dieser beiden Sequenzen ist schwierig.

Es sei noch bemerkt, dass durch alle diese Deletionen Verschiebungen im Leseraster des ersten Teils der Sequenz auftreten. Dadurch entsteht nach Translation also nicht ein Protein, in dem einfach nur bestimmte Abschnitte fehlen, sondern die Translation bricht kurz nach der Deletion ab. Eine weitere Möglichkeit ist, dass putativen alternativen Spleißprodukte von einem alternativen Startcodon translatiert werden. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die umgebende Sequenz des Startcodons und weiterer im Leseraster liegender Methionen-Codons mit der von Kozak [Kozak, 1987] veröffentlichten Konsensussequenz verglichen (Abbildung 4.2). Hierbei stellt sich heraus, dass die Umgebung des Startmethionins sehr gut mit der Konsensussequenz übereinstimmt. Die Umgebung aller weiteren Methionine zeigt eine weitaus schlechtere Übereinstimmung mit der Konsensussequenz. Als weiteres Startcodon könnte nach diesen Kriterien eventuell noch das Methionin 175 gelten, das sowohl bei Mensch, als auch bei der Ratte den konservierten Purinrest an Position  $-3$  hat. Solche Zusammenhänge können natürlich auch rein auf Zufall beruhen, so dass das Vorhandensein von alternativen Transkriptionsstarts reine Spekulation bleiben, bis solche Produkte auf Proteinebene nachgewiesen sind.

Die Frage ist also nach der Bedeutung dieser Sequenzen. Sie wurden alle durch PCR gewonnen. Diese Methode ist sehr sensitiv und kann auch sehr geringe DNA Mengen amplifizieren. Kürzere Fragmente werden bei der Amplifikation bevorzugt. Es ist möglich, dass diesen Formen keine physiologische Funktion zukommt und sie nur durch PCR selektiert wurden. Ein Nachweis dieser Sequenzen im Northernblot war nicht möglich, da die Sonde so gelegen war, dass sie die Grenze zwischen Exon 2 und Exon 3 überspannt und in diesem Bereich haben alle gefundenen putativen Spleißvarianten eine Deletion.

### **4.3 Genstruktur des humanen Centaurin $\alpha$ 2**

Das humane Centaurin $\alpha$ 2 dagegen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 (17q11.2) in der Nähe des Neurofibromin1 (NF1) Gens lokalisiert. Etwa 5%-20% der Patienten mit Neurofibromatose1, die über einen besonders schweren Phänotyp verfügen, finden sich in diesem Bereich Deletionen von  $\sim 1,5$ Mb. Neben dem NF1 Gen sind durch diese Deletionen mindestens 10 weitere Gene betroffen, zu denen auch das Gen für das Centaurin $\alpha$ 2 gehört [Jenne et al., 2001].

Das Centaurin $\alpha$ 2 wird ebenso wie das Centaurin $\alpha$ 2 durch 11 Exons kodiert. Der

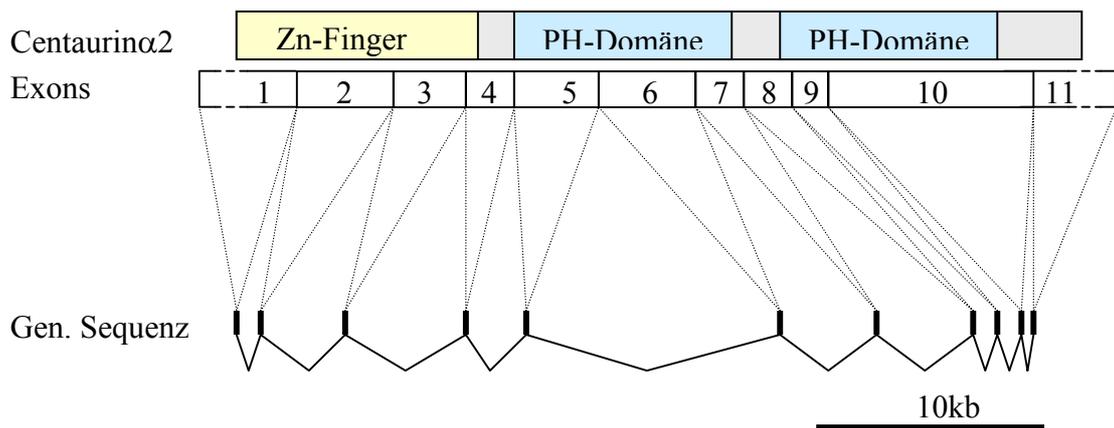


Abbildung 4.3: Organisation der Exons des humanen Centaurin $\alpha$ 2.

Aufbau aus den einzelnen Exons ist bemerkenswerter Weise fast identisch zu dem des Centaurin $\alpha$ 1. Die Exons sind auf genomischer Ebene über einen Bereich von etwa 35kb verteilt.

#### 4.3.1 Das Centaurin $\alpha$ 2 im Vergleich zum Centaurin $\alpha$ 1 auf Sequenzebene

Eine Datenbanksuche nach Centaurin $\alpha$ 1 ähnlichen Sequenzen hat zur Klonierung des Centaurin $\alpha$ 2 geführt. Das Protein ist mit 381 Aminosäuren etwas länger als das Centaurin $\alpha$ 1 mit 374 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz weist eine Identität von 55% auf. Das Centaurin $\alpha$ 2 besitzt, ebenso wie das Centaurin $\alpha$ 1 eine N-terminale Zinkfingerdomäne die dem ARF-GAP homolog ist und zwei putative PH-Domänen. Diese Ähnlichkeiten lassen vermuten, dass das Centaurin $\alpha$ 2 eine ähnliche physiologische Funktion wie das Centaurin $\alpha$ 1 ausüben könnte.

#### 4.4 Vergleich des unterschiedlichen Expressionsmusters der humanen Centaurine $\alpha$ 1 und $\alpha$ 2

Die Expression der humanen Centaurin $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 wurde durch einen Northernblot untersucht in zwölf unterschiedlichen humanen Geweben untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Expressionsmuster der beiden Proteine stark voneinander abweichen. Während das Centaurin $\alpha$ 1 vor allem in Gehirn, in der Niere, im Herz und in Leukozyten exprimiert, dagegen deutlich schwächer in Kolon ohne Mukosa, Lunge, Plazenta, Dünndarm, Leber und Milz. Die mRNA des Centaurin $\alpha$ 2 findet sich vor allem

in Milz, Plazenta, Niere und Leber. Eine schwächere Expression findet in Leukozyten, Lunge Dünndarm und Herz statt. Der Umstand, dass diese beiden Formen recht spezifisch in unterschiedlich differenzierten und spezialisierten Geweben exprimiert werden, deutet darauf hin, dass sie verschiedene Funktionen besitzen, die den jeweiligen Umständen angepasst ist.

Gewebe, in denen beide Formen des Centaurin $\alpha$  in deutlichem Maße exprimiert werden, sind Nierengewebe, Herzgewebe und Leukozyten. Ob beide Formen aber auch in den gleichen Zellen zusammen exprimiert werden, ist durch diese Untersuchung nicht zu entscheiden. Hierzu sind als Methoden *in situ* Hybridisierung oder Immunhistochemie geeignet. Diese sind bislang nur für das Centaurin $\alpha$ 1 an Rattenhirnen durchgeführt worden [Kreutz et al., 1997]. Sie bestätigen das Vorhandensein von Centaurin $\alpha$ 1 im Gehirn und zeigen eine recht spezifische Expression in Neuronen auf. Zu dem Centaurin $\alpha$ 2 liegen hier keine Daten vor.

Außerdem muss bemerkt werden, dass es sich hier um Untersuchungen auf Transkriptionsebene hält. Es ist damit nichts über das Vorhandensein oder gar Abundanz der Proteine ausgesagt ist. Hier sind immunologische Nachweise, wie Westernblot oder Immunhistochemische Untersuchungen gefordert. Solche Daten liegen aber, wie oben erwähnt, bisher nur für das humane Centaurin $\alpha$ 1 vor, wären jedoch sowohl für Centaurin $\alpha$ 2

Außerdem unterscheiden sich die mRNAs der humanen Centaurine $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 in ihrer Länge. Anhand von Vergleichen mit auf dem Blot angegebenen Markerbanden errechnete sich für die mRNA des Centaurin $\alpha$ 1 eine Länge von etwa 2,4kb, während die mRNA des Centaurin $\alpha$ 2 eine Länge von etwa 2,8kb aufweist und damit etwas kürzer ist. Diese Angaben werden durch Daten aus GenBank gestützt. Dort wird für Centaurin $\alpha$ 1 eine Länge der mRNA von 2295kb angegeben. Für das Centaurin $\alpha$ 2 wird diese mit 2579kb angegeben. Diese Angaben werden als modellhaft bezeichnet, da nicht ausgeschlossen ist, dass Sequenzbereiche an den Enden fehlen. Aber im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus dem Northernblot erscheint eine unterschiedliche Länge von 300-400bp realistisch.

### **4.5 Allgemeine Aspekte zu *in vivo* Lokalisationsstudien**

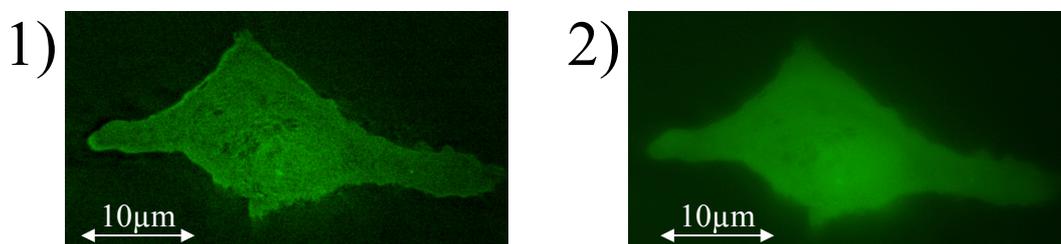
Die *in vivo* Lokalisationsstudien bilden in gewisser Weise den Hauptteil dieser Arbeit,

da durch sie Aussagen über das physiologische Verhalten der Centaurine erhofft werden. Hierzu wurden Fusionskonstrukte aus einem GFP und den Centaurinen erstellt und die intrazelluläre Lokalisation durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen beobachtet. Die Aussagen in dieser Arbeit sind im wesentlichen qualitativer Art und ihre Güte hängt somit stark von der Qualität der Aufnahmen ab. Verwendet wurde in dieser Arbeit die quasikonfokale Mikroskopie, die mehrere Vorteile gegenüber konventioneller Mikroskopie bietet. Deshalb sei im nächsten Abschnitt zuerst auf methodische Aspekte eingegangen.

### 4.5.1 Vorteile quasikonfokaler gegenüber konventioneller Mikroskopie

Die Aufnahmen von Zellen wurden, mit Ausnahme der ersten Bilder von Jurkat Zellen, mit der Methode der quasikonfokalen Mikroskopie erstellt. Bei der konventionellen Mikroskopie fließt auch Licht von Quellen ober- und unterhalb der Fokusebene in das Bild mit ein. Konventionelle mikroskopische Aufnahmen stellen somit eher eine Projektion eines dreidimensionalen Volumens auf eine zweidimensionale Ebene dar. Um intrazelluläre Lokalisationen besser beurteilen zu können, ist es wünschenswert, die störenden Einflüsse auszuschalten, um so einen genauen Überblick über die Lichtquellen einer Fokusebene zu erhalten.

Zur Zeit gibt es zwei Ansätze, dieses Problem zu lösen: Auf der einen Seite gibt es die konfokalen Mikroskope, die durch ein konfokales Pinhole, alles Licht, das nicht aus der



**Abbildung 4.4: Darstellung der selben PC12 Zelle transformiert mit pEYFP-HsCent $\alpha$ 1 zum Zeitpunkt 15 Sekunden nach Stimulation mit 20nM EGF. 1) Dekonvolviertes Bild; 2) Nicht dekonvolvierte, konventionelle Aufnahme der gleichen Fokusebene wie 1). Während in 1) schon eine beginnende Membranlokalisierung des Fusionsproteins zu erkennen ist, ist diese in 2) nicht zu erkennen. Weiter sind bei dem dekonvolvierten Bild intrazelluläre Details genauer auszumachen.**

Fokusebene stammt, ausschließen. Ein anderer Weg wird durch die quasikonfokale Mikroskopie beschrieben: Hierbei wird ein Schnittbild durch einen Computer in einem sogenannten Dekonvolutions- oder image restoration Prozess aus den umliegenden Fokusebenen errechnet. Hierzu muss die point spread-Funktion des Mikroskops, die Aussagen über das 3D-Streuverhalten macht, bekannt sein. Die Quasikonfokale Mikroskopie erfordert einigen Aufwand an Rechenleistung, aber mit dieser Methode lassen sich Schnittbilder auf mit konventionellen Mikroskopen erzeugen. Zur Aufnahme der für die Berechnungen dienen meistens CCD Kameras. [Carrington et al. 1998]

Die Fluoreszenzaufnahmen dieser Arbeit wurden auch durch quasikonfokale Mikroskopie erzeugt. Die als Grundlage für die Berechnungen dienenden, konventionellen Aufnahmen sind nicht abgebildet worden. Um den Unterschied deutlich zu machen, der durch die Berechnungen entsteht, sei hier einmal das errechnete, konfokale Schnittbild der konventionellen Aufnahme der selben Fokusebene gegenübergestellt. An diesem Beispiel ist deutlich zu sehen, dass die quasikonfokale Mikroskopie einen Gewinn an Details mit sich bringt. Die in der dekonvolvierten Aufnahme zu erkennende, beginnende Membranassoziation des EYFP-Centaurin $\alpha$ 1 Fusionsproteins ist in der konventionellen Aufnahme noch nicht zu sehen.

### **4.5.2 Lokalisationsstudien durch Überexpression von fluoreszierenden Fusionsproteinen**

In dieser Arbeit wurden Aussagen über die Lokalisation eines Proteins gemacht, indem das Zielprotein, in diesem Fall die Centaurine, mit einem GFP fusioniert wurden. Die Lokalisation des Centaurins alleine kann *in vivo* nicht anders untersucht werden. Es stellt sich die Frage, in wie weit durch die Fusion mit dem GFP Artefakte entstehen. Die Expression des Fusionskonstruktes stand unter der Kontrolle des sehr starken CMV immediate early Promotors. Auch die dadurch entstandene Konzentration des Centaurins auf unphysiologisch hohe Werte mag eine Quelle von Artefakten sein.

### **4.5.3 Der Einfluss des GFPs**

Die Bilder von Zellen, die mit pEYFP-C1 transfiziert wurden, zeigen eine recht homogene Verteilung der Fluoreszenz. Daraus läßt sich schließen, daß vom GFP alleine

keine bevorzugte Lokalisierunstendenz ausgeht und alle davon abweichenden Fluoreszenzverteilungen durch das fusionierte Centaurin bedingt sind. Ebenso zeigt das GFP nach Stimulation mit EGF keine Translokation.

Während vom GFP selber keine Lokalisation ausgeht, stellt sich andererseits die Frage, wie der Einfluß des GFPs auf das Lokalisationsverhalten des Centaurins ist. Um hierüber Aussagen machen zu können, wurden von dem Centaurin $\alpha$ 1 zwei Konstrukte erstellt: eines mit N-terminalem GFP (pEYFP-HsCent $\alpha$ 1) und eines mit C-terminalem GFP (pHsCent $\alpha$ 1-EGFP). Diese sind die beiden sich anbietenden Möglichkeiten zur Fusion von zwei Proteinen. Andere Variationsmöglichkeiten, wie verschiedene Längen des Linkerpeptids zwischen den beiden Fusionspartnern, wurden nicht ausprobiert.

Als Experiment zur Entscheidung über die Funktionalität des Fusionskonstrukts wurde die Transfektion in Jurkat Zellen durchgeführt. Dieses basierte auf der Überlegung, daß das Centaurin $\alpha$ 1, wenn es tatsächlich ein PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> bindendes Protein sei, es bei Jurkat Zellen an der Membran lokalisieren müsste, da diese Zelle sehr viel PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> besitzen [Mayr, unveröffentlichte Daten]. In der Tat fand sich bei beiden Konstrukten eine Lokalisation an der Plasmamembran, die jedoch bei dem Konstrukt mit N-terminalem GFP deutlicher und bei allen Zellen ausgeprägt war, während sie sich bei C-terminalem GFP die Lokalisation nicht bei allen Zellen und auch nicht so deutlich ausgeprägt fand. Dieser Effekt war im normalen Fluoreszenzmikroskop deutlich zu sehen, eine Quantifizierung oder Untersuchung im quasikonfokalem Mikroskop, das zu der Zeit noch nicht zur Verfügung stand, wurden aber nicht durchgeführt.

Hieraus ist deutlich zu sehen, dass das GFP einen Einfluss auf die Funktionalität des Centaurins ausüben kann. Die Abhängigkeit von der Position des GFPs spricht für einen sterischen Effekt. Es ist anzunehmen, dass ein C-terminales GFP durch seine Nähe zu den C-terminalen PH-Domänen einer korrekten Bindung an Phospholipide entgegensteht.

Wenn nun ein C-terminales GFP die Funktionalität der PH-Domänen beeinflusst, ist natürlich auch davon auszugehen, dass auch ein N-terminales GFP sterische Effekte erzeugt. Es ist also durchaus möglich, dass die Funktion des Zinkfingermotivs eingeschränkt ist. Dies hat insofern Bedeutung, als dass einige Autoren [Tanaka et al., 1999] dem Zinkfinger Funktion bei der Kernlokalisierung zuschreiben. Darauf wird weiter unten näher eingegangen.

---

#### **4.5.4 Auswirkungen der Überexpression**

Die Centaurine üben in Zellen eine physiologische Funktion aus. Die Expression von Proteinen wird sehr genau und vielfältig kontrolliert da ein Zuviel oder ein Zuwenig schwere Folgen für die Zellen haben kann. Dies gilt insbesondere für Proteine, die an Signaltransduktions- oder Regulationsprozessen beteiligt sind, wie man dies auch vom Centaurin annimmt. Außerdem stellt die Überexpression eine Belastung für den Proteinsyntheseapparat der Zellen dar.

Außerdem binden die Centaurine an den wichtigen Botenstoff PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und das Centaurin $\alpha$ 2 wahrscheinlich noch an weitere Liganden. Sobald die Centaurine an diese Signalmoleküle gebunden haben, stehen diese nicht mehr den anderen Bindungsproteinen zur Verfügung. Auch durch diesen Effekt kann eventuell massiv in den Zellstoffwechsel eingegriffen werden, vor allem bei sehr hohen Centaurin Konzentrationen.

Die Überexpression lässt sich aber nicht vollständig umgehen, da der Sensitivität der Fluoreszenzmikroskopie Grenzen gesetzt sind. Es wurde aber darauf Rücksicht genommen, indem für die mikroskopischen Aufnahmen solche Zellen ausgewählt wurden, die in ihrem Aussehen den nichttransfizierten Zellen glichen und bei denen Fluoreszenzstärke gerade für die Untersuchungen ausreichte. Es ist klar, dass dadurch eine gewisse Selektion der untersuchten Zellen auftritt, die eventuell Tendenzen in den Ergebnissen bewirkt. Diese Selektion wurde aber aus oben genannten Gründen bewusst durchgeführt. Eventuellen Tendenzen wurde durch die Messung jeweils mehrerer Zellen entgegengewirkt.

#### **4.6 *in vivo* Lokalisation des humanen Centaurin $\alpha$ 1**

Die Lokalisationsexperimente ergaben für das humane Centaurin $\alpha$ 1 ein nicht ganz einheitliches Bild. In PC12 und in CHO Zellen gleicht die Fluoreszenzverteilung des EYFP-Centaurin $\alpha$ 1 Fusionsproteins derjenigen des EYFP: Bei beiden Zelllinien weist der Zellkern eine höhere Fluoreszenz als das Zytoplasma auf. In den NT2 Zellen dagegen ist die Fluoreszenz im Zellkern beim EYFP-Centaurin $\alpha$ 1 Fusionsprotein im Gegensatz zum EYFP schwächer als im Zytoplasma. Dieser Unterschied ist auffällig. Er könnte ein Hinweis auf eine zellspezifische Lokalisation und damit Funktion des Centaurin $\alpha$ 1 im Nukleus hindeuten.

Eine weitere Differenz bezüglich der Kernlokalisierung des Centaurin $\alpha$ 1 ergibt folgender Vergleich: Die Jurkat Zellen mit einem konstitutiv hohen PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> Gehalt zeigen das EYFP-Centaurin $\alpha$ 1 Fusionskonstrukt fast ausschließlich an der Zellmembran. Der Zellkern zeigt keine Fluoreszenz. Bei stimulierten PC12 Zellen dagegen transloziert ausschließlich der zytoplasmatische Anteil des EYFP-Centaurin $\alpha$ 1 Fusionsproteins in einer PI 3-Kinaseabhängigen Weise an die Zellmembran, während der Zellkern während der ganzen Zeit (etwa 50 Minuten) seine ursprüngliche Fluoreszenz beibehält. Möglicherweise bewirkt bei Jurkat Zellen die hohe basalen PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> an der Zellmembran eine fast komplette Bindung aller Fusionsproteine an die Zellmembran, so dass nur geringe Mengen der Fusionsproteine in den Kern aufgenommen werden können.

Ebenso unterschiedlich sind die Aussagen, die durch zwei weitere Arbeiten getroffen werden:

In einer Arbeit [Kreutz et al., 1997] wurde sehr ausführlich mit *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie die Lokalisation des Centaurin $\alpha$ 1 im Paraffinschnitten von Gehirnen verschieden alter Ratten untersucht. Es fand sich eine fast ausschließliche Transskription von RNA in Neuronen mit besonderer Betonung des Hippokampus, Kortex, Kleinhirn und Thalamus. An zellulären Strukturen wurden mit Antikörpern gegen Centaurin $\alpha$ 1 vor allem die proximalen Neuriten und die Zellsomata gefärbt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten das Centaurin $\alpha$ 1 darüber hinaus vor allem an der axonalen Membran, an präsynaptischen Membranen und an präsynaptischen Vesikeln lokalisiert.

Dagegen beschreibt die Arbeit von [Tanaka et al., 1999] eine fast ausschließlich nukleäre Lokalisation des Centaurin $\alpha$ 1. Die Untersuchungen wurden wiederum an Rattenhirnen durchgeführt. Die *in situ* Hybridisierungen des Centaurin $\alpha$ 1 stehen im Einklang mit oben erwähnter Arbeit und zeigen das Centaurin $\alpha$ 1 nur in Neuronen und nicht in Gliazellen exprimiert. Dagegen zeigten Immunhistochemische Untersuchungen mit einem gegen das PIP<sub>3</sub>BP, dem Centaurin $\alpha$ 1 Homologen des Rinds, gewonnenen monoklonalen Antikörper das Centaurin $\alpha$  vor allem im Zellkern lokalisiert. Untersuchungen von Neuro2A Zellen, einer Neuroblastomzelllinie, mit dem selben Antikörper zeigten das Centaurin $\alpha$ 1 wiederum fast ausschließlich im Zellkern.

Als weiteres Experiment wurde in der Arbeit ein Fusionskonstrukt aus PIP<sub>3</sub>BP und N-

terminalem EGFP erstellt, welches dem Konstrukt EYFP-HsCentaurin $\alpha$ 1 entspricht. Die Lokalisation wurde in COS-7 Zellen, PC12 Zellen und Neuro2A Zellen untersucht. Auch hier fanden die Autoren eine fast ausschließliche Lokalisation des Fusionskonstrukts im Zellkern.

Als Verantwortlich die Zellkernlokalisation konnten Tanaka et al. die ersten 10-14 Aminosäuren herausstellen. Diese enthalten einen stark basischen Bereich (KERRK) der als mögliches nuclear localization signal (NLS) dienen kann. Ein EGFP fusioniert mit den 14 N-terminalen Aminosäuren des PIP<sub>3</sub>BP führt zu einer ausschließlichen Lokalisation im Zellkern, während ein Deletion der ersten neun Aminosäuren des PIP<sub>3</sub>BP zu einer diffusen Verteilung des Fusionsproteins führt.

Vor allem die Ergebnisse der Arbeit von Tanaka et al. sind schwer mit meinen Ergebnissen zu vereinen. Bei den PC12 und den CHO Zellen zeigte sich bei mir zwar eine bevorzugte Lokalisation der Fusionsproteins im Zellkern, aber diese war auch bei der Kontrolle mit EYFP allein zu finden und außerdem war sie nur diskret ausgeprägt. Dieser Unterschied lässt sich auch nur schwer dem der unterschiedlichen verwendeten Centaurin $\alpha$ 1 zuordnen, das bei Tanaka et al. aus dem Rind, bei mir vom Menschen stammt. Die Proteine weisen eine zu ausgeprägte Sequenzhomologie auf und es ist schwer vorstellbar, dass so konservierte Proteine in verschiedenen Spezies eine so unterschiedliche Funktion besitzen.

Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass in meinem Fusionskonstrukt das N-terminale EYFP durch sterische Effekte eine normale Funktion der direkt benachbarten N-Terminus des Centaurin $\alpha$ 1 behindert, so wie ein C-terminales EYFP die Funktion der PH-Domänen negativ beeinflusst. Allerdings benutzte auch Tanaka et al. ein Fusionskonstrukt mit N-terminalem GFP. Möglicherweise wurde ein längeres oder anderes Übergangsstück zwischen den beiden Fusionspartnern gewählt. So eine längere Übergangssequenz könnte dann eventuell den Einfluss des GFPs auf das Centaurin $\alpha$ 1 abschwächen. Leider ist die genaue Art der Klonierung in der Arbeit nicht erwähnt, so dass hierüber keine Aussagen gemacht werden können.

Insgesamt ist zu bemerken, dass die Ergebnisse der Arbeit von [Tanaka et al., 1999], die eine fast ausschließliche Lokalisation des Centaurin $\alpha$ 1 in Zellkernen feststellen, isoliert dastehen. Auffällig ist zwar, dass sie die Kernlokalisation sowohl in der Immunhistochemie, im Widerspruch zu [Kreutz et al., 1997], als auch in GFP-Fusionsexperimenten, die im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit und der

von [Venkateswarlu et al., 1999] stehen, gefunden wurden. Die Übereinstimmung der Ergebnisse von drei unterschiedlichen Arbeitsgruppen lässt die Vermutung zu, dass die Beobachtung einer ausschließlichen Kernlokalisierung des Centaurin $\alpha$  auf experimentellen Besonderheiten beruht. Bei geringer Leuchtstärke kann eine bevorzugte Kernlokalisierung, wie sie auch von mir in PC12 Zellen beobachtet wurde, eventuell mit einer ausschließlichen Kernlokalisierung verwechselt werden. Eine andere Möglichkeit ist die Abhängigkeit der Lokalisation von der Zeit nach Transfektion. Die Zellen in dieser Arbeit wurden 24 Stunden nach Transfektion untersucht, bei der Arbeit von [Tanaka et al., 1999] ist dieser Zeitpunkt leider nicht angegeben. Unter diesem Aspekt ist wichtig zu bemerken, dass die Bildung des Fluorophors des GFPs mehrere Stunden benötigt, so dass eine zu frühe Untersuchung zu verfälschten Ergebnissen führen kann.

### **4.7 Translokationsverhalten des Centaurins nach Stimulation**

Nach Stimulation der PC12 Zellen mit EGF kommt es reproduzierbar zu einer reversiblen, deutlich ausgeprägten Translokation des zytosolischen EYFP-Centaurin $\alpha$ 1 Fusionsproteins an die Plasmamembran. Die Translokation lässt sich durch Vorbehandlung der Zellen mit dem PI 3-Kinaseinhibitor Wortmannin verhindern. Dieses Verhalten spricht dafür, dass membranständige Signalmoleküle downstream der PI 3-Kinase für die Translokation des Centaurin $\alpha$ 1 verantwortlich sind. Hier kommen vor allem die Phosphoinositide PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> oder auch PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> in Frage. In vorhergegangenen Untersuchungen [Hammons-Odie et al., 1996] [Stricker et al., 1997] [Tanaka et al., 1997] wurde bereits gezeigt, dass Centaurin $\alpha$ 1 *in vitro* an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> bzw. Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> binden kann. In diesem Zusammenhang kann man davon ausgehen, dass PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> der physiologische Bindungspartner für das Centaurin $\alpha$ 1 ist. Weiter *in vitro* Experimente werden im nächsten Abschnitt besprochen.

Das Translokationsverhalten des Centaurin $\alpha$ 1 gleicht denen von anderen Proteinen, wie zum Beispiel dem General receptor for 3-phosphoinositides (GRP1) [Venkateswarlu et al., 1998] oder dem Cytohesin-1 [Venkateswarlu et al., 1999b], die alle als PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> Rezeptoren gelten. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass auch Centaurin $\alpha$ 1 ein physiologischer PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Rezeptor ist.

Unabhängig von meiner Arbeit wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ein gleiches Ergebnis mit einem Fusionsprotein aus humanem Centaurin $\alpha$ 1 und N-terminalem EGFP erzielt [Venkateswarlu et al., 1999]. Auch in dieser Arbeit wurde die Lokalisation

des Fusionsproteins vor und nach Stimulation mit EGF und NGF in PC12 Zellen untersucht. Es wurde nach Stimulation eine reversible Translokation des cytosolischen Anteils des Fusionsproteins an die Zellmembran gefunden. Im Unterschied zu meinen Ergebnissen war die Translokation allerdings schon nach 10 Minuten wieder aufgehoben, während bei mir der Effekt bis zu 50 Minuten angehalten hat. Möglicherweise ist dies in der etwas niedrigeren EGF Konzentration begründet: 100ng/ml entsprechend etwa 16,7nM im Gegensatz zu den von mir benutzten 20nM. Auch in dieser Arbeit ist eine Hemmung der Translokation durch die PI 3-Kinase Inhibitoren Wortmannin und LY294002 gefunden worden.

### **4.8 Mögliche Rolle der Centaurine in der Regulation des intrazellulären Vesikeltransports**

Die Centaurine besitzen als gemeinsames Merkmal ein Zinkfingermotiv, das dem Zinkfinger, der dem des ARF1-GAP und dem des Gcs1, dem ARF-GAP der Hefe [Poon et al. 1996], ähnelt. Von diesem konnte gezeigt werden, dass er für die GTPase aktivierende Funktion des ARF1-GAP verantwortlich ist [Cukierman et al., 1999]. Somit kann vermutet werden, dass die Centaurine auch ARF-GTPase aktivierende Funktion besitzen.

Ein Hinweis, dass das Centaurin $\alpha$ 1 eine GTPase aktivierende Funktion ausüben kann, ist durch einen Versuch belegt, bei dem sich des Hefestamms  $\Delta$ gcs bedient wurde: Bei diesem Hefestamm ist das Gcs1 Gen deletiert. Dadurch können die Hefen nicht mehr auf fluoridhaltigem Nährboden wachsen. Wird nun humanes Centaurin $\alpha$ 1 in diese Hefen transfiziert, wachsen die Zellen wieder auf fluoridhaltigem Nährboden. Diese Komplementation der Gcs1 Funktion kann durch Mutationen in der Zinkfingerdomäne rückgängig gemacht werden, während Mutationen in den PH-Domänen keinen Einfluss auf das Wachstum der Hefen haben [Venkateswarlu et al. 1999].

Ausgehend von diesem Befund und den in dieser Arbeit erhobenen Daten kann man postulieren, dass das Centaurin als ein von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> gesteuertes ARF-GAP wirkt. Dadurch kann ein Modell aufgestellt werden, wie die PI 3-Kinase über die Steuerung der ARF Proteine den intrazellulären Vesikeltransport reguliert. In diesem Zusammenhang ist der Befund interessant, dass auch die zu den Cytohesinen gehörenden ARF-GEFs wie GRP1 und ARNO mit hoher Affinität an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> binden [Klarlund et al. 1997]. Eine PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> vermittelte Rekrutierung dieser

ARF-GEFs kann zu einer lokalen Bildung von ARF-GTP aus ARF-GDP führen. Das membranständige, aktive ARF-GTP kann nun mit seinen Zielproteinen interagieren. Es führt zu einer Aktivierung der PLD, bestimmter PIPkinasen und der Coat- bzw. Adaptorproteine (AP-1, AP-2 und COPI). In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Translokation von ARF und Aktivierung der PLD durch Insulin in Adipozyten von Ratten durch die PI 3-Kinase gesteuert wird [Karnam et al., 1997]. Auf die Rollen der PLD und der PIPkinasen wurde schon in der Einleitung kurz hingewiesen. Dem Produkt der PLD, dem Phosphatidylcholin, wird eine Rolle bei der Membranfusion zugeschrieben. Außerdem wirkt es in einem feed-forward Mechanismus stimulierend auf die PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> Produktion durch die PIPkinasen [Moss u. Vaughan, 1998]. Das in diesem Zusammenhang gebildete PtdIns(4,5) dient nun einerseits dazu, die Verbindung zum Spectrin- und Actinzytoskelett herzustellen. Diesem kommt eine wichtige Rolle bei der Organisation und Motilität der Vesikel zu [De Matteis u. Morrow, 2000]. Das PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> kann andererseits aber auch als Substrat für die PI 3-Kinasen dienen und für eine kontinuierliche Produktion des PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> sorgen.

Dem Centaurin $\alpha$ 1 als putativem ARF-GAP käme nun die Rolle zu, das ARF-GTP vermittelte Signal wieder abzuschalten. Eine Rekrutierung der Centaurine kann durch das lokal gebildete PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> geschehen. Das nun an der Membran sitzende Centaurin bewirkt eine Hydrolyse des ARF-GTPs zum inaktiven ARF-GDP. Letzteres transloziert in das Zytosol. Die Effektorproteine werden inaktiviert und die Coatproteine dissoziieren vom Vesikel ab, so dass die Bedingungen für eine Fusion des Vesikels mit der Zielmembran gegeben sind.

Eine weitere Rolle können in diesem Zusammenhang die Ankyrinrepeats spielen. Ankyrinrepeats sind ein weit verbreitetes Motiv für Protein-Protein Interaktionen. [Sedgwick u. Smerdon, 1999]. Diese Repeats bilden beim Ankyrin, bei dem sie zuerst beschrieben wurden einen Teil der Spectrinbindungsdomäne. Bei dem Centaurin könnten die Ankyrinrepeats durch Bindung an weitere Proteine, wie z.B. Zytoskelettanteile, einen zusätzlichen Mechanismus für eine spezifische Rekrutierung bieten.

Die Rolle des Centaurin $\alpha$ 2 ist etwas schwieriger einzuordnen, da noch keine genauen Daten zu genauen Bindungspartnern vorliegen. Die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation deutet darauf hin, dass weitere Faktoren eine Rolle spielen. Eine Beteiligung des PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> konnte aber gezeigt werden [Max, 2000]. Außerdem

fehlt bislang der Nachweis einer ARF-GAP Aktivität bei diesem Protein. Bis dieser nicht erbracht ist, ist eine Einbeziehung des Centaurin $\alpha$ 2 in den ARF gesteuerten Vesikeltransport natürlich sehr spekulativ. Dennoch macht es durch die hohe Homologie zum Centaurin $\alpha$ 1 sehr wahrscheinlich. Die unterschiedlichen Bindungseigenschaften könnten auf eine Funktion in unterschiedlichen Zellkompartimenten hindeuten.

Für eine unterschiedliche Spezialisierung spricht auch die verschiedene Gewebeverteilung der beiden Formen. Das Centaurin $\alpha$ 1 ist hauptsächlich in Neuronen exprimiert und die oben genannten Überlegungen zur Beteiligung am Vesikeltransport zusammen mit den immunhistochemischen Daten [Kreutz et al. 1997], die eine Assoziation unter anderem mit präsynaptischen Vesikeln zeigen, ist eine Beteiligung an der Neurotransmitterausschüttung wahrscheinlich. Für das Centaurin $\alpha$ 2 sind zu wenig Daten vorhanden, um hier Vorhersagen zu machen.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Centaurin $\alpha$ 1 spezifisch mit der Casein Kinase I assoziieren kann. Es wird aber nicht von dieser Kinase phosphoryliert [Dubois et al. 2001]. Eine physiologische Bedeutung dieses Befundes unklar.

### **4.9 Lokalisation des Centaurin $\alpha$ 2**

Das EYFP-Centaurin $\alpha$ 2 Fusionsprotein war bei allen getesteten Zelllinien (Jurkat, NT2, PC2 und CHO) überwiegend an der Zellmembran lokalisiert. Dabei wurden auch feine Strukturen wie Zellausläufer oder Vesikel markiert. Im Zytoplasma war die Fluoreszenzstärke deutlich geringer ausgeprägt. Bei den CHO Zellen war der Kontrast zwischen Membran- und zytosolischer Lokalisation nicht so stark ausgeprägt wie bei den anderen Zelllinien. Bei diesen Zellen war außerdem der Zellkern durch eine gegenüber dem Zytosol verminderte Fluoreszenz zu erkennen.

Bei einer Stimulation mit EGF war mit diesen Mitteln keine so ausgeprägte Translokation des Fusionsproteins an die Membran wie beim Centaurin $\alpha$ 1 zu erkennen. Mit Hilfe von Doppelfluoreszenzkompositaufnahmen [Max 2000], bei denen die Zellen zusätzlich homogen durch das rotfluoreszierende Protein DsRed gekennzeichnet waren, das einen quantitativen Vergleich der Fluoreszenzstärken ermöglicht, konnte gezeigt werden, dass dennoch eine Translokation von dem zytosolischen Anteil der Fusionsproteine weiter an die Membran stattfindet. Dieser Effekt ist sensibel gegen

Wortmannin. Diese Arbeit zeigt, dass auch das Centaurin $\alpha$ 2 ein möglicher Bindungspartner für 3-phosphorylierte Phosphoinositide wie z.B. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> oder PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> ist. *In vitro* Daten sind zu diesem Protein noch nicht vorhanden. Sie wären zur genaueren Beurteilung wünschenswert.

Zu der Funktion dieses Proteins liegen zur Zeit noch keine Daten vor. Aussagen über eine mögliche Funktion als ARF-GAP bleiben Spekulation.

### **4.10 Möglichkeit, durch Fusionsproteine Phosphoinositide sichtbar zu machen**

Die membrangebundenen Phosphoinositide bieten eine Möglichkeit zur Vermittlung von örtlich begrenzten Signalen. Zur besseren Erforschung der komplexen Zusammenhänge von den durch Phosphoinositiden vermittelten Signalwege ist eine Lokalisation der jeweiligen Phosphoinositiden in lebenden Zellen von besonderem Interesse. Bei dem PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> kommt hinzu, dass es, wie bei seinen proliferativen und antiapoptotischen Eigenschaften zu erwarten, in vielen Tumorzellen erhöht ist. Für die Hintergründe sei hier noch einmal auf die Einleitung verwiesen. Insofern könnte eine Möglichkeit, die PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> Konzentration in lebenden Zellen zu bestimmen bzw. die PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> Vorkommen zu lokalisieren auch für die Identifikation von Tumorzellen von Bedeutung sein.

Die PH-Domänen des Centaurin $\alpha$ 1 scheint sehr spezifisch an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zu binden. Nach Stimulation mit EGF war eine Translokation des Fusionsproteins an die Plasmamembran, den Ort der Bildung des PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zu erkennen. Es stellt sich die Frage, ob nicht das EYFP-HsCentaurin $\alpha$ 1 Fusionsprotein, oder möglicherweise ein Fusionskonstrukt bestehend aus einem GFP und nur den beiden PH-Domänen nicht als eine Art PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Sensor eingesetzt werden kann. Mit Hilfe eines solchen PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Sensor könnte dann sehr einfach das örtliche und zeitliche Vorkommen von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> untersucht werden. Eine solche Methode wäre auch einfacher und bei kleinerer Zellzahl durchführbar, als die Analysen an fraktionierten Zellen.

In der Tat sind solche Versuche durch Fusion eines GFPs mit Phosphoinositidbindungsdomänen, auch solchen, die eine spezifisch an andere Phosphoinositide als PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> binden, schon mehrfach durchgeführt worden

[Balla et al. 2000]. Als PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Sensoren wurden Fusionskonstrukte von GFP mit den PH-Domänen von Arf nucleotide opener (ARNO) [Venkateswarlu et al., 1998] [Oatey et al., 1999], der Bruton's Tyrosin Kinase (BTK) [Várnai et al., 1999], des general receptor for phosphoinositides 1 (GRP1) [Oatey et al., 1999] [Gray et al., 1999] und des Cytohesin-1 [Venkateswarlu et al. 1999b]. Bei all diesen Versuchen konnte eine PI-3-Kinase abhängige Translokation des Fusionsproteins an die Membran beobachtet werden. Dies entspricht den Ergebnissen, die mit dem Centaurin $\alpha$ 1 gewonnen wurden.

Etwas anders sind dagegen die Ergebnisse zu bewerten, die mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> bindenden Domänen durchgeführt wurden. Die PH-Domäne der Phospholipase C $\delta$ <sub>1</sub> (PLC $\delta$ <sub>1</sub>) bindet vor allem an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, das sich in der Zellmembran befindet [Várnai et al., 1998]. Nach Degradation des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> durch Stimulation mit AngiotensinII findet eine Translokation des Fusionsproteins in des Zytosol statt [Stauffer et al., 1998]. Intrazelluläre Membranen (Golgi, Endosomen, sekretorische Vesikel) oder Actinzytoskelett werden dagegen nicht markiert, auch wenn sich auf biochemischem Wege dort PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> nachweisen lässt [Payraastre et al., 2001]. Die PH-Domäne des Oxysterol bindenden Proteins (OSBP), die auch PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> bindet, markiert dagegen vor allem die Golgimembranen und nur schwächer die Plasmamembran [Levine u. Munro, 1998].

Diese Befunde deuten darauf hin, dass zur spezifischen Translokation von phosphoinositidbindenden Proteinen neben den Phosphoinositiden auch noch andere Faktoren, wie zum Beispiel bestimmte Proteine als Bindungspartner vorhanden sein müssen. Zusätzlich erforderliche Protein-Protein Interaktionen könnten eine viel spezifischere und feinere Regulation ermöglichen. Dafür, dass solche zusätzlichen Protein-Protein Interaktionen stattfinden, gibt es mehrere Hinweise. Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass PH-Domänen, aber auch andere phosphoinositidbindende Domänen an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind [Bottomley et al., 1998]. Als Beispiel sei hier nur die Bindung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von Heterotrimeren G-Proteinen an die PH-Domäne der BTK erwähnt. Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung zusätzlicher Faktoren zur Translokation geben weitere Beobachtungen an der oben bereits erwähnten PH-Domäne des Cytohesin-1. Bei dieser kann eine Translokation nur beobachtet werden, wenn eine der PH-Domäne benachbarte Polybasische Sequenz Teil des Fusionsproteins mit dem GFP ist [Nagel et al., 1998].

Ein weiterer Punkt ist die Frage, in wie weit der Zellstoffwechsel durch das überexprimierte Bindungsprotein beeinflusst wird.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Fusionsproteine aus GFP und phosphoinositidbindenden Domänen zwar eine einfach zu handhabende Möglichkeit bietet, den zeitlichen Verlauf der Bildung von Phosphoinositiden in einzelnen Zellen zu beobachten. Aber aufgrund der oben erwähnten Limitationen besteht weiterhin der Bedarf, die so erhobenen Daten mit biochemischen Messdaten zu vergleichen.

### **4.11 Welchen Vorteil bietet die durch $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ ausgelöste Membrantranslokation von Proteinen?**

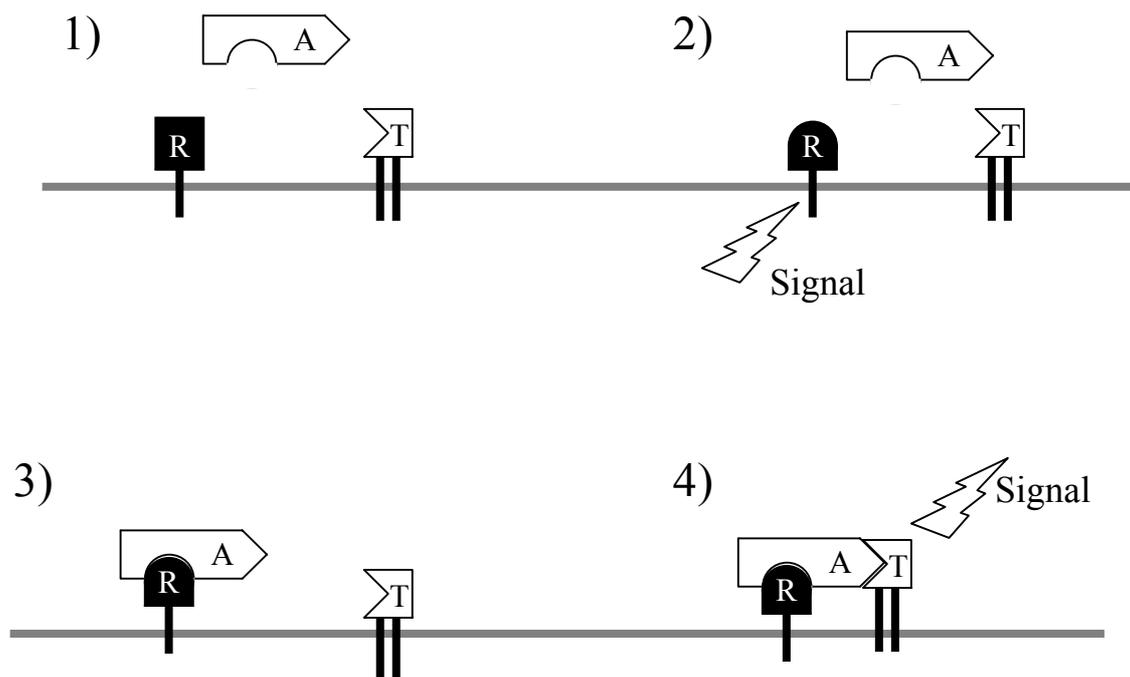
Die Translokation zytosolischer Proteine an die Zellmembran erweist sich als ein grundlegendes Prinzip der Signalweiterleitung durch  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  und anderer Phosphoinositide, wie mittlerweile Untersuchungen an verschiedenen Proteinen gezeigt haben. Aber auch andere Signalwege beinhalten eine Translokation zur Membran, wie zum Beispiel Rezeptortyrosinkinasen. Diese können nach Phosphorylierung an Tyrosinresten von Proteinen mit SH2-Domänen gebunden werden. Letztere translozieren nach Aktivierung des Signalweges vom Zytosol an die membranständigen Rezeptoren [Krauss, 1999]. Die Translokation von Proteinen an die Zellmembran stellt also ein weit verbreitetes Phänomen in der Signaltransduktion dar. Dieser Umstand bringt die Frage nach dem Prinzip auf, durch welches das Signal nach einer Membranrekrutierung von Proteinen weitergeleitet wird.

Eine genauere Betrachtung bietet die Arbeit von [Kholodenko et al., 2000]. Bei ihren Überlegungen gehen die Autoren von zwei Extremen aus: Auf der einen Seite sind die diffusionslimitierten Signaltransduktionsprozesse. Bei diesen Prozessen folgt eine Weiterleitung des Signals nach jedem Aufeinandertreffen der beiden Bindungspartner. Die Stärke des Signals ist also von der Anzahl der Zusammenstöße pro Zeiteinheit der beiden Moleküle abhängig, daher die Bezeichnung diffusionslimitiert. Auf der anderen Seite stehen die reaktionslimitierten Prozesse: Hierbei entsteht nicht bei jedem Zusammenstoß der Reaktionspartner eine Weiterleitung des Signals, sondern nur bei dem Teil, bei dem Bindung lange genug für die Weiterleitung andauert. Faktoren, die eine Reaktionslimitierung bewirken, sind zum Beispiel eine chemische Reaktion, die längere Zeit braucht oder die Notwendigkeit der Interaktion der Proteine mit speziellen Domänen in einer bestimmten Orientierung. In keinem der Fälle soll durch die

Translokation eine zusätzliche Steigerung der Aktivität eines der Proteine stattfinden.

Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass bei diffusionslimitierten Prozessen keine Steigerung der Signalaktivität entsteht, wenn beide Proteine statt sich frei im Zytosol bewegen zu können, an der Membran verankert sind. Der Vorteil, der durch die Reduktion der Dimension entsteht, wird durch den wesentlich höheren Diffusionskoeffizienten, den membrangebundene Proteine gegenüber zytosolischen Besitzen, wieder aufgehoben.

Bei reaktionslimitierten Prozessen dagegen zeigt sich eine Steigerung der Aktivität, wenn beide Proteine an die Membran gebunden sind, wie die Autoren durch Überlegungen vom Massenwirkungsgesetz ausgehend zeigen können. Durch die erhöhte Konzentration beider Reaktanden in dem gegenüber dem kompletten Zellvolumen kleineren Volumen, das beiden Bindungspartnern von der Membran aus zugänglich ist, ergibt sich eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zum



**Abbildung 4.5 : Signaltransduktion durch Bildung eines Komplexes aus einem konstitutiv membranständigen (T) und einem zytosolischen Faktor (A) unter Mitwirkung eines membranständigen Rezeptors (R) für A. 1) und 2): Auf ein Signal hin bietet R eine Bindungsstelle für A. Daraufhin transloziert A an die Membran [3)] und kann seine Wirkung auf T ausüben [4)].**

**In diese Fall entspräche A dem Centaurin $\alpha$ 1. Der Rezeptor R in 2)-4) entspräche dem PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> das aus dem PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> [R in 1)] entsteht und eine Translokation des Centaurin $\alpha$ 1 bewirkt. Das Zielprotein T könnte z.B. das ARF-GTP sein, auf welches das Centaurin $\alpha$ 1 eine GAP Funktion ausübt.**

### Signalkomplex.

Die gleiche Steigerung der Signalaktivität ergibt sich, wenn für den Signalkomplex ein konstitutiv (T) und ein fakultativ (A) membrangebundener Reaktionspartner benötigt werden. Als weiterer Faktor wird ein dritter, membrangebundener Reaktand/Rezeptor (R) benötigt, der auf ein Signal hin eine Bindungsstelle für A abgibt und dieses an die Membran rekrutiert. Nun entsteht wieder die oben erwähnte Situation von zwei membrangebundenen Reaktionspartnern, nur dass in diesem Fall der eine Reaktand aus zwei Komponenten besteht (RA). Obwohl dieses Modell von den Autoren am Beispiel der Tyrosinkinase-Rezeptoren entwickelt wurde, kann es leicht auf die Phosphoinositide übertragen werden. Das Centaurin $\alpha$ 1 entspräche nun dem anfänglich zytosolischem Reaktionspartner A, während das PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> als temporärer Membrananker die Rolle des Rezeptors und Signalgebers R einnimmt (Abbildung 4.5).

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die *in vivo* Lokalisation des humanen Centaurin $\alpha$ 1 zum Nachweis der Bindung an den second messenger PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Da die humane Form des Centaurin $\alpha$ 1 zu Beginn der Arbeit noch nicht bekannt war, stand an erster Stelle die Klonierung des humanen Centaurin $\alpha$ 1.

Für die Klonierung des humanen Centaurin $\alpha$ 1 wurde durch Datenbanksuche mehrere humane ESTs identifiziert, die ein humanes Centaurin $\alpha$ 1 kodieren könnten. Aus diesen ESTs wurde eine Konsensussequenz erstellt, die als Grundlage zur Konstruktion von Primern diente. Aus einer cDNA-Präparation von NT2 Zellen ließ sich durch PCR das humane Centaurin $\alpha$ 1 klonieren. Durch eigene Versuche wurde die kodierende Sequenz bis auf 40 Basenpaare vor dem Stopcodon kloniert. Nach Veröffentlichung der vollständigen Sequenz in GeneBank (AJ006422) konnten auch die fehlende Sequenz kloniert werden.

Eine weitere Datenbanksuche lieferte eine humane ESTs-Sequenz, die für eine neue Isoform zu kodieren schien. Der EST Klon (I.M.A.G.E. Klon 685913) wurde bestellt und sequenziert. Er enthielt die komplette kodierende Sequenz eines zum Centaurin $\alpha$  homologen Proteins, das Centaurin $\alpha$ 2 genannt wurde.

Weiterhin wurde das Centaurin $\alpha$ 1b der Ratte kloniert. Diese Form gleicht dem Centaurin $\alpha$ 1 der anderen Spezies viel mehr als das ursprünglich publizierte Centaurin $\alpha$ 1a, dessen Klonierung sich nicht wiederholen liess. Dieses konnte auch in mehreren Kontrollversuchen nicht nachgewiesen werden. Es kann vermutet werden, dass es sich bei der nun klonierten Form um das eigentliche Centaurin $\alpha$ 1 Homologe der Ratte handelt.

Zur Untersuchung der Gewebeexpression der Centaurine  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 wurde ein Northernblot durchgeführt. Dieser ergab für das Centaurin $\alpha$ 1 eine bevorzugte Expression in Gehirn, Niere und Herz. Die mRNA des Centaurin $\alpha$ 2 wird vor allem in Milz, Niere, Plazenta, Herz und Dünndarm gefunden.

Für die Expression der Fusionsproteine aus Centaurin und GFP wurden das Centaurin $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 die Vektoren pEYFP-C1 und pEGFP-N1 kloniert. Da das

## 5 Zusammenfassung

---

Fusionskonstrukt aus Centaurin $\alpha$ 1 mit C-terminalem GFP eine schwächere Membranlokalisation in Jurkat Zellen zeigte, wurden alle weitere Experimente mit Konstrukten durchgeführt, bei denen das GFP N-terminal an das Centaurin fusioniert wurde.

Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde durch quasikonfokale Mikroskopie in vier verschiedenen Zelllinien (Jurkat, NT2, PC12 und CHO) untersucht. Das Centaurin $\alpha$ 1 zeigte sich nur bei Jurkat Zellen, im Einklang mit der bekannten hohen basalen PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Konzentration, bevorzugt an der Plasmamembran lokalisiert. In NT2, PC12 und CHO Zellen dagegen ist Centaurin $\alpha$ 1 gleichmäßig über Zytoplasma und Zellkern verteilt. Dabei ist bei NT2 Zellen der Zellkern etwas schwächer markiert als das Zytoplasma, während er bei PC12 und CHO Zellen stärker fluoresziert. Das Centaurin $\alpha$ 2 findet sich bei allen untersuchten Zellen bevorzugt an der Plasmamembran, bis hin zu feinsten Membranausstülpungen und dendritenähnlichen Extensionen.

Nach Stimulation von PC12 Zellen mit EGF konnte eine reversible Translokation des zytosolischen Centaurin $\alpha$ 1 an die Plasmamembran beobachtet werden. Diese war schon nach etwa 15 Sekunden zu erkennen und dauerte etwa 50 Minuten an. Die Translokation konnte durch PI 3-Kinase Inhibitoren Wortmannin verhindert werden. Daraus lässt sich schließen, dass Centaurin $\alpha$ 1 *in vivo* an Produkte der PI 3-Kinase, wie PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> oder PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> bindet.

Bei dem Centaurin $\alpha$ 2 konnte nach Stimulation mit EGF keine weitere Translokation an die Plasmamembran beobachtet werden. Es blieb nach EGF Gabe hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert.

## 6 Abkürzungen

### 6.1 allgemeine Abkürzungen

ARF	ADP-ribosylation factor
ADP	Adenosin 5'-Diphosphat
AP	Adaptorprotein
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BTK	Brutons Tyrosinkinase
CCD	charge coupled device
CDP	Cytidin 5'-Diphosphat
COP	coatomer protein complex
CTP	Cytidin 5'-Triphosphat
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DAG	1,2-Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. Coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
EST	expressed sequence tags
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FCS	fötales Kälberserum
GAP	GTPase activating protein
GCN	Guanidiniumthiocyanat
GDI	Guanin nucleotide dissociation inhibitors

## 6 Abkürzungen

---

GEF	guaninnucleotide exchange factor
GFP	Grün fluorszierendes Protein/green fluorescent protein
Grp1	general receptor for phosphoinositides 1
GTP	Guanosin 5'-Triphosphat
HS	Pferdeserum
IP <sub>3</sub> -3-Kinase	Inositolphosphat 1,4,5-Trisphosphate 3 Kinase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thioalactopyranosid
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
MAPK	mitogen activating protein kinase
mRNA	Boten RNA
NaAc	Natriumazetat
N-Terminus	Aminoterminus
PA	Phosphatidsäure
PBS	phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Lösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDK1	phosphoinositide dependent kinase1
PH-Domäne	pleckstrin homology Domäne
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-OH Kinase
PIPkinase	Phosphatidylinositol Kinase
PLC	Phospholipase C
PKB	Protein Kinase B
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinsäure
RT-PCT	Polymerase Kettenreaktion mit reverser Transkription
SDS	Natriumdodezylsulfat
SH2-Domäne	src homology 2 Domäne
SH3-Domäne	src homology 3 Domäne
SSC	Natriumchlorid/Natriumzitat Puffer
TAE	Tris/Azetat/EDTA Puffer
TE	Tris/EDTA Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
UTP	Uridintriphosphat

## 6 Abkürzungen

---

UTR	untranslatierte Region
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Inolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid

### **6.2 Abkürzungen der Inositolphosphate und Phosphoinositide**

Die Abkürzungen für Inosilphosphate und Phosphoinositide folgen dem IUPAC System. Die Zahlen in den Klammern geben die Position der Phosphatreste am Inosiolring an:

Ins	Inositol		
PtdIns	Phosphatidylinositol		
Ins(X,-,N)P <sub>x</sub>	Inositol X,...,N-Phosphat		
PtdIns(X,-,N)P <sub>x</sub>	Phosphatidylinositol X,...,N-Phosphat		
...P	...-Monophosphat	...P <sub>4</sub>	...-Tetrakisphosphat
...P <sub>2</sub>	...-Bisphosphat	...P <sub>5</sub>	...-Pentakisphosphat
...P <sub>3</sub>	...-Trisphosphat	...P <sub>6</sub>	...-Hexakisphosphat

### **6.3 Abkürzungen von Nukleotiden in Sequenzen**

A	Adenosinnukleotid
C	Cytidinnukleotid
G	Guanosinnukleotid
N	unbekanntes Nukleotid
T	Thymidinnukleotid
U	Uridinnukleotid

### **6.3 Abkürzungen von Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstaben-Code**

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

## 7 Literaturverzeichnis

- Abel**, K., Anderson, R. A., Shears, S. B. (2001). Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism. *J. Cell Science* 114: 2207-2208
- Aggensteiner**, M., Stricker, R., Reiser, G. (1998). Identification of rat brain p42<sup>IP4</sup>, a high-affinity inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphate/ phosphatidylinositol(3,4,5) trisphosphate binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1387: 117-128
- Andreev**, J., Simon, J. P., Sabatini, D.D., Kam, J., Plowman, G., Randazzo, P. A., Schlessinger, J. (1999). Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-Gap activity. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2338-2350
- Alessi**, D. R., Downes, C.P (1998). The role of PI 3-Kinase in Inulin action. *Biochim. Biophys. Acta* 1436:151-164
- Alessi**, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol.* 7: 261-269
- Altschul**, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410
- Andrews**, P. W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G. S., Carlin, C., Dracopoli, N. C., Fogh, J. (1984). Pluripotent Embryonal Carcinoma Clones Derived from the Human Teratocarcinoma Cell Line Tera-2. *Lab. Invest.* 50:147-162
- Andrews**, P. W. (1984). Retinoic Acid Induces Neuronal Differentiation of a Cloned Human Embryonal Carcinoma Cell Line in Vitro. *Dev. Biol.* 103: 298-293
- Balla**, T. (1998). Phosphatidylinositol 4-Kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 69-85
- Balla**, T., Bondeva, T., Várnai, P. (2000). How accurately can we image inositol lipids in living cells? *Trend Biochem. Sci.* 21: 238-241
- Berridge**, M. J., Irvine, R. F., (1984). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-205
- Bondeva**, T., Pirola, L., Bulgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R., Wymann, M. P. (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein

- kinases PKB and MAPK. *Science* 282: 293-296.
- Bottomley**, M. J., Salim, K., Panayotou, G. (1998). Phospholipid-binding proteins domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 165-183
- Bromann**, P.A., Boetticher, E. E., Lomasney, J. W. (1997). A single amino acid substitution in the pleckstrin homology domain of phospholipase C $\delta$ 1 enhances the rate of substrate hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 272: 16420-16426
- Brown**, M. T., Andrade, J., Radhakrishna, H., Donaldson, J. G., Cooper, J. A., Randazzo, P. A. (1998). ASAP1, a phospholipid-dependent Arf GTPase-activating protein that associates with and is phosphorylated by src. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7038-7051
- Bullock**, W.O., Fernandez J.M. & Short J.M. (1987). XL-1 Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with  $\beta$ -Galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376-379
- Caroni**, P. (2001). Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P<sub>2</sub> rafts. *EMBO J.* 20: 4332-4336
- Carrington**, W., K. Fogarty, R. Rizzuto, L. Lifshitz, and R. Tuft. "High Resolution 3-D Imaging of Living Cells by Image Restoration", in *Imaging Living Cells*, R. Rizzuto and C. Fasolato, eds., Springer, Heidelberg, 1998.
- Chalfie**, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* 263: 802-805
- Chavrier**, P., Goud, B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1999 Aug; 11(4): 466-75.
- Cormack**, B.P., Valdivia, R., Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38
- Corvera**, S., D'Arrigo, A., Stenmark, H. (1999). Phosphoinositides in membrane traffic. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11:460-465
- Cosson**, P., Letourneur, F. (1997). Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 484-487
- Cubitt**, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., Tsien, R. Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem.*

Sci. 20: 448-455

- Cukierman**, E., Huber, I., Rotman, M., Cassel, D. (1999). The ARF1 GTPase-Activating Protein: Zinc Finger Motif and Golgi Complex Localization. *Science* 270:1999-2002
- Cullen**, P. J. (1998). Bridging the GAP in inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 35-47
- Czech**, M. P. (2000). PIP2 and PIP3: Complex Roles at the Cell Surface. *Cell* 100: 603-606
- Dewaste**, V., Pouillon, V., Moreau, C., Shears, S., Takazawa, K., Erneux, C. (2000). Cloning and expression of a cDNA encoding human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-Kinase C. *Biochem. J.* 352: 343-351
- Donie**, F., Reiser, G. (1991). Purification of a high-affinity inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor from brain. *Biochem. J.* 275: 453-457
- Dowler**, S., Currie, R. A., Campbell, D. G., Deak, M., Kular, G., Downes, C. P., Alessi, D. R. (2000). Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem. J.* 351: 19-31
- Drake**, M. T., Zhu, Y., Kornfeld, S. (2000). The assembly of AP-3 adaptor complex-containing clathrin-coated vesicles on synthetic liposomes. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3723-36
- Dubois**, T., Kerai, P., Zemlickova, E., Howell, S., Jackson, T. R., Venkateswarlu, K., Cullen, P. J., Theibert, A. B., Larose, L., Roach, P. J., Aitken, A. (2001). Casein Kinase I Associates with Members of the Centaurin- $\alpha$  Family of Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate-binding Proteins. *J. Biol. Chem.* 276:18757-18764
- D'Santos**, C. S., Clarke, J. H., Divecha, N. (1998). Phospholipid signalling in the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 201-232
- Erneux**, C., Govaerts, C., Communi, D., Pesesse, X. (1998). The diversity and possible functions of the inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 185-199
- Fukuda**, M., Mikoshiba, K. (1996). Structure-function relationship of the mouse GAP1<sup>m</sup> determination of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding domain. *J.*

Biol. Chem. 271: 18838-18842

**Fukuda**, M., Mikoshiba K.(1997). The function of inositol high polyphosphate binding proteins. *BioEssays* 19(7): 593-603

**Fruman**, D. A., Meyers, R. E., Cantley, L. C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 481-507

**Godi**, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di-Tullio, G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D., De-Matteis, M. A. (1999). ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> on the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 1:280-287

**Gray**, A., Van Der Kaag, J., Downes, C. P. (1999). The pleckstrin homology domain of protein kinase B and GRP1 (general receptor for phosphoinositides-1) are sensitive and selective probes for the cellular detection of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and/or phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in vivo. *Biochem. J.* 344: 929-936

**Greene**, L. A., Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 73:2424-2428.

**Hammonds-Odie**, L.P., Jackson, T. R., Profit, A. A., Blader, I. J., Turck, C. W., Prestwich, G. D. und Theibert, A. B. (1996). Identification and cloning of centaurin- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 271, 18859-18868

**Hanck**, T., Stricker, R., Krishna, U. M., Falck, J. R., Chang, Y.-T., Chung, S.-K., Reiser, G. (1999). Recombinant p42<sup>IP4</sup>, a brain specific 42-kDa high affinity Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> receptor protein, specifically interacts with lipid membranes containing Ptd-Ins(3,4,5)P<sub>3</sub>. *Eur. J. Biochem.* 261: 577-584

**Heim**, R., Cubitt, A.B., Tsien, R. Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664

**Hinchliffe**, K. A., Ciruela, A., Irvine R. F. (1998). PIPkins, their substrates and their products: new functions for old enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 87-104

**Hinchliffe**, K. A. (2000). Intracellular signalling: Is PIP<sub>2</sub> a messenger too? *Curr. Biol.* 10: 104-105

**Hirst**, J., Bright, N. A., Rous, B., Robinson, M. S. (1999). Characterization of a Fourth

Adaptor-related Protein Complex. *Mol. Biol. Cell* 10: 2787-2802

- Honda**, A., Nogami, M., Yokezeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Wanatabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A., ; Kanaho, Y. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99: 521-532
- Irvine**, R. I., Cullen, P- J. (1996). Inositol phosphates - whither bound? Intracellular signalling. *Curr. Biol.* 6: 537-540
- Irvine**, R. I., Schell, M. J. (2001). Back into the water: The return of the inositol phosphates. *Nature Rev.* 2: 327-337
- Jackson**, T. R., Kearns, B. G., Theibert, A. B. (2000). Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signalling. *Trends Biochem. Sci.* 25: 489-495
- Kahn**, R. A., Gilman, A. G. (1984). Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. *J. Biol. Chem.* 259: 6228-6234
- Katan**, M. (1998). Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 5-17
- Kholodenko**, B. N., Hoek, J. B., Westerhoff, H. V. (2000). Why cytoplasmic signalling proteins should be recruited to cell membranes. *Trends Cell Biol.* 10: 173-178
- Klarlund**, J. K., Guilherme, A., Holik, J. J., Virbasius, J. V., Chawla, A., Czech, M. P. (1997). Signaling by phosphoinositide 3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and sec7 homology domains. *Science* 275: 1927-1930
- King**, F. J., Hu, E., Harris, D. F., Sarraf, P., Spiegelman, B. M., Roberts, T. M. (1999). Def-1, a novel src SH3 binding protein that promotes adipogenesis in fibroblastic lines. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2330-2337
- Kirchhausen**, T., Bonifacio, J. S., Riezman, H. (1997). Linking cargo proteins to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 488-495
- Kondo**, A., Hashimoto, S., Yano, H., Nagayama, K., Mazaki, Y., Sabe, H. (2000). (2000). A new paxillin binding protein, PAG3/Pap $\alpha$ /KIAA0400, bearing an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein activity, is involved in paxillin

- recruitment to focal adhesions and cell migration. *Mol. Cell. Biol.* 11: 1315-1327
- Kozak, M.** (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger mRNAs. *Nucl. Acids Res.* 15: 8125-8148
- Krauss, G.** (1999). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation.* Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- Kreutz, M. R., Böckers, T. M., Sabel, B. A., Hülser, E., Stricker, R., Reiser, G.** (1997). Expression and Subcellular Localization of p42<sup>IP4</sup>/Centaurin  $\alpha$ , a Brain -Specific, High-affinity Receptor for Inositol 1,3,4,5-Tektrakisphosphate and Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate in Rat Brain. *Eur. J. Neurosci.* 9: 2110-2124
- Kuehn, M. J., Schekman, R.** (1997). COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 477-483
- Lennon, G., Aoffray, C., Polymeropoulos, M., Soares, M. B.** (1996). The I.M.A.G.E. Consortium : an integrate molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* 33: 151-152
- Levine, T. P., Munro, S.** (1998). The pleckstrin-homology domain of oxysterol-binding protein recognises a determinant specific to Golgi membranes. *Curr. Biol.* 8: 729-739
- Lu, P. J., Hsu, A. L., Wang, D. S., Yan, H. Y., Yin, H. L., Chen, C. S.** (1998). Phosphoinositide 3-Kinase in rat liver nuclei. *Biochemistry* 37: 5738-5745
- Mayr, G.W.** (1988). Inositol phosphates: structural components, regulators and signal transducers of the cell - a review. Boehringer Mannheim, *Topics In Biochemistry* 7
- Max, Klaas** (2000). Einsatz von 3D-Strukturmodellen zur funktionalen Mutagenese der Phosphoinositid-Bindungsstellen in den Pleckstrin-homologen Domänen des humanen Centaurin alpha 1 und 2. Diplomarbeit Biochemie/Molekularbiologie, Universität Hamburg
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H., Winant, J.** (1974). Intermolecular Energy Transfer in the Bioluminescent System of Aequorea. *Biochem.* 13: 2656-2662
- Moss, J., Vaughan, M.** (1998). Molecules in the ARF Orbit. *J. Biol. Chem.* 273: 21431-21434
- Nagel, W., Schilcher, P., Zeitlmann, L., Kolanus, W.** (1998). The PH domain and the

- polybasic c domain of cytosin-1 cooperate specifically in plasma membrane-association and cellular function. *Mol. Biol. Cell.* 9: 1981-1994
- Nickel, W., Wieland, F. T.** (1997). Biogenesis of COPI-coated transport vesicles. *FEBS Let.* 413: 395-400
- Oatey, P. B., Venkateswarlu, K., Williams, A. G., Fletcher, L. M., Foulstone, E. J., Cullen P. J.** (1999). Confocal imaging of subcellular distribution of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in insulin- and PDGF stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* 344: 511-518
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., Remington, S. J.** (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273: 1392-1395
- Payraastre, B., Missy, K., Giuriato, S., Bodin, S., Plantavid, M., Gratacap, M.-P.** (2001). Phosphoinositides Key players in cell signalling, in time and space. *Cell. Signalling* 13: 377-387
- Poon, P. P., Wang, X. M., Rotman, M., Huber, I., Cukierman, E., Cassel, D., Sinder, R. A., Johnston, G. C.** (1996). *Saccharomyces cerevisiae* Gcs1 is an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10074-10077
- Puck, T. T. et al.** (1958). Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* 108: 945-956
- Rameh, L. E, Cantley, L. C.** (1999). The Role of Phosphoinositide 3-Kinase in Lipid Products in Cell Function. *J. Biol. Chem* 274: 8347-8450
- Randazzo, P. A., Andrade, J., Miura, K., Brown, M. T., Long, Y.-Q., Stauffer, S., Roller, P., Cooper, J. A.** (2000). The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4011-4016
- Reiser, G., Schafer, R., Donie, F., Hulser, E., Nehls-Sahabandu, M., Mayr, G.W.** (1991). A high-affinity inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor protein from brain is specifically labelled by a newly synthesized photoaffinity analogue, N-(4-azidosalicyl)aminoethanol(1)-1-phospho-D-myo-inositol 3,4,5-trisphosphate. *Biochem. J.* 280: 533-539
- Roth, M.** (1999). Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex.

Trends Cell Biol. 9: 174-179

- Safrany**, T. S., Caffrey, J. J., Yang, X., Shears, S. B. (1999). Diphosphoinositol Polyphosphates: The Final Frontier for Inositide Research? *Biol. Chem.* 380: 945-951
- Salim**, K., Bottomley, M. J., Querfurth, E., Zvelebil, M. J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R. L., Gigg, R., Smith, C. I., Driscoll, P. C., Waterfield, M. D., Panayotou, G (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* 15: 6241-6250
- Schneider**, U., Schwenk, H. U., Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* 19: 621-626, 1977 PubMed: 68013
- Segdwick**, S. G., Smerdon, S. J. (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biol. Chem.* 24: 311-316
- Shears**, S. B. (1998). The Versatility of Inositol Phosphates as Cellular Signals. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 49-67
- Simonsen**, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M., Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394: 494-498.
- Staal**, S. P., Huebner, K., Croce, C. M., Parsa, N. Z., Testa, J. R.(1988). The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics* 2: 96-98.
- Stauffer**, Ahn, S., Meyer, T. (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> concentration monitored in living cells. *Curr. Biol.* 8: 463-466
- Stein**, R. C., Waterfield, M. D. (2000). PI 3-Kinase inhibition: a target for drug development? *Mol. Medicine today* 6: 347-357
- Stricker**, R., Chang, Y.-T., Chung, S.-K., Reiser, G. (1996). Determination of specificity of a high-affinity inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding site at a 42 kDa receptor protein, p42IP4: comparison of affinities of all inositoltris-, -tetrakis-, and -pentakisphosphate regioisomers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 228: 596-604

- Stricker**, R., Hülser, E., Fischer, J., Jarchau, Th., Walter, U., Lottspeich, F., Reiser, G. (1997). cDNA cloning of porcine p42<sup>IP4</sup>, a membrane-associated and cytosolic 42kDa inositol (1,3,4,5)tetrakisphosphate receptor from pig brain with similarly high affinity for phosphatidylinositol (3,4,5)P<sub>3</sub>. FEBS Lett. 405: 229-236
- Stryer**, L. (1996). Biochemie, 4. Auflage, 1996, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Tanaka**, K., Imajoh-Ohmi, S., Sawadi, T., Shirai, T., Hashimoto, Y., Iwasaki, S., Kaibuchi, K., Kanoho, Y., Shirai, T., Terada, Y., Kimura, K., Nagata, S., Fukui, Y. (1997). A target of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate with a zinc motif similar to that of the ADP-ribosylation-factor GTPase-activating protein and two pleckstrin homology domains. Eur. J. Biochem. 245: 512-519
- Tanaka**, K., Horiguchi, K., Yoshida, T., Takeda, M., Fujisawa, H., Takeuchi, K., Umeda, M., Kato, S., Ihara, S., Nagata S., Fukui, Y. (1999). Evidence That a Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate-binding Protein Can Function in Nucleus. J. Biol. Chem. 274: 3919-3922
- Toker**, A., Cantley, L. C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. Nature 387: 673-676
- VanWayenberg**, V., Communi, D., D'Santos, C. S., Erneux, C. (1995). Tissue- and cell-specific expression of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-kinase isoenzymes. Biochem. J. 306: 429-435
- Várnai**, P., Balla, T. (1998). Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist induced dynamic changes and relationship to myo-[<sup>3</sup>H]inositol-labeled phosphoinositide pools. J. Cell. Biol. 143: 501-510
- Várnai**, P., Rother, C. T., Balla, T. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. J. Biol. Chem. 274: 10983-10989
- Venkateswarlu**, K., Oatey, P. B., Tavaré, J. M., Cullen, P. J. (1998). Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. Curr. Biol. 8: 463-466
- Venkateswarlu**, K., Gunn-Moore, F., Oatey, P. B., Tavaré, J. M., Cullen, P. J. (1998). Nerve growth factor- and epidermal growth factor-stimulated translocation of the

ADP-ribosylation factor exchange factor GRP1 to the plasma membrane of PC12 cells requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the GRP1 pleckstrin homology domain. *Biochem. J.* 335: 139-146

**Venkateswarlu, K., Oatey, P.B., Tavaré, J.M., Jackson, T.R., Cullen, P.J (1999).** Identification of centaurin- $\alpha$ 1 as a potential in vivo phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding protein that is funktionally homologous to the yeast ADP-ribosylation factor (ARF) GTPase-activating protein, Gcs1. *Biochem. J.:* 340: 359-363

**Venkateswarlu, K., Gunn-Moore, F., Tavaré, J. M., Cullen, P. J. (1999).** EGF- and NGF-stimulated translocation of cytohesin -1 to the plasma membrane of PC12 cells requires PI 3-kinase activation and a functional cytohesin-1 PH domain. *J. Cell. Sci.* 112: 1957-1965

**Wang, D.-S., Miller, R., Shaw, R., Shaw, G.** The Pleckstrin Homology Domain of Human  $\beta$ I $\Sigma$ II Spectrin is Targeted to the plasma Membrane in Vivo. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 225: 420-426

**Wymann, M. P., Pirola, L. (1998).** Structure and function of phosphoinositide 3-kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 127-150

## **8 Danksagung**

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Mayr danken für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung räumlichen und technischen Mittel zur Durchführung der Arbeit und für die großzügige Unterstützung in wissenschaftlichem Arbeiten.

Herrn Dr. Bertsch gilt mein besonderer Dank für die intensive Betreuung und die geduldige Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken.

Für das gute Arbeitsklima und zahlreiche Ratschläge möchte ich Werner Fanick, Christina Deschermeier, Klaas Max, Marcus Möller, Marcus Nalaskowski, Isabell Schreiber, Philip Hartjen und Silke Süsse danken.

Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der Graduiertenkollegs „Molekulare Endokrinologie – molekularer Stoffwechsel“ und „Neuronale Signaltransduktion und deren pathologische Störung“.

## 9 Lebenslauf

### ***persönliche Daten:***

Name: Christopher Illies  
Geburtsdatum: 29. Mai 1973  
Geburtsort: Hamburg  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: ledig

### ***Ausbildung:***

Schulische Ausbildung:	1980-1984	Grundschule in Hamburg
	1984-1993	Gymnasium in Hamburg
	1990-1991	High-school in Texas, USA
	1993	Abitur in Hamburg
Zivildienst:	1994-1995	Zivildienst in der Behindertenbetreuung (Wedel)
Studium:	4/1995	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg
	3/1997	Physikum
	3/1998	1. Staatsexamen
	8/2000	2. Staatsexamen
	11/2001	3. Staatsexamen
Promotion:	6/1997	Beginn der Promotion bei Prof. Dr. Mayr am Insitut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie (ehem. Institut für physiologische Chemie)

## **Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

.....