

**Identifizierung und Charakterisierung  
intrazellulärer Bindungspartner des  
Transmembranrezeptors SorLA**

Antonia Munck

# **Identifizierung und Charakterisierung intrazellulärer Bindungspartner des Transmembranrezeptors SorLA**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
des Fachbereichs Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Antonia Munck**  
aus Hamburg

Hamburg 2004

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II : Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe Neurobiochemie durchgeführt.

Sie wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 444 B10).

Genehmigt vom Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

**Gutachter der Dissertation:**

Herr PD Dr. Wolfgang Hampe

Herr Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein

Disputation: 19.11.2004

Ich danke Herrn PD Dr. Wolfgang Hampe und Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel für die Bereitstellung des Themas sowie der benötigten Sachmittel.

Ein großer Dank richtet sich auch an Frau Prof. Dr. H. Chica Schaller und ihre Arbeitsgruppe, die mir fortwährend mit Ratschlägen und Sachmitteln zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein danke ich für die Betreuung der Arbeit im Fachbereich Chemie.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Beisiegel für die gewährte Hilfe beim Erlernen der molekularbiologischen Methoden und den beratenden Beistand bei fachbezogenen Fragestellungen. Insbesondere bedanke ich mich an dieser Stelle bei Christopher Böhm, Nicole Seibel und Susanne Hoppe für ihre Unterstützung.

Schließlich gilt mein besonderer Dank allen meinen Freunden, insbesondere Ina Burkschat, Marcus Rehbein, Astrid Scholz, Benjamin Gerwat und Sima Karimi-Tabiz sowie meinen Eltern, die mir zu jeder Zeit die Ruhe und das Verständnis entgegen gebracht haben, die ich zur Bewältigung dieser Arbeit brauchte.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Domänenstruktur des Mosaikrezeptors SorLA	1
1.2	Funktionen von SorLA	5
1.3	Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems	6
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>8</b>
2.1	Identifizierung intrazellulärer Bindungspartner von SorLAcp mit der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode	8
2.1.1	Klonierung des Köderkonstruktes	8
2.1.2	Prüfung auf Transaktivierung der Reportergene durch das Köderprotein	10
2.1.3	Durchmusterung einer cDNA-Bank aus menschlichem Gehirn	10
2.1.4	Analyse der positiven Klone	11
2.1.5	Identifizierung proteinbindender Regionen von SorLAcp mit Hilfe der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode	14
2.2	Bestätigung der Interaktion von PLD3, THG-1a und ART-27 mit SorLAcp in einem Glutathion-S-Transferase-Bindungsassay	17
2.2.1	Expression von GST-SorLAcp in <i>E. coli</i>	17
2.2.2	Aufreinigung von GST-SorLAcp und GST aus <i>E. coli</i>	18
2.2.3	<i>In vitro</i> Translation der Interaktionspartner	19
2.2.4	Interaktion von PLD3, THG-1a und ART-27 mit SorLAcp	19
2.3	Untersuchungen zu THG-1a	21
2.3.1	Charakterisierung von THG-1a mittels bioinformatischer Methoden	21
2.3.2	Untersuchung der Interaktion von SorLAcp mit THG-1 und TSC-22 in einem GST-Bindungsassay	23
2.3.3	Gewebeverteilung von THG-1a und THG-1	25
2.3.4	Lokalisierung von THG-1amyc in transfizierten COS-Zellen	28
2.4	Untersuchungen zu ART-27	30
2.4.1	Lokalisierung von HA-ART-27 in transfizierten COS-Zellen	30
2.4.2	Kolokalisierung von HA-ART-27 und SorLA	31

2.5	Untersuchungen zu PLD3	33
2.5.1	Charakterisierung von PLD3 mittels bioinformatischer Methoden	33
2.5.2	Gewebeverteilung von PLD3	38
2.5.3	Charakterisierung eines polyklonalen Antiserums gegen PLD3	40
2.5.4	Lokalisierung von PLD3 in transfizierten COS-Zellen	42
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>46</b>
3.1	Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse	46
3.2	Interaktionspartner von SorLAcp	48
3.2.1	PLD3	48
3.3.2	THG-1a und ART-27	50
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Summary</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>59</b>
6.1	DNA	59
6.1.1	Vektoren	59
6.1.2	Bakterienstämme und Transformation	60
6.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	60
6.1.4	Restriktion, Ligation, Auffüllen von 5'-überhängenden Enden	60
6.1.5	Agarosegelelektrophorese und Reinigung von DNA aus Gelen	60
6.1.6	Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen durch PCR	60
6.2	Proteinanalytik	61
6.2.1	Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	61
6.2.2	Western-Blot-Analyse	62
6.2.3	Absättigung des PLD3-Antiserums mit immunogenem Peptid	63
6.2.4	Proteinfärbungen	63
6.3	Hefe-Zwei-Hybrid-System	63
6.3.1	Klonierung des Köderkonstruktes	64
6.3.2	Transformation des Hefestamms AH 109	64
6.3.3	Bestimmung der Transformationsrate	65
6.3.4	Analyse der positiven Klone	65
6.3.5	Plasmidisolierung	66

6.3.6	Retransformation	66
6.3.7	SorLAcp-Deletionskonstrukte	66
6.3.8	Bioinformatische Analyse von Gen- und Proteinsequenzen	66
6.4	GST-Bindungsassay	67
6.4.1	Klonierung des Expressionskonstruktes pGEX-KG-SorLAcp	67
6.4.2	Expression und Aufreinigung von GST und GST-SorLAcp in <i>E. coli</i>	67
6.4.3	Verwendete EST-Klone	68
6.4.4	Klonierung der Interaktionspartner	68
6.4.5	<i>In vitro</i> Translation und radioaktive Markierung	68
6.4.6	Bindungsassay	69
6.5	Northern-Blot-Analyse und MTE-Array	69
6.5.1	Synthese [ <sup>32</sup> P]-markierter DNA-Sonden	69
6.5.2	Hybridisierung der Membranen und Auswertung	70
6.6	Zellkultur	70
6.6.1	Zelllinien	70
6.6.2	Expressionskonstrukte	71
6.6.3	Transfektion	71
6.6.4	Herstellung von Zelllysaten	72
6.6.5	Membranpräparation	72
6.6.6	Immunfluoreszenz	72
6.6.7	Sicherheitsvorkehrungen und Entsorgung	73
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>79</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis	79
8.2	Verwendete Primeroligonukleotide	81
8.3	Vektorkarten der Konstrukte für eine eukaryotische Expression	83
8.4	DNA-Sequenz von SorLA	84
8.5	Proteinsequenz von SorLA	86
8.6	DNA-Sequenz von ART-27	87
8.7	Proteinsequenz von ART-27	87
8.8	Publikationen und Kongressbeiträge	88
8.9	Lebenslauf	89

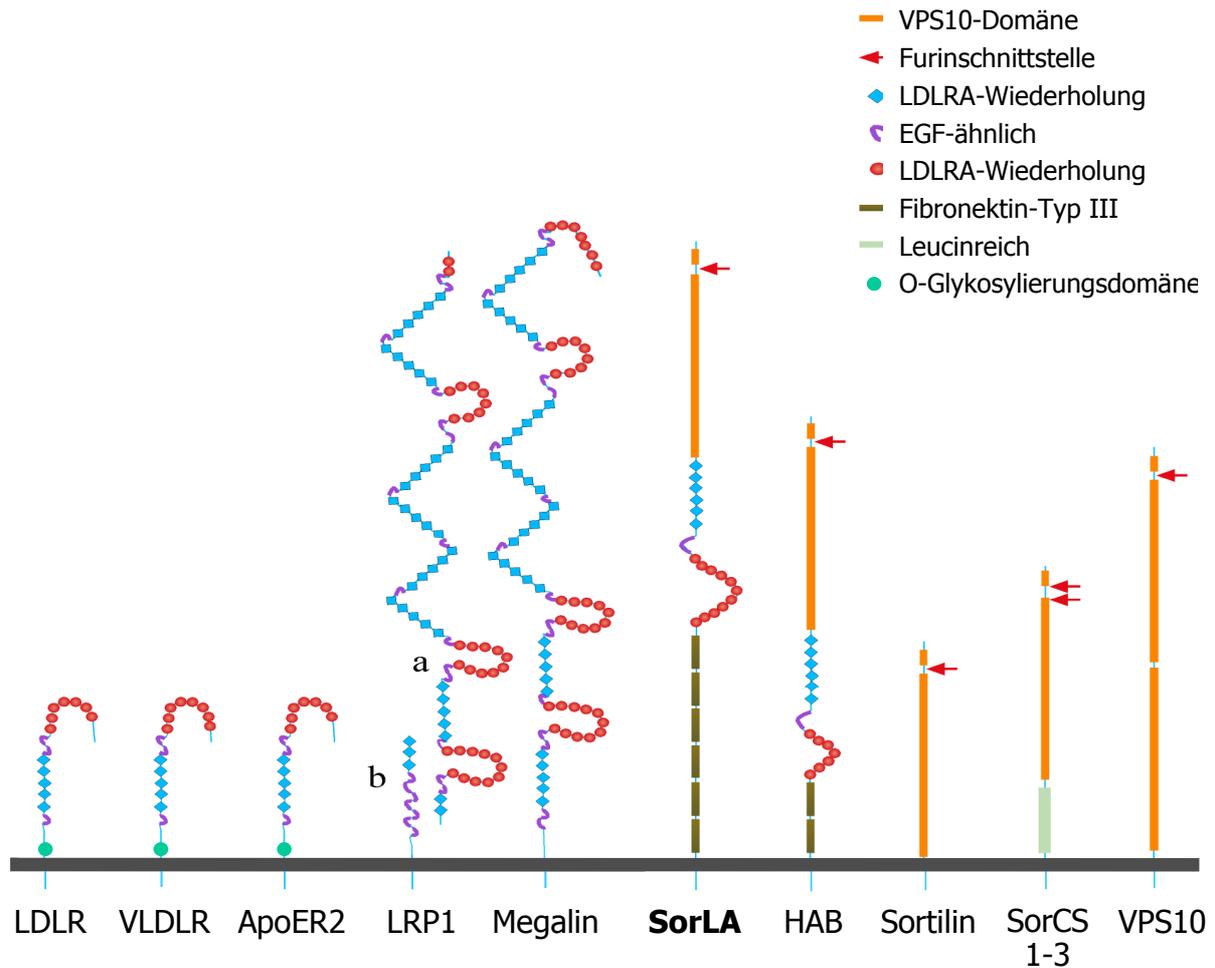
# 1 Einleitung

Die Fähigkeit von Zellen, Signale von außerhalb der Zellmembran zu empfangen und weiterzuleiten, stellt die Voraussetzung für jegliches Leben dar. Diese Funktion wird von Rezeptorproteinen übernommen, die in der Lage sind, Reize aus der Umgebung zu registrieren und den Organismus zu einer Reaktion zu befähigen, die er zum Überleben benötigt. Damit jede einzelne Zelle eines mehrzelligen Organismus ihre spezifische Aufgabe übernehmen kann, ist eine Kommunikation der Zellen untereinander unerlässlich. Durch die Bindung von Transmittermolekülen an ihre Rezeptoren werden Signalkaskaden eingeleitet, die es den Zellen ermöglichen, Informationen z. B. in den Zellkern oder an andere Zellen weiterzuleiten. Ein großes Interesse der heutigen Forschung besteht in der Aufklärung der neuronalen Signalweiterleitung. Mutationen von Rezeptoren im zentralen Nervensystem, ihrer Liganden oder anderer an dem Signalweg eines Rezeptors beteiligter Proteine bedingen pathologische Veränderungen des Gehirnstoffwechsels und stellen somit die Ursache vieler Erkrankungen dar. Nur mit einem Verständnis der exakten molekularen Vorgänge im Gehirn wird es möglich sein, gezielte Arzneistoffe gegen die Alzheimer-Demenz, Schizophrenie und andere neurologische Erkrankungen zu entwickeln.

Einer der vielen neuronalen Rezeptoren ist der hoch konservierte Transmembranrezeptor SorLA. Homologe Proteine findet man in Maus und Ratte aber auch in dem Süßwasserpolyphen *Chlorohydra viridissima*. Er scheint für bestimmte Vorgänge im Gehirn eine wichtige Rolle zu spielen, seine genaue Funktion ist aber bisher noch ungeklärt. Mit dieser Arbeit sollte ein erster Einblick in die durch den Rezeptor SorLA vermittelte Signalkaskade erhalten werden.

## 1.1 Domänenstruktur des Mosaikrezeptors SorLA

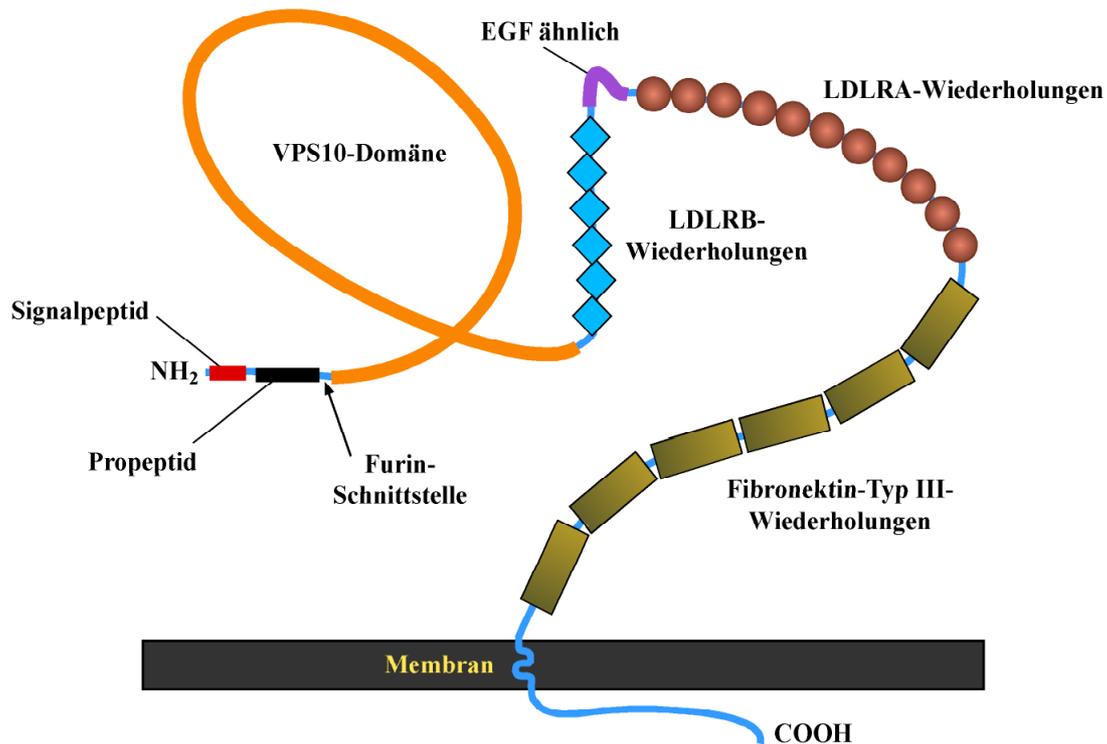
Der Typ-I-Transmembranrezeptor SorLA (*sorting-receptor related protein containing low-density lipoprotein receptor class A repeats*) bzw. LR11 (*LDLR relative with 11 binding repeats*) wurde 1996 als ein Mosaikrezeptor identifiziert (Jacobsen *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1996), der aufgrund seiner Domänenstruktur sowohl in die Familie der Lipoproteinrezeptoren als auch in die der Rezeptoren mit VPS10-Domäne eingeordnet werden kann. Abbildung 1 verdeutlicht die strukturelle Verwandtschaft von SorLA mit Mitgliedern aus der Familie der LDL-Rezeptoren sowie mit Rezeptoren, die eine VPS10-Domäne enthalten. Das zu SorLA homologe Protein HAB (*head-activator binding protein*) aus *Chlorohydra viridissima* lässt die starke Konservierung des Rezeptors erkennen.



**Abb. 1: SorLA und verwandte Rezeptoren**

SorLA beinhaltet sowohl Strukturelemente der Lipoproteinrezeptorfamilie wie z. B. des LDL-Rezeptors selbst, des VLDL- (*very low density lipoprotein-*) Rezeptors, des ApoE- (*apolipoprotein E-*) Rezeptors 2, LRP1 und Megalin aber auch solche aus der Rezeptorfamilie mit VPS10-Domäne wie Sortilin und SorCS1-3. Der homologe Rezeptor HAB aus *Chlorohydra viridissima* unterscheidet sich nur durch die Anzahl an Fibronectin-Typ-III-Domänen und LDLRA-Wiederholungen von SorLA.

SorLAs Außendomäne umfasst ein Signal- und ein Propeptid, eine VPS10-Domäne gefolgt von sechs LDLRB- (*low-density lipoprotein receptor class B-*) Wiederholungen, eine EGF- (*epidermal growth factor-*) ähnliche Domäne, elf LDLRA- (*low-density lipoprotein receptor class A-*) Wiederholungen und sechs Fibronectin-Typ-III-Wiederholungen. An sie schließen sich eine Transmembrandomäne und ein kurzer cytoplasmatischer Carboxyterminus an (Abb. 2).

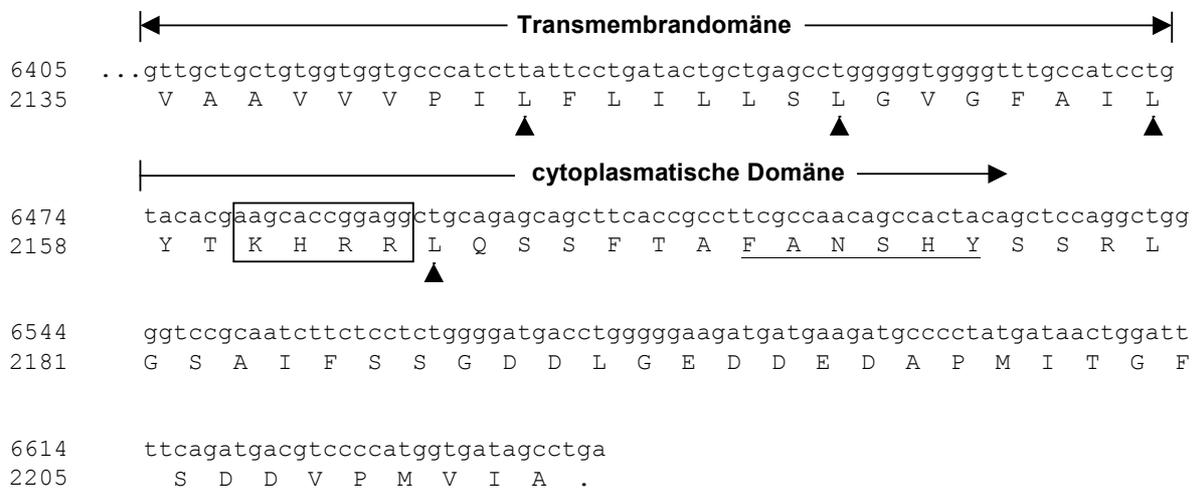


**Abb. 2: Domänenstruktur von SorLA**

Das Propeptid besteht aus 53 Aminosäureresten und endet mit dem Aminosäure-Erkennungsmotiv RRKR für die Endoprotease Furin (Nakayama, 1997; Molloy *et al.*, 1999). Es wird bei der Reifung des Rezeptors im Golgi-Apparat abgespalten (Hampe *et al.*, 2000). Die dem Propeptid folgende VPS10-Domäne wurde zuerst in dem Carboxypeptidase-Y-Rezeptor VPS10 in Hefe beschrieben (Abb. 1). VPS10 ist in diesem Organismus an der Sortierung der Carboxypeptidase Y vom Golgi in die Vakuolen beteiligt (Marcusson *et al.*, 1994; Horazdovsky *et al.*, 1995). Die LDLRA- und LDLRB-Wiederholungen sowie die EGF-ähnlichen Domänen sind typisch für die Mitglieder der Lipoproteinrezeptorfamilie. Über sie wird die Bindung und Dissoziation der Liganden vermittelt (Krieger und Herz, 1994; Davis *et al.*, 1987). Fibronectin-Typ-III-Domänen werden häufig in neuronalen Proteinen gefunden, u. a. in den neuronalen Adhäsionsmolekülen N-CAM und L1 (Brummendorf und Rathjen, 1993). Es werden derzeit verschiedene Funktionen der Fibronectin-Domänen diskutiert. Sie sind beispielsweise bei dem extrazellulären Matrixmolekül Tenascin-C an der Modulation von hippocampalen Lernprozessen und synaptischer Plastizität beteiligt (Strekalova *et al.*, 2002). Innerhalb der Transmembrandomäne von SorLA befinden sich die ersten drei Leucinreste eines Leucinzipper-Motivs, der vierte Leucinrest ist im Cytosol lokalisiert (Abb. 3). Man findet solche Motive häufig in Proteinen, die direkt an DNA-Sequenzen binden und bei der

Regulation von Transkriptionsprozessen eine Rolle spielen (Harrison *et al.*, 1991). Durch die  $\alpha$ -helikale Struktur des Leucinzipper-Motivs können Proteine über diese Domäne Homo- oder Heterodimere bilden und mit bestimmten Bereichen der DNA interagieren. Ob diesem Motiv in SorLA jedoch eine Bedeutung zugemessen werden darf, ist zur Zeit unklar.

Der Transmembrandomäne von SorLA schließt sich eine kurze, 56 Aminosäuren umfassende, cytoplasmatische Domäne an (Abb. 3), die Motive für Internalisierung (Chen *et al.*, 1990; Jacobsen *et al.*, 1996), G-Proteinkopplung (Hampe *et al.*, 1999) und Kernlokalisierung enthält (identifiziert mit dem Programm PSORT II; Nakai und Horton, 1999). Sie wird im Folgenden als SorLAcp bezeichnet.



**Abb. 3: Transmembrandomäne und cytoplasmatische Domäne von SorLA**

Dargestellt ist die codierende Nukleotidsequenz und die daraus abgeleiteten Aminosäuren. Die Leucinreste des Leucinzipper-Motivs sind durch kleine Pfeile gekennzeichnet. Die umrahmten Aminosäurereste KHRR bilden das putative Kernlokalisierungssignal. Das mögliche Internalisierungsmotiv FANSHY ist unterstrichen.

Die SorLA-mRNA wird in verschiedenen Geweben wie Hoden, Leber, Pankreas und adrenergen Drüsen (Yamazaki *et al.*, 1996) gebildet. Eine besonders starke Expression des Rezeptors liegt im Gehirn vor. Dort wurde er insbesondere in Neuronen des Hippocampus, des Hirnstamms und der Purkinje-Zellen nachgewiesen (Motoi *et al.*, 1999; Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1998). Kürzlich wurde neben der neuronalen auch eine gliale Expression SorLAs beobachtet (Offe *et al.*, persönliche Mitteilung).

## 1.2 Funktionen von SorLA

Es werden zur Zeit verschiedene Funktionen von SorLA diskutiert. Der Rezeptor scheint wie alle Lipoproteinrezeptoren eine Funktion im Lipidmetabolismus zu besitzen. So wurde die Bindung und Aufnahme von Apolipoprotein-E-reichen Lipoproteinen (Bujo *et al.*, 2000; Taira *et al.*, 2001) sowie eine erhöhte Expression des Rezeptors in atherosklerotischen Läsionen (Kanaki *et al.*, 1999) gezeigt. Die Interaktion von GGA1 und GGA2 (*golgi-localized, gamma-ear-containing, ARF-binding protein*) mit SorLAcp weist außerdem auf eine Beteiligung SorLAs an zellulärer Proteinsortierung hin (Jacobsen *et al.*, 2002). GGAs werden in Hefe und eukaryotischen Zellen für die Bildung Clathrin-ummantelter Vesikel im Trans-Golgi-Netzwerk benötigt (Zhu *et al.*, 2001; Puertollano *et al.*, 2001) und sind damit essentiell für Golgi-Endosom-Proteinsortierungsprozesse.

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Rezeptoren der Lipoproteinrezeptorfamilie an neuronalen Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind. So sind der VLDL-Rezeptor und der Apolipoprotein-E-Rezeptor an der Reelin-Signalkaskade und damit maßgeblich an neuronalen Entwicklungsprozessen beteiligt (Trommsdorff *et al.*, 1999). LRP, ein weiteres Mitglied der Lipoproteinrezeptorfamilie, ist nach Bindung seines Liganden  $\alpha_2$ -Macroglobulin an einem durch den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in primäre Neurone beteiligt (Bacsikai *et al.*, 2000). Auch SorLA besitzt eine Funktion als Signalrezeptor. Wie auch sein Homolog HAB aus *Chlorohydra viridissima* bindet SorLA das Neuropeptid Kopfaktivator (Hampe *et al.*, 2000). Die Bindung dieses Liganden an die VPS10-Domäne stimuliert die Abspaltung der Ektodomäne von SorLA, dessen Translokation und Neusynthese sowie die Mitose und Proliferation der neuroendokrinen Zelllinie BON und der neuronalen Vorläuferzelllinie NT2 (Hampe *et al.*, 2000; Lintzel *et al.*, 2002).

Ein weiterer Hinweis auf SorLAs Rolle in Signaltransduktionsprozessen wurde kürzlich innerhalb der Arbeitsgruppe erhalten. SorLA unterliegt, wie auch eine Reihe weiterer Typ-I-Transmembranproteine (Fortini, 2002; Medina und Dotti, 2003), einer sogenannten regulierten Intramembranproteolyse durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex. Dieser neu identifizierte Signaltransduktionsweg soll an dieser Stelle kurz erklärt werden:

Die Tatsache, dass Presenilin als  $\gamma$ -Sekretase an der Generierung des A $\beta$ -Peptids aus APP (*amyloid precursor protein*;) beteiligt ist und somit eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung einnimmt, führte zu vielfältigen Bemühungen, die Funktion dieses Proteins zu verstehen. Man weiß heute, dass Presenilin 1 bzw. seine Isoform Presenilin 2 zusammen mit den Proteinen Nicastrin, APH-1 und PEN-2 eine proteolytisch aktive Funktionseinheit bildet, die als  $\gamma$ -Sekretase-Komplex bezeichnet wird (Medina und Dotti, 2003).

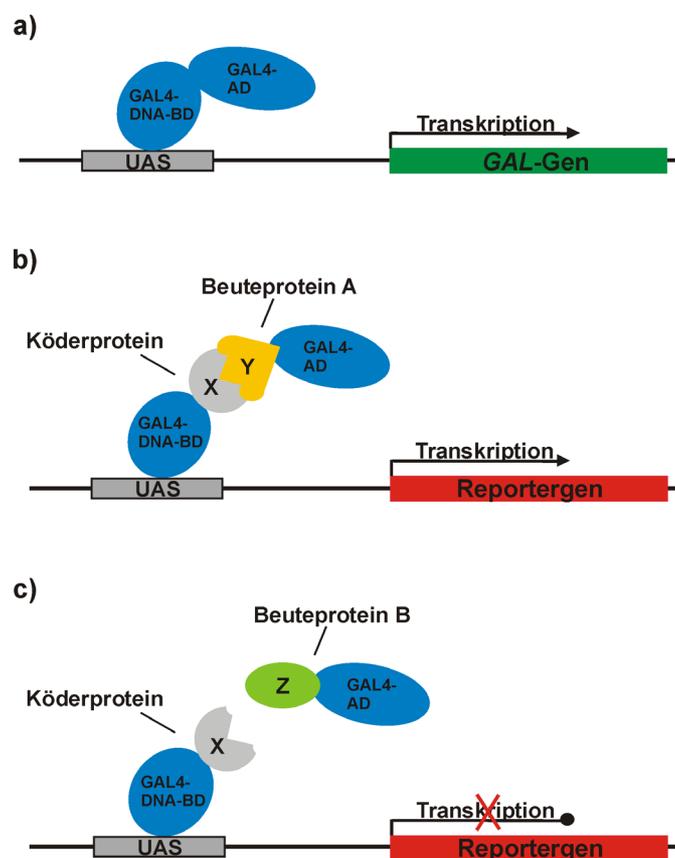
Die Beteiligung des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes an der Signalkaskade des Rezeptors Notch prägte erstmals den Begriff der regulierten Intramembranproteolyse. Die Bindung eines Liganden wie z. B. des Proteins Delta an Notch führt zur Abspaltung der Ektodomäne des Rezeptors durch eine Metalloprotease. Direkt daran anschließend findet eine zweite Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase innerhalb der Membran statt (De Strooper *et al.*, 1999). Die so freigesetzte cytoplasmatische Domäne von Notch transloziert in den Zellkern und hebt dort durch eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Repression eines Zielgens auf. Der Signalweg von Notch ist essentiell für die interzelluläre Kommunikation und besitzt einen großen Einfluss auf die Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems (Mumm und Kopan, 2000; Fortini, 2002; Selkoe und Kopan, 2003).

Innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführte Versuche zeigten auch für SorLA eine auf den  $\gamma$ -Sekretase-Schnitt folgende Translokation von SorLAcp in den Zellkern. Die Analogie zu der Signalkaskade von Notch lässt vermuten, dass weitere Adaptorproteine und Transkriptionsfaktoren für eine potentiell durch SorLAcp eingeleitete Expression von Zielgenen benötigt werden. Ziel dieser Arbeit war es, Proteine, die an SorLAcp binden, mittels einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse zu identifizieren. Durch die weitere Charakterisierung dieser Proteine sollte ein Hinweis auf ihre mögliche Funktion in der durch SorLA vermittelten Signalkaskade erhalten werden.

### 1.3 Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Bei dem Hefe-Zwei-Hybrid-System handelt es sich um eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Das System wurde ursprünglich im Labor von Stanley Fields entwickelt und macht sich die Eigenschaften des GAL4-Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* zunutze (Fields und Song, 1989; Toby und Golemis, 2001). Bei diesem Protein handelt es sich um einen Transkriptionsaktivator, der die Expression von Genen einleitet, die für Enzyme des Galaktosestoffwechsels codieren (Johnston, 1987). Er besteht aus zwei funktionellen Domänen: Die N-terminale Domäne bindet an eine spezifische DNA-Sequenz in der Promotorregion (**UAS** = *upstream activating sequence*) des Zielgens, die C-terminale Domäne aktiviert die Transkription des nachgeschalteten Gens. Das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems beruht auf der Separation dieser beiden Domänen und deren Fusionierung mit Proteinen, die auf eine Interaktion getestet werden sollen (Abb. 4). Das Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindedomäne stellt hierbei das Köderprotein dar, das mit der GAL4-Aktivierungsdomäne wird als Beuteprotein bezeichnet. Nur im Falle einer Protein-Protein-Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein sind die Domänen des GAL4-Proteins wieder vereint, und die GAL4-Aktivierungsdomäne kann die Transkription eines nachgeschalteten

Reportergens einleiten. Die anschließende Translation des codierten Enzyms kann entsprechend seiner Eigenschaft durch eine Farbreaktion oder Wachstumsanalyse der Hefen in einem bestimmten Mangelmedium nachgewiesen werden. Interagieren die beiden Fusionsproteine nicht miteinander, kann keine Funktionseinheit aus der GAL4-DNA-Bindedomäne und der Aktivierungsdomäne entstehen, die Transkription der Reportergene und die Synthese des codierten Enzyms unterbleibt. Das Hefe-Zwei-Hybrid-System bietet neben der direkten Untersuchung einer Protein-Protein-Interaktion die Möglichkeit, aus einer Vielzahl an Beuteproteinen, die von Plasmiden einer cDNA-Bank codiert werden, spezifische Bindungspartner zu selektionieren. Das System stellt somit ein wichtiges Hilfsmittel bei der Aufklärung rezeptorvermittelter Signalkaskaden dar.



**Abb. 4: Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems**

a) Modell der Transkriptionsaktivierung eines *GAL*-Gens durch das GAL4-Protein in *Saccharomyces cerevisiae*

Nach Bindung der GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4-DNA-BD) an eine stromaufwärts gelegene Aktivierungssequenz der DNA (UAS) leitet die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) die Transkription des nachgeschalteten *GAL*-Gens ein.

b) und c) Modell des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Durch die Interaktion der Proteine X und Y entsteht ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor aus dem Köderprotein und dem Beuteprotein A, der die Transkription des Reportergens einleitet (b). Bei einer fehlenden Wechselwirkung der Proteine X und Z unterbleibt die durch die GAL4-Aktivierungsdomäne vermittelte Transkriptionsaktivierung (c).

## 2 Ergebnisse

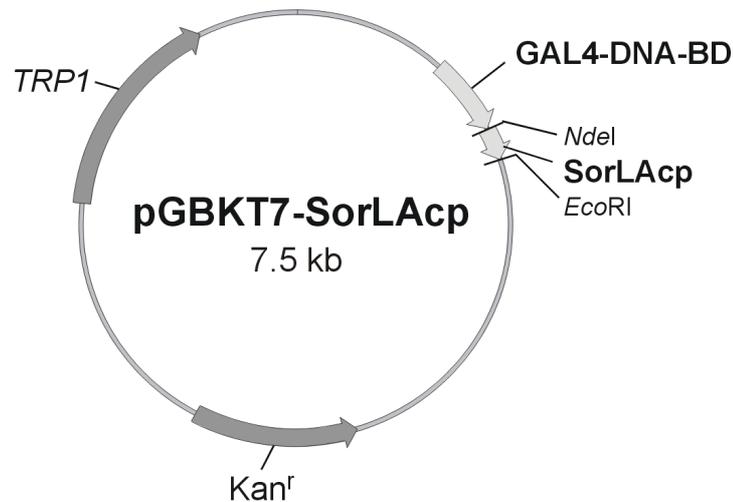
In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse sowie die Bestätigung der Interaktion von SorLAcp mit den potentiellen Bindungspartnern THG-1a, ART-27 und PLD3 vorgestellt. Anschließend werden die Untersuchungen erläutert, die zu jedem der drei Proteine durchgeführt wurden.

### 2.1 Identifizierung intrazellulärer Bindungspartner von SorLAcp mit der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode

Für die Identifizierung potentieller Interaktionspartner von SorLAcp mit der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode (siehe 1.3) wurde das *MATCHMAKER*<sup>®</sup> 3 System der Firma Clontech verwendet. Zur Reduktion der Anzahl falsch-positiver Klone sind in dem Hefestamm AH109 dieses Systems mehrere Reportergene integriert. Es handelt sich hierbei um die Gene *HIS3*, *ADE2*, *lacZ* und *MEL1*. Sie stehen unter der Kontrolle der GAL4-Aktivierungssequenz und eines Minimalpromotors (TATA-Box). Bei einer Interaktion des Köderproteins mit einem Beuteprotein wird die Transkription aller Reportergene eingeleitet. Durch Aktivierung der Gene *HIS3* und *ADE2* werden die Hefen befähigt, in Medien zu wachsen, denen Adenin und Histidin fehlen. Die Transkription des *lacZ*-Gens führt zur Bildung des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase, das nach Aufschluss der Hefen durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Alternativ kann die Expression des *MEL1*-Reportergens genutzt werden, dessen Aktivierung zur Bildung des sekretierten Enzyms  $\alpha$ -Galaktosidase führt. Dieses kann direkt auf Indikator-Agarplatten durch Blaufärbung der Hefekolonien nachgewiesen werden. Durch die Selektion von Hefekolonien, in denen alle Reporterkonstrukte aktiviert worden sind, werden von Beginn an solche ausgeschlossen, bei denen das Beuteprotein fälschlicherweise eine Selbstaktivierung nur eines der Reportergene verursacht hat.

#### 2.1.1 Klonierung des Köderkonstruktes

Zur Herstellung des Köderkonstruktes wurde die für SorLAcp codierende DNA-Sequenz durch eine PCR amplifiziert und in die *EcoRI*- und *NdeI*-Schnittstellen des Vektors pGBKT7 eingefügt. Das resultierende Konstrukt pGBKT7-SorLAcp wurde durch Sequenzierung überprüft. Es enthält den durchlaufenden Leserahmen zur Expression eines Fusionsproteins aus der DNA-Bindedomäne des GAL4-Proteins und SorLAcp (Abb. 5 und 6).



**Abb. 5: pGBKT7-SorLAcp**

Die 171 Basenpaare umfassende Sequenz von SorLAcp wurde so in den Vektor eingefügt, dass ein durchgängiges Leseraster mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4-DNA-BD) entstand. Durch das Gen *TRP1* können Hefen, die mit diesem Vektor transformiert worden sind, in Trp-Medium selektiert werden. Das Kanamycin-Resistenzgen (*Kan<sup>r</sup>*) dient als Hilfsmittel für die bakterielle Selektion.

		<b>GAL4-DNA-Bindedomäne</b>																
1155		TCA	TCG	GAA	GAG	AGT	AGT	AAC	AAA	GGT	CAA	AGA	CAG	TTG	ACT	GTA	TCG	→
		S	S	E	E	S	S	N	K	G	Q	R	Q	L	T	V	S	
1203		CCG	GAA	TTT	GTA	ATA	CGA	CTC	ACT	ATA	GGG	CGA	GCC	GCC	ATC	ATG	GAG	
		P	E	F	V	I	R	L	T	I	G	R	A	A	I	M	E	
1251		GAG	CAG	AAG	CTG	ATC	TCA	GAG	GAG	GAC	CTG	<u>NdeI</u>		<u>SorLAcp</u>			→	
		E	Q	K	L	I	S	E	E	D	L	H	M	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>...</b>	
1445		*				<u>EcoRI</u>												
		<b>...</b>	<b>GTG</b>	<b>ATA</b>	<b>GCC</b>	<b>TGA</b>	ATA	ATC	ACT	AGT	GAA	TTC	CCG	GGG	ATC	CGT	CGA	
		<b>V</b>	<b>I</b>	<b>A</b>	<b>.</b>													

**Abb. 6: Übergang der GAL4-DNA-Bindedomäne zu SorLAcp im pGBKT7-Vektor**

Die DNA-Sequenz von SorLAcp ist zwischen die *NdeI*- und *EcoRI*-Schnittstellen des Vektors eingefügt, so dass sich ein durchgängiger Leseraster für das Fusionsprotein codierende Sequenz ergibt. Der Stern (\*) kennzeichnet das Stoppcodon. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist als Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Die Nummerierung der Nukleotide erfolgte entsprechend der Vektorkarte des pGBKT7-Vektors (*MATCHMAKER*<sup>®</sup> 3 System, Clontech).

### 2.1.2 Prüfung auf Transaktivierung der Reportergene durch das Köderprotein

Um eine Transaktivierung der Reportergene durch das Köderprotein auszuschließen, wurden mit pGBKT7-SorLAc<sub>p</sub> transformierte Hefen des Hefestamms AH109 auf Reporter-genaktivierung getestet. Die Hefen waren in der Lage, auf Trp<sup>-</sup>-Agarplatten zu wachsen. Dadurch wurde gezeigt, dass die Hefen mit dem Vektor transformiert waren und dass das Köderprotein nicht toxisch für sie war. Auf Trp<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Nährböden konnten die transformierten Hefen dagegen nicht wachsen. Das Fusionsprotein aus der GAL4-DNA-Bindedomäne und SorLAc<sub>p</sub> führte folglich nicht zu einer Transkriptionsaktivierung des *ADE2*- und *HIS3*-Gens. Auf Trp<sup>-</sup>/X- $\alpha$ -Gal-Agarplatten waren keine blauen Kolonien zu erkennen. Es fand somit auch keine Aktivierung des *MEL1*-Gens statt, und das Enzym  $\alpha$ -Galaktosidase, das durch die Umsetzung des Substrats X- $\alpha$ -Gal eine Blaufärbung der Hefekolonien bewirkt hätte, wurde nicht gebildet. Dieser Vorversuch zeigte, dass sich das Köderkonstrukt für die weiteren Versuche eignete.

### 2.1.3 Durchmusterung einer cDNA-Bank aus menschlichem Gehirn

Für die anschließende Durchmusterung aller im menschlichen Gehirn vorkommenden mRNAs wurden mit pGBKT7-SorLAc<sub>p</sub> prätransformierte Hefen mit einer reamplifizierten cDNA-Bank aus menschlichem Gehirn (*oligo-dT-primed* im pACT2-Vektor, Clontech) transformiert, die etwa  $2 \times 10^6$  unabhängige Klone umfasste. Die pACT2-Vektoren der cDNA-Bank enthalten die codierende Sequenz für die Fusionsproteine aus der GAL4-Aktivierungsdomäne und den Beuteproteinen. Sie beinhalten außerdem das *LEU1*-Gen, dessen Expression Hefen, die mit einem der cDNA-Bank-Plasmide transformiert wurden, ein Wachstum in Leu<sup>-</sup>-Medium ermöglicht. Die Anzahl der Transformanden wurde nach Ausplattierung des Transformationsansatzes auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>-Agarböden und anschließender Auszählung der Kolonien bestimmt. Sie betrug etwa  $1.3 \times 10^6$ . Die Selektion auf Aktivierung aller Reporterkonstrukte erfolgte auf 15 großen Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>/X- $\alpha$ -Gal-Agarplatten. Von insgesamt annähernd 150 Kolonien waren ca. 90 blau gefärbt. Es wurden 60 blaue Klone ausgewählt und ihr Wachstumsverhalten durch mindestens zweimaliges Ausstreichen auf dem Selektionsnährboden überprüft.

### 2.1.4 Analyse der positiven Klone

Um einen einfachen Zugang zu den Sequenzen der cDNAs zu bekommen, die für die Beuteproteine in den positiven Hefeklonen codieren, wurden sie nach Lyse der Hefezellen durch eine direkte PCR amplifiziert. Da der Erfolg dieser Methode stark von der Größe der zu amplifizierenden Sequenz und der vollständigen Lyse der harten Hefezellwände abhängt, gelang die PCR nur bei 41 von den 60 ausgewählten Klonen. Die PCR-Produkte wurden vom 5'-Ende aus ansequenziert und anschließend mit bestehenden Datenbankeinträgen verglichen (NCBI, GenBank). Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms DNASTar. Es wurden diejenigen cDNAs verworfen, die sich nicht im richtigen Leseraster hinter der DNA-Sequenz für die Aktivierungsdomäne des GAL4-Proteins im pACT2-Vektor befanden. Ausgeschlossen wurden auch cDNAs, die für Proteine codieren, deren Interaktion mit SorLAcp aufgrund ihrer Lokalisierung außerhalb des Cytosols unphysiologisch wäre. Übrig blieben insgesamt 12 Klone, die eine cDNA enthielten, deren abgeleitetes Protein als potentieller Bindungspartner für SorLAcp in Frage kam. Es handelte sich hierbei um cDNA-Sequenzen für die Proteine FANCL (*Fanconi anemia, complementation group L*), Snapin, Sharpin, PLD3 (*Phospholipase D3*), die Serinprotease HtrA2 (*high temperature requirement protein A2*), ART-27 (*androgen-receptor trapped clone-27*), das uncharakterisierte Hypothalamusprotein HSMNP1, ein unbekanntes Genprodukt des cDNA-Klons FLJ90634fis, WSB-1 (*WD-repeat and SOX-box containing protein 1*), den Laminin-Rezeptor 1, eine Spleißvariante des Proteins THG-1 (*transforming growth factor- $\beta$ -stimulated clone-22 homologue-1*, im Folgenden als THG-1a bezeichnet) und das hypothetische Protein DKFZp434F054. Abgesehen von der cDNA für Snapin, die in drei unabhängigen Klonen enthalten war, wurden die cDNAs aller übrigen potentiellen Interaktionspartner nur einmalig identifiziert.

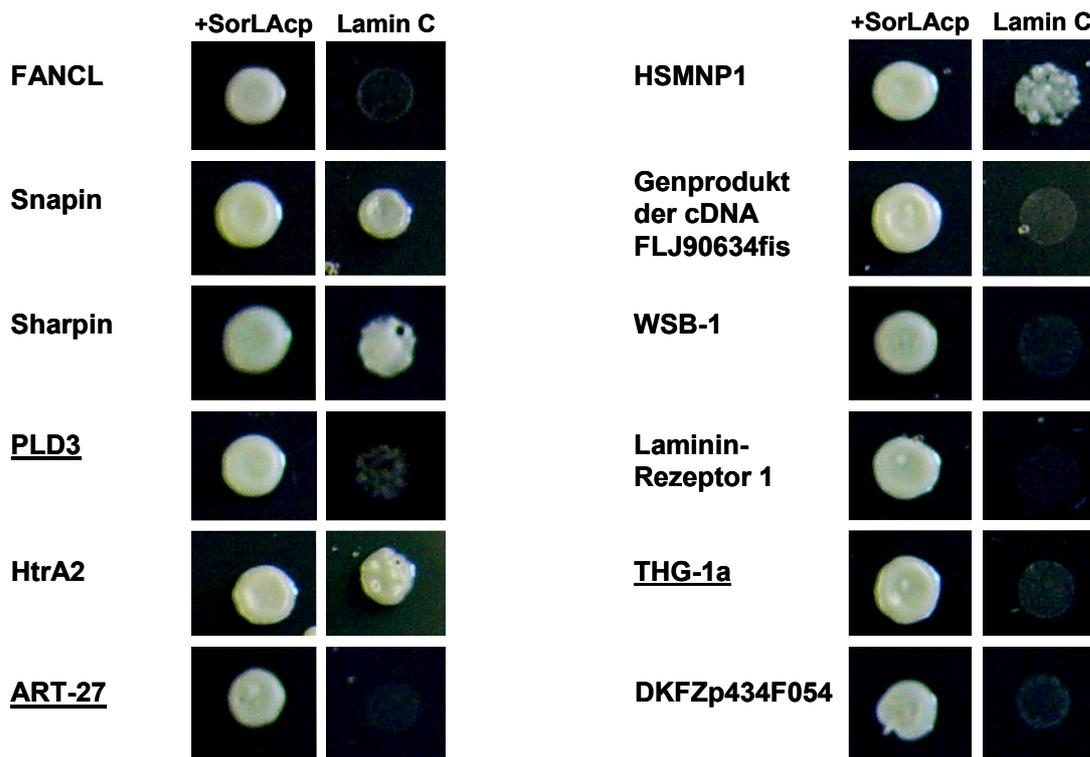
Da die Problematik einer großen Anzahl falsch-positiver Klone auch bei dem verwendeten MATCHMAKER<sup>®</sup> 3 System noch besteht, wurden durch die nachfolgenden Versuche weitere offensichtlich falsche Klone eliminiert.

#### Retransformationskontrolle

Um Doppeltransformationen und Aktivierung der Reportergene durch kotransformierte Beuteproteine auszuschließen, wurden zunächst die cDNA-Bank-Plasmide aus den Hefen isoliert und in pGBKT7-SorLAcp enthaltende Hefen retransformiert. In allen 12 Fällen wurde ein uneingeschränktes Wachstum auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Agarplatten beobachtet (nicht gezeigt).

### Untersuchung der Bindungsspezifität von SorLAcP und den Beuteproteinen

Als nächstes wurde kontrolliert, ob die Aktivierung der Reportergene durch eine spezifische Interaktion von SorLAcP mit den Beuteproteinen ausgelöst wird. Dazu wurden die cDNA-Bank-Plasmide in Hefen transformiert, die den Vektor pGBKT7-Lamin C enthielten. Bei einer unspezifischen Interaktion der Beuteproteine mit dem Köderprotein bestehend aus der GAL4-DNA-Bindedomäne und Lamin C oder einer Bindung der Beuteproteine an die Promotoren der Reportergene würde die nachfolgende Transkription dieser Gene die Hefen zum Wachstum auf den Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Agarböden befähigen. Ein Vergleich des Wachstumsverhaltens ergab, dass die Hefen, die das Plasmid pGBKT7-Lamin C und einen der pACT2-Vektoren mit den für Snapin, Sharpin, HtrA2 oder HSMNP1 codierenden cDNAs enthielten, unter den o. g. Selektionsbedingungen wuchsen (Abb. 7). Es scheint somit zwischen SorLAcP und diesen Proteinen keine spezifische Interaktion vorzuliegen. Diese Klone wurden deshalb von der weiteren Analyse ausgeschlossen.



**Abb. 7: Mit SorLAcP interagierende Proteine im Hefestamm AH109**

Hefen wurden mit pGBKT7-SorLAcP und der cDNA der Bindungspartner im pACT2-Vektor kotransformiert (+SorLAcP). Sie sind in der Lage, auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Nährböden zu wachsen. Zur Kontrolle wurden die Hefen mit pGBKT7-Lamin C und den cDNA-Bank-Plasmiden kotransformiert (+Lamin C). Wuchsen diese Hefen auf dem Selektionsmedium, wurde die Interaktion als falsch-positiv angesehen und die cDNA von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die im Folgenden weiter untersuchten Proteine sind unterstrichen dargestellt.

Anschließend wurde in Datenbanken nach typischen falsch-positiven Interaktionspartnern bei Verwendung der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode recherchiert (<http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>). Es handelt sich hierbei um ribosomale, mitochondriale und an Proteinfaltung und -degradation beteiligte Proteine. Ein solches Protein ist der Laminin-Rezeptor 1, ein ribosomales Protein, dessen cDNA daher ebenfalls von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde. Die cDNA-Sequenz der verbleibenden 7 Klone und die dazu vorhandenen Datenbankeinträge wurden genauer untersucht (Tab. 1).

codiertes Protein	GenBank-Eintrag	Länge des vollständigen offenen Leserasters (Nukleotide)	offenes Leseraster der cDNA in pACT2 (Nukleotide)	Funktion / Merkmale
<b>FANCL</b>	BC054517	1127	699 - 1127	Ubiquitin-Ligase (Meetei <i>et al.</i> , 2003)
<b>Genprodukt der cDNA FLJ90634fis</b>	AK075115	1358	734 - 1358	unbekannt
<b>DKFZp434F054</b>	BC008025	2372	1964 - 2372	unbekannt
<b>WSB-1</b>	BC021110	1265	890 - 1265	- SOCS-Domäne enthaltendes WD-Protein (Hilton <i>et al.</i> , 1998; siehe 3.1); - vielfältige Funktionen für Proteine mit WD-Wiederholungen beschrieben (Neer <i>et al.</i> , 1994); - Beteiligung der SOCS-Familienmitglieder an der negativen Regulation von Signaltransduktionsprozessen (Nicholson <i>et al.</i> , 1998)
<b>PLD3</b>	BC036327	1472	1124 - 1472	- Beteiligung von PLDs an Signaltransduktionsprozessen (Rizzo und Romero, 2002; siehe 2.5); - keine Phospholipaseaktivität des Mausehomologs SAM-9 (Pedersen <i>et al.</i> , 1998)
<b>ART-27</b>	BC008890	473	vollständig	- Koaktivator bei androgenrezeptorvermittelter Transaktivierung; - Lokalisierung v. a. im Zellkern (Markus <i>et al.</i> , 2002; siehe 2.4)
<b>THG-1a</b>	nicht vorhanden	507	vollständig	- Spleißvariante des Transkriptionsrepressors THG-1 (GenBank-Eintrag BC001486; Kester <i>et al.</i> , 1999; siehe 2.3.1)

Tab. 1: Ausgewählte Interaktionspartner von SorLAcp

Die cDNAs, die mit den Datenbankeinträgen für FANCL, FLJ90634fis, DKFZp434F054, WSB-1 und PLD3 übereinstimmten, waren jeweils nur als Fragment im pACT2-Vektor enthalten. Die Fragmente umfassten einige hundert der terminalen Nukleotide des offenen Leserasters und daran anschließende 3' untranslatierte Sequenzen. Die Interaktion mit SorLAcp fand bei diesen Proteinen somit innerhalb ihrer C-terminalen Bereiche statt. Die cDNA-Sequenzen, die für ART-27 und THG-1a codieren, waren dagegen vollständig im pACT2-Vektor enthalten. Über die Proteine FANCL, DKFZp434F054 und das Genprodukt der cDNA FLJ90634fis war zum Zeitpunkt der Datenbankanalyse noch nichts bekannt. FANCL wurde erst kürzlich als eine Ubiquitin-Ligase identifiziert (Meetei *et al.*, 2003) und gehört damit als am Proteinabbau beteiligte Komponente zu den typischen falsch-positiven Interaktionspartnern bei der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse.

Da SorLA in Bezug auf seine Signalkaskade hin untersucht werden sollte, erschien die Interaktion mit der möglicherweise an Signaltransduktionsprozessen beteiligten PLD3 und den Transkriptionsfaktoren ART-27 und THG-1a besonders interessant zu sein. Diese Proteine wurden im Verlauf der Arbeit näher untersucht. Das Protein WSB-1 könnte ebenfalls bei der Signaltransduktion von SorLA eine Rolle spielen, es wurde jedoch nicht weiter analysiert.

### 2.1.5 Identifizierung proteinbindender Regionen von SorLAcp mit Hilfe der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode

Um die für die Bindung von PLD3, ART-27 und THG-1a verantwortlichen Aminosäurereste in SorLAcp näher einzugrenzen, wurden Hefen mit Deletionskonstrukten von SorLAcp (Abb. 8) im pGBKT7-Vektor und anschließend mit den Beutepiasmiden pACT2-PLD3, pACT2-ART-27 oder pACT2-THG-1a transformiert. Untersucht wurde, ob Hefen, die anstelle des vollständigen pGBKT7-SorLAcp-Köderkonstruktes SorLAcp-Deletionsmutanten enthielten, auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Nährböden wachsen konnten (Abb. 9).

	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210
SorLA	—	...STDVAAVVVPIILFLILLSLGVGF	AILY	YTKHRR	LQSSFTA	FANSHYSSRLGSAIFSSGDDLGEDDEDAPMITGFSDDVPMVIA.		
SorLAcp	—			YTKHRR	LQSSFTA	FANSHYSSRLGSAIFSSGDDLGEDDEDAPMITGFSDDVPMVIA.		
SorLAcp $\Delta$ 14	—			YTKHRR	LQSSFTA	FANSHYSSRLGSAIFSSGDDLGEDDEDAP.		
SorLAcp $\Delta$ 25	—			YTKHRR	LQSSFTA	FANSHYSSRLGSAIFSSG.		
SorLAcp $\Delta$ 43	—			YTKHRR	LQSSFTA.			

**Abb. 8: Aminosäuresequenz von SorLAcp und den untersuchten Deletionskonstrukten**

SorLAcp besteht aus den cytosolischen 55 Aminosäureresten, die sich an die Transmembrandomäne (grau hinterlegt) anschließen. Bei den Deletionskonstrukten SorLAcp $\Delta$ 14, SorLAcp $\Delta$ 25 und SorLAcp $\Delta$ 43 fehlen die C-terminalen 14, 25, bzw. 43 Aminosäurereste.

**PLD3**

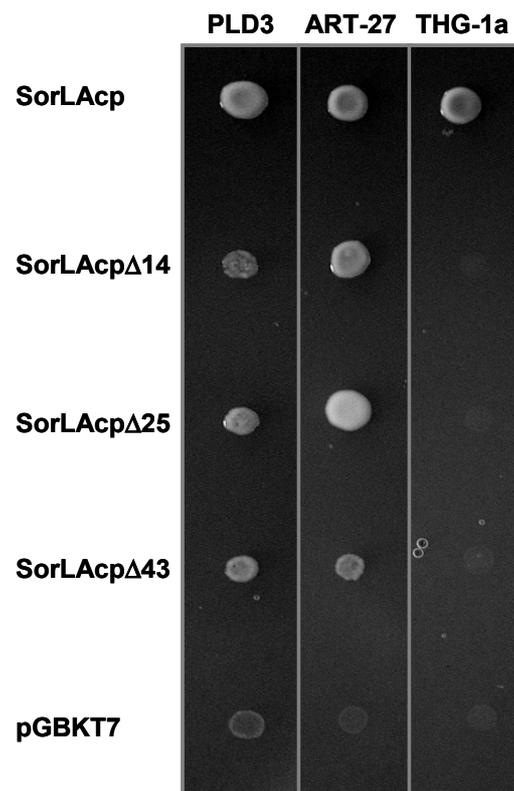
Im Fall von PLD3 wuchsen Hefen auf den Selektionsagarplatten am besten, wenn sie ein Köderprotein mit dem vollständigen Carboxyterminus von SorLA exprimierten. Ein etwas eingeschränkteres Wachstum zeigten aber auch Hefen, die das Köderprotein aus der GAL4-DNA-Bindedomäne und SorLAcp $\Delta$ 25 oder SorLAcp $\Delta$ 43 bildeten. Die Bindung von PLD3 an SorLAcp findet somit nahe der Transmembrandomäne statt, für eine hochaffine Interaktion scheint allerdings die korrekte Faltung des gesamten Carboxyterminus wichtig zu sein. Das schlechte Wachstum der Hefen, die mit pGBKT7-SorLAcp $\Delta$ 14 transformiert waren, könnte auf Faltungsartefakten der Deletionsmutante beruhen.

**ART-27**

Hefen, die mit pACT2-ART-27 und den Deletionskonstrukten pGBKT7-SorLAcp $\Delta$ 14 bzw. pGBKT7-SorLAcp $\Delta$ 25 kotransformiert wurden, konnten uneingeschränkt auf dem Selektionsmedium wachsen. Diese C-terminale Region von SorLAcp ist damit nicht für die Interaktion mit ART-27 verantwortlich. Hefen, die pGBKT7-SorLAcp $\Delta$ 43 enthielten, zeigten dagegen nur ein eingeschränktes Wachstum. ART-27 scheint somit ausschließlich an juxtamembranäre Bereiche von SorLAcp zu binden.

**THG-1a**

Da keine der Hefen, die mit einem der pGBKT7-SorLAcp-Deletionskonstrukte und der THG-1a-cDNA im pACT2-Vektor kotransformiert worden waren, auf dem Selektionsnährboden überlebten, kann angenommen werden, dass THG-1a an einen Bereich innerhalb der 14 C-terminalen Aminosäuren von SorLAcp bindet. Nur Hefen, die ein Köderprotein aus der GAL4-DNA-Bindedomäne und dem vollständigen Carboxyterminus von SorLA exprimierten, waren auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Agarböden lebensfähig.



**Abb. 9: Interaktionsstudien mit verkürzten SorLAcP-Köderproteinen**

Hefen wurden mit der PLD3-, ART-27- bzw. THG-1a-cDNA im pACT2-Vektor und mit pGBKT7-SorLAcP bzw. den SorLAcP-Deletionskonstrukten im pGBKT7-Vektor sowie mit dem unveränderten pGBKT7-Vektor kotransformiert und ihr Wachstum auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Agarplatten untersucht.

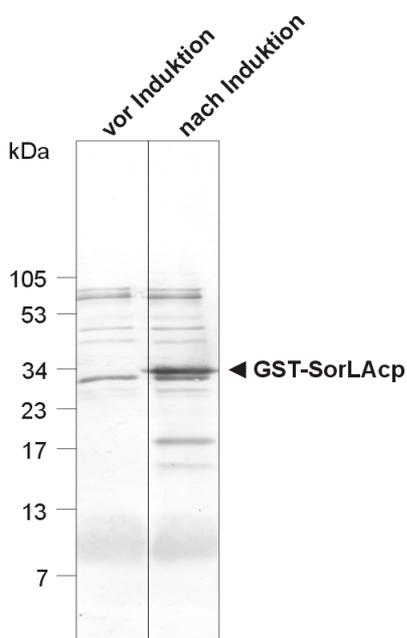
Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass PLD3, ART-27 und THG-1a mit jeweils unterschiedlichen Regionen von SorLAcP interagieren. SorLAcP besitzt somit verschiedene proteinbindende Bereiche.

## 2.2 Bestätigung der Interaktion von PLD3, THG-1a und ART-27 mit SorLAcP in einem Glutathion-S-Transferase-Bindungsassay

Um die Interaktion von SorLAcP mit PLD3, THG-1a und ART-27 in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen, wurde ein Glutathion-S-Transferase-Bindungsassay durchgeführt. In diesem Versuch macht man sich die hohe Affinität des Enzyms Glutathion-S-Transferase (GST) zu seinem Substrat Glutathion zunutze. Das auf eine Interaktion zu testende Protein wird als Fusionsprotein mit GST exprimiert, an Glutathion-Sepharose gekoppelt und damit immobilisiert. Im Falle einer Interaktion mit einem zweiten Protein wird dieses über seine Bindung an das Fusionsprotein ebenfalls an der Sepharosematrix immobilisiert und kann mittels biochemischer Nachweisverfahren detektiert werden.

### 2.2.1 Expression von GST-SorLAcP in *E. coli*

Zur Gewinnung des rekombinanten Fusionsproteins GST-SorLAcP wurde die codierende Sequenz von SorLAcP im Leseraster hinter die für GST codierende Sequenz des Vektors pGEX-KG kloniert. Dieses Konstrukt wurde in kompetente *E. coli* des Stammes DH5 $\alpha$  transformiert und die Proteinsynthese durch Zugabe von IPTG induziert. Die Expression des Fusionsproteins war nach drei bis vier Stunden am stärksten. Der in Abbildung 10 gezeigte Nachweis von GST-SorLAcP erfolgte in der Western-Blot-Analyse mit einem gegen SorLAcP gerichteten Antikörper (anti-SorLAcP). Die apparente Masse des Fusionsproteins betrug etwa 34 kDa (berechnete Masse: 30 kDa).



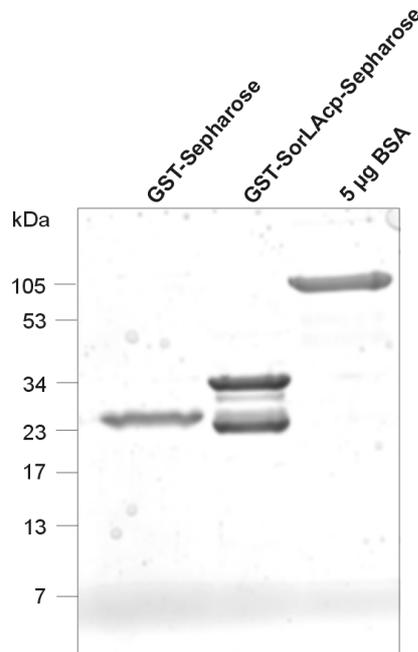
**Abb. 10: Nachweis von GST-SorLAcP in *E. coli* nach Induktion mit IPTG**

Mit pGEX-KG-SorLAcP transformierte *E. coli* des Stammes DH5 $\alpha$  wurden in der Phase ihres exponentiellen Wachstums für 4 Stunden mit 0,5 mM IPTG bei Raumtemperatur induziert. Die Bakterien wurden sedimentiert und für die folgende gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine in reduzierendem Probenpuffer solubilisiert. In der Western-Blot-Analyse mit einem gegen SorLAcP gerichteten Antikörper konnte das gebildete Fusionsprotein GST-SorLAcP durch eine zusätzliche Bande bei ca. 34 kDa nachgewiesen werden.

### 2.2.2 Aufreinigung von GST-SorLAcp und GST aus *E. coli*

Um GST-SorLAcp für die Aufreinigung zugänglich zu machen, wurden zunächst Standardmethoden verwendet, wie z. B. der Aufschluss der Bakterien mit Ultraschall oder Lysozym. Diese Methoden führten jedoch nicht zum Erfolg, da das Protein unlösliche Einschlussverbindungen im Pellet der abzentrifugierten Bakterienzellwände bildete (nicht gezeigt). Mit einer von Frangioni *et al.* (1993) entwickelten Methode wurden die Bakterien mit Ultraschall in Gegenwart einer hohen Konzentration von Sarkosyl aufgeschlossen. Nach der anschließenden Rückfaltung des Proteins durch Triton-X-100 konnte schließlich GST-SorLAcp an Glutathion-Sepharose gekoppelt werden. Die Ausbeute betrug etwa 50 µg GST-SorLAcp pro 200 ml Bakterienkultur.

Für die Gewinnung von GST wurde mit pGEX-KG transformierten *E. coli* wie oben beschrieben verfahren. Da die Ausbeute an GST etwas größer war als die von GST-SorLAcp, wurde die Menge der verwendeten Sepharose so eingestellt, dass für die folgenden Versuche je 5 µg Protein pro 20 µl Sepharosematrix zur Verfügung standen. In dem mit Coomassie-Lösung gefärbten Acrylamidgel (Abb. 11) ist neben GST-SorLAcp auch ein kleineres Spaltprodukt zu erkennen, bei dem es sich wahrscheinlich um GST aus dem proteolytischen Abbau des Fusionsproteins handelt.



**Abb. 11: Aufreinigung von GST und GST-SorLAcp aus *E. coli***

Nach Aufschluss der Bakterien wurde das Lysat 20 min mit Glutathion-Sepharose inkubiert. Die Sepharosematrix wurde anschließend sedimentiert und mehrfach gewaschen. Die an 20 µl Sepharosematrix gebundenen Proteine wurden in reduzierendem Probenpuffer solubilisiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die Abschätzung der Proteinmenge erfolgte durch einen optischen Vergleich mit 5 µg BSA.

### 2.2.3 *In vitro* Translation der Interaktionspartner

Für den späteren autoradiographischen Nachweis der an GST-SorLAcP gebundenen Proteine, wurden diese zunächst *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert. Hiefür wurde das mit der T3-Polymerase gekoppelte TNT<sup>®</sup> Retikulozytenlysat System der Firma Promega und [<sup>35</sup>S]-Methionin verwendet.

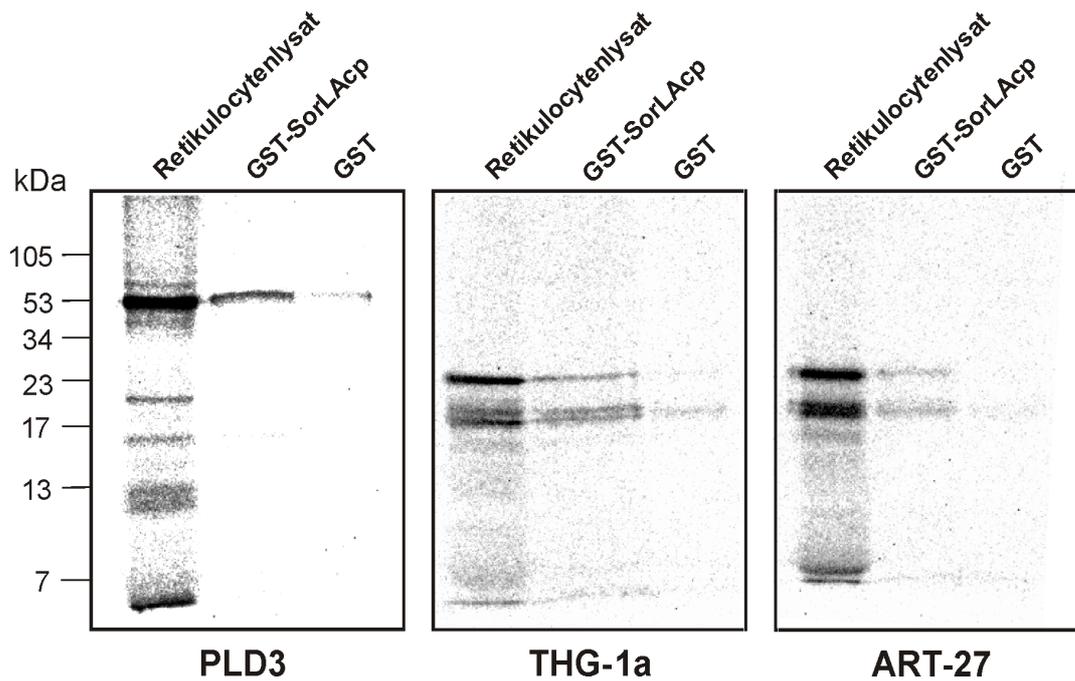
Für die *in vitro* Translation wurden folgende Konstrukte hergestellt:

Die vollständigen DNA-Sequenzen von ART-27 und THG-1a aus dem pACT2-Vektor wurden mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II ausgeschnitten und in die kompatible *Bam*HI-Schnittstelle des Plasmids pBluescript II SK(+) hinter die T3-Promotorregion eingefügt.

Da die DNA-Sequenz für PLD3 im pACT2-Vektor unvollständig war, wurde die vollständige codierende Sequenz von PLD3 aus einem EST-Klon (IMAGE:159455) über die *Eco*RI und *Hind*III-Schnittstellen in pBluescript II SK(+) kloniert.

### 2.2.4 Interaktion von PLD3, THG-1a und ART-27 mit SorLAcP

Zur Bestätigung der Wechselwirkung zwischen SorLAcP und PLD3, THG-1a und ART-27 wurde das an Glutathion-Sepharose gebundene Fusionsprotein GST-SorLAcP mit den *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten Proteinen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde anstelle des Fusionsproteins GST verwendet. Nach gründlichem Waschen der Sepharoseansätze und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Auswertung autoradiographisch mit einem Phosphoimager (Abb. 12). Die apparente Molekülmasse insbesondere von THG-1a und ART-27 stimmt hier nicht exakt mit der berechneten überein (ART-27: 18 kDa; THG-1a: 18 kDa; PLD3: 55 kDa). Der Grund dafür liegt in der Abhängigkeit des Laufverhaltens von Proteinen von dem verwendeten Gelsystem. Da für den aufgetragenen Größenmarker (MultiMark<sup>®</sup>, Invitrogen) keine Angaben zum Laufverhalten im hier verwendeten Neville-Gelsystem (Neville *et al.*, 1971) gemacht werden, wurden die auf ein Tricin-Gelsystem bezogenen Angaben für eine Abschätzung der Proteingröße zugrunde gelegt. Der quantitative Vergleich der Banden ergab, dass etwa die dreifache Menge radioaktiv markierter PLD3 an GST-SorLAcP als an GST alleine gebunden hat. Die Signalintensität des an SorLAcP gebundenen THG-1a war im Vergleich zu der GST-Negativkontrolle um den Faktor 55 stärker, bei ART-27 wurde ein Faktor von 33 gegenüber der Kontrolle ermittelt. Die unteren Banden des *in vitro* translatierten THG-1a und ART-27 wurden auch in Parallelversuchen beobachtet und könnten durch Proteolysereaktionen verursacht worden sein. Dieses Ergebnis bestätigt die im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundene Interaktion von SorLAcP mit PLD3, THG-1a und ART-27.



**Abb. 12: GST-Bindungsassay mit PLD3, THG-1a und ART-27**

Retikuloctenlysat mit den *in vitro* translatierten und mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markierten Proteinen wurden mit GST-SorLAcp- bzw. GST-Sepharose inkubiert. Die Sepharosematrix wurde anschließend gründlich gewaschen, die gebundenen Proteine in reduzierendem Probenpuffer denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. In den linken Spuren wurden als Kontrolle 10% des verwendeten Retikuloctenlysatates aufgetragen. Die Detektion der an SorLAcp gebundenen Proteine erfolgte durch Autoradiographie.

## 2.3 Untersuchungen zu THG-1a

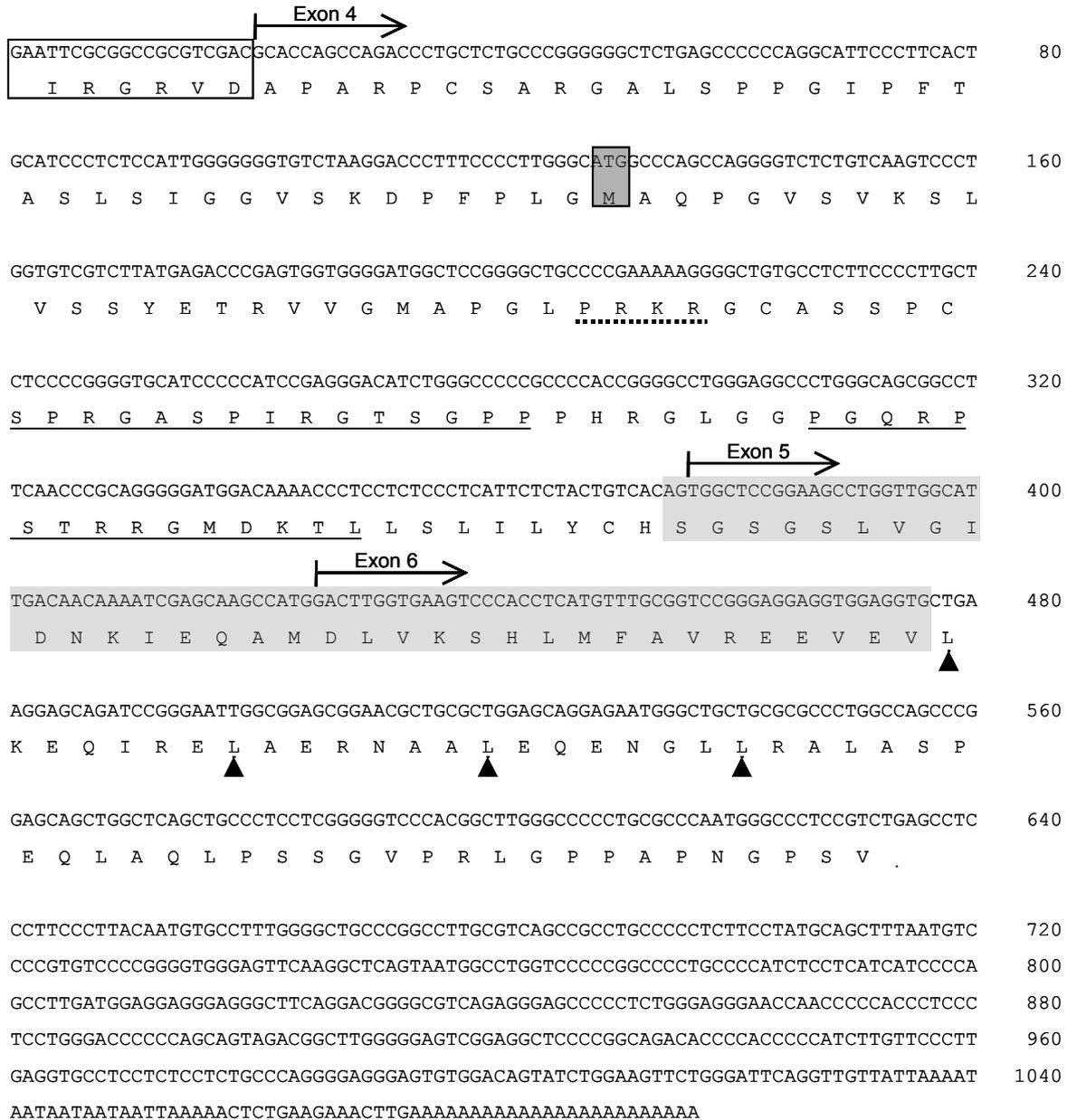
Bei THG-1a handelt es sich um eine neu identifizierte Spleißvariante des Transkriptionsfaktors THG-1 (*Transforming growth factor- $\beta$ -stimulated clone-22 homologue 1*). THG-1 ist in der Lage, über seine Leucizipper-Domäne Homo- oder Heterodimere auszubilden und mit Promotorregionen der DNA zu interagieren (Kester *et al.*, 1999).

### 2.3.1 Charakterisierung von THG-1a mittels bioinformatischer Methoden

Die Sequenz der in Hefe gefundenen cDNA stimmte ab Nukleotid 375 (Abb. 13) mit dem Datenbankeintrag für THG-1 überein. Eine genauere Sequenzanalyse ergab, dass sich an Position 129-131 die Nukleotide ATG im Leseraster befinden. Dieses Codon befindet sich in einer für einen Translationsstart günstigen Umgebung (Kozak *et al.*, 1995) und kann daher als Startcodon erkannt werden. Das resultierende Protein umfasst 168 Aminosäuren. Die mit THG-1 übereinstimmende abgeleitete Aminosäuresequenz enthält eine TSC- und eine Leucizipper-Domäne (Abb. 13), die bereits in homologen Proteinen wie TSC-22 (*Transforming growth factor- $\beta$ -stimulated clone-22*) identifiziert wurden. Die Funktion der stark konservierten TSC-Domäne ist bisher noch unklar. Wie bereits für THG-1 gezeigt wurde (Kester *et al.*, 1999), kann auch für THG-1a eine genregulierende Funktion durch Dimerisierung und DNA-Interaktion angenommen werden. In einer Analyse mit den Programmen SignalP und Protean fielen keine nennenswerten hydrophoben Regionen auf, die auf eine Transmembrandomäne oder Membranankerregion hingedeutet hätten. Das Programm PSORT II berechnet eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Kernlokalisierung des Proteins und identifiziert das basische Aminosäuremotiv PRKR als potentielle Signalsequenz für eine nukleäre Lokalisierung. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass es sich bei THG-1a wie auch bei seiner Isoform THG-1 und den homologen Proteinen um einen Transkriptionsfaktor handelt.

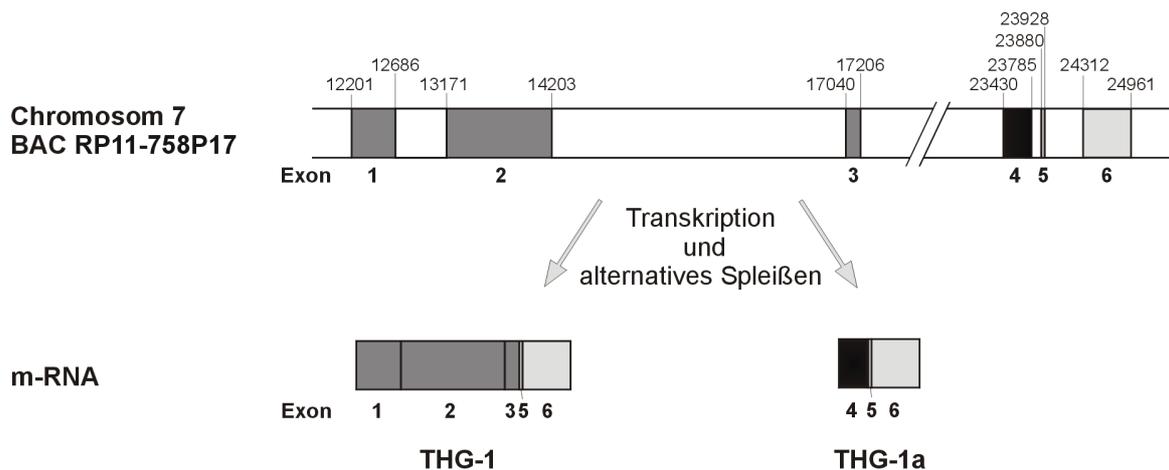
Zur Bestimmung der Intron-Exon-Struktur wurde die genomische Sequenz des humanen BAC-Klons RP11-758P17 (GenBank-Eintrag AC092849.4), der das gesamte THG-1-Gen umfasst, genauer analysiert. Der BAC-Klon wurde durch elektronische PCR auf Chromosom 7q22.1 lokalisiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/forward.cgi>). Es zeigte sich, dass die aus der Datenbank bekannte mRNA von THG-1 aus den Exons 1, 2, 3, 5 und 6 besteht (Abb. 14). Die Exons 5 und 6, die auch in THG-1a vorkommen, enthalten die codierenden Sequenzen für die TSC- und die Leucizipper-Domäne (Abb. 13 und 14). Der vordere Sequenzbereich von THG-1a, der nicht mit THG-1 übereinstimmt, wird von dem alternativen Exon 4 codiert, das sich in der genomischen Sequenz vor den Exons 5 und 6 befindet. Der

alternative 5'-Bereich wurde auch in einer Vielzahl humaner EST-Sequenzen gefunden. Damit ließ sich beweisen, dass es sich bei THG-1a nicht um ein Artefakt der cDNA-Bank handelte, sondern um eine alternativ gespleißte Variante von THG-1.



**Abb. 13: Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von THG-1a**

Dargestellt ist die in der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse gefundene cDNA-Sequenz für THG-1a ab der *EcoRI*-Schnittstelle des Hefevektors pACT2. Die ersten 20 Nukleotide beinhalten die Linker-Nukleotide aus der cDNA-Herstellung (schwarz eingerahmt). Um das Start-ATG des offenen Leserahmens (grau hinterlegt mit schwarzer Umrandung) befindet sich eine für einen Translationsstart optimale Nukleotidsequenz (Kozak *et al.*, 1995). Der Beginn der mit THG-1 gemeinsamen TSC-Domäne (hellgrau hinterlegt) ist mit einem waagerechten Pfeil und die Leucinreste der Leucinzipper-Domäne sind mit kleinen Pfeilen gekennzeichnet. Das putative Kernlokalisierungssignal ist mit einer gepunkteten Linie unterstrichen. Die Peptidsequenzen, die später zur Gewinnung eines THG-1a-Antiserums für die Immunisierung von Kaninchen ausgewählt wurden, sind mit einer durchgehenden Linie unterstrichen.



**Abb. 14: Alternatives Spleißen der für THG-1 und THG-1a codierenden Exons**

Das THG-1-Gen besteht aus sechs Exons, von denen fünf für die ursprünglich beschriebene THG-1-mRNA und drei für die hier gefundene THG-1a-mRNA codieren. Die Exons sind zur Veranschaulichung in verschiedenen Graustufen hinterlegt, die dazwischen liegende Intronsequenz auf Chromosom 7 ist weiß dargestellt. Die Nummerierung der Nukleotide entspricht der des BAC-Klons RP11-758P17 im GenBank-Eintrag AC092849.4.

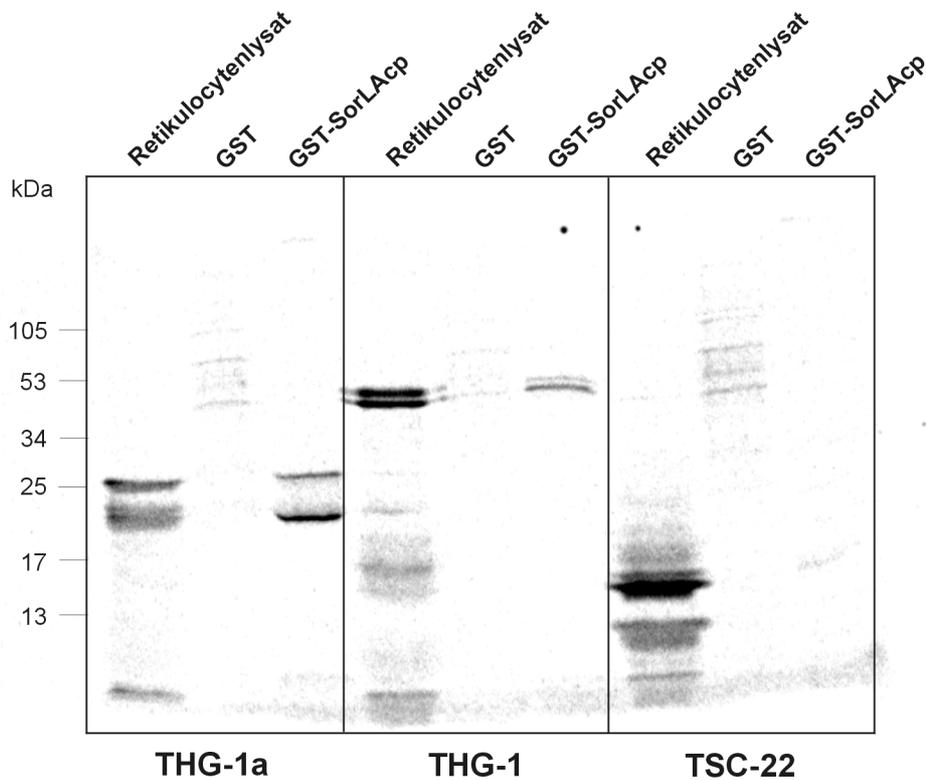
### 2.3.2 Untersuchung der Interaktion von SorLAcp mit THG-1 und TSC-22 in einem GST-Bindungsassay

Mit dem Ziel, eine Aussage über die proteinbindende Domäne von THG1a und die Spezifität seiner Bindung an SorLAcp zu erhalten, wurden die Interaktionen von SorLAcp mit THG-1 und dem zu THG-1 homologen Protein TSC-22 im GST-Bindungsassay untersucht. Die TSC- und die Leucinzipper-Domäne von TSC-22 sind bis auf wenige Aminosäurereste identisch mit den analogen Domänen in THG-1 bzw. THG-1a (Abb. 28). Eine Interaktion aller drei Homologen mit SorLAcp würde auf eine Vermittlung der Protein-Protein-Wechselwirkung durch eine oder beide dieser Domänen hindeuten. Für die *in vitro* Translation wurden die vollständigen codierenden Sequenzen von THG-1 (IMAGE: 6042914) und TSC-22 (IMAGE: 3911094) im Vektor pCMV-SPORT6 unter Kontrolle des SP6-Promotors verwendet.

Der Assay wurde mit *in vitro* translatiertem, [<sup>35</sup>S]-markiertem THG-1, TSC-22 sowie THG-1a und bakteriell gewonnenem GST und GST-SorLAcp durchgeführt. Das apparente Molekulargewicht der Proteine entspricht wie auch zuvor nicht exakt dem berechneten (THG-1a: 18 kDa; THG-1: 40 kDa; TSC-22: 16 kDa). Das *in vitro* translatierte THG-1 zeichnet sich durch eine klar umrissene Doppelbande im Acrylamidgel aus. Sie wurde bereits von Kester *et al.* (1999) bei dieser Methode beobachtet und könnte wie auch bei *in vitro* translatiertem THG-1a und ART-27 durch Proteindegradation oder posttranslationale Modifikationen erklärt werden. Die autoradiographische Auswertung ergab, dass nicht nur THG-1a an

GST-SorLAcp bindet, sondern auch die Isoform THG-1. Das entfernter verwandte Homolog TSC-22 interagiert dagegen nicht mit GST-SorLAcp (Abb. 15).

Um eine Aussage über die Affinität der beiden Isoformen zu SorLAcp treffen zu können, wurde der Quotient aus der Signalstärke des eingesetzten Retikulocytenlysats und der des gebundenen, radioaktiven Proteins ermittelt. Aus je zwei Versuchen wurde der Mittelwert gebildet. Von dem ursprünglich im Bindungsassay eingesetzten radioaktiv markierten THG-1a banden 5,2% an SorLAcp, die gebundene Menge der Isoform THG-1 betrug dagegen nur 1,4%. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Affinität von THG-1a zu SorLAcp größer ist als die der Isoform THG-1. Sowohl bei THG-1a als auch bei THG-1 fällt auf, dass das kleinere Degradations- oder Modifikationsprodukt stärker als das größere an SorLAcp bindet.



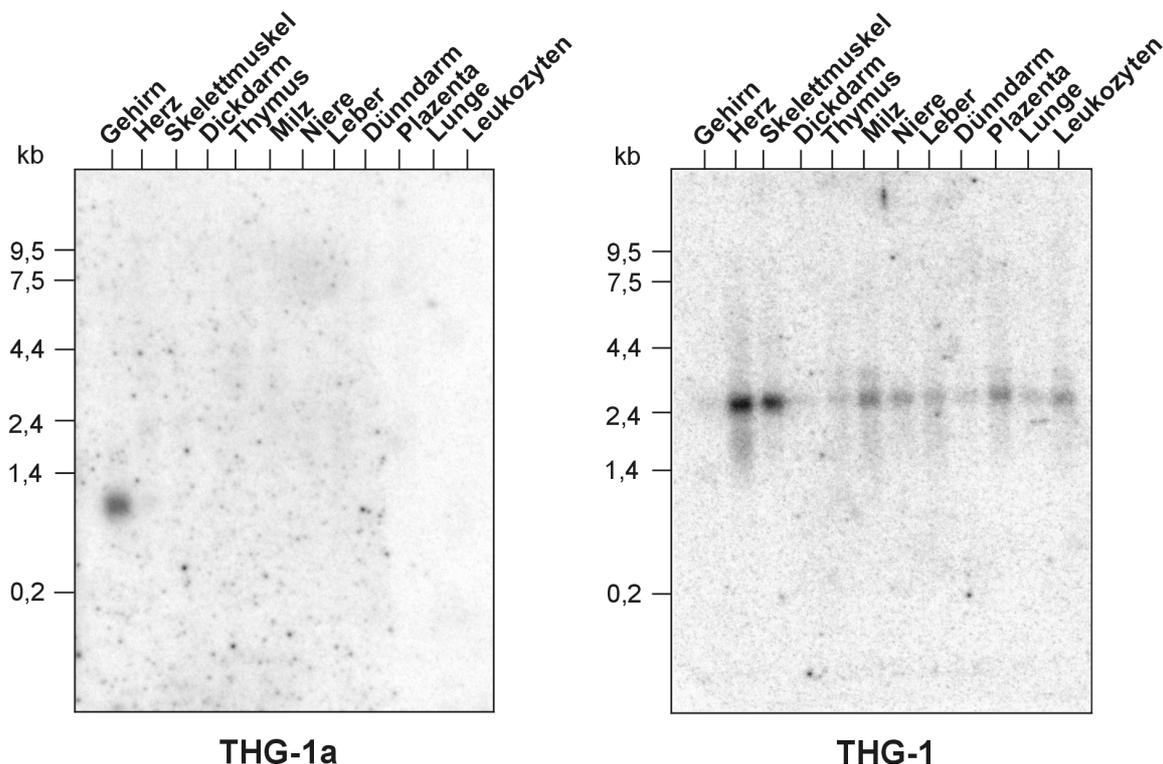
**Abb. 15: GST-Bindungsassay mit THG-1a, THG-1 und TSC-22**

Die Retikulocytenlysate mit den [<sup>35</sup>S]-markierten Proteinen wurden mit GST- und GST-SorLAcp-Sepharose inkubiert. Anschließend wurde die Matrix gewaschen und die gebundenen Proteine unter reduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt. In den linken Spuren wurden als Kontrolle 10% des eingesetzten Retikulocytenlysates aufgetragen. Die Detektion der an SorLAcp gebundenen, radioaktiv markierten Proteine erfolgte autoradiographisch.

### 2.3.3 Gewebeverteilung von THG-1a- und THG-1

#### Northern-Blot-Analyse

Die Frage, warum nur THG-1a, nicht aber seine Isoform THG-1 in der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse als Bindungspartner von SorLAcP identifiziert wurde, sollte durch eine Untersuchung des Expressionsmusters beider mRNAs beantwortet werden. Dazu wurden isolierte mRNAs aus unterschiedlichen Geweben in einer Northern-Blot-Analyse mit spezifischen [<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Sonden inkubiert. Die Herstellung der Sonden erfolgte durch PCR-Amplifikation eines 622 bp großen DNA-Fragments aus den Exons 2 und 3 von THG-1 und eines 262 bp großen Fragments aus dem alternativen ersten Exon 4 der Spleißvariante THG-1a. Abb. 16 zeigt, dass THG-1a nur im Gehirn exprimiert wird. THG-1 findet man dagegen nur außerhalb des Gehirns. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei THG-1a um eine gehirnspezifische Isoform von THG-1 handelt. Da die in der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse verwendete cDNA-Bank aus menschlichem Gehirn stammt, enthielt sie keine THG-1-cDNA, und es war damit nicht möglich, sie in dem Assay zu identifizieren.



**Abb. 16: Northern-Blot-Analyse der THG-1a- und THG-1-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben**

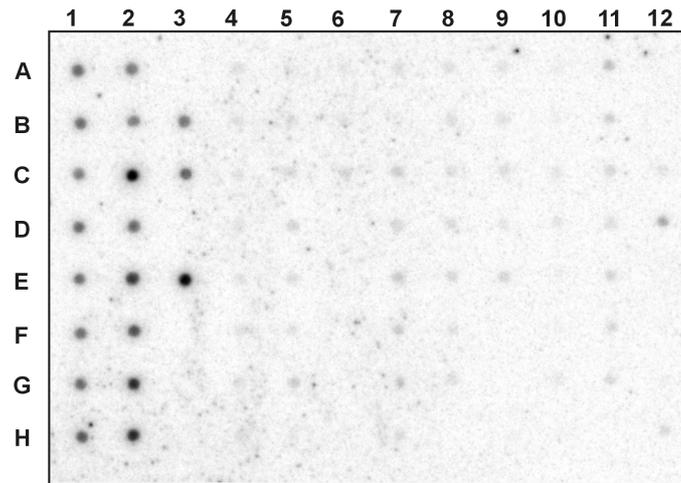
Ein humaner Gewebe-Northern-Blot wurde mit spezifischen [<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Sonden für THG-1a und THG-1 inkubiert. Die Auswertung erfolgte autoradiographisch. Das etwa 1000 Nukleotide große Transkript von THG-1a ließ sich nur im Gehirn nachweisen. Die ca. 2500 Nukleotide umfassende mRNA von THG-1 wurde mit unterschiedlicher Signalintensität in allen untersuchten Geweben außer Gehirn detektiert.

### MTE-Array

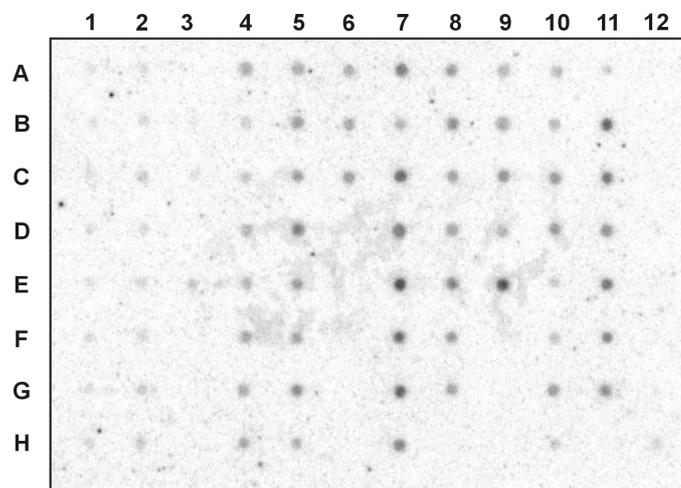
Zur Untersuchung des detaillierten Expressionsmusters der THG-1a- und THG-1-mRNA wurden humane MTE<sup>TM</sup>- (*multiple tissue expression*-) Arrays mit den zuvor beschriebenen DNA-Sonden hybridisiert (Abb. 17).

Die mRNA von THG-1a wurde in allen untersuchten adulten Bereichen des Gehirns und Nervensystems detektiert. Eine besonders starke Expression findet im Corpus callosum, Nucleus caudatus, Rückenmark, Putamen und in der Medulla oblongata statt. Das schwache Signal bei der als Negativkontrolle aufgetragenen DNA aus *E. coli* definiert die Stärke des Hintergrundes. Es scheint keine bzw. eine nur geringe Expression von THG-1a in fötalem Gehirn zu geben.

Im Gegensatz zu der mRNA von THG-1 wird die seiner Isoform THG-1 nicht im Gehirn und Rückenmark sondern in den meisten übrigen Geweben exprimiert. In den Gehirngeweben deutet das schwache Signal eher auf unspezifischen Hintergrund als auf eine echte Expression hin. Dieses Ergebnis bestätigt die in der Northern-Blot-Analyse ermittelte gehirnspezifische Expression der THG-1a-mRNA.



THG-1a



THG-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gesamt-Hirn	Cerebellum, links		Herz	Ösophagus	Colon transversum	Niere	Lunge	Leber	Leukämie, HL-60	fötales Gehirn	Hefe Gesamt-RNA
B	Cortex	Cerebellum, rechts	Nucleus accumbens	Aorta	Magen	Colon descendens	Skelettmuskel	Plazenta	Pankreas	HeLa S3	fötales Herz	Hefe tRNA
C	Frontallappen	Corpus callosum	Thalamus	Vorhof, links	Duodenum	Rektum	Milz	Harnblase	Nebenniere	Leukämie, K-562	fötale Niere	<i>E. coli</i> rRNA
D	Parietallappen	Amygdala		Vorhof, rechts	Jejunum		Thymus	Uterus	Schilddrüse	Leukämie, MOLT-4	fötale Leber	<i>E. coli</i> DNA
E	Occipitalappen	Nucleus caudatus	Rückenmark	Kammer, links	Ileum		periphere Leukozyten	Prostata	Speicheldrüse	Burkitt-Lymphom, Raji	fötale Milz	Poly r(A)
F	Temporalappen	Hippocampus		Kammer, rechts	Ileocoecum		Lymphknoten	Testis		Burkitt-Lymphom, Daudi	fötaler Thymus	humane cdt-1 DNA
G	Gyrus paracentalis	Medulla oblongata		Kammerscheidewand	Appendix		Knochenmark	Ovar		Colorektales Adenokarzinom, SW480	fötale Lunge	humane DNA 100 ng
H	Pons	Putamen		Herzspitze	Colon ascendens		Trachea			Lungenkarzinom, A549		humane DNA 500 ng

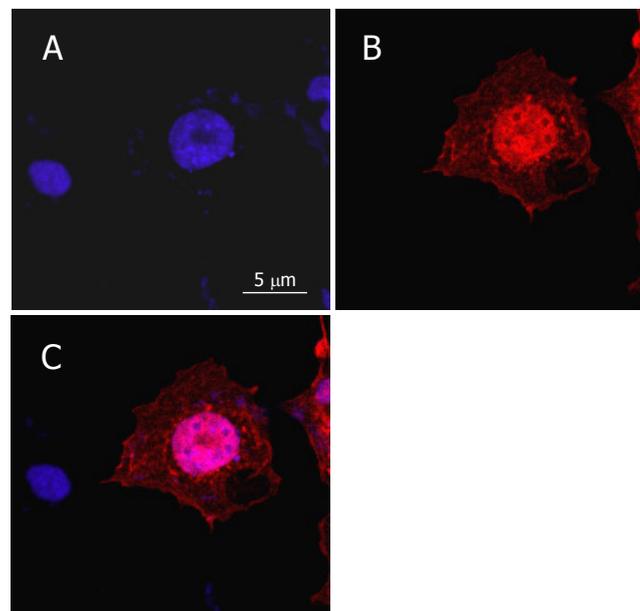
Abb. 17: Detailliertes Expressionsmuster der THG-1a- und THG-1-mRNA

MTE-Arrays wurden mit spezifischen Sonden für THG-1a und THG-1 hybridisiert und die Signale mit einem Phosphorimager detektiert. Die Anordnung der RNA-Proben auf dem Array ist unten dargestellt.

### 2.3.4 Lokalisierung von THG-1 $amyc$ in transfizierten COS-Zellen

Für die weitere Charakterisierung von THG-1a wurde die Firma Eurogentec beauftragt, einen spezifisch gegen diese Spleißvariante gerichteten Antikörper herzustellen. Hierfür wurden Kaninchen mit einem Gemisch der Peptide H<sub>2</sub>N- CSP RGA SPI RGT SGP P -CONH<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>N- CPG QRP STR RGM DKT L -CONH<sub>2</sub> (Abb. 13) immunisiert. Die Cysteine (unterstrichen) dienten zur Kopplung der Peptide an das Trägerprotein Hämocyamin. Die immunogene Potenz dieser Peptide wurde mit dem Programm DNASTar ermittelt und durch die Experten von Eurogentec bestätigt. Es war jedoch mit keinem der beiden Seren möglich, THG-1a in der Western-Blot-Analyse oder Immunfluoreszenz zu detektieren. Aus diesem Grund wurde das THG-1a-Expressionskonstrukt pcDNA3.1/*myc*-His\_THG-1a generiert, das für ein Fusionsprotein aus THG-1a und dem *c-myc*-Peptid codiert (Vektorkarte siehe 8.3).

THG-1 $amyc$  ließ sich mit diesem Konstrukt transient in COS-Zellen exprimieren und wurde mit einem gegen das *c-myc*-Epitop gerichteten monoklonalen Antikörper nachgewiesen. In der konfokalen Lasermikroskopanalyse wurde entsprechend der Vorhersage des Programms PSORT II neben einer cytoplasmatischen Verteilung eine dominante Lokalisierung des Proteins im Zellkern beobachtet (Abb. 18). In Zellen, die gleichzeitig SorLA und THG-1a exprimierten, konnte keine Kolo-kalisierung der beiden Proteine festgestellt werden (nicht gezeigt).

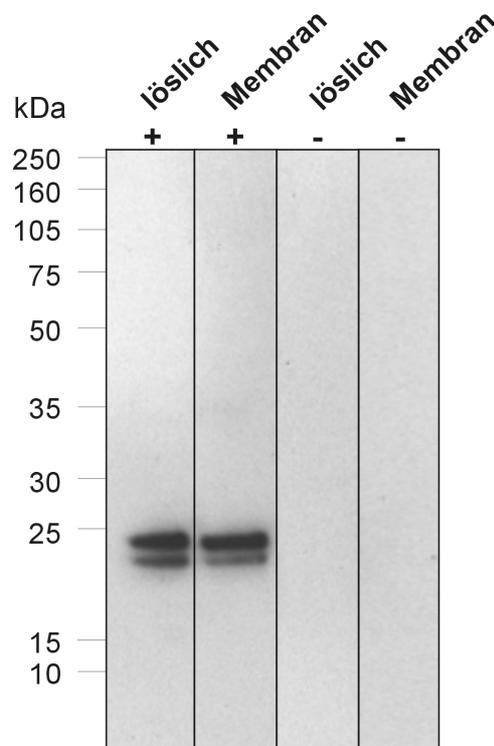


**Abb. 18: Lokalisierung von THG-1 $amyc$  in einer transfizierten COS-Zelle**

Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden mit einem monoklonalen, gegen das *c-myc*-Epitop gerichteten, Antikörper inkubiert. An THG-1 $amyc$  gebundener Antikörper wurde durch eine Sekundärreaktion mit Cy3-gekoppeltem anti-Maus IgG sichtbar gemacht (rot).

**A:** DAPI-Färbung des Zellkerns; **B:** Immunfluoreszenzfärbung von THG-1 $amyc$ ; **C:** überlagerte Darstellung von (A) und (B)

Um zu zeigen, dass es sich bei THG-1a um ein lösliches Protein handelt, wurden die Membranen und die lösliche Fraktion von COS-Zellen, die THG-1a $myc$  exprimierten, in der Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 19). Das Protein konnte ähnlich dem Produkt der *in vitro* Translation durch eine Doppelbande bei 23 kDa (apparentes Molekulargewicht) in beiden Fraktionen identifiziert werden. Die untere Bande wurde vermutlich auch hier durch Proteolyse oder verschiedene posttranslationale Modifikationen verursacht. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Protein sowohl in einer löslichen als auch in einer membranassoziierten Form vorliegt.



**Abb. 19: Western-Blot-Analyse von Membranen und löslicher Proteinfraction THG-1a $myc$  exprimierender COS-Zellen**

COS-Zellen wurden mit pcDNA3.1/*myc*-His\_THG-1a (+) und pcDNA3.1/*myc*-His als Kontrolle (-) transfiziert und nach zwei Tagen Inkubation mit einer Ultraschallspitze aufgeschlossen. Nach dem Sedimentieren der Zellkerne wurde der Überstand durch Ultrazentrifugation in die Membranfraktion und die lösliche Proteinfraction aufgetrennt und mit einem monoklonalen Antikörper gegen das *c-myc*-Peptid in der Western-Blot-Analyse untersucht.

### 2.4 Untersuchungen zu ART-27

Das Gen, das für ART-27 codiert, wurde erstmals von Schröer *et al.* (1999) identifiziert. Es befindet sich auf Chromosom 11, besteht aus sieben Exons und codiert ein 157 Aminosäuren umfassendes Protein. Aufgrund seiner ubiquitären Expression in menschlichen Geweben wurde es zunächst als UXT (*ubiquitously expressed transcript*) bezeichnet. Die Strukturhomologien wurden bereits von Liu und McKeehan (2002) ausführlich beschrieben und lassen vermuten, dass das Protein eine Art Brückenfunktion zu aktinbasierten Strukturen oder Transkriptionskomplexen ausüben könnte. Zum etwa gleichen Zeitpunkt wurde es als Koaktivator für den Androgenrezeptor identifiziert und charakterisiert (Markus *et al.*, 2002) und in ART-27 (*androgen-receptor trapped clone-27*) umbenannt. ART-27 scheint selbst keine intrinsische Transaktivierungsfunktion zu besitzen, ist aber vermutlich als Bestandteil von Multiprotein-Transkriptionskomplexen an einer Transkriptionsaktivierung beteiligt. Aktuelle Forschungsergebnisse von Taneja *et al.* (2004) deuten darauf hin, dass ART-27 eine Rolle in der Regulation Androgenrezeptor-responsiver Gene spielt und damit an der Androgenrezeptor-vermittelten Differenzierung von Prostatazellen beteiligt ist.

Die Tatsache, dass ART-27 als Interaktionspartner weiterer Proteine wie z. B. des DSCR1-Proteins (*Down's syndrome candidate region protein*) identifiziert wurde (Silveira *et al.*, 2004), lässt vermuten, dass es neben der bisher beschriebenen, eine Funktion bei einer Reihe weiterer Signalwege ausübt. Eine Interaktion des Proteins mit SorLA könnte daher auch in der Signalkaskade dieses Rezeptors von Bedeutung sein.

#### 2.4.1 Lokalisierung von HA-ART-27 in transfizierten COS-Zellen

Zur Untersuchung der Lokalisierung von HA-ART-27 wurden COS-Zellen mit dem Expressionskonstrukt pcDNA3.1/Hygro\_HA-ART-27 (Vektorkarte siehe 8.3) transfiziert. HA-ART-27 wurde mit einem gegen das HA-Peptid (anti-HA) gerichteten Antikörper nachgewiesen. Bedingt durch die für einen Translationsstart schlecht geeignete Sequenz um das Start-ATG (Kozak *et al.*, 1995) wurde HA-ART-27 in nur sehr wenigen Zellen exprimiert. Für die Untersuchung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie erwies sich die geringe Expression von HA-ART-27 als ausreichend, für weiterführende Versuche muss das Konstrukt jedoch noch optimiert werden.

Bei einer Reihe HA-ART-27 exprimierender COS-Zellen konnte das Protein sowohl im Kern als auch im Cytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 20 A-C). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der von Taneja *et al.* (2004) gezeigten cytoplasmatischen und nukleären Lokalisierung von HA-ART-27 in Zellen von Prostata- und Brustgewebe.

Ein großer Teil der HA-ART-27 exprimierenden Zellen wies allerdings eine primäre Lokalisierung des Proteins jedoch vorwiegend außerhalb des Zellkerns auf (siehe auch Abb. 20 D-G).

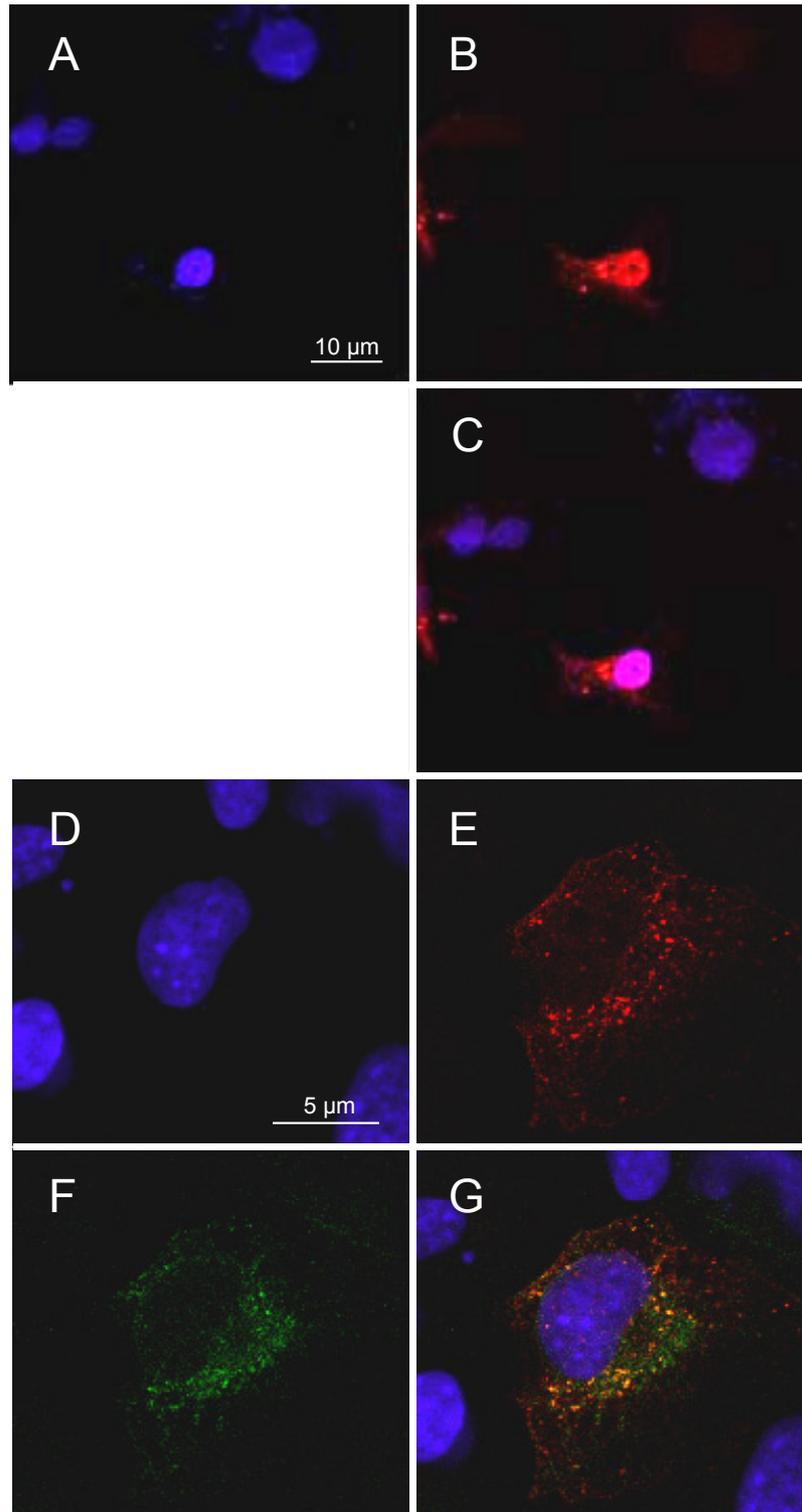
#### 2.4.2 Kolokalisierung von HA-ART-27 und SorLA

Um die Kolokalisierung dieses Proteins mit SorLA zu untersuchen, wurden COS-Zellen mit den Expressionskonstrukten pcDNA3.1/Hygro\_HA-ART-27 (Vektorkarte siehe 8.3) und pSorLAok (siehe 6.6.2) kotransfiziert. HA-ART-27 wurde wie oben beschrieben und SorLA mit einem gegen die cytoplasmatische Domäne gerichteten Antikörper (anti-SorLAcp; Hampe *et al.*, 2000) nachgewiesen.

Exprimierten die Zellen beide Proteine gleichzeitig, wurde häufig eine ähnliche subzelluläre Verteilung beider Proteine beobachtet (Abb. 20, D-G). Bereiche der Zelle, in denen SorLA und HA-ART-27 kolokalisieren, sind durch die bei der Überlagerung der Bilder entstehende gelbe Fluoreszenz zu erkennen.

Für SorLA wurde früher bereits eine vesikuläre Lokalisierung beschrieben (Jacobsen *et al.*, 2001). Die hier beobachtete tüpfelartige Anfärbung von HA-ART-27 und seine Kolokalisierung mit SorLA könnten auf eine Assoziation von ART-27 mit endosomalen Strukturen hindeuten. Aufgrund der fehlenden Signalsequenz würde sich das Protein in diesem Fall auf der cytosolischen Seite von Vesikelmembranen aufhalten.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Vorkommen von ART-27 nicht auf ein bestimmtes Zellkompartiment beschränkt ist. Es scheint vielmehr dazu in der Lage zu sein, alleine oder im Komplex mit weiteren Proteinen vom Cytoplasma in den Zellkern gelangen zu können. Genauere Aussagen über eine möglicherweise veränderte subzelluläre Verteilung von ART-27 durch eine SorLA-Überexpression oder Stimulierung SorLAs mit einem Liganden werden sich erst durch zukünftige Versuche mit einem optimierten Expressionskonstrukt machen lassen.



**Abb. 20: Lokalisierung von HA-ART-27 in transfizierten COS-Zellen**

COS-Zellen wurden mit pcDNA3.1/Hygro\_HA-ART-27 allein (**A-C**) oder zusammen mit pSorLAok transfiziert (**D-G**). Die Immunfärbung von HA-ART-27 erfolgte mit anti-HA-Serum als Primär- und Cy3-gekoppeltem anti-Maus IgG als Sekundärantikörper (rot), die von SorLA mit anti-SorLAcp als Primär- und Cy2-gekoppeltem anti-Kaninchen IgG als Sekundärantikörper (grün).

**A,C,D,G:** DAPI-Färbung der Zellkerne; **B,E:** indirekte Immunfärbung von HA-ART-27; **F:** indirekte Immunfärbung von SorLA; **C:** Überlagerung von **A** und **B**; **G:** Überlagerung von **D**, **E** und **F**

## 2.5 Untersuchungen zu PLD3

Phospholipasen sind in der Natur weit verbreitete Enzyme, die Phospholipide aus Membranbestandteilen hydrolysieren. Neben ihrer Funktion beim Auf- und Abbau von Membranen, sind sie an der Generierung von intrazellulären Signalmolekülen und damit an Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Die Einteilung der Phospholipasen erfolgt nach der Position ihres hydrolytischen Angriffs. Man unterscheidet hierbei zwischen den Phospholipasen A1, C und D. Mitglieder der Phospholipase-D- (PLD-) Familie katalysieren die Hydrolyse der terminalen Phosphodiester-Bindung von Phospholipiden. Insbesondere der Spaltung von Phosphatidylcholin in Cholin und Phosphatidsäure wird eine große Bedeutung beigemessen, da Phosphatidsäure als intrazelluläres Signalmolekül bei einer Reihe von Signalkaskaden eine zentrale Rolle spielt. Ein allen PLD-Analoga gemeinsames Strukturelement stellen zwei HKD-Motive (HxKxxxxD) dar, die wichtig für die Ausbildung des katalytischen Zentrums sind (Stuckey *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 1997). Die Interaktion SorLAs mit einem Mitglied der PLD-Familie könnte einen wichtigen Hinweis auf einen stromaufwärts stattfindenden Schritt in der Signalkaskade des Rezeptors liefern.

### 2.5.1 Charakterisierung von PLD3 mittels bioinformatischer Methoden

In Abbildung 21 ist die Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des EST-Klons vom I.M.A.G.E. Konsortium dargestellt, der für alle weiteren Versuche verwendet wurde (IMAGE: 159455; GenBank-Eintrag H15746). Der Datenbankeintrag mit der Bezeichnung HU-K4-mRNA (GenBank-Eintrag U60644) beschreibt die zu diesem EST-Klon weitgehend identische PLD3-cDNA. Bei einem Vergleich mit weiteren EST-Sequenzen stellte sich jedoch heraus, dass bei dem Datenbankeintrag der HU-K4-mRNA ein Sequenzfehler bei Nukleotid 484 (Abb. 21) vorliegt. Durch das Auslassen eines Cytosins an dieser Stelle kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters mit Einführung eines Stoppcodons. Folglich wurde das ATG von Nukleotid 489-491 als Start des offenen Leserasters angegeben. Unter Berücksichtigung der richtigen Sequenz stellte sich heraus, dass das offene Leseraster mit dem Start-ATG der Nukleotide 330-332 beginnt. Dieses Codon befindet sich in einer günstigeren Umgebung für einen Translationsstart als die folgenden möglichen Startcodons (Kozak *et al.*, 1995). Ein vorangehendes Stoppcodon weist darauf hin, dass sich das offene Leseraster nicht weiter in 5'-Richtung erstreckt. Mit dem Programm PSORT II und einem Hydrophobizitätsplot mit dem Programm DNASTar konnte eine mögliche Transmembrandomäne vor dem ursprünglich beschriebenen Startcodon identifiziert werden. Das Programm SignalP berechnet eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dieser Region um einen

Signalanker handelt. Zusätzlich werden die vier C-terminalen Aminosäurereste von dem Programm PSORT II als mögliches Prenylierungsmotiv erkannt. Im Falle einer Prenylierung würde das Protein mit cytosolischer Orientierung über einen Prenylanker in einer Membran verankert vorliegen.

Eine Analyse von ca. 100 in der Datenbank (NCBI, GenBank) eingetragenen EST-Sequenzen ergab, dass es eine große Varianz an PLD3-mRNAs gibt. Durch alternatives Spleißen sind die mRNAs im 5' untranslatierten Bereich (5' UTR) unterschiedlich zusammengesetzt (Abb. 22). Die Exons des codierenden Bereichs (Exons 5-15) sind bei allen analysierten EST-Klonen identisch. Bis auf zwei Ausnahmen ist auch das Exon 1 in allen Varianten vorhanden. Anstelle des Exons 1 beinhalten diese beiden EST-Klone das Exon 2, das in keinen der anderen EST-Sequenzen wiederzufinden ist, sowie die Exons 4 und 5. Nur die Sequenz dieser aus Brustgewebe-cDNA-Banken stammenden EST-Klone ist derzeit als offizieller Datenbankeintrag für PLD3 vorhanden. Eine Variante wurde besonders häufig identifiziert (38 mal), deren 5' UTR ein um 47 Nukleotide verlängertes Exon 1 (1 und 1' in Abb. 22), ein um 32 Nukleotide verlängertes Exon 3 (3 und 3' in Abb. 22), ein um 56 Nukleotide verlängertes Exon 4 (4' und 4 in Abb. 22) sowie das Exon 5 beinhaltet. Die zugehörigen Klone stammen u. a. aus Retina, Gehirn, Plazenta, fötalem Gehirn, T-Zellen, Leukozyten, Neuroblastom, Niere, großzelligem Lungenkarzinom, Pankreaskarzinom und HeLa-Zellen. Eine weitere Spleißvariante wurde 15 mal gefunden und enthält das verlängerte Exon 1 (s. o.) sowie das Exon 5. Die entsprechenden EST-Klone stammen aus . Eine mit 13 Einträgen ebenfalls relativ häufig vertretene Variante besteht aus dem verlängerten Exon 1 (s. o.) und den Exons 4 und 5. Diese EST-Klone stammen aus kleinzelligem Lungenkarzinom, Chondrosarkom, Trophoblasten, Teratokarzinom, Neuroblastom, großzelligem Lungenkarzinom, dorsalen Wurzelganglien, Leukozyten und Hypothalamus. Die anderen Spleißvarianten kommen mit unterschiedlicher Häufigkeit in der EST-Datenbank vor, einige nur ein einziges Mal. Oft treten in einer Gewebeart zwei oder mehr Spleißvarianten auf.

Exon 2  $\longleftrightarrow$  Exon 4

CTCTTTATAATTTAGTTTCCATAGAAAGTTATATGTGCATTTAAAAAATTC AATGCTGGAGCGACCGTGTCTGGGGAGCC 80  
GAGCCCCGCTTCTCGCTGCGGTGAGCCCGGACTGGGGCACGCACCTGCGCAGACTCCCCGCTGCAGTGGGGCGAGTCCCAC 160  
AGGCCCGGCCCTCCTCCACCCTCGTTCAGCCTGTCCAGACAGAAGCTGGGGCCAGCGGAGGTAGCAGCAGACGCCTG 240

Exon 4  $\longleftrightarrow$  Exon 5

AGAGCGAGGCCGAGGCCCTCAGGGTTTGGAGACCCTGACACACCCACCTTCTCACCTGGGCTCTGCGTATCCCCAGCCT 320

TGAGGGGAAGATGAAGCCTAAACTGATGTACCAGGAGCTGAAGGTGCCTGCAGAGGAGCCCGCCAATGAGCTGCCATGAA 400  
M K P K L M Y Q E L K V P A E E P A N E L P M N

TGAGATTGAGGCGTGAAGGCTGCGGAAAAGAAAGCCCGCTGGTCTGCTGGTCCTCATTCTGGCGGTTGTGGGCTTCG 480  
E I E A W K A A E K K A R W V L L V L I L A V V G F  
.....

▼ M 2  
GAGCCCTGATGACTCAGCTGTTTCTATGGGAATACGGCGACTTGCATCTCTTTGGGCCCAACCAGCGCCAGCCCCCTGC 560  
G A L M T Q L F L W E Y G D L H L F G P N Q R P A P C  
.....

TATGACCCTTGCGAAGCAGTGTGGTGGAAAGCATTCTGAGGGCCTGGACTTCCCCAATGCCTCCACGGGGAACCCTTC 640  
Y D P C E A V L V E S I P E G L D F P N A S T G N P S

CACCAGCCAGGCCTGGCTGGGCTGCTCGCCGGTGCACAGCAGCCTGGACATCGCCTCCTTCTACTGGACCCTCACCA 720  
T S Q A W L G L L A G A H S S L D I A S F Y W T L T

ACAATGACACCCACAGCAGGAGCCCTCTGCCAGCAGGGTGGAGAGTCTCCGGCAGCTGCAGACCCTGGCACCAAAG 800  
N N D T H T Q E P S A Q Q G E E V L R Q L Q T L A P K

GGCGTGAACGTCCGCATCGCTGTGAGCAAGCCCAGCGGGCCCCAGCCACAGGCGGACCTGCAGGCTCTGCTGCAGAGCGG 880  
G V N V R I A V S K P S G P Q P Q A D L Q A L L Q S G

TGCCAGGTCCGCATGGTGGACATGCAGAAGCTGACCCATGGCGTCTGCATACCAAGTTCTGGGTGGTGGACCAGACCC 960  
A Q V R M V D M Q K L T H G V L H T K F W V V D Q T

ACTTCTACCTGGGCAGTGCCAACATGGACTGGCGTTCACTGACCCAGGTCAAGGAGCTGGGCGTGGTCATGTACAACTGC 1040  
H F Y L G S A N M D W R S L T Q V K E L G V V M Y N C

AGCTGCCTGGCTCGAGACCTGACCAAGATCTTTGAGGCCTACTGGTTCCTGGGCCAGGCAGCAGCTCCATCCCATCAAC 1120  
S C L A R D L T K I F E A Y W F L G Q A G S S I P S T

TTGGCCCCGGTTCTATGACACCCGCTACAACCAAGAGACACCAATGGAGATCTGCCTCAATGGAACCCCTGCTCTGGCCT 1200  
W P R F Y D T R Y N Q E T P M E I C L N G T P A L A

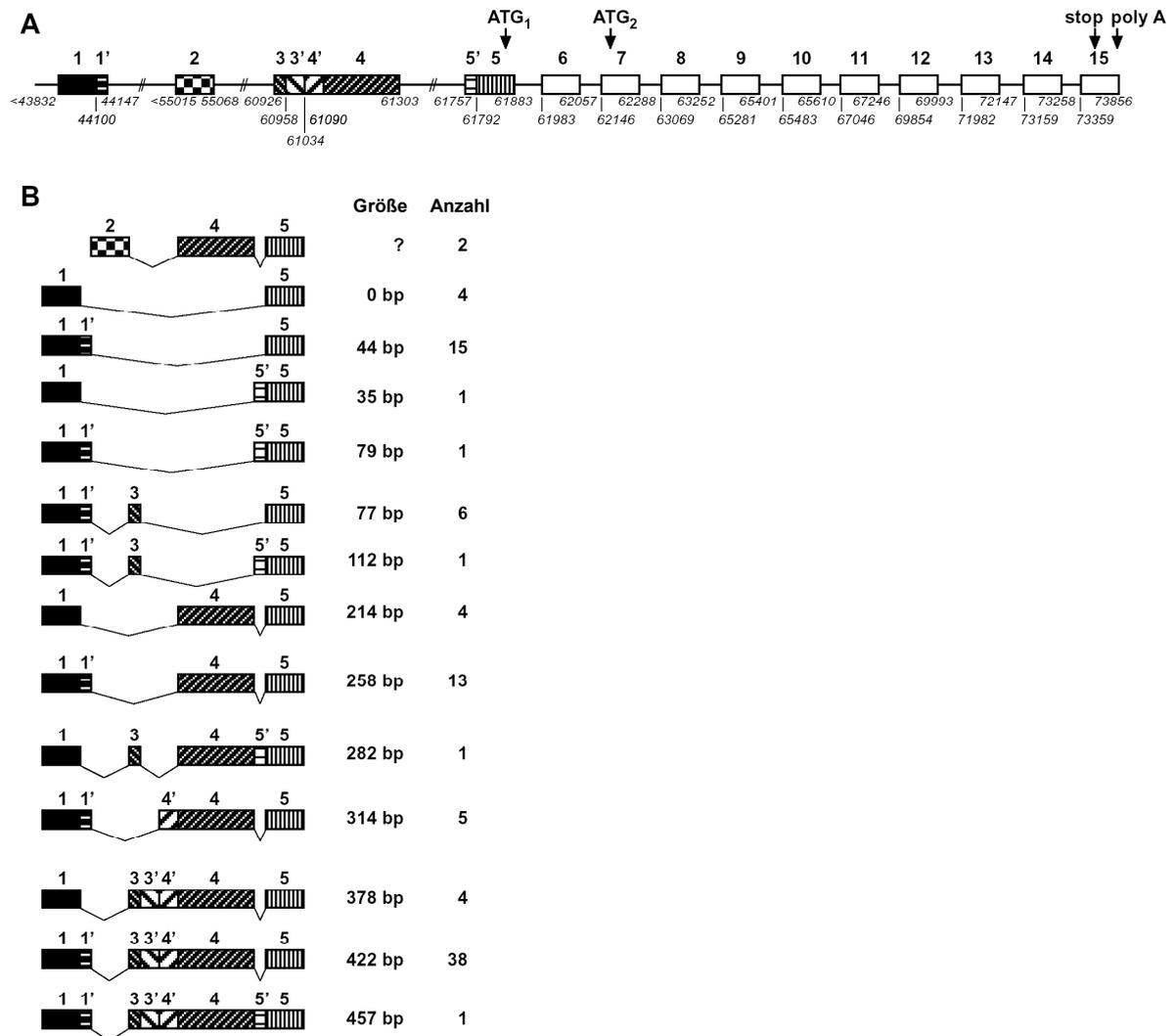
ACCTGGCGAGTGCGCCCCACCCTGTGTCCAAGTGGCCGCACTCCAGACCTGAAGGCTCTACTCAACGTGGTGGACAAT 1280  
Y L A S A P P P L C P S G R T P D L K A L L N V V D N

GCCCGGAGTTTCATCTACGTGCTGTGCATGAACCTGACCTGCCACTCTGGAGTTCTCCACCCTCACAGGTTCTGGCCTGC 1360  
A R S F I Y V A V M N Y L P T L E F S H P H R F W P A

CATTGACGATGGGCTGCGGCGGGCCACCTACGAGCGTGGCGTCAAGGTGCGCCTGCTCATCAGCTGCTGGGGACACTCGG	1440
I D D G L R R A T Y E R G V K V R L L I S C W G H S	
AGCCATCCATGCGGGCCTTCCTGCTCTCTGGCTGCCCTGCGTGACAACCATAACCCACTCTGACATCCAGGTGAAACTC	1520
E P S M R A F L L S L A A L R D N H T H S D I Q V K L	
TTTGTGGTCCCCGCGGATGAGGCCAGGCTCGAATCCCATATGCCCGTGTCAACCACAACAAGTACATGGTGACTGAACG	1600
F V V P A D E A Q A R I P Y A R V N <u>H N K Y M V T E R</u>	
CGCCACCTACATCGGAACCTCCAACCTGGTCTGGCAACTACTTCACGGAGACGGCGGGCACCTCGCTGCTGGTGACGCAGA	1680
A T Y I G T S N W S G N Y F T E T A G T S L L V T Q	
ATGGGAGGGGCGGCCTGCGGAGCCAGCTGGAGGCCATTTTCCTGAGGGACTGGGACTCCCCTTACATTCATGACCTTGAC	1760
N G R G G L R S Q L E A I F L R D W D S P Y I H D <u>L D</u>	
ACCTCAGCTGACAGCGTGGGCAACGCCTGCCGCCTGCTCTGAGGCCGATCCAGTGGGCAGGCCAAGGCCTGCTGGGCCC	1840
<u>T S A D S V G N A</u> <u>C R L L</u> .	
CCGCGGACCCAGGTGCTCTGGGTACGGTCCCTGTCCCCGCACCCCGCTTCTGTCTGCCCCATTGTGGCTCCTCAGGCT	1920
CTCTCCCCTGCTCTCCACCTCTACCTCCACCCACCAGGCTGACGCTGTGGCCCCGGGACCCAGCAGAGCTGGGGGAG	2000
GGATCAGCCCCAAAGAAATGGGGGTGCATGCTGGCCTGCCCCCTGGCCCACCCCACTTCCAGGGCAAAAAGGGCCA	2080
GGTTATAATAAGTAAATAACTTGTCTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

**Abb. 21: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von PLD3**

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der PLD3-cDNA (GenBank-Eintrag H15746) sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz. Das Startcodon des 5' verlängerten Leserasters (1) und das im Datenbankeintrag der HU-K4-mRNA (2) sind mit einer durchgezogenen Linie umrahmt, das Stoppcodon, das sich im Leseraster vor dem Start-ATG 1 befindet, ist mit einer gestrichelten Linie umrahmt. Das zusätzliche Cytosin an Position 484 (verglichen mit der HU-K4-mRNA) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die zwei HKD-Motive sind mit einer fetten, die potentielle Transmembrandomäne mit einer gepunkteten und die beiden Peptidsequenzen, die für die spätere Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden, mit einer durchgehenden Linie unterstrichen. Das C-terminale potentielle Prenylierungsmotiv ist grau hinterlegt.



**Abb. 22: 5'-UTR-Spleißvarianten der PLD3-mRNA**

**A:** Genomische Verteilung der Exons des PLD3-Gens auf dem humanen Chromosom 19 (Nummerierung entsprechend der des BAC-Klons CTC-492K19, GenBank-Eintrag AC010271)

Exon 5 enthält das neu definierte Startcodon ( $ATG_1$ ). Die weiteren Exons im 5' UTR sind zur Verdeutlichung mit verschiedenen Mustern abgebildet.  $ATG_2$  bezeichnet das Startcodon der HU-K4-mRNA.

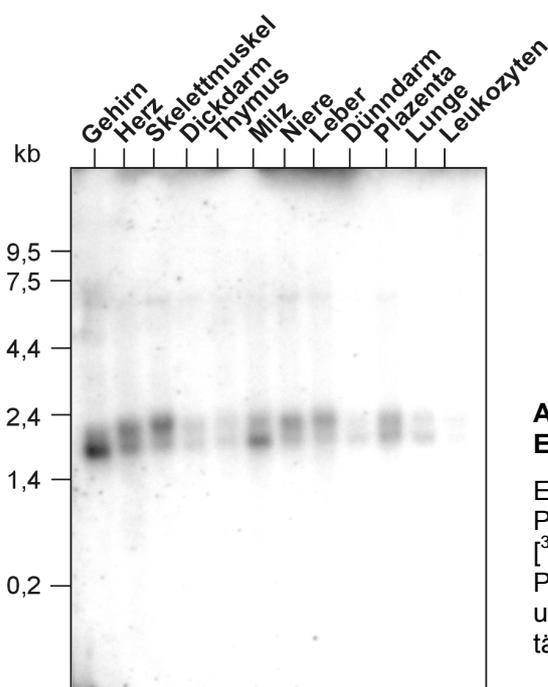
**B:** Schematische Darstellung der 5'-UTR-Regionen verschiedener PLD3-mRNAs

Durch Analyse verschiedener EST-Sequenzen wurden 14 verschiedene 5'-UTR-Spleißformen der PLD3-mRNA ermittelt. Sie beinhalten alle das Exon 5 mit dem Startcodon ( $ATG_1$ ). Exon 1 kommt mit einer Ausnahme ebenfalls in allen Varianten vor. Ansonsten variieren die mRNAs in ihrer Zusammensetzung der Exons 1', 3, 3', 4, 4' und 5'. Die Exons des codierenden Bereichs (Exons 5-15) sind bei allen analysierten EST-Klonen identisch. Die Größenangaben in bp beziehen sich auf die Anzahl der Basenpaare, die sich zwischen den Exons 1 und 5 befinden. In der rechten Spalte ist die Anzahl gefundener EST-Klone für die jeweilige Spleißform angegeben.

## 2.5.2 Gewebeverteilung von PLD3

### Northern-Blot-Analyse

Zur Untersuchung der Gewebeverteilung von PLD3 wurde ein Northern-Blot mit einer etwa 900 Nukleotide umfassenden [<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Sonde inkubiert, die den gesamten 5' UTR sowie die ersten ca. 500 Nukleotide des codierenden Bereiches der PLD3-mRNA umfasst (Abb. 21). Die Auswahl fiel auf diese DNA-Sequenz, da sie durch einen Restriktionsverdau der PLD3-Sequenz im Vektor pBluescript II SK(+) leicht zugänglich war. Der Sequenzabschnitt der Sonde, der den Teil des codierenden Bereichs beinhaltete, war hierbei für eine Hybridisierung mit allen vorkommenden Speißvarianten ausreichend. Der Northern-Blot (Abb. 23) zeigt eine starke Expression kleinerer, etwa 1,7 kb großer, Spleißformen im Gehirn. In den anderen untersuchten Geweben kommen dagegen neben kleineren auch bis zu 2,2 kb große Varianten vor. Im Skelettmuskel scheinen größere, in der Milz dagegen eher kleinere Varianten exprimiert zu werden. Die Expression der PLD3-mRNA in Dickdarm, Thymus, Plazenta und Lunge ist vergleichsweise gering, in Leukozyten ist sie kaum nachweisbar. Die unterschiedliche Höhe der Signale im Northern-Blot entspricht annähernd dem Größenunterschied der größten und kleinsten häufig vorkommenden 5'-UTR-Spleißvariante (Abb. 22). Obwohl der Northern-Blot eine dominierende Expression kleinerer Transkripte im Gehirn vermuten lässt, findet man in der EST-Datenbank sowohl längere als auch kürzere aus Gehirngeweben stammende EST-Klone (siehe 2.5.1). Die Expression der kürzeren Spleißformen scheint hier jedoch stark zu überwiegen, sodass die der größeren nicht eindeutig in der Northern-Blot-Analyse detektiert werden kann.

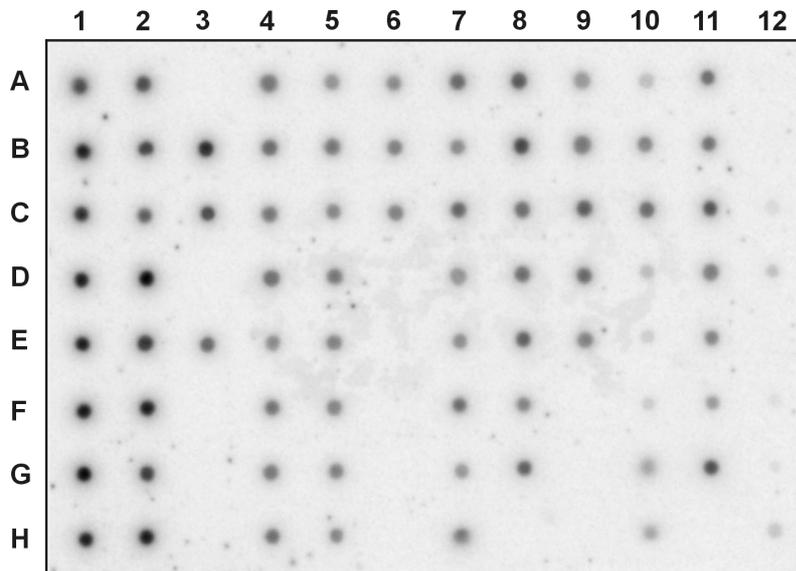


**Abb. 23: Northern-Blot-Analyse der PLD3-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben**

Ein humaner Gewebe-Northern-Blot wurde mit einer PLD3-spezifischen, ca. 900 Nukleotide umfassenden [<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Sonde inkubiert. Mit dem Phosphoimager ließen sich zwei dominante Transkripte unterschiedlicher Größe mit variierender Signalintensität in den untersuchten Geweben detektieren.

## MTE-Array

Zur Untersuchung des detaillierten Expressionsmusters der PLD3-mRNA wurden humane MTE<sup>TM</sup>- (*multiple tissue expression*-) Arrays mit der zuvor beschriebenen DNA-Sonde hybridisiert (Abb. 24). Der Array zeigt in allen untersuchten Geweben eine Expression der PLD3-mRNA. Wie im Northern-Blot bereits gezeigt wurde, ist sie in Gehirngeweben besonders stark ausgeprägt. Auch in allen untersuchten fötalen Geweben wird PLD3-mRNA gebildet. Das Ergebnis des Northern-Blots und MTE-Arrays weisen auf eine große Bedeutung des Proteins in allen adulten und fötalen Geweben hin.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gesamt-Hirn	Cerebellum, links		Herz	Ösophagus	Colon transversum	Niere	Lunge	Leber	Leukämie, HL-60	fötales Gehirn	Hefe Gesamt-RNA
B	Cortex	Cerebellum, rechts	Nucleus accumbens	Aorta	Magen	Colon descendens	Skelettmuskel	Plazenta	Pankreas	HeLa S3	fötales Herz	Hefe tRNA
C	Frontallappen	Corpus callosum	Thalamus	Vorhof, links	Duodenum	Rektum	Milz	Harnblase	Nebenniere	Leukämie, K-562	fötale Niere	<i>E. coli</i> rRNA
D	Parietallappen	Amygdala		Vorhof, rechts	Jejunum		Thymus	Uterus	Schilddrüse	Leukämie, MOLT-4	fötale Leber	<i>E. coli</i> DNA
E	Occipitalappen	Nucleus caudatus	Rückenmark	Kammer, links	Ileum		periphere Leukozyten	Prostata	Speicheldrüse	Burkitt-Lymphom, Raji	fötale Milz	Poly r(A)
F	Temporalappen	Hippocampus		Kammer, rechts	Ileocoecum		Lymphknoten	Testis		Burkitt-Lymphom, Daudi	fötaler Thymus	humane c,t-1 DNA
G	Gyrus paracentalis	Medulla oblongata		Kammerscheidewand	Appendix		Knochenmark	Ovar		Colorektales Adenokarzinom, SW480	fötale Lunge	humane DNA 100 ng
H	Pons	Putamen		Herzspitze	Colon ascendens		Trachea			Lungenkarzinom, A549		humane DNA 500 ng

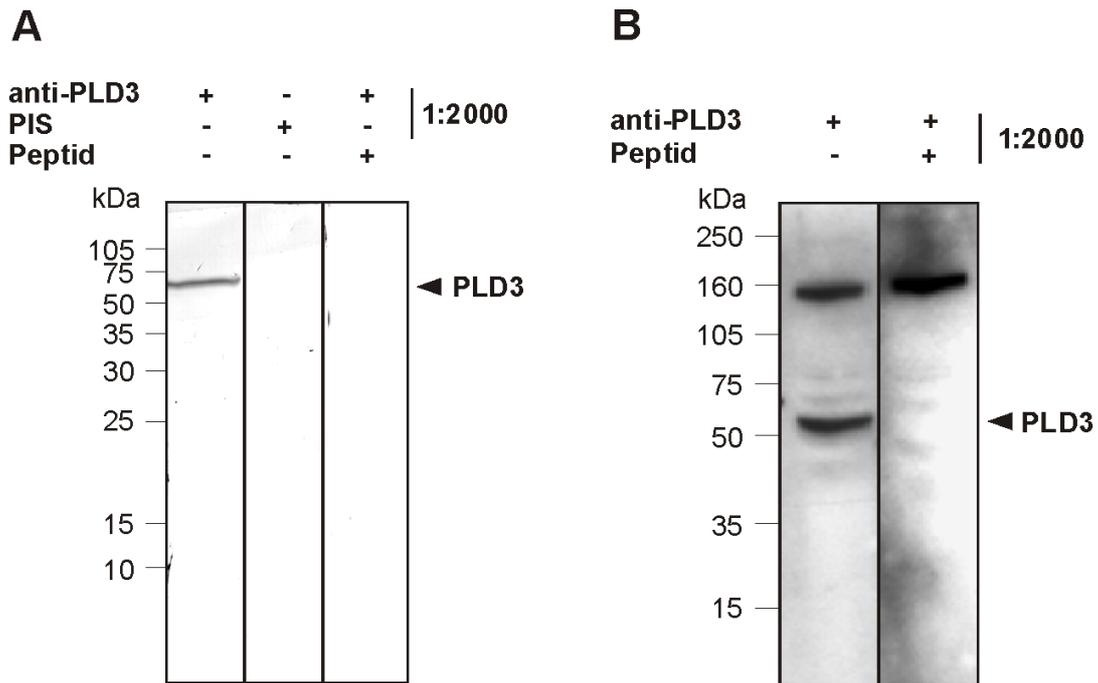
**Abb. 24: Detailliertes Expressionsmuster der PLD3-mRNA**

Ein MTE-Array wurde mit einer PLD3-spezifischen [<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Sonde hybridisiert und die Signale mit einem Phosphoimager detektiert. Die Anordnung der RNA-Proben auf dem Array ist unten dargestellt.

### 2.5.3 Charakterisierung eines polyklonalen Antiserums gegen PLD3

Um PLD3 näher charakterisieren zu können, wurde die Firma Eurogentec mit der Produktion eines spezifischen Antiserums beauftragt. Hierfür wurden zwei Kaninchen mit einem Gemisch der Peptide  $\text{H}_2\text{N-CTWPRFYDTRYNQETP-CONH}_2$  und  $\text{H}_2\text{N-LDTSADSVGNACRLL-COOH}$  immunisiert. Das erste Peptid wurde über das Cystein (unterstrichen), das zweite mit Glutaraldehyd an das Trägerprotein Hämocyanin gekoppelt. Die Auswahl der immunogenen Peptide erfolgte mit Hilfe des Programms DNASTar und Experten von Eurogentec. Das Serum eines der Kaninchen wies bereits nach der dritten Antigeninjektion eine spezifische Immunantwort auf. PLD3 konnte sowohl in CHO- (nicht gezeigt) als auch in COS-Zellen, die mit pcDNA3.1/Hygro\_PLD3 (Vektorkarte siehe 8.3) transfiziert worden waren, in der Western-Blot-Analyse (Abb. 25 A.; erste Spur) und Immunfluoreszenz (Abb. 26) detektiert werden. Das apparente Molekulargewicht von 65 kDa ist höher als das der *in vitro* translatierten PLD3 und deutet auf posttranslationale Modifikationen des Proteins in den kultivierten COS-Zellen hin. In der Western-Blot-Analyse von COS-Zellen, die zur Kontrolle mit dem Vektor pcDNA3.1/hygro transfiziert worden waren und somit keine PLD3 exprimierten, wurden keine unspezifischen Banden detektiert (Abb. 28).

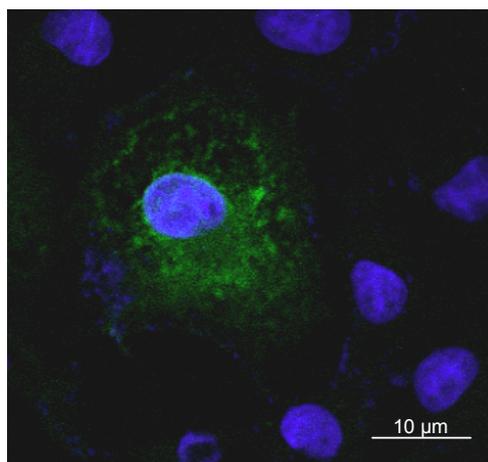
Die Spezifität der Antikörper-Antigen-Reaktion wurde durch die Absättigung des Antikörpers mit dem Peptid  $\text{H}_2\text{N-LDTSADSVGNACRLL-COOH}$  in der Western-Blot-Analyse bestätigt (Abb. 25 A, letzte Spur). Mit dem Peptid  $\text{H}_2\text{N-CTWPRFYDTRYNQETP-CONH}_2$  ließ sich das Antiserum dagegen nicht absättigen (nicht gezeigt). Zum Nachweis endogener PLD3 wurde ein Extrakt aus Rattenhirn-Membranen in der Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 25 B). Die C-terminalen 15 Aminosäurereste des PLD3-Homologs aus Ratte sind identisch mit denen des immunogenen Peptids. Es war deshalb zu erwarten, dass die PLD3 aus Ratte mit dem Antiserum detektiert werden kann. Das apparente Molekulargewicht dieses PLD3-Homologs ist mit ca. 55 kDa etwas geringer als das der in COS-Zellen überexprimierten humanen PLD3. Dieser Unterschied könnte ebenfalls durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen bedingt sein. Mit dem immunogenen Peptid abgesättigtes Antiserum (s. o.) erkennt auch hier das Antigen nicht mehr. Die Bande bei 160 kDa wird durch eine unspezifische Immunreaktion verursacht und lässt sich nicht durch eine Präinkubation des Antiserums mit dem Peptid unterdrücken.



**Abb. 25: Western-Blot-Analyse PLD3 exprimierender COS-Zellen (A) und Nachweis endogener PLD3 in Rattenhirn-Membranen (B)**

**A:** COS-Zellen wurden mit pcDNA3.1/Hygro\_PLD3 durch Elektroporation transfiziert. Nach zwei Tagen wurden Zelllysate hergestellt und in der Western-Blot-Analyse untersucht. Im Gegensatz zum Präimmenserum (PIS, zweite Spur) detektiert das Antiserum (anti-PLD3, erste Spur) PLD3 mit einem apparenten Molekulargewicht von 65 kDa. Wurde das Antiserum zuvor mit dem Peptid H<sub>2</sub>N-LDTSADSVGNACRLL-COOH abgesättigt, wurde PLD3 nicht mehr erkannt (dritte Spur).

**B:** Endogene PLD3 wurde in Rattenhirn-Membranen mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 55 kDa von dem PLD3-Antiserum erkannt. Die Immunreaktion ließ sich, wie unter A beschrieben, durch Absättigung des Antiserums mit dem immunogenen Peptid unterdrücken.



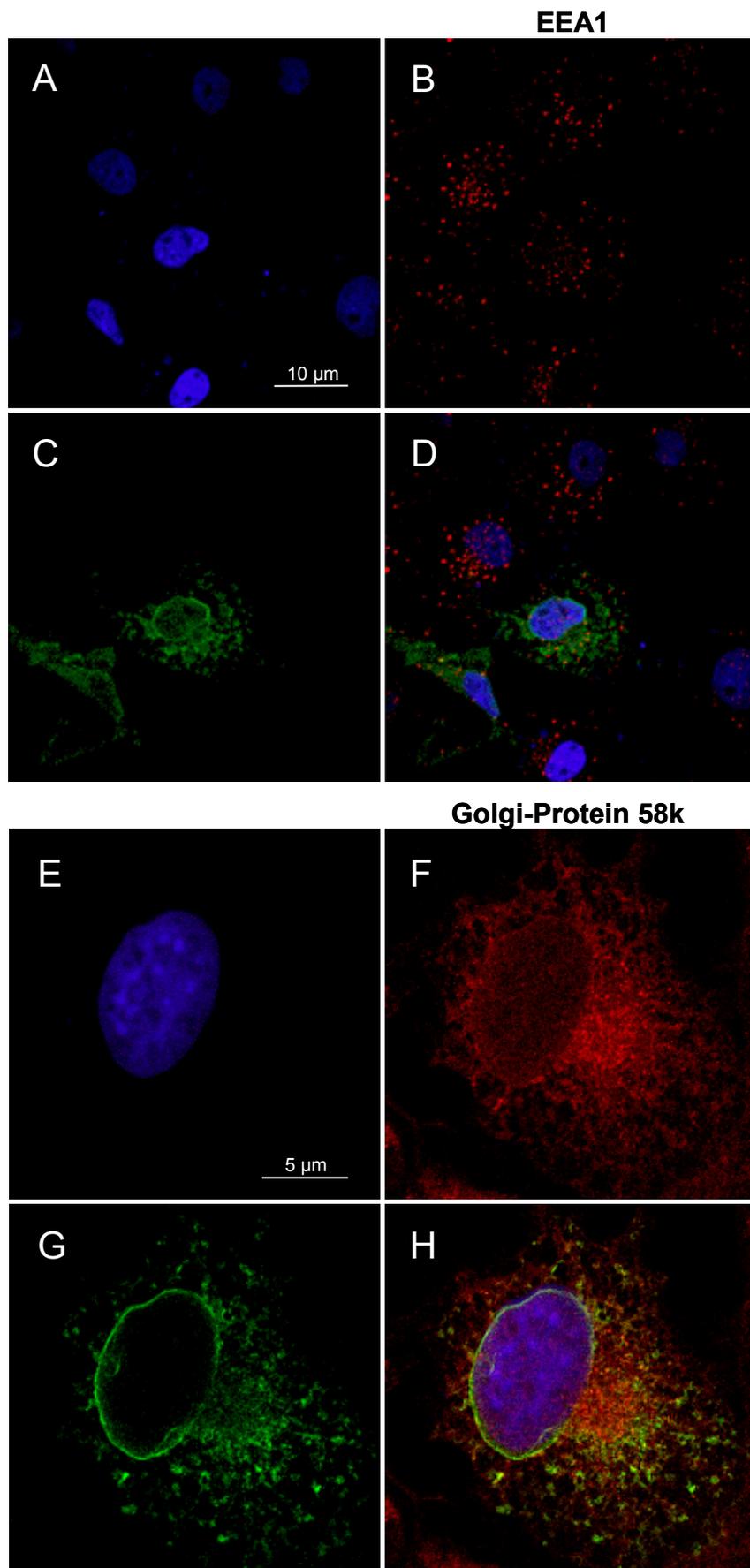
**Abb. 26: PLD3 exprimierende COS-Zelle**

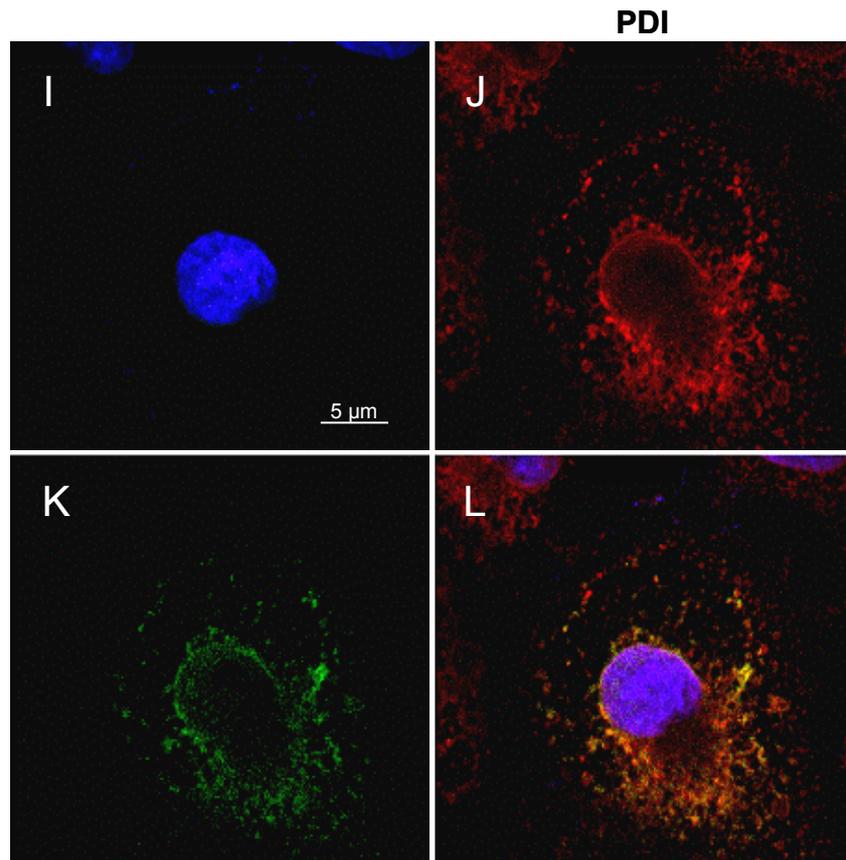
COS-Zellen wurden mit pcDNA3.1/Hygro\_PLD3 transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit anti-PLD3 (1:1000 verdünnt) als Primär- und Cy2-gekoppeltem anti-Kaninchen IgG als Sekundärantikörper untersucht. Die PLD3 exprimierende Zelle ist durch die grüne Fluoreszenz deutlich von den nicht-transfizierten Zellen zu unterscheiden.

### 2.5.4 Lokalisierung von PLD3 in transfizierten COS-Zellen

Zur Untersuchung auf Kollokalisierung von PLD3 und SorLA innerhalb einer Zelle wurden COS-Zellen mit pcDNA3.1/Hygro\_PLD3 und pSorLAok kotransfiziert. Die nach zwei Tagen durchgeführte immunocytochemische Untersuchung der Zellen wurde mit konfokaler Laser-mikroskopie durchgeführt. Zellen, die beide Proteine exprimierten, wiesen eine sehr unterschiedliche subzelluläre Verteilung von SorLA und PLD3 auf (nicht gezeigt).

Um eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer physiologischen Interaktion von PLD3 mit SorLA machen zu können, wurde die Lokalisierung von PLD3 in verschiedenen Zellkompartimenten untersucht. Da bekannt ist, dass die Phospholipasen D1 und D2 eine Assoziation mit Membranstrukturen aufweisen (Exton, 1997), wurde eine Koimmunfärbung von PLD3 und dem Golgiprotein 58 k, dem Markerprotein für frühe Endosomen EEA 1 (*early endosomal antigen 1*) bzw. dem ER-assoziierten Protein PDI (**P**rotein-**D**isulfid-**I**somerase) in PLD3 überexprimierenden COS-Zellen durchgeführt. In den Aufnahmen von Abbildung 27 ist überexprimierte PLD3 durch die grüne Fluoreszenz des Cy2-gekoppelten Sekundärantikörpers zu erkennen. Endogenes EEA 1 sowie Golgiprotein 58 k und endogene PDI sind durch die rote Fluoreszenz des Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Die gelbe, bei der Überlagerung beider Aufnahmen entstehende, Mischfarbe der beiden Emissionswellenlängen weist auf eine enge räumliche Assoziation der untersuchten Proteine hin. Die Aufnahmen A-D lassen vermuten, dass PLD3 nicht in frühen Endosomen lokalisiert ist. In der Koimmunfärbung von PLD3 und dem Golgiprotein 58 k (E-H) sind dagegen einige gelbe Bereiche zu erkennen, die ein Vorkommen von PLD3 im Golgi-Kompartiment vermuten lassen. Anschließend wurde die Lokalisierung überexprimierter PLD3 und endogener PDI, einem Markerprotein für das Endoplasmatische Retikulum, verglichen (I-L). Die gelben Bereiche in L deuten hierbei auf eine starke Assoziation überexprimierter PLD3 mit dem ER hin.





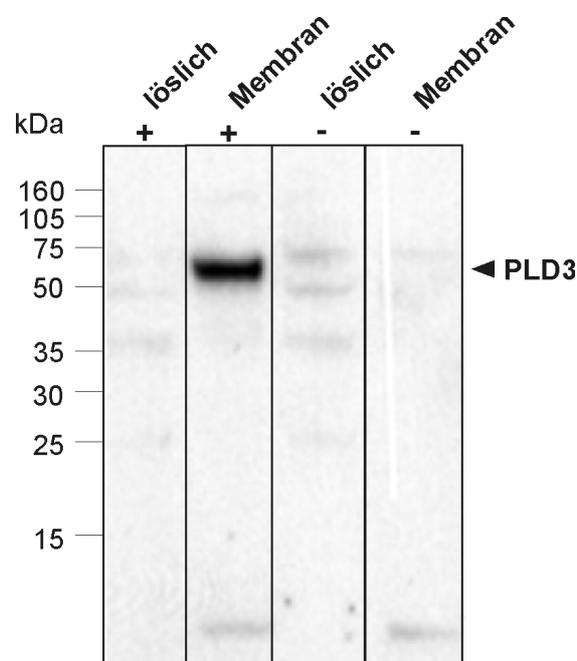
**Abb. 27: Subzelluläre Lokalisierung von PLD3 in COS-Zellen**

COS-Zellen wurden mit pcDNA3.1/Hygro\_PLD3 transfiziert. Nach zweitägiger Inkubation wurde überexprimierte PLD3 durch Inkubation mit anti-PLD3 und anschließende Reaktion mit Cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper (grün) sichtbar gemacht. Endogenes Golgi-Protein 58k, das in frühen Endosomen lokalisierte Protein EEA 1 und das ER-assoziierte Protein PDI wurden nach Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper durch die Sekundärreaktion mit Cy3-gekoppelten anti-Maus IgG sichtbar gemacht (rot).

**A,E,I:** DAPI-Färbung der Zellkerne; **C,G,K:** indirekte Fluoreszenzfärbung von PLD3 (grün); **B:** indirekte Fluoreszenzfärbung von EEA1; **F:** indirekte Fluoreszenzfärbung des Golgi-Proteins 58 k; **J:** indirekte Fluoreszenzfärbung von PDI; **D,H,L** Überlagerung der jeweils drei vorangegangenen Aufnahmen

### Nachweis von PLD3 in der Membranfraktion transfizierter COS-Zellen

Aufgrund der zuvor beschriebenen bioinformatischen Analyse liegt die Annahme nahe, dass es sich bei PLD3 um ein membranverankertes Protein handelt. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden die Membranen und die lösliche Proteinfraction PLD3 exprimierender COS-Zellen in der Western-Blot-Analyse untersucht. PLD3 wurde eindeutig mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 65 kDa in der Membranfraktion nachgewiesen. In dem löslichen Überstand wurde sie nicht detektiert.



**Abb. 28: Nachweis von PLD3 in der Membranfraktion transfizierter COS-Zellen**

COS-Zellen wurden mit pcDNA3.1/hygro\_PLD3 (+) oder als Kontrolle mit pcDNA3.1/hygro (-) transfiziert und nach zwei Tagen durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach der Sedimentation der Zellkerne wurde der Überstand durch Ultrazentrifugation in die Membranfraktion und lösliche Fraktion aufgetrennt und mit anti-PLD3 im Western-Blot untersucht.

Die Ergebnisse bezüglich der Lokalisierung von PLD3 zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit der bereits für PLD1 beschriebenen Assoziation mit Membranen des ER und Golgi-Apparates (Exton, 1997; Liscovitch *et al.*, 2000). Es kann daher vermutet werden, dass PLD3 eine Funktion direkt an den Membranen dieser Zellkompartimente ausübt.

## 3 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteine identifiziert und charakterisiert, die mit der cytosolischen Domäne von SorLA interagieren. Die Ergebnisse sollten Hinweise auf den Ablauf der Signalkaskade des Rezeptors liefern. Als Methode, mögliche Interaktionspartner aus der Vielzahl von gewebespezifisch exprimierten Proteinen zu isolieren, wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System gewählt (Fields und Song, 1991; Chen *et al.*, 1991; Nishimune *et al.*, 1996).

### 3.1 Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse

Zur Identifizierung intrazellulärer Bindungspartner von SorLA wurde ein Plasmid zur Expression eines Köderkonstruktes aus der GAL4-Bindedomäne und SorLAcp hergestellt. Vor der Durchmusterung der cDNA-Bank wurde zunächst gezeigt, dass das Köderkonstrukt selbst nicht zu einer Transaktivierung der Reportergene führt und somit im Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet werden konnte. Entsprechend der neuronalen Expression von SorLA wurde für die anschließende Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse eine cDNA-Bank aus menschlichem Gehirn verwendet. Beim Durchmustern von etwa  $1.3 \times 10^6$  Transformanten kam es bei ca. 90 zu einer Aktivierung aller Reportergene. Die enthaltene cDNA konnte bei 41 dieser Klone durch eine direkte PCR amplifiziert werden. Bei der Analyse der Sequenzen fiel auf, dass nur kurze cDNA-Fragmente bis maximal 1500 bp unter den von der Firma BIO101 vorgeschriebenen Reaktionsbedingungen zugänglich waren. Die von Jacobsen *et al.* (2001) in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay mit SorLAcp als Köderprotein identifizierten Klone, die für die an Proteinsortierungsprozessen beteiligten Proteine GGA1 und GGA2 codieren, wurden in dieser Arbeit nicht gefunden. Ein Vergleich der von Jacobsen *et al.* mit den hier identifizierten Bindungspartnern von SorLAcp zeigte einige Übereinstimmungen. So wurden die Serinprotease HtrA2 (Faccio *et al.*, 2000) und das an synaptischer Vesikelfusion beteiligte Protein Snapin (Ilardi *et al.*, 1999) in beiden Fällen als Interaktionspartner von SorLAcp gefunden. Diese zwei Proteine wurden jedoch nicht weiter untersucht, da eine spezifische Interaktion mit SorLAcp aufgrund der Ergebnisse der Kontrollversuche fraglich erschien.

Unter Berücksichtigung der drei möglichen Leseraster der cDNAs, der Lokalisierung der abgeleiteten Proteine in der Zelle, der typischen falsch-positiven Interaktionspartner im Hefe-Zwei-Hybrid-System sowie der Spezifität der Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein wurde die Anzahl möglicher Interaktionspartner auf sieben eingegrenzt. Das zum Zeitpunkt der Analyse unbekanntes Protein FANCL wurde erst kürzlich von Meetei *et al.* (2003) charakterisiert. Als Ubiquitin-Ligase, und damit an Proteindegradationsprozessen beteiligt, gehört

es zu den falsch-positiven Interaktionspartnern bei dieser Methode. Bei dem unbekanntem Protein DKFZp434F054 und dem Genprodukt der FLJ90634fis-cDNA könnte es sich um echte, physiologische Bindungspartner von SorLAcp handeln. Auch WSB-1 stellt einen interessanten Kandidaten dar. Es beinhaltet sowohl eine SOCS- (*suppressor of cytokine signaling*-) Domäne als auch konservierte Trp-Asp- (WD-40-) Wiederholungen. Die WD-40-Wiederholungen wurden erstmals in der  $\beta$ -Untereinheit von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren identifiziert, später wurden sie auch für eine Reihe weiterer cytoplasmatischer Proteine beschrieben, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind (Neer *et al.*, 1994). Die Konsensussequenz der SOCS-Domäne wurde von Hilton *et al.* (1998) als gemeinsames Strukturelement aller SOCS-Proteine benannt. Sie sind an der Signalkaskade vieler Cytokine beteiligt. Die Interaktion von SorLAcp mit den zwei unbekanntem Proteinen und WSB-1 findet in allen drei Fällen innerhalb der C-terminalen Aminosäuren der Proteine statt, da nur diese zusammen mit der GAL4-Aktivierungsdomäne in Hefe exprimiert wurden. Diese drei Bindungspartner wurden hier zwar nicht näher untersucht, sie könnten aber einen interessanten Schwerpunkt zukünftiger Forschung darstellen. Da es das Ziel war, Proteine zu charakterisieren, die an SorLAs Signaltransduktion beteiligt sein könnten, wurde den an Transkriptionsprozessen beteiligten Proteinen ART-27, THG-1a und dem potentiellen Mitglied der Phospholipase-D-Familie PLD3 besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Vor der weiteren Charakterisierung dieser Proteine wurde ihre Interaktion mit SorLAcp in einem GST-Bindungsassay bestätigt.

Die Hefe-Zwei-Hybrid-Methode bietet eine gute Möglichkeit, Domänen oder Aminosäurereste innerhalb eines Bindungspartners zu identifizieren, die für eine Protein-Protein-Wechselwirkung essentiell sind. Es zeigte sich, dass die C-terminalen 14 Aminosäurereste nur für die Bindung von THG-1a notwendig sind, nicht jedoch für eine Bindung von PLD3 oder ART-27. Jacobsen *et al.* (2001) fanden dagegen nur Proteine, die an die C-terminalen 14 Aminosäurereste von SorLAcp binden. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit im Gegensatz zu der von Jacobsen *et al.* durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse auch Proteine gefunden wurden, die an Bereiche nahe der Transmembrandomäne von SorLAcp binden, kann durch die Verwendung verschiedener Köderkonstrukte erklärt werden. Jacobsen *et al.* verwendeten in ihrer Analyse ein SorLAcp-Köderkonstrukt im pBD-GAL4-Vektor (Stratagene), das einen sehr kurzen Linker-Bereich zwischen der für die GAL4-DNA-Bindedomäne und der für das Köderprotein codierenden Sequenz besitzt. Durch die Tertiärstruktur des resultierenden Fusionsproteins bedingt, könnte ein großer Teil der juxtamembranären Aminosäurereste von SorLAcp für eine Proteininteraktion unzugänglich vorliegen. In so einem Fall würden mit der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode nur Interaktionspartner identifiziert werden, die an den freiliegenden C-terminalen Bereich des Carboxyterminus binden. Das in dieser Arbeit verwendete Köderkonstrukt zeichnet sich durch einen längeren Linker-Bereich von insge-

samt 28 Aminosäureresten zwischen der GAL4-DNA-Bindedomäne und SorLAcp aus (Abb. 5), was möglicherweise eine andere Tertiärstruktur des exprimierten Fusionsproteins bedingt. SorLAcp könnte deshalb für eine Protein-Protein-Wechselwirkung im hier durchgeführten Assay vollständig zugänglich vorgelegen haben.

## 3.2 Interaktionspartner von SorLAcp

### 3.2.1 PLD3

Mitglieder der Phospholipase-D-Familie sind innerhalb der Tier- und Pflanzenwelt weit verbreitet. Ihre Hauptfunktion besteht in der Spaltung von Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure und Cholin, sie katalysieren aber auch den Transfer von Phosphatidylresten (Exton, 1997 und 2000). Der Phosphatidsäure wird einerseits eine Funktion als intrazelluläres Signalmolekül bei einer Reihe physiologischer Prozesse zugeschrieben, sie dient aber auch als Substrat zur Generierung weiterer Effektormoleküle. Sie kann durch die Phosphatidphosphohydrolase in Diacylglycerol oder durch eine spezifische Phospholipase A<sub>2</sub> in Lysophosphatidsäure umgewandelt werden. Diacylglycerol ist ein wichtiges Aktivatormolekül der Proteinkinase C, Lysophosphatidsäure fungiert dagegen als extrazelluläres Signalmolekül. PLDs werden durch Hormone und Wachstumsfaktoren reguliert und sind an einer Reihe verschiedener Signalkaskaden beteiligt. Sie weisen zwei hoch konservierte HKD-Motive auf, die auch in weiter entfernt verwandten Proteinen wie bakteriellen Phospholipidsynthasen und Endonukleasen, einem Hüllprotein des Pockenvirus (Sung *et al.*, 1997) und dem Toxin aus *Yersinia pestis* (Rudolph *et al.*, 1999) gefunden werden. Mutations- und Strukturanalysen deuten darauf hin, dass die beiden HKD-Motive an der Ausbildung des katalytischen Zentrums der Phospholipasen beteiligt sind (Stuckey *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 1997). Bei einer genaueren Betrachtung der verschiedenen PLD-Analoga fällt auf, dass die HKD-Motive essentiell für ihre katalytische Aktivität sind. Nicht alle Proteine mit HKD-Motiven üben dagegen eine Funktion als Phospholipase aus. So besitzt das Protein K4L des *Vaccinia virus* zwar zwei intakte Motive, scheint aber katalytisch inaktiv zu sein (Sung *et al.*, 1997). Auch die in dieser Arbeit beschriebene PLD3 weist zwei HKD-Motive auf, eine Homologie zur PLD1 und PLD2 besteht davon abgesehen jedoch nicht. Die Identifizierung und Aufklärung der Funktion einer neuen Phospholipase D wäre zwar physiologisch von großer Bedeutung, es ist jedoch noch fraglich, ob PLD3 in diese Familie eingeordnet werden darf. So konnten Pedersen *et al.* (1998) bei dem murinen Homolog SAM-9 keine Phospholipase-Aktivität feststellen. Man kann deshalb vermuten, dass PLD3 bei anderen membranassoziierten Prozessen eine Rolle spielt, die nicht auf einer enzymatischen Spaltung von Phospholipiden beruhen.

Die Vielzahl unterschiedlicher 5'-UTR-Spleißvarianten der PLD3-mRNA lässt vermuten, dass das Ausmaß der PLD3-Expression feinen gewebespezifischen Regulationsmechanismen unterliegt. So fällt besonders die dominierende Expression kleinerer 5'-UTR-Spleißvarianten der PLD3-mRNA im Gehirn auf. Ein derartiges Phänomen wurde in den letzten Jahren bei einer Reihe weiterer mRNAs entdeckt, die in verschiedenen 5'-UTR-Spleißvarianten vorkommen. So wurden für das 5HTT-Gen (Serotonintransporter-Gen) drei 5'-UTR-Spleißvarianten identifiziert, von denen zwei eine gleiche Gewebeverteilung aufweisen, die dritte dagegen nur in Herz und Darm vorkommt (Ozsarac *et al.*, 2002). Man nimmt an, dass sich derartige Spleißvarianten durch verschiedene regulatorische Elemente unterscheiden, die die Quantität der Proteinexpression beeinflussen. In den meisten Fällen ermöglichen kurze 5' UTRs mit einem niedrigen Gehalt an Guanin und Cytosin eine effiziente Translation, während die Anzahl und Lage potentiell aktiver, stromaufwärts gelegener, Startcodons die Translationseffizienz negativ beeinflusst (Meijer und Thomas, 2002). Die Variabilität innerhalb der 5' UTRs stellt somit einen Regulationsmechanismus für eine zellspezifische Translations-effizienz dar und könnte bedingt sein durch die während der Evolution stattgefundenene Adaption an das sich ändernde Umfeld.

Die ubiquitäre Expression von PLD3 weist auf eine wichtige Funktion in allen Zellen adulter sowie fötaler Gewebe hin. Die Untersuchungen zur Gewebeverteilung der humanen PLD3 (Abb. 23 und 24) stimmen mit den Ergebnissen von Pedersen *et al.* (1998) überein, die murines SAM-9 hauptsächlich in Gehirn, aber auch in anderen Geweben fanden. Alle untersuchten Hirngewebe zeigen eine starke Expression der PLD3-mRNA. Nur im Cerebellum, Corpus callosum, Thalamus und Rückenmark ist das Hybridisierungssignal schwächer ausgeprägt. Dieses Ergebnis steht ebenfalls im Einklang mit den *in situ* Hybridisierungen, die von Pedersen *et al.* (1998) an murinen Hirnschnitten durchgeführt wurden. PLD3 wird wie auch SAM-9 besonders in neuronalen Regionen des Vorderhirns exprimiert. Die Expression der PLD3-mRNA im Corpus callosum deutet darauf hin, dass das Protein außer in neuronalen Strukturen auch in Gliazellen vorkommt. Die SAM-9- und die SorLA-mRNA werden beide hauptsächlich in neuronalen Strukturen des adulten murinen Gehirns gebildet (Petersen *et al.*, 1998; Hermanns-Borgmeyer *et al.*, 1998), das detaillierte Expressionsmuster weist jedoch Unterschiede auf. So scheint im Striatum keine Expression der SorLA- im Gegensatz zur SAM-9-mRNA stattzufinden.

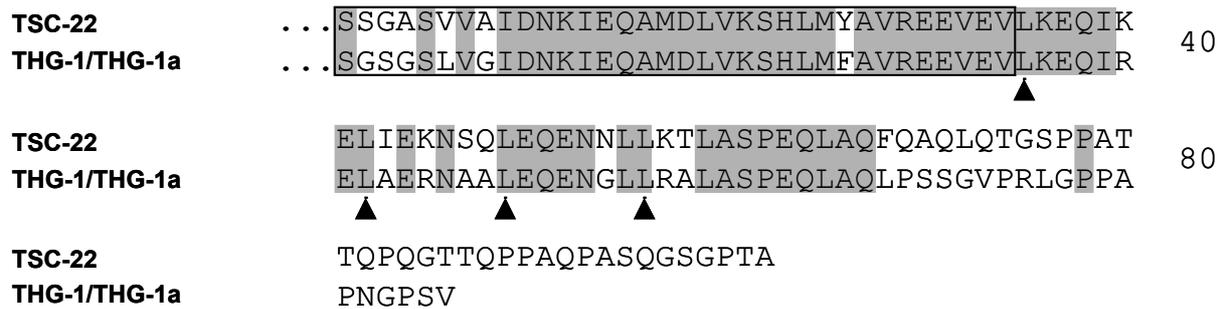
Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit muss eine physiologische Interaktion von PLD3 mit SorLAcp in Frage gestellt werden. Es handelt sich bei PLD3 um ein Protein, dass an vorwiegend an Membranen des Endoplasmatischen Retikulums assoziiert vorliegt. Daraus lässt sich eine Funktion des Proteins direkt an der Zellmembran dieses Kompartiments ableiten. Eine Beteiligung von PLD3 an einer durch SorLAcp vermittelten Signalkaskade von der Zellmembran in den Kern kann somit angezweifelt werden.

In der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse wurde ein cDNA-Klon identifiziert, der nur für die C-terminalen 116 Aminosäurereste von PLD3 codiert. Nur der C-Terminus dieses Proteins interagiert folglich mit SorLAcp. Eine physiologische Interaktion der beiden Proteine ist nur möglich, wenn PLD3 über einen C-terminalen Prenylanker (Abb. 21) mit cytosolischer Orientierung in der Membran verankert vorläge. Unter Berücksichtigung des Start-ATG 1 (Abb. 21), lässt sich durch die Aneinanderreihung lipophiler Aminosäuren allerdings eine potentielle Transmembrandomäne vorhersagen. Die Anhäufung positiv geladener Aminosäuren vor dem hydrophoben Bereich weist auf eine cytosolische Orientierung des N-Terminus hin (Hartmann *et al.*, 1989; von Heijne, 1994). Folglich wäre die in der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit SorLAcp interagierende Domäne luminal orientiert und eine physiologische Wechselwirkung mit SorLAcp somit nicht möglich. Versuche zur Aufklärung der Membrantopologie des Proteins werden zur Zeit im Arbeitskreis durchgeführt.

Auch das Ergebnis des GST-Bindungsassays lässt eine physiologische Interaktion von PLD3 und SorLAcp in Frage stellen. Es fiel auf, dass von GST-SorLAcp nur dreimal mehr radioaktiv markierte PLD3 gebundenen wurde als von der Negativkontrolle GST. Eine spezifische Interaktion von PLD3 und SorLAcp ist somit nicht sehr wahrscheinlich.

#### 3.2.2 THG-1a und ART-27

Da es sich bei THG-1a mit großer Wahrscheinlichkeit so wie bei THG-1 um einen Transkriptionsfaktor mit repressorischen Eigenschaften handelt (Kester *et al.*, 1999), würde eine physiologische Interaktion von THG-1a mit SorLAcp einen interessanten Hinweis auf den Ablauf einer durch SorLA vermittelten Signalkaskade liefern. Die Tatsache, dass auch die Isoform THG-1 an SorLAcp bindet, nicht aber das entfernter homologe Protein TSC-22, lässt Spekulationen über die möglicherweise für eine Proteinbindung verantwortliche Domäne innerhalb der beiden THG-1-Isoformen zu. Da die durch die unterschiedlichen Exons codierten N-Termini keine identischen Strukturelemente aufweisen, ist eine über diesen Bereich der Proteine vermittelte Interaktion mit SorLAcp unwahrscheinlich. Andererseits sind die TSC- und die Leucinzipper-Domäne der beiden Isoformen sehr homolog zu den entsprechenden Domänen von TSC-22 (Abb. 29). Eine Bindung von SorLAcp an eine dieser Domänen kann ebenfalls in Frage gestellt werden, da in diesem Fall auch eine Interaktion mit TSC-22 nachzuweisen wäre. Wenig Homologie zwischen TSC-22 und den beiden THG-1-Isoformen besteht dagegen innerhalb der C-terminalen 19 Aminosäurereste. Es kann daher angenommen werden, dass die Wechselwirkung mit SorLAcp innerhalb dieses Bereiches stattfindet.



**Abb. 29: Homologie der C-terminalen Aminosäuresequenz von TSC-22 und THG-1/THG-1a**

Die identischen Aminosäuren der Proteine sind grau hinterlegt, die TSC-Domänen schwarz umrandet und die Leucinreste der Leucinzipper-Domänen durch Pfeile gekennzeichnet.

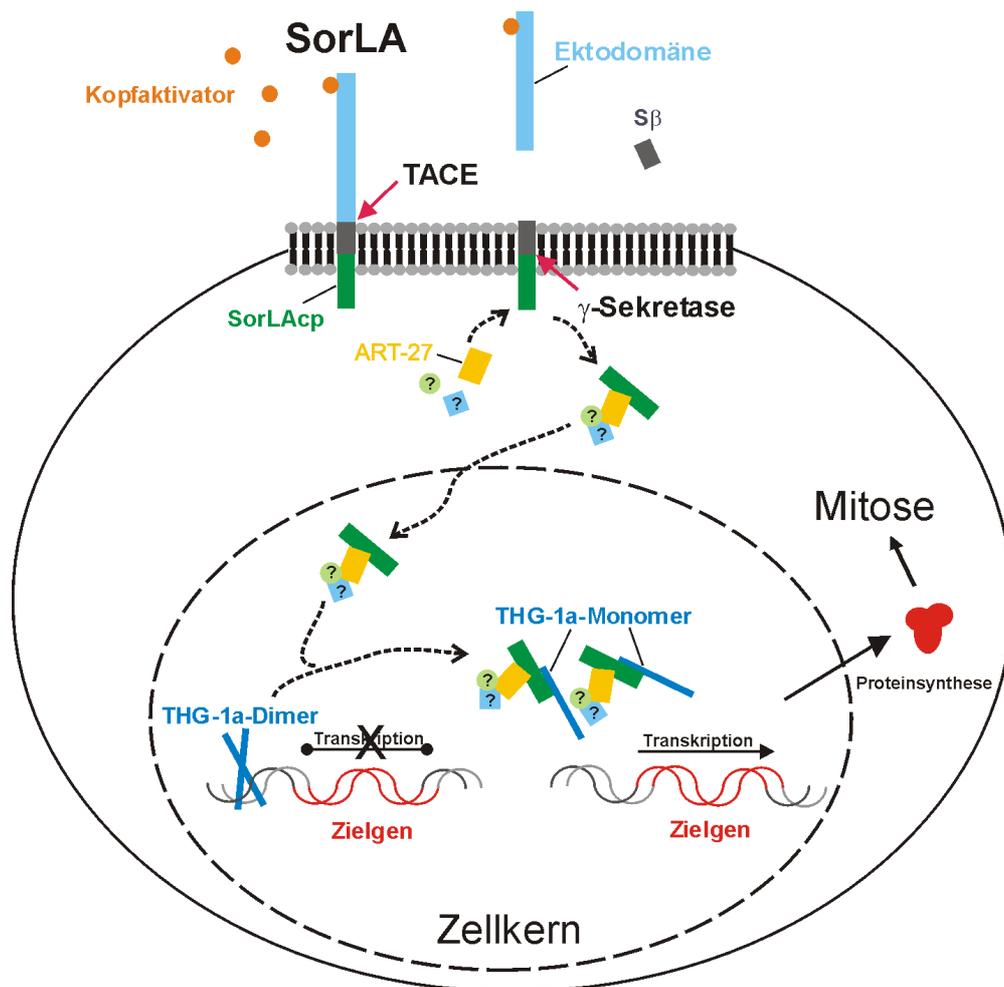
Bei einer Betrachtung des Expressionsmusters von THG-1a (Abb. 17) fällt eine besonders starke Expression der THG-1a-mRNA im Corpus callosum auf. Das Corpus callosum stellt die neuronale Verbindung der rechten mit der linken cerebralen Hemisphäre dar und besteht aus dicken Bündeln myelinisierter und unmyelinisierter Axone. Da eine Expression von mRNAs in der Regel nicht in Axonen stattfindet, wird die THG-1a-mRNA im Corpus callosum vermutlich ausschließlich in den Oligodendrozyten gebildet, die die Axone umgeben. Auch die zu vernachlässigende Expression der THG-1a-mRNA in fötalem Gehirngewebe (20.-30. Schwangerschaftswoche) spricht für eine vorrangig gliale Expression. Die Neurogenese des Fötus ist in der 18. Schwangerschaftswoche bereits großteils abgeschlossen, die Gliazellen beginnen mit einer Ausdifferenzierung dagegen erst ab der 24. Woche (Chan *et al.*, 2002). In dem untersuchten Gewebe sind somit hauptsächlich Neurone, weniger Gliazellen enthalten. Diese Ergebnisse weisen stark auf eine oligodendrogliale Expression von THG-1a hin. Das zusätzliche Vorkommen in Mikrogliazellen und Astrocyten kann anhand des Ergebnisses des MTE<sup>TM</sup>-Arrays jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die starke Expression der THG-1a-mRNA im Cortex, der einen hohen Anteil an Neuronen aufweist, scheint der diskutierten glialen Expression allerdings zu widersprechen. Einen genaueren Aufschluss über das exakte neuronale und gliale Expressionsmuster von THG-1a könnten zukünftige *in situ* Hybridisierungen an Gehirnschnitten geben. Die Voraussetzung für eine physiologische Interaktion von SorLAcp und THG-1a ist ihr gemeinsames Vorkommen in den gleichen Zelltypen. Eine Expression der SorLA-mRNA wurde von Hermans-Borgmeyer *et al.* (1998) in neuronalen nicht aber in glialen Geweben nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wiesen Offe *et al.* SorLA durch Immunfärbung sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen der Hirnrinde nach (persönliche Mitteilung). Da der heutige Stand der Forschung noch keine eindeutigen Aussagen zum glial-neuronalen Expressionsmuster sowohl von THG-1a als auch von SorLA zulässt, ist ein Vorkommen beider Proteine in den selben Zelltypen des Nervensystems durchaus möglich und eine physiologische Interaktion somit denkbar.

Die Immunfluoreszenzuntersuchung von THG-1a überexprimierenden COS-Zellen zeigt neben einer cytoplasmatischen Verteilung eine starke Präsenz des Proteins im Zellkern. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass es sich bei THG-1a so wie auch bei seiner Isoform THG-1 um ein transkriptionsregulierendes Protein mit seiner Hauptfunktion im Zellkern handelt. In der Western-Blot-Analyse wurde gezeigt, dass es sich bei THG-1a um ein lösliches Protein handelt. Der Nachweis des Proteins in der Membranfraktion transfizierter COS-Zellen deutet zudem auf eine mögliche Membranassoziation des Proteins hin. Die Frage, ob es sich hierbei um ein physiologisches Phänomen handelt oder ob der Nachweis von THG-1a in der Membranfraktion von transfizierten COS-Zellen durch Proteinaggregate verursacht wird, die zusammen mit den Membranen sedimentiert wurden, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Die genaue subzelluläre Lokalisierung von THG-1a wird sich durch zukünftige Koimmunfärbungen von THG-1a und Markerproteinen für bestimmte Zellstrukturen und -kompartimente aufklären lassen. Obwohl SorLA in der Immunfärbung von transfizierten CHO-Zellen eine Lokalisierung im späten Golgi-Kompartiment aufweist (Jacobsen *et al.*, 2001) und keine Kolo-kalisierung mit THG-1a in transfizierten COS-Zellen gezeigt werden konnte, kann eine Beteiligung von THG-1a an SorLAs Signalkaskade nicht ausgeschlossen werden. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass SorLA durch die  $\gamma$ -Sekretase analog zu APP (Li, 2001) aber auch zu Rezeptoren wie Notch (De Strooper *et al.*, 1999) und LRP (May *et al.*, 2002) prozessiert wird und der Carboxyterminus anschließend in den Zellkern migriert (siehe 1.2). An der Translokation und nachfolgender Genregulation sind vermutlich eine Vielzahl weiterer Proteine beteiligt. Es ist denkbar, dass die  $\gamma$ -Sekretase SorLA prozessiert, SorLAc<sub>p</sub> anschließend in den Zellkern transloziert und durch Bindung an THG-1a die für eine DNA-Bindung notwendige Dimerisierung dieses Proteins inhibiert (Abb. 30). Damit würde die durch das THG-1a-Dimer vermittelte Repression aufgehoben und die Transkription von Zielgenen eingeleitet werden. Der geringe, bei einer derartigen Transkriptionskontrolle kolo-kalisierende, Anteil von THG-1a und SorLAc<sub>p</sub> wäre in einer normalen Koimmunfärbung nicht zu erkennen. Die fehlende offensichtliche Kolo-kalisierung der beiden Proteine ließe sich hiermit erklären.

Die Forschungsergebnisse von Liu und McKeehan (2002) und von Markus *et al.* (2002) sprechen dafür, dass es sich bei ART-27 um ein mobiles Brückenprotein handelt, das mit Transkriptionskomplexen oder aktinbasierten Strukturen in Verbindung steht. Markus *et al.* (2002) zeigten außerdem, dass ART-27 als Bestandteil eines größeren Proteinkomplexes vorliegt. Analog zu diesen Ergebnissen kann man annehmen, dass ART-27 auch in SorLAs Signalkaskade als einer von mehreren Bestandteilen eines Multiproteinkomplexes beteiligt ist. Die in dieser Arbeit gezeigte Lokalisierung des überexprimierten Proteins entweder im Zellkern oder an Vesikelmembranen von COS-Zellen könnte auf seine Beweglichkeit inner-

halb der Zelle hindeuten. Die Koimmunfärbung von HA-ART-27 und SorLA in transfizierten COS-Zellen (Abb. 20) lässt vermuten, dass ART-27 ähnlich wie SorLA an endosomal Strukturen lokalisiert sein kann. Es kann spekuliert werden, dass ART-27 zusammen mit SorLA-enthaltenen Vesikeln an die Zellmembran gelangt, um anschließend dort für eine SorLA-Signalkaskade zur Verfügung zu stehen.

Die mögliche Funktion von ART-27 und THG-1a innerhalb einer möglichen ligandeninduzierten Signalkaskade von SorLA wird anhand des Modells in Abbildung 30 veranschaulicht: Die Bindung des Neuropeptids Kopfaktivator an SorLA führt zu einer Abspaltung der Ekto-domäne durch die Metalloprotease TACE. Anschließend findet eine Prozessierung innerhalb der Zellmembran durch die  $\gamma$ -Sekretase statt. Das S $\beta$ -Peptid wird in den Interzellularraum entlassen und dort entweder proteolytisch abgebaut oder von dieser bzw. einer benachbarten Zelle internalisiert. In das Cytoplasma freigesetztes SorLAcp interagiert daraufhin mit ART-27 und migriert als Multiproteinkomplex mit weiteren Proteinen entlang des Aktin-Cytoskeletts in den Zellkern. Durch die Bindung von SorLAcp an THG-1a im Zellkern wird die für eine Transkriptionsrepression notwendige Dimerisierung von THG-1a aufgehoben und die Transkription des nachgeschalteten Gens eingeleitet. ART-27 würde somit eine Rolle als Koaktivator für die durch SorLAcp vermittelte Transkriptionsaktivierung spielen. Eine derartige Funktion von ART-27 wurde bereits von Markus *et al.* (2002) für die Signaltransduktion des Androgenrezeptors gezeigt. Entsprechende Versuche in Bezug auf SorLAs Signaltransduktion könnten zur Aufklärung der molekularen Mechanismen einer ligandeninduzierten Signalkaskade dieses Rezeptors beitragen.



**Abb. 30: Modell einer ligandeninduzierten Signalkaskade von SorLA**

Die Bindung des Liganden Kopffaktor führt zu einer Abspaltung der Ektodomäne von SorLA durch die Metalloprotease TACE und nachfolgender Prozessierung durch die  $\gamma$ -Secretase. Das S $\beta$ -Peptid wird in den Interzellularraum freigesetzt, wo proteolytisch abgebaut oder internalisiert wird. Freigesetztes SorLAcP interagiert mit ART-27 und migriert in einem Multiproteinkomplex zusammen mit weiteren Proteinen in den Zellkern. Dort wird durch die Interaktion von SorLAcP mit THG-1a die durch das THG-1a-Dimer vermittelte Transkriptionsrepression aufgehoben und die Transkription eines Zielgens eingeleitet.

## 4 Zusammenfassung

SorLA ist ein Typ-I-Transmembranrezeptor, der zu der Familie der Lipoproteinrezeptoren gehört. Er ist hoch konserviert und zeichnet sich durch ein vorwiegend neuronales Expressionsmuster aus. Man kennt mehrere Liganden von SorLA, wie z. B. das Neuropeptid Kopfaktivator, RAP (*low-density lipoprotein receptor-associated protein*) aber auch Apolipoprotein E enthaltende Lipoproteine. Kopfaktivator ist an Signalkaskaden beteiligt, die zu einer Stimulierung der Mitose und Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen führen. Zudem führt die Bindung des Neuropeptids an SorLA zu einer Abspaltung der Ektodomäne des Rezeptors durch die Metalloprotease TACE. In unserer Gruppe wurde eine durch die  $\gamma$ -Sekretase vermittelte Abspaltung der cytoplasmatischen Domäne von SorLA (SorLAcp) und eine anschließende Translokation dieser Domäne in den Zellkern gezeigt. Eine vergleichbare Prozessierung durch die  $\gamma$ -Sekretase wurde zuvor bereits für die Rezeptoren Notch und LRP (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) sowie für APP (*amyloid precursor protein*) beschrieben. Die freie cytoplasmatische Domäne von Notch transloziert in den Zellkern und ist dort transkriptionell aktiv. Die Analogien der Prozessierungsmuster führte zu der Annahme, dass SorLAcp eine wichtige Rolle in dem Signaltransduktionsweg von SorLA spielt, vergleichbar der Funktion der cytoplasmatischen Domäne von Notch.

Ziel dieser Arbeit war es, Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren, die mit SorLAcp interagieren. So sollte ein erster Einblick in den möglichen Ablauf einer ligandeninduzierten Signalkaskade des Rezeptors gewonnen werden.

In einem Hefe-Zwei-Hybrid-Assay wurden mehrere Bindungspartner von SorLAcp identifiziert. Ein Protein, das an SorLAcp bindet, ist PLD3, ein potentielles Mitglied der Phospholipase-D-Familie. Gegen dieses Protein wurde ein polyklonales Antiserum hergestellt und charakterisiert. Durch Western-Blot-Analyse wurde die Membranständigkeit dieses Proteins belegt. Untersuchungen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zeigten eine Lokalisierung überexprimierter PLD3 im vorwiegend im Endoplasmatischen Retikulum von COS-Zellen. Aufgrund der fehlenden Kolkalisierung mit SorLA und weiterer Ergebnisse dieser Arbeit, muss eine physiologische Interaktion beider Proteine jedoch angezweifelt werden.

Zwei weitere Interaktionspartner von SorLAcp, ART-27 und THG-1a, sind Transkriptionsfaktoren und könnten zusammen mit SorLAcp die Transkription von Zielgenen regulieren. THG-1a ist eine gehirnspezifische Spleißvariante des Proteins THG-1 und gehört in die Familie der Leucinzipper-Proteine mit TSC-Domäne. Wie auch seine Isoform THG-1 übt es vermutlich als Dimer eine transkriptionsrepressorische Funktion aus. Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten eine Lokalisierung des Proteins im Cytoplasma und Zellkern. Eine Kolkalisierung

von überexprimiertem THG-1a und SorLA konnte nicht nachgewiesen werden, eine physiologische Interaktion der beiden Proteine kann damit aber nicht ausgeschlossen werden.

ART-27 ist ein Transkriptionsfaktor, dem eine Art Brückenfunktion zu Transkriptionskomplexen zugeschrieben wird. Wie für THG-1a wurde auch für ART-27 eine nukleäre und cytoplasmatische Lokalisierung in transfizierten COS-Zellen gezeigt. Exprimierten COS-Zellen gleichzeitig SorLA und ART-27, kolokalisieren beide Proteine z. T. an endosomalen Strukturen der Zellen.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und der dazu angestellten Überlegungen, schlage ich folgendes Modell einer Signalkaskade von SorLA vor:

Die Bindung des Neuropeptids Kopffaktivator führt zu einer ligandeninduzierten Prozessierung von SorLA durch die Metalloprotease TACE und die  $\gamma$ -Secretase. Dadurch wird SorLAcp ins Cytoplasma freigesetzt, interagiert dort mit ART-27 und migriert als Multiproteinkomplex zusammen mit weiteren Proteinen in den Zellkern. Dort wird durch die Bindung von SorLAcp an THG-1a die für eine Transkriptionsrepression notwendige Dimerisierung von THG-1a aufgehoben und die Transkription des nachgeschalteten Gens eingeleitet.

## 5 Summary

SorLA is a type I transmembrane receptor belonging to the family of lipoprotein receptors. It is highly conserved and shows a predominant expression in neuronal tissues. SorLA binds several ligands such as the neuropeptide head activator, the low-density lipoprotein receptor associated protein RAP and also apolipoprotein E containing lipoproteins. Head activator has been shown to be involved in a signaling process stimulating mitosis and proliferation of neuronal precursor cells. Additionally, binding of the neuropeptide to SorLA induces shedding of SorLA's ectodomain by the metalloprotease TACE. Results obtained in our group demonstrate a  $\gamma$ -secretase mediated release of SorLA's cytoplasmic domain (SorLAcp) and its subsequent migration into the nucleus. A cleavage by the  $\gamma$ -secretase had previously been reported for the receptors Notch and LRP (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) as well as for APP (*amyloid precursor protein*). The released cytoplasmic domain of Notch translocates to the nucleus where it reveals transcriptional activity. The similarities between the processing patterns led to the assumption that SorLAcp might play an important role in the signal transduction pathway of SorLA comparable to the function of the cytoplasmic domain of Notch.

Goal of this work was the identification and characterization of proteins that interact with SorLAcp and thus gain a first insight into the ligand-induced signaling cascade of the receptor. Several putative interaction partners of SorLAcp were identified in a yeast two-hybrid screen. One of them, PLD3, is a putative member of the phospholipase D3 family. A polyclonal antiserum against this protein was produced and characterized. Western-blot analysis demonstrated that PLD3 is a membrane-associated protein. Confocal microscopy studies revealed a predominant localization of overexpressed PLD3 in the ER of COS cells. Due to the lack of colocalization of PLD3 and SorLA and other results obtained in this work a physiological interaction of these two proteins does not seem to be likely.

Two other interaction partners of SorLAcp, ART-27 and THG-1a, are involved in gene-regulating processes and thus might mediate transcriptional regulation together with the released SorLAcp. THG-1a represents a brain-specific splice variant of the TSC-22 homologue THG-1 which belongs to the family of TSC-box containing leucine-zipper proteins. Like its isoform THG-1 it presumably dimerizes and acts as a transcriptional repressor.

Immunofluorescence studies revealed a localization of the protein in the cytoplasm and nucleus. Although a colocalization of overexpressed THG-1a and SorLA could not be shown, a physiological interaction of these two proteins cannot be excluded.

ART-27 is a transcription factor that might act as an adaptor protein to transcription complexes. Like THG-1a, ART-27 is located in the cytoplasm and nucleus of transfected COS cells. A coexpression of SorLA and ART-27 revealed a partial colocalization at endosomal structures.

I propose the following model of SorLA's signal transduction pathway:

Binding of the neuropeptide head activator leads to a ligand-induced processing of SorLA by the metalloprotease TACE and the  $\gamma$ -secretase. The released SorLAcp interacts with ART-27 and migrates together with further proteins into the nucleus. Binding of SorLAcp to THG-1a prevents formation of the gene-repressing THG-1a dimer and thereby, transcription of a target gene is induced.

## 6 Material und Methoden

Sofern nicht anders erwähnt, wurde für die Herstellung aller Puffer und Lösungen demineralisiertes Wasser verwendet.

### 6.1 DNA

#### 6.1.1 Vektoren

In der Arbeit wurden die in der Tabelle zusammengestellten Vektoren verwendet.

Vektor	Firma	Verwendung
pGBKT7	Clontech	Expression eines Köderproteins im Hefe-Zwei-Hybrid-System
pACT2	Clontech	Expression eines Beuteproteins im Hefe-Zwei-Hybrid-System
pcDNA3.1 <sup>TM</sup> /myc-His A	Invitrogen	eukaryotische Expression von Proteinen mit C-terminalem <i>myc</i> -Peptid
pcDNA3.1hygro	Invitrogen	eukaryotische Expression von Proteinen
pBluescript SK II (+)	Stratagene	<i>in vitro</i> Translationen unter Ausnutzung des T3- und T7-Promotors
pGEX-KG	Pharmacia	bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen
pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Promega	direkte Ligation von PCR-Produkten

#### 6.1.2 Bakterienstämme und Transformation

Für chemische Transformationen nach Anleitung der Firma wurden *E. coli* XL1 blue (Stratagene) oder DH5 $\alpha$  (Invitrogen), für Transformationen mittels Elektroporation *E. coli* XL1-blue MRF' (Stratagene) verwendet.

### 6.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Aus 3 ml Übernachtskulturen wurde die Plasmid-DNA mit dem Plasmid Miniprep Kit der Firma Sequence Laboratories (Göttingen) und aus 200 ml Kulturen mit dem Nukleobond® AX-Kit der Firma Macherey-Nagel nach Anleitung des Herstellers isoliert.

### 6.1.4 Restriktion, Ligation, Auffüllen von 5'-überhängenden Enden

Die Restriktion von Plasmid-DNA wurde nach allgemein üblichen Standardvorschriften durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Restriktionsendonukleasen wurden in den von den Herstellern (NEB, MBI Fermentas, Boehringer Mannheim) mitgelieferten Puffern eingesetzt. Die Ligation von Vektor-DNA mit einem DNA-Fragment wurde mit LigaFast Rapid DNA Ligation System® (Promega) nach Vorschrift der Firma durchgeführt. Das Auffüllen von 5'-überhängenden Enden erfolgte mit dem Klenow-Enzym (NEB) ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

### 6.1.5 Agarosegelelektrophorese und Reinigung von DNA aus Gelen

Die DNA wurde in ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen von geeigneter Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TBE (90 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA, pH 8,0) benutzt. Die Analyse der DNA-Banden im Gel sowie das Ausschneiden der Banden wurden unter UV-Licht (bei 360 nm) durchgeführt. Ausgeschnittene DNA-Fragmente wurden mit dem NucleoSpin®-Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt und eluiert.

### 6.1.6 Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen durch PCR

Die Reaktionen wurden mit der Platinum®Taq DNA-Polymerase (Life Technologies) nach Angabe der Firma ausgeführt. Die benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

## 6.2 Proteinanalytik

### 6.2.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Alle Proteinproben wurden durch Erhitzen auf 95 °C in Probenpuffer denaturiert und entweder in 12,5%igen Polyacrylamidgelen nach Neville (Neville, 1971; Pipettierschema siehe unten) oder in 4-12%igen Bis-Tris-Gradientengelen (NuPAGE®-Gelsystem, Invitrogen) bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt (Mini Protean® 3, Biorad). Für die spätere Abschätzung der Proteingrößen wurde ein Protein-Molekulargewichtstandard (MultiMark®, Invitrogen oder RPN800, Amersham) mit aufgetrennt.

#### *Probenpuffer, 4X:*

3% SDS (w/v); 80 mM Tris, pH 6,8; 16% Glycerol (v/v); 3,75% Mercaptoethanol (v/v); 0,2% Bromphenolblau (w/v)

#### *Obergelpuffer (Neville-Gelsystem):*

0,2M Tris, pH 6,14 mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingestellt

#### *Untergelpuffer (Neville-Gelsystem):*

1,7M Tris, pH 9,18 mit HCl eigestellt.

#### **Pipettierschema für Acrylamidgele:**

<b>Sammelgel, 3%</b>	
40% N,N'-Methylenbis-acrylamid (BioRad)	385 µl
Obergelpuffer	1,25 ml
A. dem.	3,4 ml
10 % Ammoniumpersulfat	25 µl
TEMED	5 µl

<b>Trenngel, 12,5%</b>	
40% N,N'-Methylenbis-acrylamid (BioRad)	2,5 ml
Untergelpuffer	2 ml
A. dem.	3,5 ml
10 % Ammoniumpersulfat	40 µl
TEMED	10 µl

### 6.2.2 Western-Blot-Analyse

Zur Analyse im Western-Blot wurden die Proteine vom Acrylamidgel in einer Nassblotkammer (Mini Protean<sup>®</sup> 3, Biorad) auf eine PVDF-Membran (Millipore) bei einer Stromstärke von 400 mA übertragen. Die Membranen wurden mit einer Blockierlösung aus 10% Magermilchpulver und 5% BSA in Waschpuffer A (154 mM NaCl; 20 mM Tris; 0,5% Tween 20) eine Stunde lang abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in geeigneter Verdünnung in Blockierlösung. Die Membranen wurden dann mit Waschpuffer A, dann zweimal mit Waschpuffer B (20 mM Tris; 154 mM NaCl; 3 mM Natriumdodecylsulfat; 6 mM Natriumdesoxycholat) und nochmals mit Waschpuffer A für jeweils mindestens 20 min gewaschen. Als sekundäre Antikörper wurden mit Alkaliner Phosphatase oder Peroxidase gekoppelte Antikörper verwendet. Die zweistündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte mit der vom Hersteller angegebenen Verdünnung in Blockierlösung. Die mit Alkaliner Phosphatase gekoppelten Antikörper wurden nach dem Waschen der Membran (wie oben beschrieben) in AP-Puffer (100 mM Tris, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) mit Hilfe eines Chemilumineszenzreagenzes (Lumi-Phos<sup>®</sup> WB, Pierce) und nachfolgender Exposition auf einem BioMAX MR Film (Kodak) oder durch Färbung mit einer Lösung aus 10 ml AP-Puffer, 60 µl NBT-Stammlösung (50 mg/ml Nitroblautetrazolium in 70% Dimethylformamid) und 30 µl BCIP-Stammlösung (50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat in Dimethylformamid) nachgewiesen. Bei Verwendung von Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte die Detektion des zu untersuchenden Proteins ebenfalls durch eine Chemilumineszenzreaktion (Super Signal<sup>®</sup> West Dura, Pierce).

#### verwendete Antikörper:

Primärantikörper	Verdünnung	Firma
anti-PLD3 (polyklonal, Kaninchen)	1:2000	Eurogentec (Auftragsproduktion)
anti- <i>myc</i> (monoklonal, Maus)	1:500	Sigma

Sekundärantikörper	Verdünnung	Firma
anti-Kaninchen IgG, AP-konjugiert	1:7500	Sigma
anti-Kaninchen IgG, PO-konjugiert	1:20000	Dianova
anti-Maus IgG, PO-konjugiert	1:20000	Dianova

### 6.2.3 Absättigung des PLD3-Antiserums mit immunogenem Peptid

Pro  $\mu\text{l}$  PLD3-Antiserum wurden ca. 4  $\mu\text{g}$  des immunogenen Peptids  $\text{H}_2\text{N-LDTSADSVGNA CRLL-COOH}$  in 1 ml PBS gelöst und zusammen mit dem Antiserum eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Der anschließende Western-Blot wurde, wie unter 6.2.2 beschrieben, durchgeführt

### 6.2.4 Proteinfärbungen

Zur Anfärbung von Proteinen in Acrylamidgelen wurden die Gele in einer Lösung mit Coomassie-Brillantblau (0,1% Coomassie-Brillantblau R250, 45% Ethanol, 10% Eisessig) einige Stunden geschüttelt und anschließend bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden in einer Lösung aus 45% Ethanol und 10% Eisessig entfärbt.

Zur Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen wurde Ponceau-Färbelösung (0,2% Ponceau-Rot in 3% Trichloressigsäure) verwendet. Die Membranen wurden 15 min in der Färbelösung geschwenkt und dann bis zum Auftreten der Proteinbanden mit demineralisiertem Wasser entfärbt.

## 6.3 Hefe-Zwei-Hybrid-System

### 6.3.1 Klonierung des Köderkonstruktes

Die 171 Basenpaare umfassende DNA-Sequenz, die für den cytoplasmatischen Carboxyterminus von SorLA codiert, wurde durch eine PCR unter Verwendung der Primeroligonukleotide SorLAhumICfor und SorLAhumICrev (siehe 8.3) amplifiziert. Als Vorlage diente der Vektor pSorLAok (siehe 6.6.2). Nach Aufreinigung des Fragmentes über ein Agarose-Gel wurde es in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor (Promega) gemäß der Vorschrift der Firma ligiert. Die Klonierung in den Vektor pGBKT7 (Clontech), der für die GAL4-DNA-Bindedomäne codiert, erfolgte über die *EcoRI*- und *NdeI*-Schnittstellen. Nachfolgende Sequenzierung bestätigte die Fehlerfreiheit des Konstruktes.

### **6.3.2 Transformation des Hefestamms AH 109**

Die Transformation der Hefen mit den jeweiligen Köder- oder Beutekonstrukten erfolgte entweder nach der Anleitung im Handbuch zum *MATCHMAKER*<sup>®</sup> 3 System oder wie nachfolgend beschrieben. Für die Herstellung der Kulturmedien wurden Nährstoffzusammensetzungen der Firma Clontech und Bio 101 verwendet.

#### **Transformation einzelner Plasmide in Hefe:**

5 ml einer bei 30°C geschüttelten Übernachtskultur der Hefen wurden mit 45 ml YPD- bzw. geeignetem Selektionsmedium (30°C) so verdünnt, dass die OD<sub>600</sub> zwischen 0,2 und 0,3 lag. Dieser Ansatz wurde in einem 500 ml Erlenmeyerkolben 4-6 h bei 250 U/min bei 30°C inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,6 lag (Phase des exponentiellen Wachstums). Die Hefezellen wurden 5 min lang bei 1000 x g abzentrifugiert, in 20 ml deionisiertem Wasser resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Hefezellen wurden in 1 ml steriler 0,1 M Lithiumacetat-Lösung aufgenommen und bei 190 U/min bei 30°C für 10 min inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Sediment so in 0,1 M Lithiumacetat-Lösung resuspendiert, dass ein Endvolumen von 500 µl erhalten wurde. Pro Transformationsansatz wurden 50 µl dieser Hefesuspension abgenommen, kurz zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dann wurden nacheinander 240 µl einer 50%igen sterilen PEG 400-Lösung, 36 µl 1 M Lithiumacetat-Lösung, 5 µl DNA aus Heringssperma (2 mg/ml; zuvor 10 min bei 95°C gekocht und 20 min auf Eis inkubiert) und ca. 2 µg Plasmid-DNA (in 50 µl autoklaviertem Wasser verdünnt) auf das Sediment pipettiert. Der Transformationsansatz wurde kurz mit einer Pipette resuspendiert, 30 min bei 190 U/min und 30°C inkubiert und anschließend 20 min lang bei 42°C im Wasserbad unter gelegentlichem Umschwenken einem Hitzeschock unterzogen. Die Hefen wurden danach bei 1000 x g abzentrifugiert, in 1 ml autoklaviertem deionisiertem Wasser aufgenommen, 100 µl davon auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausgestrichen, und diese dann drei bis vier Tage bei 30°C inkubiert.

#### **Transformation von Hefen mit einer cDNA-Bank:**

100 ml DOB/Trp<sup>-</sup>-Medium wurden mit frischen Kolonien des Hefestamms AH109, die zuvor nach o. g. Methode mit pGBKT7SorLacp prätransformiert worden waren, angeimpft, 16 Stunden bei 30°C und 250 U/min inkubiert und anschließend in 250 ml YPD-Medium überführt. Der Ansatz wurde ca. 5 Stunden unter o. g. Bedingungen geschüttelt bis die OD<sub>600</sub> zwischen 0,4-0,6 lag. Die Hefezellen wurden dann bei 1000 x g abzentrifugiert, das Sediment in 20 ml Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert.

Auf das Hefesediment wurden der Reihe nach folgende Lösungen gegeben:

4,8 ml PEG 400

720 µl 1 M autoklavierte Lithiumacetat-Lösung

500 µl Heringssperma-DNA (2 mg/ml), vorbereitet wie oben beschrieben

77 µl cDNA-Bank aus menschlichem Gehirn im pACT2-Vektor (0,65 µg/µl; *oligo-dT-primed*, Clontech, reamplifiziert)

973 µl autoklaviertes, deionisiertes Wasser

Der Ansatz wurde mit einer Pipette vorsichtig resuspendiert, 30 min lang bei 190 U/min und 30°C inkubiert und danach einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad unterzogen. Anschließend wurden die Hefezellen kurz bei 16000 x g sedimentiert und in 2250 µl autoklaviertem, deionisiertem Wasser resuspendiert. Je 150 µl dieser Suspension wurden auf insgesamt 15 Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/X-α-Gal-Agarplatten (Durchmesser: 14 cm) ausgestrichen. Die Platten wurden 6 Tage bei 30°C inkubiert. Blaue Kolonien wurden anschließend erneut auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>-Selektionsnährböden ausgestrichen und nach 4 Tagen Inkubation bei 30°C als Glycerol-Stock (nach Anleitung von Clontech) für spätere Analysen bei -80°C eingefroren.

### **6.3.3 Bestimmung der Transformationsrate**

Von dem Transformationsansatz wurde 1 µl der Hefesuspension mit autoklaviertem, deionisiertem Wasser auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>-Agarplatten ausplattiert und drei Tage bei 30°C inkubiert. Die Transformationsrate errechnete sich aus der Gesamtmenge des Transformationsansatzes, der eingesetzten DNA-Menge und der Anzahl gewachsener Kolonien. Bei einer Anzahl von 180 Kolonien ergab sich so eine Transformationsrate von etwa 25000 Kolonien/µg cDNA-Bank.

### **6.3.4 Analyse der positiven Klone**

Die Analyse der positiven Hefeklone erfolgte durch eine nach Herstellerangaben durchgeführte PCR-Reaktion mit dem *Whole Cell Yeast PCR Kit* (BIO 101), nachfolgender Gelanalyse, Sequenzierung und Datenbankrecherche (NCBI Datenbank). Als Primer für die PCR-Reaktion und Sequenzierung wurden die Oligonukleotide 3'ADY2H und 5'ADY2H (siehe 8.2) verwendet.

### 6.3.5 Plasmidisolierung

Die Plasmide der cDNA-Bank, die die Bindungspartner codieren, wurden mit dem YEAST-MAKER™ *Yeast Plasmid Isolation Kit* (Clontech) isoliert und entweder chemisch oder durch Elektroporation in *E. coli* transformiert.

### 6.3.6 Retransformation

Die aus den positiven Hefeklonen isolierten cDNA-Fragmente im pACT2-Vektor wurden in GAL4-SorLAcp exprimierende Hefen nach der unter 6.3.2 beschriebenen Methode retransformiert.

### 6.3.7 SorLAcp-Deletionskonstrukte

Köderkonstrukte im pBD-GAL4-Vektor (Stratagene), die für deletierte GAL4-SorLAcp Proteine codieren, wurden von Linda Jacobsen (Amsterdam) zur Verfügung gestellt. Sie wurden über die *EcoRI*- und *NdeI*-Schnittstellen in den Vektor pGBKT7 kloniert.

### 6.3.8 Bioinformatische Analyse von Gen- und Proteinsequenzen

DNA- und Proteinsequenzen wurden mit der Software DNASTar 4.0 analysiert und bearbeitet. Die Datenbankrecherchen wurden mit dem *BLAST*-Programm (*BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*) am *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) durchgeführt. Die ansequenzierten cDNAs aus der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse wurden dort mit der *non-redundant* (nr) Datenbank verglichen, die Suche nach humanen EST-Sequenzen erfolgte sowohl am „National Center for Biotechnology Information“ als auch mit dem *BLAST*-Programm des *Institute for Genomic Research* (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>). Zum Vergleich zweier DNA-Sequenzen wurde auf das Programm „Blast 2 Sequences“ am *National Center for Biotechnology Information* zurückgegriffen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>). Die im Internet zugänglichen Programme PSORT II (Nakai und Horton, 1999; <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>) und SignalP (Nielsen *et al.*, 1997; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) wurden für die Suche nach möglichen Signalsequenzen herangezogen.

## 6.4 GST-Bindungsassay

### 6.4.1 Klonierung des Expressionskonstruktes pGEX-KG-SorLAcp

Für die Herstellung des Expressionskonstruktes für das Fusionsprotein aus GST und SorLAcp wurde der pGEX-KG-Vektor (Stratagene) verwendet. Der Vektor pGBKT7-SorLAcp wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym *NdeI* verdaut, die überhängenden Enden aufgefüllt und anschließend mit *EcoRI* geschnitten. Das SorLAcp-Fragment wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und in den mit *SmaI* und *EcoRI* geschnittenen pGEX-KG-Vektor ligiert. Das resultierende Konstrukt pGEX-KG-SorLAcp wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert.

### 6.4.2 Expression und Aufreinigung von GST und GST-SorLAcp in *E. coli*

Chemisch kompetente DH5 $\alpha$  wurden mit den Plasmiden pGEX-KG bzw. pGEX-KG-SorLAcp transformiert. Je 200 ml ampicillinhaltiges Medium wurden mit einer 5 ml Übernachtskultur der transformierten *E. coli* angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 bei 37°C und 230 U/min geschüttelt. Die Induktion der Bakteriensuspensionen erfolgte nach Abkühlung auf Raumtemperatur (RT) für 3-4 h mit 0,5 mM IPTG (230 U/min). Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert, das Pellet mit kaltem PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) gewaschen und erneut bei 4°C zentrifugiert. Kalter STE-Puffer (10 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH 8) wurde mit Lysozym (100-500  $\mu$ g/ml) und Proteaseinhibitoren (Complete<sup>®</sup> Mini, Roche) versetzt, das Pellet in 12 ml resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte nach Zugabe von DTT (5 mM) und Sarkosyl (1,5%) mit einer Ultraschallspitze (3 x 1 min bei maximaler Stärke). Der Überstand der folgenden Zentrifugation (5 min bei 10000 x g) wurde mit Triton X-100 (2%) versetzt und mit 1 ml equilibrierter Glutathion-Sepharose 20 min auf einem Rollschüttler bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend 6-8 mal mit kaltem PBS gewaschen. Die Abschätzung der Proteinmenge erfolgte mittels Coomassie-Färbung eines 12,5%igen Acrylamidgels. Gegebenenfalls wurden die Proteinkonzentrationen von GST- und GST-SorLAcp-Sepharose mit PBS aneinander angeglichen.

### 6.4.3 Verwendete EST-Klone

Die EST-Sequenzen mit dem vollständigen offenen Leseraster für PLD3, THG-1 und TSC-22 wurden vom I.M.A.G.E.-Konsortium (Lennon *et al.*, 1996) zur Verfügung gestellt.

codiertes Protein	IMAGE-Nr.	GenBank-Eintrag	Vektor
PLD3	159455	H15746	pT7T3D
THG-1	6042914	BQ229311	pCMV-SPORT6
TSC-22	3911094	BE886331	pCMV-SPORT6

### 6.4.4 Klonierung der Interaktionspartner

Die vollständige cDNA der PLD3 wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* aus dem pT7T3D-Vektor geschnitten und in die *EcoRI/HindIII*-Schnittstellen des Vektors pBlue-script II SK(+) kloniert.

Die cDNAs von THG-1a und ART-27 wurden mit *BglII* aus dem Hefevektor pACT2 geschnitten und ungerichtet in die kompatible *BamHI* Schnittstelle des Vektors pBluescript II SK(+) eingefügt. Die durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifizierten Konstrukte enthielten die cDNAs unter der Kontrolle des T3-Promotors. Die unter der Kontrolle des SP6-Promotors stehenden Sequenzen von THG-1 und TSC-22 im pCMV-SPORT6 Vektor konnten direkt für die *in vitro* Translation verwendet werden. Für die Sequenzierungen wurden die im Anhang (8.2) aufgelisteten Primeroligonukleotide verwendet.

### 6.4.5 *In vitro* Translation und radioaktive Markierung

Für die nachfolgenden Bindungsassays wurden die Interaktionspartner mit dem T7/SP6- bzw. T3-gekoppelten TNT<sup>®</sup> Retikulozytenlysatsystem von Promega gemäß der Anleitung der Firma *in vitro* translatiert. Die radioaktive Markierung erfolgte mit [<sup>35</sup>S]-Methionin (Amersham Pharmacia Biotech). Zur Verifizierung einer erfolgreichen Translation wurde eine Gelelektrophorese mit 1 µl des Retikulozytenlysates durchgeführt. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt, bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden entfärbt, auf einem Whatman-Filterpapier mit einem Geltdrockner getrocknet und die [<sup>35</sup>S]-markierten Proteine mit Hilfe des Phosphoimagers Typhoon 9410 (Amersham Pharmacia Biotech) detektiert.

### 6.4.6 Bindungsassay

50-60 µl Glutathion-Sepharose, an die ca. 10 µg GST (Negativkontrolle) bzw. GST-SorLAcp gekoppelt war, wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 45 min lang auf einem Schüttler mit 1 ml PBS + 10% FCS inkubiert. Der Sepharoseansatz wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit PBS auf eine 50%ige Sepharose-Suspension eingestellt. Zu dieser Suspension wurden 200 µl Bindungspuffer (50 mM Tris, pH 7,4; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 200 mM NaCl; 0,1% Triton X-100) und 10 µl des Retikulozytenlysats mit translatiertem Protein gegeben. Nach zweistündigem Schütteln wurde die Sepharose viermal mit kaltem Bindungspuffer gewaschen. Der Puffer wurde danach mit einer Kanüle vollständig vom Sepharosepellet abgetrennt, das Pellet mit 15 µl Probenpuffer 5 min bei RT geschüttelt und die im Probenpuffer gelösten denaturierten Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Analyse erfolgte wie oben beschrieben. Die quantitative Auswertung der Signalintensitäten wurde mit dem Programm ImageQuant® (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt.

## 6.5 Northern-Blot-Analyse und MTE-Array

### 6.5.1 Synthese [<sup>32</sup>P]-markierter DNA-Sonden

#### THG-1a-Sonde:

Durch eine PCR mit der THG-1a-cDNA im Vektor pBluescript II SK(+) als Matrize und den Primern THG-1a\_nor\_for und THG-1a\_nor\_rev wurde ein für THG-1a spezifisches 235 bp großes Fragment amplifiziert (Nukleotid 128-363 in Abb. 13). Die radioaktive Markierung erfolgte mit [<sup>32</sup>P]-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech) und dem *Megaprime<sup>TM</sup> DNA-Labelling System* (Amersham Pharmacia Biotech) nach Anleitung des Herstellers.

#### THG-1-Sonde:

Ein 601 bp umfassendes THG-1-spezifisches DNA-Fragment (Datenbankeintrag BC001486: Nukleotide 1026-1626) wurde durch PCR mit den Primeroligonukleotiden THG1nor\_for und THG1nor\_rev amplifiziert und radioaktiv markiert (s.o.). Als Matrize diente die THG-1-Sequenz im Vektor pCMVSPORT6.

### **PLD3-Sonde:**

Aus der PLD3-cDNA im Vektor pBluescript II SK(+) wurde ein DNA-Fragment (Abb. 21; Nukleotide 1-916) mit den Enzymen *EcoRI* (Vektorschnittstelle) und *NcoI* (endogene Schnittstelle in der PLD3-cDNA) ausgeschnitten, über ein Agarosegel aufgereinigt und radioaktiv markiert (s. o.).

## **6.5.2 Hybridisierung der Membranen und Auswertung**

Für die Analyse des mRNA-Expressionsmusters wurden MTN<sup>®</sup>-Blots sowie MTE<sup>™</sup>-Arrays (Clontech) verwendet. Die Hybridisierung wurde in ExpressHyb<sup>™</sup>-Lösung von Clontech nach dem Protokoll der Firma durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Phosphoimager Typhoon 9410 (Amersham Pharmacia Biotech).

## **6.6 Zellkultur**

### **6.6.1 Zelllinien**

#### COS-Zellen

Herkunft: Niere der Afrikanischen Grünen Meerkatze (Gluzman 1981)

Kulturmedium: DMEM (Gibco<sup>™</sup>, Invitrogen) mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (Gibco<sup>™</sup>, Invitrogen) und 1% Penicillin-Streptomycin (10000 units/ml; Gibco<sup>™</sup>, Invitrogen)

#### CHO-Zellen

Herkunft: Ovarium eines chinesischen Hamsters (Puck *et al.*, 1958)

Kulturmedium: DMEM Nut-Mix F-12 mit (Gibco<sup>™</sup>, Invitrogen) mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (Gibco<sup>™</sup>, Invitrogen) und 1% Penicillin-Streptomycin (10000 units/ml; Gibco<sup>™</sup>, Invitrogen)

## 6.6.2 Expressionskonstrukte

### **pcDNA3.1/myc-His\_THG-1a:**

Durch eine PCR mit den Primern THG1aPCRkfor und THG1aPCRender (Matrizen-DNA: THG1a in pBluescript II Sk (+)) wurde ein Fragment mit einer für einen Translationsstart günstigen Sequenz um das Start-ATG (Kozak, 1995) sowie den benötigten *HindIII*- und *XbaI*-Schnittstellen amplifiziert und in den Vektor pcDNA3.1/myc-His eingefügt (Vektorkarte siehe 8.3).

### **pcDNA3.1/Hygro\_HA-ART-27:**

Die cDNA von ART-27 wurde einschließlich der für das HA-Peptid codierenden Sequenz mit *BglII* aus dem Hefevektor pACT2 ausgeschnitten und in die kompatible *BamHI*-Schnittstelle des Vektors pcDNA3.1/Hygro eingefügt (Vektorkarte siehe 8.3). Die richtige Orientierung der cDNA im Vektor wurde durch Restriktionsanalyse und die Fehlerfreiheit des Konstruktes durch Sequenzierung ermittelt.

### **pcDNA3.1/Hygro\_PLD3:**

Die PLD3-cDNA wurde aus dem Vektor pBluescript II SK(+)-PLD3 mit *BamHI* und *SalI* ausgeschnitten und in den mit *BamHI* und *XhoI* verdauten Vektor pcDNA3.1/Hygro ligiert.

### **pSorLAok:**

Das SorLA-Expressionskonstrukt im pcDNA3-Vektor wurde zuvor in der Arbeitsgruppe kloniert und in dieser Arbeit für die Kotransfektionen verwendet.

## 6.6.3 Transfektion

Beide Zelllinien wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes FuGENE 6 (Roche) nach Anweisung der Firma (Verhältnis Fugene:DNA = 3:1) oder durch Elektroporation transfiziert. Bei der Elektroporation werden die Zellen während eines elektrischen Pulses kurzzeitig permeabel für Fremd-DNA (Klenchin *et al.*, 1991). Pro Transfektionsansatz wurden Zellen aus 1,5 zu ca. 80% konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet, in 400 µl kaltem D-PBS (Gibco™, Invitrogen) resuspendiert und mit 10 µg Plasmid-DNA und 100 µg Heringssperma-DNA (mit A. dem auf 40 µl aufgefüllt) für 15 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette einem elektrischen Puls von 0,3 V und 500 µFD mit dem Gene-Pulser II (BioRad) ausgesetzt und anschließend in Medium suspendiert. Vor der weiteren Bearbeitung wurden die Zellen für 2 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### **6.6.4 Herstellung von Zelllysaten**

Zellen wurden vom Boden einer Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) mit einem Zellschaber gelöst, mit PBS (Gibco™, Invitrogen) gewaschen, sedimentiert und in 150 µl STEN-Lysispuffer (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Tergitol (NP-40), pH 7,6) mit Proteaseinhibitoren (Complete® Mini, Roche) resuspendiert. Die Zellfragmente wurden nach einer Inkubation von 10 min auf Eis sedimentiert (13000 x g, 4°C, 20 min) und der Überstand für anschließende Untersuchungen eingefroren.

#### **6.6.5 Membranpräparation**

Die Zellen aus einer 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche wurden geerntet und in 500 µl PBS mit Proteaseinhibitoren (Complete® Mini, Roche) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte für 3-4 x 10 sek mit einer Ultraschallspitze (50% der maximalen Stärke). Zum Nachweis der Proteine in der Membranfraktion wurden danach zunächst die Zellkerne und die nicht aufgeschlossenen Zellen durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 1000 x g bei 4°C pelletiert. Die Membranen wurden im folgenden Zentrifugationsschritt 40 min bei 100.000 x g (4°C) abgetrennt und für die Analyse im Western Blot in 500 µl PBS aufgenommen. Der Nachweis von THG-1a in der löslichen Fraktion erfolgte nach Abtrennung von Kern- und Membranbestandteilen durch erneute Ultrazentrifugation bei 100.000 x g (40 min, 4°C).

#### **6.6.6 Immunfluoreszenz**

Für die Immunfärbung wurden auf Deckgläschen gewachsene Zellen mit warmen PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 30 min fixiert. Um das Paraformaldehyd anschließend vollständig zu entfernen, wurden die Zellen 5 x 5 min mit PBS gewaschen und danach mit einer Permeabilisierungslösung (0,5% Glyzin, 0,1% Saponin in PBS) für 5 min inkubiert. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden für 30 min mit Blockierlösung (1% BSA, 5% Pferdeserum, 5-10% Eseserum in Permeabilisierungslösung) abgesättigt. Die einstündige Inkubation mit dem Primär- und anschließend mit dem Sekundärantikörper erfolgte in Blockierlösung. Zwischen und nach den Inkubationsschritten wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen zum Schluss mit Fluoromount-G™ (Southern Biotech) auf Objektträgern eingedeckelt. Für die Färbung der Zellkerne wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindol (0,025 µg/ml) zu der letzten Waschlösung gegeben. Die konfokalen Aufnahmen wurden bei einer optischen Schichtdicke von 0,8-1,2 µm mit dem Laser-mikroskop Zeiss LSM 510 erstellt.

**verwendete Antikörper:**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
anti-PLD3 (polyklonal, Kaninchen)	1:500 - 1:1000	Eurogentec (Auftragsproduktion)
anti-SorLAcp (polyklonal, Kaninchen)	1:3000	eigene Herstellung (Hampe <i>et al.</i> , 2000)
anti-myc (monoklonal, Maus)	1:500	Sigma
anti-HA (monoklonal, Maus)	1:500	Covance
anti-PDI (monoklonal, Maus)	1:100	StressGen
anti-Golgi 58 k	1:50	Sigma
anti-EEA 1	1:100	BD Biosciences

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Anregung (nm)</b>	<b>Emission (nm)</b>	<b>Firma</b>
anti-Kaninchen IgG Cy2-gekoppelt	1:800	488	528 (grün)	Dianova
anti-Maus IgG Cy3-gekoppelt	1:800	568	628 (rot)	Dianova

**6.6.7 Sicherheitsvorkehrungen und Entsorgung**

Bei der Arbeit mit Chemikalien wurden die allgemein gültigen R- und S-Sätze aus den zugehörigen Sicherheitsdatenblättern berücksichtigt. Beim Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen wurde das Gentechnikgesetz sowie die „Betriebsanweisung Genlabor“ beachtet. Biologisches Material (Bakterien-, Hefesuspensionen, usw.) und mit diesem kontaminierte Gebrauchsartikel (Pipettenspitzen, Agarplatten etc.) wurden autoklaviert und anschließend entsorgt.

Bei der Arbeit mit radioaktiven Isotopen fanden die Strahlenschutzverordnung und die Betriebsanweisung zum Umgang mit radioaktiven Isotopen Anwendung. Anfallende kontaminierte Verbrauchsmaterialien wurden in den entsprechenden Abfalltonnen gesammelt und von der Firma Amersham entsorgt.

Organische Lösungsmittel wurden, getrennt nach halogenhaltig und -frei, in die entsprechenden Sammelbehälter entsorgt. Mit Ethidiumbromid kontaminierte Lösungen, Gele und Verbrauchsmaterialien wurden gesondert entsorgt.

## 7 Literaturverzeichnis

- Bacsikai, B. J, Xia, M. Q., Strickland, D. K., Rebeck, G. W. und Hyman, B. T. (2000). The Endocytic Receptor Protein LRP Also Mediates Neuronal Calcium Signaling Via N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**: 11551-11556.
- Brummendorf, T. und Rathjen, F. G. (1993). Axonal Glycoproteins With Immunoglobulin and Fibronectin Type-iii-Related Domains in Vertebrates - Structural Features, Binding Activities, and Signal-Transduction. *J. Neurochem.* **61**: 1207-1219.
- Bujo, H., Taira, K., Hirayama, S., Yamazaki, H., Takahashi, K., Ishii, I., Miida, T., Schneider, W. J. und Saito, Y. (2000). Lr11, a Mosaic LDL Receptor Family Member Expressed in Smooth Muscle Cells in Atheroma, Mediates the Uptake of Apo E-Rich Lipoproteins. *Circulation* **102**: 182.
- Chan, W. Y., Lorke, D. E., Tiu, S. C. und Yew, D. T. (2002). Proliferation and Apoptosis in the Developing Human Neocortex. *Anat. Rec.* **267**: 261-276.
- Chen, W.-J., Goldstein, J. L. und Brown, M. S. (1990). NPXY, a Sequence Often Found in Cytoplasmic Tails, Is Required for Coated Pit-Mediated Internalization of the Low Density Lipoprotein Receptor. *J. Biol. Chem.* **265**: 3116-3123.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. und Fields, S. (1991). The 2-Hybrid System - A Method to Identify and Clone Genes for Proteins That Interact With A Protein of Interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**: 9578-9582.
- Davis, C. G., Goldstein, J. L., Sudhof, T. C., Anderson, R. G., Russell, D. W. und Brown, M. S. (1987). Acid-Dependent Ligand Dissociation and Recycling of LDL Receptor Mediated by Growth Factor Homology Region. *Nature* **326**: 760-765.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A. und Kopan, R (1999). A Presenilin-1-Dependent Gamma-Secretase-Like Protease Mediates Release of Notch Intracellular Domain. *Nature* **398**: 518-522.
- Exton, J. H. (1997). New Developments in Phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **272**: 15579-15582.
- Exton, J. H. (2000). Phospholipase D. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **905**: 61-68.
- Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventre JV und Zervos AS (2000). Characterization of a Novel Human Serine Protease That Has Extensive Homology to Bacterial Heat Shock Endoprotease HtrA and Is Regulated by Kidney Ischemia. *J. Biol. Chem.* **275**: 2581-2588.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A Novel Genetic System to Detect Protein-Protein Interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Fortini, M. E. (2002). Gamma-Secretase-Mediated Proteolysis in Cell-Surface-Receptor Signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 673-684.
- Frangioni, J. V. und Neel, B. G. (1993). Solubilization and Purification of Enzymatically Active Glutathione S-Transferase (PGEX) Fusion Proteins. *Anal. Biochem.* **210**: 179-187.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-Transformed Simian Cells Support the Replication of Early SV40 Mutants. *Cell* **23**: 175-182.

- Hampe, W., Riedel, I. B., Lintzel, J., Bader, C. O., Franke, I. und Schaller, H. C. (2000). Ectodomain Shedding, Translocation and Synthesis of SorLA are Stimulated by Its Ligand Head Activator. *J. Cell Sci.* **113**: 4475-4485.
- Hampe, W., Urny, J., Franke, I., Hoffmeister-Ullerich, S. A. H., Herrmann, D., Petersen, C. M., Lohmann, J. und Schaller, H. C. (1999). A Head-Activator Binding Protein Is Present in Hydra in a Soluble and a Membrane-Anchored Form. *Development* **126**: 4077-4086.
- Harrison SC (1991). A Structural Taxonomy of DNA-Binding Domains. *Nature* **353**: 715-719.
- Hartmann E, Rapoport TA und Lodish HF (1989). Predicting the Orientation of Eukaryotic Membrane-Spanning Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**: 5786-5790.
- Hermans-Borgmeyer, I., Hampe, W., Schinke, B., Methner, A., Nykjaer, A., Susens, U., Fenger, U., Herbarth, B. und Schaller, H. C. (1998). Unique Expression Pattern of a Novel Mosaic Receptor in the Developing Cerebral Cortex. *Mech. Dev.* **70**: 65-76.
- Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D. und Nicola, N. A. (1998). Twenty Proteins Containing a C-Terminal SOCS Box Form Five Structural Classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 114-119.
- Horazdovsky, B. F., Dewald, D. B. und Emr, S. D (1995). Protein-Transport to the Yeast Vacuole. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 544-551.
- Ilardi, J. M., Mochida, S. und Sheng, Z. H. (1999). Snapin: a SNARE-Associated Protein Implicated in Synaptic Transmission. *Nat. Neurosci.* **2**: 119-124.
- Jacobsen, L., Madsen, P., Jacobsen, C., Nielsen, M. S., Gliemann, J. und Petersen, C. M. (2001). Activation and Functional Characterization of the Mosaic Receptor SorLA/LR11. *J. Biol. Chem.* **276**: 22788-22796.
- Jacobsen, L., Madsen, P., Moestrup, S. K., Lund, A. H., Tommerup, N., Nykjaer, A., Sottrup-Jensen, L., Gliemann, J. und Petersen, C. M. (1996). Molecular Characterization of a Novel Human Hybrid-Type Receptor That Binds the  $\alpha_2$ -Macroglobulin Receptor-Associated Protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 31379-31383.
- Jacobsen, L., Madsen, P., Nielsen, M. S., Geraerts, W. P., Gliemann, J., Smit, A. B. und Petersen, C. M. (2002). The SorLA Cytoplasmic Domain Interacts With GGA1 and -2 and Defines Minimum Requirements for GGA Binding. *FEBS Lett.* **511**: 155-158.
- Johnston, M. (1987). A Model Fungal Gene Regulatory Mechanism: the GAL Genes of Saccharomyces Cerevisiae. *Microbiol. Rev.* **51**: 458-476.
- Kanaki, T., Bujo, H., Hirayama, S., Ishii, I., Morisaki, N., Schneider, W. J. und Saito, Y. (1999). Expression of LR11, a Mosaic LDL Receptor Family Member, Is Markedly Increased in Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 2687-2695.
- Kester, H. A., Blanchetot, C., den Hertog, J., van der Saag, P. T. und van der Burg, B. (1999). Transforming Growth Factor-Beta-Stimulated Clone-22 Is a Member of a Family of Leucine Zipper Proteins That Can Homo- and Heterodimerize and Has Transcriptional Repressor Activity. *J. Biol. Chem.* **274**: 27439-27447.
- Klenchin, V. A., Sukharev, S. I., Serov, S. M., Chernomordik, L. V. und Chizmadzhev, Y. (1991). Electrically Induced DNA Uptake by Cells Is a Fast Process Involving DNA Electrophoresis. *Biophys. J.* **60**: 804-811.
- Kozak, M. (1995). Adherence to the First-AUG Rule When a Second AUG Codon Follows Closely Upon the First. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2662-2666.

- Krieger, M. und Herz, J. (1994). Structures and Functions of Multiligand Lipoprotein Receptors: Macrophage Scavenger Receptors and LDL Receptor-Related Protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 601-637.
- Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M. und Soares, M. B. (1996). The I.M.A.G.E. Consortium: an Integrated Molecular Analysis of Genomes and Their Expression. *Genomics* **33**: 151-152.
- Li, Y. M. (2001). Gamma-Secretase: a Catalyst of Alzheimer Disease and Signal Transduction. *Mol. Interv.* **1**: 198-207.
- Lintzel, J., Franke, I., Riedel, I. B., Schaller, H. C. und Hampe, W. (2002). Characterization of the VPS10 Domain of SorLA/LR11 As Binding Site for the Neuropeptide HA. *Biol. Chem.* **383**: 1727-1733.
- Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G. und Tang, X. (2000). Phospholipase D: Molecular and Cell Biology of a Novel Gene Family. *Biochem. J.* **345 Pt 3**: 401-415.
- Liu, L. und McKeehan, W. L. (2002). Sequence Analysis of LRPPRC and Its SEC1 Domain Interaction Partners Suggests Roles in Cytoskeletal Organization, Vesicular Trafficking, Nucleocytosolic Shuttling, and Chromosome Activity. *Genomics* **79**: 124-136.
- Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E. und Emr, S. D. (1994). The Sorting Receptor for Yeast Vacuolar Carboxypeptidase Y Is Encoded by the VPS10 Gene. *Cell* **77**: 579-586.
- Markus, S. M., Taneja, S. S., Logan, S. K., Li, W., Ha, S., Hittelman, A. B., Rogatsky, I. und Garabedian, M., J. (2002). Identification and Characterization of ART-27, a Novel Coactivator for the Androgen Receptor N Terminus. *Mol. Biol. Cell* **13**: 670-682.
- May, P., Reddy, Y. K. und Herz, J. (2002). Proteolytic Processing of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Mediates Regulated Release of Its Intracellular Domain. *J. Biol. Chem.* **277**: 18736-18743.
- Medina, M. und Dotti, C., G. (2003). RIPped Out by Presenilin-Dependent Gamma-Secretase. *Cell Signal.* **15**: 829-841.
- Meetei, A. R., de Winter, J. P., Medhurst, A. L., Wallisch, M., Waisfisz, Q., van de Vrugt, H. J., Oostra, A. B., Yan, Z., Ling, C., Bishop, C., E., Hoatlin, M. E., Joenje, H. und Wang, W. (2003). A Novel Ubiquitin Ligase Is Deficient in Fanconi Anemia. *Nat. Genet.* **35**: 165-170.
- Meijer, H. und Thomas, A., A., M. (2002). Control of Eucaryotic Protein Synthesis by Upstream Open Reading Frames in the 5'-Untranslated Region of an mRNA. *Biochem. J.* **367**: 1-11
- Molloy, S. S., Anderson, E. D., Jean, F. und Thomas, G. (1999). Bi-Cycling the Furin Pathway: From TGN Localization to Pathogen Activation and Embryogenesis. *Trends Cell Biol.* **9**: 28-35.
- Motoi, Y., Aizawa, T., Haga, S., Nakamura, S., Namba, Y. und Ikeda, K. (1999). Neuronal Localization of a Novel Mosaic Apolipoprotein E Receptor, LR11, in Rat and Human Brain. *Brain Res.* **833**: 209-215.
- Mumm, J. S. und Kopan, R. (2000). Notch Signaling: From the Outside in. *Dev. Biol.* **228**: 151-165.
- Nakai, K. und Horton, P. (1999). PSORT: a Program for Detecting Sorting Signals in Proteins and Predicting Their Subcellular Localization. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 34-36.
- Nakayama, K. (1997). Furin: a Mammalian Subtilisin/Kex2p-Like Endoprotease Involved in Processing of a Wide Variety of Precursor Proteins. *Biochem. J.* **327**: 625-635.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R. und Smith, T. F. (1994). The Ancient Regulatory-Protein Family of WD-Repeat Proteins. *Nature* **371**: 297-300.

- Neville, D. M., Jr. (1971). Molecular Weight Determination of Protein-Dodecyl Sulfate Complexes by Gel Electrophoresis in a Discontinuous Buffer System. *J. Biol. Chem.* **246**: 6328-6334.
- Nicholson, S. E. und Hilton, D. J. (1998). The SOCS Proteins: a New Family of Negative Regulators of Signal Transduction. *J. Leukoc. Biol.* **63**: 665-668.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997). Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Signal Peptides and Prediction of Their Cleavage Sites. *Protein Eng* **10**: 1-6.
- Nishimune, A., Nash, S. R., Nakanishi, S. und Henley, J. M. (1996). Detection of Protein-Protein Interactions in the Nervous System Using the Two-Hybrid System. *Trends Neurosci.* **19**: 261-266.
- Ozsarac, N., Santha, E. und Hoffman, B. J. (2002). Alternative Non-Coding Exons Support Serotonin Transporter mRNA Expression in the Brain and Gut. *J. Neurochem.* **82**: 336-344.
- Pedersen, K. M., Finsen, B., Celis, J. E. und Jensen, N. A. (1998). Expression of a Novel Murine Phospholipase D Homolog Coincides With Late Neuronal Development in the Forebrain. *J. Biol. Chem.* **273**: 31494-31504.
- Puck, T. T., Cieciura, S. J. und Robinson, A. (1958). Genetics of Somatic Mammalian Cells. III. Long-Term Cultivation of Euploid Cells From Human and Animal Subjects. *J. Exp. Med.* **108**: 945-956.
- Puertollano, R., Randazzo, P. A., Presley, J. F., Hartnell, L. M. und Bonifacino, J. S. (2001). The GGAs Promote ARF-Dependent Recruitment of Clathrin to the TGN. *Cell* **105**: 93-102.
- Quinn, K. A., Pye, V. J., Dai, Y. P., Chesterman, C. N. und Owensby, D. A. (1999). Characterization of the Soluble Form of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP). *Exp. Cell Res.* **251**: 433-441.
- Rizzo, M. und Romero, G. (2002). Pharmacological Importance of Phospholipase D and Phosphatidic Acid in the Regulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade. *Pharmacol. Ther.* **94**: 35-50.
- Rudolph, A. E., Stuckey, J. A., Zhao, Y., Matthews, H. R., Patton, W. A., Moss, J. und Dixon, J. E. (1999). Expression, Characterization, and Mutagenesis of the Yersinia Pestis Murine Toxin, a Phospholipase D Superfamily Member. *J. Biol. Chem.* **274**: 11824-11831.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Schroer, A., Schneider, S., Ropers, H. und Nothwang, H. (1999). Cloning and Characterization of UXT, a Novel Gene in Human Xp11, Which Is Widely and Abundantly Expressed in Tumor Tissue. *Genomics* **56**: 340-343.
- Selkoe, D. und Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: Regulated Intramembrane Proteolysis Links Development and Degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**: 565-597.
- Silveira, H. C., Sommer, C. A., Soares-Costa, A. und Henrique-Silva, F. (2004). A Calcineurin Inhibitory Protein Overexpressed in Down's Syndrome Interacts With the Product of a Ubiquitously Expressed Transcript. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**: 785-789.
- Strekalova, T., Sun, M., Sibbe, M., Evers, M., Dityatev, A., Gass, P. und Schachner, M. (2002). Fibronectin Domains of Extracellular Matrix Molecule Tenascin-C Modulate Hippocampal Learning and Synaptic Plasticity. *Mol. Cell Neurosci.* **21**: 173-187.
- Stuckey, J. A. und Dixon, J. E. (1999). Crystal Structure of a Phospholipase D Family Member. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 278-284.

- Sung, T. C., Roper, R. L., Zhang, Y., Rudge, S. A., Temel, R., Hammond, S. M., Morris, A. J., Moss, B., Engebrecht, J. und Frohman, M. A. (1997). Mutagenesis of Phospholipase D Defines a Superfamily Including a Trans-Golgi Viral Protein Required for Poxvirus Pathogenicity. *EMBO J.* **16**: 4519-4530.
- Taira, K., Bujo, H., Hirayama, S., Yamazaki, H., Kanaki, T., Takahashi, K., Ishii, I., Miida, T., Schneider, W. J. und Saito, Y. (2001). LR11, a Mosaic LDL Receptor Family Member, Mediates the Uptake of ApoE-Rich Lipoproteins in Vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**: 1501-1506.
- Taneja, S. S., Ha, S., Swenson, N. K., Torra, I. P., Rome, S., Walden, P. D., Huang, H. Y., Shapiro, E., Garabedian, M. J. und Logan, S. K. (2004). ART-27, an Androgen Receptor Coactivator Regulated in Prostate Development and Cancer. *J. Biol. Chem.* **279**: 13944-13952.
- Toby, G. G. und Golemis, E. A. (2001). Using the Yeast Interaction Trap and Other Two-Hybrid-Based Approaches to Study Protein-Protein Interactions. *Methods* **24**: 201-217.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson J.A und Herz J. (1999). Reeler/Disabled-Like Disruption of Neuronal Migration in Knockout Mice Lacking the VLDL Receptor and ApoE Receptor 2. *Cell* **97**: 689-701.
- von Heijne G. (1994). Membrane Proteins: From Sequence to Structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 167-192.
- Xie, Z., Ho W., T., und Exton, J. H. (2000). Association of the N- and C-Terminal Domains of Phospholipase D. Contribution of the Conserved HKD Motifs to the Interaction and the Requirement of the Association for Ser/Thr Phosphorylation of the Enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**: 24962-24969.
- Yamazaki, H., Bujo, H., Kusunoki, J., Seimiya, K., Kanaki, T., Morisaki, N., Schneider, W. J. und Saito, Y. (1996). Elements of Neural Adhesion Molecules and a Yeast Vacuolar Protein Sorting Receptor Are Present in a Novel Mammalian Low Density Lipoprotein Receptor Family Member. *J. Biol. Chem.* **271**: 24761-24768.
- Yamazaki, H., Bujo, H. und Saito, Y. (1997). A Novel Member of the LDL Receptor Gene Family With Eleven Binding Repeats Is Structurally Related to Neural Adhesion Molecules and a Yeast Vacuolar Protein Sorting Receptor. *J. Atheroscler. Thromb.* **4**: 20-6.
- Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V.P. und Kornfeld, S. (2001). Binding of GGA2 to the Lysosomal Enzyme Sorting Motif of the Mannose 6-Phosphate Receptor. *Science* **292**: 1716-1718.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Peptid
Ade <sup>-</sup>	Nährmedium für Hefe ohne Adenin
<i>ADE2</i>	Gen für Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase
AP	Alkaline Phosphatase
APH-1	<i>anterior pharynx defective 1</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
Apo E	Apolipoprotein E
A. dem.	demineralisiertes Wasser
ART-27	<i>androgen-receptor trapped clone-27</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	codierende DNA
Cy2, Cy3	Cyanin-Farbstoffe
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DOB	Medium für Hefen, dem bestimmte Nährstoffe fehlen („ <i>drop-out base</i> “)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbeccos Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	verstärkte Chemilumineszenz ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FCS	fötale Kälberserum
FD	Farad
GAL4	Transkriptionsfaktor des Galaktosestoffwechsels in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GGA	<i>golgi-localized, gamma-ear-containing, ARF-binding protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HA	Hämagglutinin
HAB	<i>head-activator binding protein</i>
His <sup>-</sup>	Nährmedium für Hefe ohne Histidin
<i>HIS3</i>	Gen für Imidazolglyzerolphosphat-Dehydratase
HtrA2	<i>high temperature requirement protein A2</i>
IgG	Immunglobulin G
IMAGE	<i>integrated molecular analysis of genes and their expression</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low-density lipoprotein receptor</i>
Leu <sup>-</sup>	Nährmedium für Hefe ohne Leucin
LPR	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
M	molar

MEL1	Gen für Melibiase 1
min	Minuten
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
NBT	p-Nitro-blau-tetrazoliumchlorid
N-CAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NEB	<i>New England Biolabs</i>
OD <sub>600</sub>	optische Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PEG	Polyethylenglykol
PEN-2	<i>presenilin enhancer protein 2</i>
PIS	Präimmunserum
PLD	Phospholipase D
PO	Peroxidase
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunden
SorLA	<i>sorting protein-related receptor containing LDLR class A repeats</i>
SorLAcp	cytoplasmatische Domäne von SorLA
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
TACE	<i>tumor-necrosis-factor-<math>\alpha</math>-converting enzyme</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THG-1	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math>-stimulated clone-22 homologue-1</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP <sup>-</sup>	Nährmedium für Hefe ohne Tryptophan
U/min	Umdrehungen pro Minute
u. a.	unter anderem
5' UTR	5' untranslatierte Region
VLDL	<i>very low-density lipoprotein</i>
VLDLR	<i>very low-density lipoprotein receptor</i>
VPS10	<i>vacuolar protein sorting receptor 10</i>
WSB-1	<i>WD-repeat and SOCS-box containing protein 1</i>
X- $\alpha$ -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galaktosid
YPD	Nährmedium für Hefen
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

## 8.2 Verwendete Primeroligonukleotide

### allgemeine Primer:

SP6-Promotor-Primer (100 pmol/μl):

5'- GCC TAT TTA GGT GAC ACT ATA G -3'

M13 Rückwärts-Primer (M13rev; 100 pmol/μl):

5'- GGA AAC AGC TAT GAC CAT GT -3'

M13 Vorwärts-Primer (M13for; 100 pmol/μl):

5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'

T3-Promotor-Primer (100 pmol/μl):

5'- AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG -3'

T7-Promotor-Primer (100 pmol/μl):

5'- ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G -3'

### SorLAcp:

SorLAhumIcfor (100 pmol/μl):

5'- CAT ATG TAC ACG AAG CAC CGG AGG -3'

SorLAhumIcrev (100 pmol/μl):

5'- GAA TTC AGG CTA TCA CCA TGG GGA -3'

### Hefe-Zwei-Hybrid-System:

3' AD *Sequencing* Primer (Clontech)

T7 *Sequencing* Primer (Clontech)

3' DNA-BD *Sequencing* Primer (Clontech)

Gal4pBDf (100 pmol/μl):

5'- TAA GTG CGA CAT CAT CAT CGG A -3'

3'ADY2H (100 pmol/μl):

5'- GTG ACC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT -3'

5'ADY2H (100 pmol/μl):

5'- CTA TCC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA ACC CC -3'

### THG-1a:

90TSC22f (100 pmol/μl):

5'- GGC ATT GAC AAC AAA ATC GAG -3'

90TSC22r (100 pmol/μl):

5'- GGA CAT TAA AGC TGC ATA GGA -3'

THG1a\_nor\_for (100 pmol/μl):

5'- ATG GCC CAG CCA GGG GTC TC -5'

THG1a\_nor\_rev (100 pmol/μl):

5'- GAA TGA GGG AGA GGA GGG TT -3'

THG1a380for (100 pmol/μl):

5'- ACG CTG CGC TGG AGC AGG AG -3'

THG1a40rev (100 pmol/μl):

5'- CCA CCA CTC GGG TCT CAT AA -3'

THG1aPCRenderev (100 pmol/μl):

5'- ATT CTA GAG ACG GAG GGC CCA TTG GGC G -3'

THG1aPCRkfor (100 pmol/μl):

5'- ATA AGC TTG CCA CCA TGG CCC AGC CAG GGG TCT -3'

**THG-1:**

THG1forM1 (100 pmol/μl):

5'- CTT GGA TTC CAG GTT GGA GC -3'

THG1rev1 (100 pmol/μl):

5'- GGG CAG GCG GCT GAC GCA AG -3'

THG1nor\_for(100 pmol/μl):

5'- ACG TGT GTG GAT GTT TAT GA -3'

THG1nor\_rev (100 pmol/μl):

5'- ACT TCT GAG CTG CTA CTG CT -3'

**TSC-22:**

TSC22rev (100 pmol/μl):

5'- CCC TAG CAC ATC TTC TCC GT -3'

**PLD3:**

PLD3mitte2f (100 pmol/μl):

5'- GCG TGA ACG TCC GCA TCG CTG T -3'

PLD3Mitte1f (100 pmol/μl):

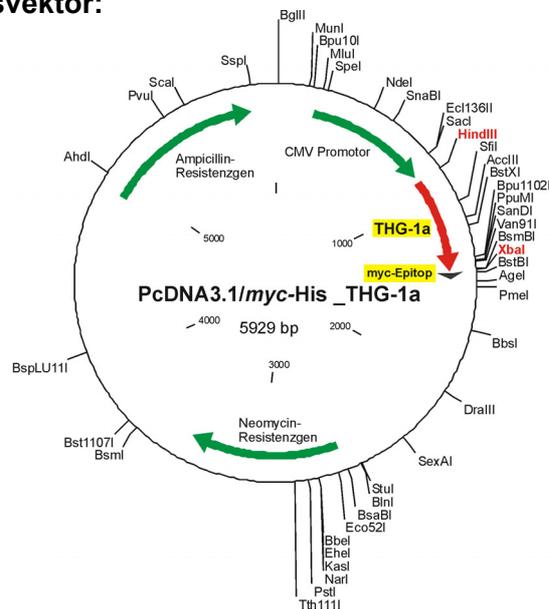
5'- GAA GGT GCC TGC AGA GGA GCC -3'

PLD3Mitter1 (100 pmol/μl):

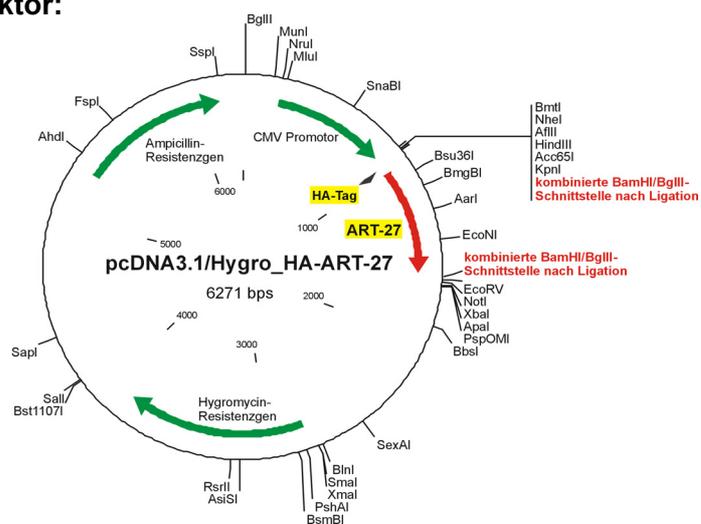
5'- AGG TCA TGA ATG TAA GGG GAG T -3'

### 8.3 Vektorkarten der Konstrukte für eine eukaryotische Expression

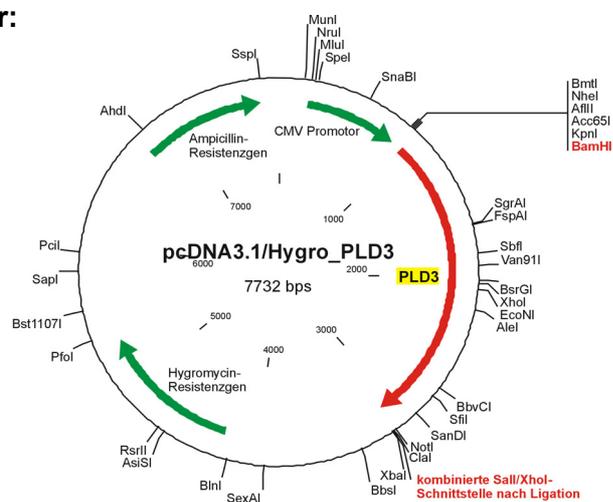
#### THG-1 $\alpha$ -Expressionsvektor:



#### HA-ART-27-Expressionsvektor:



#### PLD3-Expressionsvektor:



## 8.4 DNA-Sequenz von SorLA

### GenBank-Eintrag U60975

```

1  ttgctgcgctc aactgtgttc cctttggcct ggctgagttt gatactgtgg ggattcagtt
61 taggcgctgg cccgaggata tcccagcggg ggtacttcgg agacacctgt ctgcatctga
121 ctgagccggc tctcctggcc tcgcgctgca cattctctcc tggcggcggc gccacctgca
181 gtagcgttcg cccgaacatg gcgacacgga gcagcaggag ggagtcgca ctcccgttcc
241 tattcaccct ggtcgcactg ctgcgcgccg gagctctctg cgaagtctgg acgcagaggc
301 tgcacggcgg cagcgcgcc ttgccccagg accggggcct cctcgtgggtg cagggcgacc
361 cgcgcgagct gcggctgtgg gcgcgcgggg atgccagggg ggcgagccgc gcggacgaga
421 agccgctccg gaggaaacgg agcgcgtgcc tgcagcccga gcccatcaag gtgtacggac
481 aggttagtct gaatgattcc cacaatcaga tgggtgtgca ctgggctgga gagaaaagca
541 acgtgatcgt ggccttggcc cgagatagcc tggcattggc gaggcccaag agcagtgatg
601 tgtacgtgtc ttacgactat ggaaaatcat tcaagaaaat ttcagacaag ttaaactttg
661 gcttgggaaa taggagtgaa gctgttatcg cccagttcta ccacagccct gcggacaaca
721 agcggtagat ctttgcagac gcttatgccc agttacctg gatcacgttt gacttctgca
781 acactcttca aggcctttcc atcccatttc gggcagctga tctcctccta cacagtaagg
841 cctccaacct tctcttgggc tttgacaggt cccaccccaa caagcagctg tggaaagtca
901 atgactttgg ccagacctgg atcatgattc aggaacatgt caagtccttt tcttggggaa
961 ttgatcccta tgacaaacca aataccatct acattgaacg acacgaaccc tctggctact
1021 cactgtctt ccgaagtaca gatttcttcc agtcccggga aaaccaggaa gtgatccttg
1081 aggaagtgag agattttcag cttcgggaca agtacaatgt tgctacaaag gtggtgcatc
1141 tcttgggagc tgaacagcag tcttctgtcc agctctgggt ctctttggc cgggaagcca
1201 tgagagcagc ccagtttgtc acaagacatc ctattaatga atattacatc gcagatgcct
1261 ccgaggacca ggtgtttgtg tgtgtcagcc acagtaacaa ccgcaccaat ttatacatct
1321 cagaggcaga ggggctgaag ttctccctgt ccttggagaa cgtgctctat tacagcccag
1381 gaggggccgg cagtgcaccc ttgggtgagg attttgcaaa tgaaccattt gctgacttcc
1441 accgagtgga aggattgcaa ggagtctaca ttgctactct gattaatggt tctatgaatg
1501 aggagaacat gagatcggtc atcacctttg acaaaggggg aacctgggag tttcttcagg
1561 ctccagcctt cacgggatat ggagagaaaa tcaattgtga gctttccag ggctgttccc
1621 ttcatctggc tcagcgcctc agtcagctcc tcaacctcca gctccggaga atgccatcc
1681 tgtccaagga gtcggctcca ggccctatca tcgccactgg ctcagtggga aagaacttgg
1741 ctagaacgac aaacgtgtac atctctagca gtgctgggagc cagggtggca gaggcacttc
1801 ctggacctca ctactacaca tggggagacc acggcggaat catcacggcc attgccaggg
1861 gcatggaaac caacgagcta aaatacagta ccaatgaagg ggagacctgg aaaacattca
1921 tcttctctga gaagccagtg tttgtgtatg gcctcctcac agaacctggg gagaagagca
1981 ctgtcttcac catctttggc tcgaacaaag agaatgtcca cagctggctg atcctccagg
2041 tcaatgccac ggatgccttg ggagttccct gcacagagaa tgactacaag ctgtggtcac
2101 catctgatga gcgggggaat gagtgtttgc tgggacacaa gactgttttc aaacggcgga
2161 cccccatgc cacatgcttc aatggagagg actttgacag gccggtggtc gtgtccaact
2221 gctcctgcac ccgggaggac tatgagtgtg acttcggttt caagatgagt gaagatttgt
2281 cattagaggt ttgtgttcca gatccggaat tttctggaaa gtcatactcc cctcctgtgc
2341 cttgccctgt gggttctact tacaggagaa cgagaggcta ccggaagatt tctggggaca
2401 cttgtagcgg aggagatggt gaagcgcgac tggaaaggaga gctggtcccc tgtcccctgg
2461 cagaagagaa cgagttcatt ctgtatgctg tgaggaaatc catctaccgc tatgacctgg
2521 cctcgggagc caccgagcag ttgcctctca ccgggctacg ggcagcagtg gccctggact
2581 ttgactatga gcacaactgt ttgtattggt ccgacctggc cttggacgtc atccagcgcc
2641 tctgtttgaa tggaaagcaca gggcaagagg tgatcatcaa ttctggcctg gagacagtag
2701 aagctttggc ttttgaacct ctcagccagc tgccttactg ggtagatgca ggcttcaaaa
2761 agattgaggt agctaattcca gatggcgact tccgactcac aatcgtcaat tcctctgtgc
2821 ttgatcgtcc cagggctctg gtoctgtgc cccaagaggg ggtgatgttc tgccagagct
2881 ggggagacct gaagcctggg atttatcgga gcaatatgga tggttctgct gcctatcacc
2941 tgggtgtctga ggatgtgaag tggcccaatg gcatctctgt ggacgaccag tggatttact
3001 ggacggatgc ctacctggag tgcatagagc ggatcacggt cagtggccag cagcgcctctg
3061 tcattctgga caacctcccg caccctatg ccattgctgt ctttaagaat gaaatctact
3121 gggatgactg gtcacagctc agcatattcc gagcttccaa atacagtggg tcccagatgg
3181 agattctggc aaaccagctc acggggctca tggacatgaa gattttctac aagggaaga
3241 acactggaag caatgcctgt gtgccaggc catgcagcct gctgtgcctg cccaaggcca
3301 acaacagtag aagctgcagg tgtccagagg atgtgtccag cagtgtgctt ccatcagggg

```

3361 acctgatgtg tgactgcocct cagggctatc agctcaagaa caatacctgt gtcaaagaag  
3421 agaacacctg tcttcgcaac cagtatcgtc gcagcaacgg gaactgtatc aacagcattt  
3481 ggtggtgtga ctttgacaac gactgtggag acatgagcga tgagagaaac tgcctacca  
3541 ccatctgtga cctggacacc cagtttcggt gccaggagtc tgggacttgt atcccactgt  
3601 cctataaatg tgaccttgag gatgactgtg gagacaacag tgatgaaagt cattgtgaa  
3661 tgcaccagtg ccggagtgac gagtacaact gcagttccgg catgtgcac cgtcctcct  
3721 gggatgtgga cggggacaac gactgcaggg actggctga tgaagccaac tgtaccgca  
3781 tctatcacac ctgtgaggcc tccaacttcc agtgccgaaa cgggcactgc atccccagc  
3841 ggtgggctg tgacggggat acggactgcc aggatggttc cgatgaggat ccagtcaact  
3901 gtgagaagaa gtgcaatgga ttccgctgcc caaacggcac ttgcatccca tccagcaaac  
3961 attgtgatgg tctgcgtgat tgctctgatg gctccgatga acagcactgc gagcccctct  
4021 gtacgcactt catggacttt gtgtgtaaga accgccagca gtgcctgttc cactccatgg  
4081 tctgtgacgg aatcatccag tgccgcgacg ggtccgatga ggatgcggcg tttgcaggat  
4141 gctccaaga tcctgagttc cacaaggat gtgatgagtt cggttccag tgtcagaatg  
4201 gagtgtgcat cagtttgatt tggagtgcg acgggatgga tgattgcggc gattattctg  
4261 atgaagccaa ctgcgaaaac cccacagaag ccccaaactg ctcccgtac tccagttt  
4321 ggtgtgagaa tggccactgc atccccaaac gatggaaatg tgacagggag aacgactgtg  
4381 gggactggtc tgatgagaag gattgtggag attcacatat tcttcccttc tgcactcctg  
4441 ggccctccac gtgtctgccc aattactacc gctgcagcag tgggacctgc gtgatggaca  
4501 cctgggtgtg cgacgggtac cgagattgtg cagatggctc tgacgaggaa gcctgccct  
4561 tgcttgcaaa cgtcactgct gcctccactc ccaccaact tgggcgatgt gaccgatttg  
4621 agttcgaatg ccaccaaccg aagacgtgta ttccaactg gaagcgtgt gcggccacc  
4681 aagattgcca ggatggccgg gacgagccca attgcccac acacagcacc ttgactgca  
4741 tgagcagggg tttccagtgc gaggacgggg aggcctgcat tgtgctctcg gagcgtgcy  
4801 acggcttctt ggactgctcg gacgagagcg atgaaaaggc ctgcagtgat gagttgactg  
4861 tgtacaaagt acagaatctt cagtggacag ctgacttctc tggggatgtg actttgacct  
4921 ggatgaggcc caaaaaatg cctctgctt cttgtgtata taatgtctac tacaggggtg  
4981 ttggagagag catatggaag actctggaga cccacagcaa taagacaaac actgtattaa  
5041 aagtcttgaa accagatacc acgtatcagg ttaaagtaca ggttcagtgt ctcagcaagg  
5101 cacacaacac caatgacttt gtgacctga ggacccaga gggattgcca gatgccctc  
5161 gaaatctcca gctgtcactc cccaggaag cagaagggtg gattgtaggc cactgggctc  
5221 ctcccatcca caccatggc ctcatcctg agtacattgt agaatacagc aggagtggtt  
5281 ccaagatgtg ggcctcccag agggctgcta gtaactttac agaaatcaag aacttattgg  
5341 tcaacactct atacaccgtc agagtggctg cgggtgactag tctggaata ggaaactgga  
5401 gcgattctaa atccattacc accataaaag gaaaagtgat cccaccacca gatatccaca  
5461 ttgacagcta tggtgaaaat tatctaagct tcaccctgac catggagagt gatatcaagg  
5521 tgaatggcta tgtggtgaac cttttctggg catttgacac ccacaagcaa gagaggagaa  
5581 ctttgaactt ccgaggaagc atattgtcac acaaagttgg caatctgaca gctcatacat  
5641 cctatgatag ttctgcctgg gccaagactg acttggggga tagcctctg gcattgagc  
5701 atgttatgac gagaggggtt cgcccactg cacctagcct caagggcaaa gccatcaacc  
5761 agactgcagt ggaatgtacc tggaccggcc cccggaatgt ggtttatggt attttctatg  
5821 ccacgtcctt tcttgacctc tatcgcaacc cgaagagctt gactacttca ctccacaaca  
5881 agacggctcat tgtcagtaag gatgagcagt atttgtttct ggtccgtgta gtggtaccct  
5941 accaggggcc atcctctgac tacgtttag tagaagatgat cccggacagc aggttccac  
6001 cccgtcacct gcatgtggtt catacgggca aaacctcct ggtcatcaag tgggaatcac  
6061 cgtatgactc tcctgaccag gacttgttgt atgcaattgc agtcaaagat ctcataagaa  
6121 agactgacag gagctacaaa gtaaaatccc gtaacagcac tgtggaatac acccttaaca  
6181 agttggagcc tggcggaaaa taccacatca ttgtccaact ggggaacatg agcaaagatt  
6241 ccagcataaa aattaccaca gtttcattat cagcacctga tgccttaaaa atcataacag  
6301 aaaatgatca tgttcttctg ttttggaaaa gcctggcttt aaaggaaaag cattttaatg  
6361 aaagcagggg ctatgagata cacatgtttg atagtgccat gaatatcaca gcttaccttg  
6421 ggaatactac tgacaatttc tttaaaattt ccaacctgaa gatgggtcat aattacacgt  
6481 tcaccgtcca agcaagatgc ctttttggca accagatctg tggggagcct gccatcctgc  
6541 tgtacgatga gctggggtct ggtgcagatg catctgcaac gcaggctgcc agatctacgg  
6601 atgttgctgc tgtggtggtg cccatcttat tcctgatact gctgagcctg ggggtgggt  
6661 ttgccatcct gtacacgaag caccggaggc tgcagagcag cttcaccgcc ttcgccaaca  
6781 atgatcaaga tgcccctatg ataactggat tttcagatga cgtccccatg taagatagct  
6841 gaaagagctt tcctcactag aaaccaaag gtgtaaatat tttatttgat aaagatagct  
6901 gatggtttat tttaaaagat gcactttgag ttgcaaatat ttatttttat atgggcaaaa  
6961 aacaaaaaaa aaaaaaaaaa a

## 8.5 Proteinsequenz von SorLA

### GenBank-Eintrag U60975

```

1 matrssrres rlpflftlva llppgalcev wtqrlhggsa plpqdrghlv vqgdprelrl
61 wargdargas radekplrkr rsaalqepi kvygqvslnd shnqmvvhwa geksnvival
121 ardslalarp kssdvvvsyd ygksfkkisd klnfglgnrs eaviaqfyhs padnkryifa
181 dayaqlwit fdfcntlqgf sipfraadll lhskasnlld gfdrshpnkq lwksddfggt
241 wimiqehvks fswgidpydk pntiyierhe psgystvfrs tdffqsrenq evileevrdf
301 qlrdkymfat kvvhlhgseq qssvqlwvsf grkpmraaqf vtrhpineyy iadasedqvfv
361 vcvshsnrnt nlyiseaegl kfslslenvl yyspggagsd tlvryfanep fadfhrvegl
421 qgvyiatlin gsmneenmrs vitfdkggwtw eflqapafgt ygekinccels qgcslhlaqr
481 lsqllnlqlr rmpilskesa pgliaatgsv gknlaskntv yisssagarw realpgphyy
541 twgdhggiiit aiaqgmetne lkystneget wktfifsekp vfvvgylltep gekstvfiftif
601 gsnkenvhsw lilqvnatda lgvpctendy klwspdsderg necllghktv fkrtrtphatc
661 fngedfdrpv vvsncsctre dyecdffgkm sedlslevcv pdpefsgksy sppvpcpvgs
721 tyrtrrgyrk isgdtdcsggd vearelegely pcplaeenef ilyavrksiy lydlaagate
781 qlpltglraa valdfdyehn clywsdlald viqrlclngs tgqeviinsg letvealafe
841 plsqqlywvd agfkkievan pdgdfrltiv nssvldrpra lvlvpqegvm fwtwdgdlkp
901 giyrsmndgs aayhlvsedv kwpngisvdd qwiywtdayl ecieritfsg qqrsvildnl
961 phpyaiavfk neiywddwsq lsifraskys gsqmeilanq ltglmdmkif ykgkntgsna
1021 cvprpcslc lpkannsrsc rcpedvsssv lpsgdmlcdc pqgyqlknnt cvkeentclr
1081 nqyrscngnc insiwwcdfd ndcgdmsder ncptticdld tqfrcqesgt ciplsykcdl
1141 eddcgdnsde shcemhqcrs deyncssgmc irsswvcdgd ndcrdwsdea nctaiyhtce
1201 asnfqcrngh cipqrwacdgt dtcdqgdsgde dpvnckekcn gfrcpngtci psskhcdglr
1261 dcsdgsdeqh ceplcthfmd fvcknrqqcl fhsmvcdgii qcrdgsdeda afagcsqdpe
1321 fhkvcdefgf qcqngvcisl iwkcdgmddc gdysdeance npteapncsr yfqrccengh
1381 cipnrwkcdr endcgdwsde kdcgdshilp fstpgpstcl pnyyrcssgt cvmdtwvcdg
1441 yrdcadgsde eacpllanvt aastptqlgr cdrfefechq pktcipnwkrcdghqdcqdg
1501 rdeancpths tltcmsrefq cedgeacivl sercdgfldc sdesdekacs deltvkyvqn
1561 lqwtadfsgd vtltwmpk mpasascvynv yyrvvgesiw ktlethsnkt ntvklvlpkd
1621 ttyqvkvqvq clskahntnd fvtlrtpegl pdaprnlqls lpreaegviv ghwappihth
1681 glireyivey srsqskmwas qraasnftei knllvntlyt vrvaavtsrg ignwsdsksi
1741 ttikgkvipp pdihidsyge nylsftlme sdikvngyv nlfwafdthk qerrtlnfrg
1801 silshkvgnl tahtsyaisa waktdlgdsp lafehvmtrg vrppapslka kainqtavec
1861 twtgrnvvy gifyatsfld lyrnpksltt slhnktvivs kdeqylflvr vvvpyqgpps
1921 dyvvvmkipd srlpprhlhv vhtgktsvvi kwespydspd qdlyyaiavk dlirktdrsy
1981 kvksrnstve ytlnklepvg kyhiivqlgn mskdssikit tvslsapdal kiitendhvl
2041 lfwkslalke khfnesrgye ihmfdsamni taylgnttdn ffkisnlkmg hnytftvqar
2101 clfgnqicge paillydelg sgadasatqa arstdvaavv vpilflills lgvgfailyt
2161 khrrlqssft afanshyssr lgsaifssgd dlgeddedap mitgfsddvp mvia

```

## 8.6 DNA-Sequenz von ART-27

### GenBank-Eintrag BC008890

```
1 ggagcccatc atggcgacgc cccctaagcg gcgggcggtg gaggccacgg gggagaaagt
61 gctgcgctac gagaccttca tcagtgacgt gctgcagcgg gacttgcgaa aggtgctgga
121 ccatcgagac aaggtatatg agcagctggc caaacacctt caactgagaa atgtcattga
181 gcgactccag gaagctaagc actcggagtt atatatgcag gtggatttgg gctgtaactt
241 cttcgttgac acagtgggtcc cagatacttc acgcatctat gtggccctgg gatatggttt
301 tttcctggag ttgacactgg cagaagctct caagttcatt gatcgtaaga gctctctcct
361 cacagagctc agcaacagcc tcaccaagga ctccatgaat atcaaagccc atatccacat
421 gttgctagag gggcttagag aactacaagg cctgcagaat ttcccagaga agcctcacca
481 ttgacttctt cccccatcc tcagacatta aagagcctga atgcctttga aaaaaaaaaa
541 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

## 8.7 Proteinsequenz von ART-27

### GenBank-Eintrag BC008890

```
1 matppkrrav eatgekvlyr etfisdvlqr dlrkvldhrd kvyeqlakyl qlrnvierlq
61 eakhselymq vdlgcnffvd tvvpdtsriy valgygffle ltlaealkfi drksslitel
121 snsltkds mn ikahihmle glrelqqlqn fpekphh
```

## 8.8 Publikationen und Kongressbeiträge

Wittenberger, T.; Hellebrand, S.; Munck, A.; Kreienkamp, H.-J.; Schaller, H. C.; Hampe, W.  
GPR99, a new G protein-coupled receptor with homology to a new subgroup of  
nucleotide receptors. *BMC Genomics* 2002, **3**:17

Munck, A.; Schaller, H.-C.; Beisiegel, U.; Hampe, W.  
Cytoplasmic Interaction Partners of SorLA  
ELSO 2002 Conference, Nizza, 29. Juni - 3. Juli 2002

Munck, A.; Schaller, H.-C.; Beisiegel, U.; Hampe, W.  
Cytoplasmic Interaction Partners of SorLA  
ELSO 2003 Conference, Dresden, 20.-24. September 2003

Munck, A.; Böhm, C.; Hampe, W.  
Signal Transduction of the Neuronal Mosaic Receptor SorLA  
XXth International Winter Meeting on Growth and Death in the Nervous System,  
St. Moritz, 24.-28. März 2004

Seibel, N.; Munck, A.; Böhm, C.; Hampe, W.  
Signal Transduction of the Neuropeptide Receptor SorLA  
12th International Conference on Second Messengers and Phosphoproteins,  
Montreal, 3.-7. August 2004

Böhm, C.; Munck, A.; Hampe, W.  
Interactionpartners of SorLA  
Annual fall meeting, German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GMB) &  
German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT),  
Halle (Saale), 7.-10. September 2002

Hampe, W.; Munck, A.; Böhm, C.  
Signal transduction of SorLA, a member of the lipoprotein-receptor family  
Special FEBS 2003 meeting on Signal Transduction,  
Brüssel, 4.-8. Juli 2003

## 8.9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Antonia Munck  
 Geburtsdatum: 14.03.1974  
 Geburtsort: Hamburg

### Ausbildung

August 1980 - Juli 1984	Grundschule Hoisdorf
August 1984 - Juli 1990	Gymnasium Stormarnschule Ahrensburg
August 1990 - August 1991	Austauschjahr in den U.S.A., Besuch der Southfield High School in Michigan
August 1991 - Juni 1994	Gymnasium Stormarnschule Ahrensburg
Juni 1994	Abitur
Oktober 1994 - April 1999	Pharmaziestudium an der Universität Hamburg
April 1999	Zweites Staatsexamen
Mai 1999 - April 2000	Pharmaziepraktika bei der Firma Glaxo Wellcome GmbH & Co. in Hamburg, Abteilung für Klinische Forschung, und in der „Apotheke am Hauptbahnhof“ in Hamburg, Inhaber: Dr. Frank Stepke
Mai 2000	Drittes Staatsexamen und Approbation als Apothekerin
Oktober 2001 - Oktober 2003	Aufbaustudiengang Molekularbiologie an der Universität Hamburg mit zertifiziertem Abschluss
August 2001 - August 2004	Promotion am Zentrum für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II (Direktorin: Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel): Molekulare Zellbiologie, Arbeitsgruppe Neurobiochemie bei PD Dr. Wolfgang Hampe Thema: Identifizierung und Charakterisierung intrazellulärer Bindungspartner des Transmembranrezeptors SorLA

### Berufstätigkeit:

seit Juni 2000 Anstellung als Apothekerin in der „Apotheke am Hauptbahnhof“ in Hamburg